



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

Testovanie nanovláknenného detektoru pre určenie patogénov v ovzduší

Testing of nanofiber based detector for airborne pathogens detection

Bakalárska práca

Študijný program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví

Autor bakalárskej práce: Katarína Jakubová

Vedúci bakalárskej práce: RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Kladno 2023

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Jakubová** Jméno: **Katarína** Osobní číslo: **499603**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**

II. ÚDAJE K BAKALÁŘSKÉ PRÁCI

Název bakalářské práce:

Testovanie nanovláknenného detektoru pre určenie patogénov v ovzduší

Název bakalářské práce anglicky:

Testing of a nanofiber based detector for airborne pathogens detection

Pokyny pro vypracování:

Detektory založené na nanovlákněch se díky jejich velkému povrchu vyznačují vysokou citlivostí. V současnosti se využívají pro detekci ve vodném prostředí. Jejich použití pro specifickou detekci v ovzduší je limitováno kvůli nespecifické vazbě a snížené schopnosti tvořit vazbu bez vodného prostředí. Cílem BP je určit poměr specificky a nespecificky vázané testovací bakterie na nanovlákněm detektoru. V práci bude použita technika „electrospinning“ (zvláknování pomocí elektrostatických sil) pro přípravu nanovláknenného materiálu. Jako testovací mikroorganismus bude využita bakterie Escherichia coli. V rámci práce bude proveden návrh uspořádání experimentu, vylepšení konstrukce a designu vyvíjeného přístroje pro detekci mikroorganismů a vyhodnocení poměru specificky a nespecificky vázané testovací bakterie E. coli.

Seznam doporučené literatury:

- [1] XUE, J., T. WU, Y. DAI, Y. XIA, Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications, online, ed. 2019, ročník 119, číslo 8, Přístupné z: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593>, ISSN 0009-2665
- [2] BRAZ, V. S., K. MELCHOIR a C. Gallina MOREIRA, Escherichia coli as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium, online, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, ed. 2020, ročník 10, Přístupné z: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.548492>, ISSN 2235-2988
- [3] RAJAPAKSHA, P., A. ELBOURNE, S. GANGADOO, R. BROWN, D. COZZOLINO a J. CHAPMAN, A review of methods for detection of pathogenic microorganisms, online, The Analyst, ed. 2022, ročník 144, číslo 2, Přístupné z: <https://doi.org/10.1039/C8AN01488D>, ISSN 0003-2654

Jméno a příjmení vedoucí(ho) bakalářské práce:

RNDr. Taťána Jarošíková, CSc.

Jméno a příjmení konzultanta(ky) bakalářské práce:

Ing. Leontýna Varvařovská

Datum zadání bakalářské práce: **20.09.2022**

Platnost zadání bakalářské práce: **22.09.2024**

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som bakalársku prácu s názvom Testovanie nanovláknenného detektoru pre detekciu patogénov v ovzduší vypracovala samostatne, len s použitím prameňov, ktoré uvádzam v zozname bibliografických odkazov.

Nemám závažný dôvod proti použitiu tohoto školského diela v zmysle § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov (autorský zákon), v znení neskorších predpisov.

V Kladne dňa 18.05.2023

.....
Katarína Jakubová

POĎAKOVANIE

Rada by som sa poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce, pani RNDr. Taťáně Jarošíkovej, CSc.

Ďakujem za možnosť realizácie tejto bakalárskej práce, za odborné vedenie, cenné poznámky, pripomienky a usmernenie pri písaní práce. Ďalej by som chcela poďakovať svojej konzultantke, Ing. Leontýně Varvařovskej, za trpezlivosť, ochotu, rady a čas, ktorý mi venovala.

ABSTRAKT

V oblasti detekcie patogénnych organizmov sa čoraz viac stávajú žiadanejšie detekčné systémy pre detekciu patogénov zo vzduchu. Tieto systémy je možné využiť ako pre zdravotnícke účely, tak aj na kontrolu životného prostredia. Do popredia sa dostávajú najmä snímacie metódy (senzory, biosenzory), ktoré oproti používaným konvenčným metódam (ELISA, PCR), prinášajú množstvo výhod. Okrem nižších finančných nárokov a nárokov na obsluhu, umožňujú senzory a biosenzory taktiež veľmi presnú a predovšetkým rýchlu detekciu patogénu.

Bakalárska práca sa zaoberá testovaním detektora – bioreceptora, využívajúceho funkcionalizované nanovlákná, ktorý je súčasťou bionanosenzora. Na vopred zhotovenom detektore sa testuje baktéria *Escherichia coli* s cieľom určiť pomer špecificky a nešpecificky viazanej baktérie pri vychytávaní patogénu z ovzdušia. Na testovanie sa využívajú špeciálne funkcionalizované polyakrylonitrilové (PAN) nanovlákná a ako kontrola nemodifikované PAN nanovlákná, pripravené technikou „electrospinningu“. V rámci práce sa taktiež testuje funkčnosť systému a porovnáva sa účinnosť funkcionalizovaných PAN nanovláknien zvlhčených nebulizérom a funkcionalizovaných PAN nanovláknien bez zvlhčovania.

Z nameraných výsledkov je možné vyhodnotiť, že funkcionalizované PAN nanovlákná sú účinnejšie ako nemodifikované nanovlákná, a pre použitie funkcionalizovaných nanovláknien je dôležitá a nevyhnutná potreba vlhkého prostredia.

Kľúčové slová

biosenzory, bionanosenzory, funkcionalizované nanovlákná, nanovláknenný detektor, *Escherichia coli*

ABSTRACT

In the field of pathogen detection, airborne pathogen detection systems are becoming more and more desirable. These systems can be used for both medical purposes and environmental monitoring. Sensing methods (sensors, biosensors) are becoming more prominent as they offer many advantages over conventional methods (ELISA, PCR). In addition to lower financial and operational requirements, sensors and biosensors also enable very accurate and, above all, fast pathogen detection.

The bachelor thesis deals with the testing of a detector – bioreceptor using functionalized nanofibers, which is part of a bionanosensor. Using the bacterium *Escherichia coli*, the prefabricated detector was tested to determine the ratio of specifically and non-specifically bound bacteria in the context of capturing pathogen from the air. Specially functionalized polyacrylonitrile PAN nanofibers are used for testing and unmodified PAN nanofibers prepared by the "electrospinning" technique, are used as a control. The work also tests the functionality of the system and compares the performance of functionalized PAN nanofibers moistened with the nebulizer and functionalized PAN nanofibers without moisturization.

From the measured results it can be evaluated that functionalized PAN nanofibers are more efficient than unmodified nanofibers, and a humid environment is needed and essential for their use.

Keywords

biosensors, bionanosensors, functionalized nanofibers, nanofiber detector, *Escherichia coli*

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Ciele práce.....	10
3	Prehľad súčasného stavu	11
3.1	Nanovlákná.....	11
3.1.1	Výroba nanovlákien.....	11
3.1.2	Funkcionalizované nanovlákná	14
3.2	Senzory	14
3.2.1	Biosenzory.....	15
3.2.2	Imunosenzory.....	17
3.3	Nanovláknenný detektor	18
3.4	<i>Escherichia coli</i>	19
3.4.1	Enteropatogénna <i>E. coli</i>	20
3.4.2	Enterotoxigénna <i>E. coli</i>	20
3.4.3	Enteroinvazívna <i>E. coli</i>	21
3.4.4	Enterohemoragická <i>E. coli</i>	21
4	Metodika.....	22
4.1	Technické vybavenie a materiál.....	22
4.2	Príprava agarového média	22
4.3	Testovanie nanovláknenného detektora	23
4.3.1	Kultivácie baktérie	23
4.3.2	Tvorba bakteriálnej suspenzie.....	24
4.3.3	Detekcia <i>E. coli</i>	25
4.4	Sústava na filtráciu vzduchu.....	29

5	Výsledky.....	30
6	Diskusia	44
7	Záver	48
8	Zoznam použitých skratiek.....	49
9	Zoznam použitej literatúry	51
10	Zoznam použitých obrázkov	59
11	Zoznam použitých tabuliek.....	61

1 ÚVOD

Nanovlákná sú v súčasnej dobe pre ľudí najviac známe hlavne v textilnom priemysle – funkčný textil s dobrou priedušnosťou. V súčasnosti je ich veľké využitie i v ďalších odvetviach ako je kozmetika, informačné technológie, medicína alebo biomedicína. Sú to veľmi tenké vlákna, ktorých priemer je v rozmedzí od desiatky nanometrov až do stovky nanometrov. Pre ich pozorovanie a charakteristiku je preto nutné použiť elektrónový mikroskop. Ich charakteristickým znakom je ich variabilita a špecifický povrch, vďaka ktorému vedia zachytávať väčšie množstvo nežiadúcich častíc alebo organizmov, ako iné materiály.

Na základe potrieb, experimentov a výskumov sa nanovlákná dajú ľahko povrchovo upraviť. Dajú sa modifikovať tak, aby sa na nich zachytávali vybrané baktérie, vírusy alebo alergény.

Napriek tomu, že v súčasnosti je už vyvinutých mnoho rôznych detektorov, každý detektor je limitovaný určitými vlastnosťami, napríklad medzou detekcie. Nanovlákná sa používajú čoraz viac, preto sa výskum zameria na ich využitie pri testovaní detektora – bioreceptora. Snahou je vytvoriť nanovlákný detektor, ktorý bude veľmi citlivý aj na nízke koncentrácie patogénu. Často sa stáva, že prístroj alebo detektor nie je schopný detegovať skúmané látky alebo častice, pretože majú nízku, až nedetekovateľnú koncentráciu.

2 CIELE PRÁCE

V teoretickej časti tejto bakalárskej práce je cieľom objasniť a podať stručný prehľad o výrobe, procese a materiáloch používaných v praktickej časti.

Hlavným cieľom praktickej časti je detegovať špecificky a nešpecificky viazanú *Escherichiu coli* na nanovláknennom detektore – bioreceptore, vytvorenom pomocou techniky elektrostatického zvlákňovania – „electrospinning“.

Preto bolo nutné najprv sa prakticky zoznámiť s metódou výroby nanovláknien pomocou elektrostatického zvlákňovania na prístroji Nanospider, v laboratóriu pokročilých biomateriálov, v Univerzitnom centre energeticky efektívnych budov ČVUT.

Bakalárska práca sa zameriava na zhotovený nanovláknenný detektor, jeho správne nastavenie, zachytávanie baktérie a na dôkladnú manipuláciu s prípravou baktérie. Cieľom je overiť chemickú časť senzora, optickou detekciou.

Pracuje sa s modifikovaným PAN nanovláknom (funkcionalizovaným protilátkou) a s PAN nanovláknom bez modifikácie. Pomocou zhotoveného detektora je potrebné prefiltrovaním vzduchu vychytať baktériu *E. coli*. Množstvo zachytenej baktérie sa následne vyhodnotí optickou detekciou – zmeraním optickej hustoty (absorbancie) spektrofotometrom.

Protilátka vychytáva antigén, pre ktorý je špecifická a vytvára špecifickú biologickú väzbu protilátka-antigén. Cieľom je sledovať pomer množstva zachyteného patogénu na funkcionalizovaných a nemodifikovaných nanovláknach a vyhodnotiť účinnosť nanovláknenného detektora – bioreceptora po funkcionalizácii nanovlákná.

3 PREHĽAD SÚČASNÉHO STAVU

3.1 Nanovlákná

Nanovlákná sú jednorozmerné štruktúry charakterizované tým, že ich priečný rozmer je omnoho menší ako dĺžka – majú priemer v nanometroch. Výhodou je ich veľký merný povrch, na ktorý dokážu naviazať a zachytiť veľké množstvo častíc ako baktérie, vírusy alebo alergény. Charakteristickým prvkom je aj ich malá veľkosť pórov. Póry majú rozmery stovky až desiatky nanometrov, a preto neumožňujú priepustnosť týchto častíc po ich zachytení [1].

Nanovlákná sa vďaka svojej jedinečnej štruktúrnej architektúre a fyzikálno-chemickým vlastnostiam široko využívajú v mnohých aplikáciách v zdravotníctve a biomedicínskom inžinierstve, ako je tkanivové inžinierstvo a regeneračná medicína, obvazy na rany alebo podávanie liečiv [2].

3.1.1 Výroba nanovlákien

Existuje niekoľko techník prípravy nanovlákien. Medzi najznámejšie patrí fázová separácia, odstredivé zvlákňovanie, hydrotermálna metóda, predlžovanie, melt blown (fúkanie taveniny) a elektrostatické zvlákňovanie. V porovnaní s ostatnými spomenutými technikami je elektrostatické zvlákňovanie najčastejšie používanou metódou [3].

V porovnaní s konvenčnými plošnými materiálmi majú nanovlákná vyrábané procesmi elektrostatického zvlákňovania – electrospinning – niekoľko výhod vrátane rovnomernosti, pórovitosti, mechanickej pevnosti a veľkých plôch. Predpokladá sa, že nanovlákná, pripravené metódou elektrostatického zvlákňovania, môžu byť použité ako ideálna platforma pre vysoko citlivé biosnímacie aplikácie, vrátane veľkej povrchovej plochy pre zaťaženie,

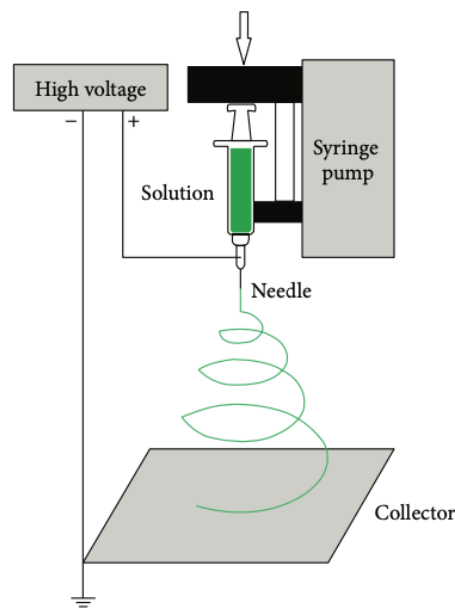
schopnosti funkčnej imobilizácie s požadovaným odstupom, reprodukovateľnosti a dlhodobého skladovania [4].

Elektrostatické zvlákňovanie bolo najpoužívanejšou technikou koncom 20. (1990) a začiatkom 21. storočia. (2000). Od jeho prvého použitia na začiatku 20. storočia (1900) došlo k významným zlepšeniam vzhľadu prístroja, použitom materiáli a vyrobených nanomateriáloch [5].

Výroba nanomateriálov (nanovlákná) elektrostatickým zvlákňovaním je ovplyvnená mnohými prevádzkovými parametrami. Parametre elektrostatického zvlákňovania zahŕňajú aplikované elektrické pole, vzdialenosť medzi ihlou a kolektorom, prietok a priemer ihly. Parametre roztoku zahŕňajú rozpúšťadlo, koncentráciu polyméru, viskozitu a vodivosť roztoku. Medzi parametre prostredia patrí relatívna vlhkosť a teplota. Všetky tieto parametre priamo ovplyvňujú tvorbu hladkých a homogénne usporiadaných nanovláknien [5].

Proces elektrostatického zvlákňovania začína, keď sa elektrické náboje presunú do roztoku polyméru cez kovovú ihlu. To spôsobuje nestabilitu v roztoku polyméru v dôsledku indukcie nábojov na kvapôčke polyméru. Vzájomné odpudzovanie nábojov zároveň vytvára silu, ktorá pôsobí proti povrchovému napätiu a nakoniec roztok polyméru prúdi v smere elektrického poľa. Ďalšie zvýšenie elektrického poľa spôsobí, že sa sférická kvapôčka deformuje a získa kužeľovitý tvar. V tomto štádiu sa z kužeľovej polymérnej kvapôčky (Taylor cone) vynárajú ultrajemné nanovlákná, ktoré sa zhromažďujú na kovovom kolektore udržiavanom v optimalizovanej vzdialenosti. Stabilný prúd náboja sa môže vytvoriť iba vtedy, keď má roztok polyméru dostatočnú kohéznu silu. Počas procesu vnútorné a vonkajšie nábojové sily spôsobujú ťahanie prúdu kvapaliny v smere kolektora. Tento ťahací pohyb umožňuje,

aby sa polymérne reťazce v roztoku naťahovali a kĺzali jeden po druhom, čo vedie k vytvoreniu vlákien s priemerom dostatočne malým na to, aby sa nazývali nanovlákná [5]. Schematický diagram systému elektrostatického zvlákňovania so základným nastavením injekčnej pumpy pripojenej k jednorazovej injekčnej striekačke s kovovou ihlou, vysokonapäťovou napájacou jednotkou a zberačom je na Obrázku 1.



Obrázok 1 – Schéma systému elektrostatického zvlákňovania [6]

Technika elektrostatického zvlákňovania je metóda, ktorá umožňuje výrobu mikro- a nano- vlákien z polymérneho roztoku napínaného aplikovaným potenciálom [7]. Je to napätím riadený proces, riadený elektrohydrodynamickým javom, pri ktorom sa vlákna a častice vyrábajú z polymérneho roztoku [8].

Polyméry, ktoré možno použiť pri elektrostatickom zvlákňovaní sú polyetylénoxid (PEO), polykaprolaktón (PLC), polyvinylpyrolidon (PVP), polyvinylalkohol (PVA), polyvinylacetát (PVAc), polymetakrylát (PMMA) alebo polyakrylonitril (PAN) [9, 10]. Z týchto uvedených polymérov sa najviac

používa polyakrylonitril (PAN), ktorý je taktiež možné využiť priamo ako materiál elektródy [7]. PAN nanovlákná majú malú hustotu, čo má za následok ľahké plávanie na roztoku a dostatočné vystavenie svetlu. Okrem toho procesy tepelného spracovania z PAN vlákna vedúce k vytvoreniu nízkodefektnej uhlíkovej štruktúry, sú jednoduchšie ako iné polymérne vlákna [11].

3.1.2 Funkcionalizované nanovlákná

Funkcionalizované materiály sú skupinou inžinierskych a pokročilých materiálov navrhnutých a syntetizovaných pre určitú špecifickú funkciu so správnou povrchovou morfológiou a prispôbenými vlastnosťami [12].

Funkcionalizácia povrchu nanovlákn sa uskutočňuje fyzikálnymi, chemickými alebo biotechnologickými metódami. Pre biologicky funkcionálne nanovlákná sa používa metóda imobilizácie. Pri imobilizácii dochádza k naviazaniu bioaktívnych molekúl, pomocou fyzikálnej adsorpcie alebo chemických väzieb, na vybraný povrch (v súvislosti s touto bakalárskou prácou, na povrch nanovlákn). Nanovlákná s naviazanými bioaktívnymi látkami potom slúžia buď ako nosiče alebo ako filtre, a sú významné v oblastiach inžinierstva, dodávania liečiv a tvorby biosenzorov [13].

Biologická odpoveď na nanomateriál do značnej miery závisí od vlastností povrchu častice. Povrchová funkcionálna nanomateriálu môže zmeniť toxicitu, osud a ekotoxicitu látky. Miera závislosti závisí taktiež od jadra látky a povahy funkcionálna [14].

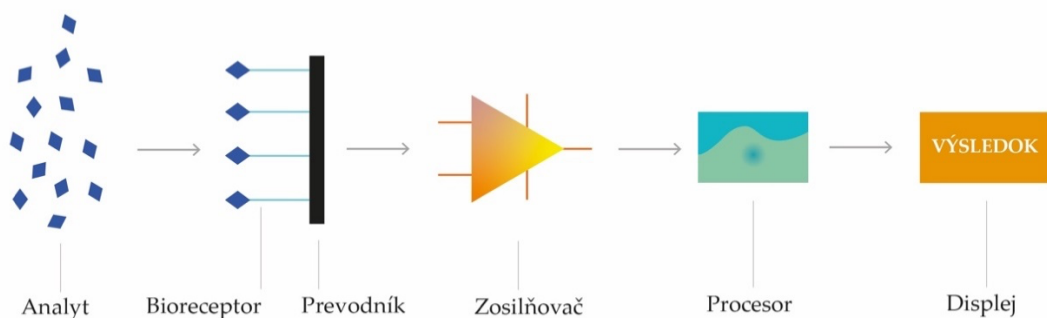
3.2 Senzory

Senzor je zariadenie používané na snímanie fyzikálnej premennej, ktorá zahŕňa, ale nie je obmedzená: teplotou, vlhkosťou, tlakom, hmotnosťou, svetlom a napätím. Aby sme tieto premenné vnímali, musíme ich previesť na univerzálny

a ľahko dostupný signál – zvyčajne napätie. Tento napäťový signál sa plynule mení s časom a je priamo úmerný príslušnej fyzikálnej premennej. Komponent zodpovedný za túto konverziu je prevodník. Analógový signál sa pomocou A/D prevodníka prevádza na digitálny signál [15].

3.2.1 Biosenzory

Biosenzory možno definovať ako analytické zariadenia, ktoré premieňajú biologický signál na elektrický výstup s detekčným mechanizmom, priamo využívajúcim biologický systém [16]. Schéma biosenzora s jeho časťami je na Obrázku 2.



Obrázok 2 – Schéma biosenzora [vlastná tvorba]

Ich schopnosťou je detegovať prítomnosť špecifického cieľového analytu vo vzorke [17]. Využívajú biochemické reakcie sprostredkované biologickým receptorom/prvkom biologického rozpoznávania, ako sú nukleové kyseliny, protilátky, enzýmy, bunky, mikroorganizmy a zvyčajne detegujú ciele na základe optických, elektrických, tepelných a iných signálov [18]. Biosenzorový systém vyžaduje molekulárny rozpoznávací prvok a fyzikálno-chemickú detekčnú zložku alebo prevodník. Rozpoznávacie molekuly sú imobilizované na povrchu detekčného komponentu a po interakcii s cieľovým analytom

vytvárajú fyzikálno-chemické zmeny, ktoré sú prevodníkom konvertované na kvantifikovateľné signály [17].

Biosenzory zohrali dôležitú úlohu pri kvantifikácii liečiv, biomolekúl a mikroorganizmov v odpadových vodách [18]. Ponúkajú niekoľko výhod oproti klasickým analytickým technikám, vrátane prenosnosti, nízkej ceny, jednoduchosti, selektivity, citlivosti a rýchlosti testu.

Skladajú sa z troch hlavných komponentov: prvok biologického rozpoznávania pre špecifickosť analytu, prevodník na konverziu procesu rozpoznávania na kvantitatívny signál a systém zachytávania a spracovania signálu na získavanie údajov [19].

Bioreceptor alebo biorozpoznávací prvok je hlavnou súčasťou biosenzora, pretože umožňuje selektívnu kvantifikáciu analytu. Ako biorozpoznávací prvok môže byť použitá akákoľvek biomolekula a molekulová zostava schopná rozpoznať cieľový analyt na zabezpečenie špecifickej a selektívnej väzby cieľového analytu na povrch senzora [19].

Biorozpoznávacie prvky možno klasifikovať ako katalytické alebo afinitné podľa ich pracovného mechanizmu. V prvom prípade biologický prvok, zvyčajne enzým, katalyzuje reakciu, čím vytvára odpoveď biosenzora. Afinitné biosenzory zahŕňajú protilátky, nukleové kyseliny a aptaméry ako biorozpoznávacie prvky a analytický signál je závislý od väzobnej udalosti cieľového analytu k bioreceptoru [19].

Veľký povrch a jednoduchosť funkcionalizácie nanovlákien, produkovaných elektrostatickým zvlákňovaním sú veľmi výhodné pre imobilizáciu biomolekúl. Poskytujú vhodné mikroprostredie pre biologicky aktívne molekuly [19].

Väzbový proces medzi bioreceptormi a cieľovými biomolekulami je vysoko špecifický. Napríklad použitie protilátky proti *Escherichia coli* (anti-*E. coli*) ako bioreceptora vygeneruje napäťový signál iba vtedy, keď *E. coli* existuje vo vzorke, ale iné baktérie alebo vírusy prítomné vo vzorke napätie neovplyvnia [15].

3.2.2 Imunosenzory

Imunosenzory sú analytické zariadenia, ktoré detegujú väzbu antigénu na jeho špecifickú protilátku [20]. Ich výhodou je vysoká selektivita poskytovaná molekulárnym rozpoznávaním protilátok [21].

V závislosti od použitej technológie prevodníka, imunosenzory možno rozdeliť do troch hlavných tried: optické, piezoelektrické a elektrochemické [20]. Taktiež ich možno rozdeliť do dvoch kategórií: neznačené a značené imunosenzory [21].

Neznačené imunosenzory sú navrhnuté tak, že imunokomplex (tj. komplex antigén-protilátka) je určený priamo meraním fyzikálnych zmien vyvolaných tvorbou komplexu. Naopak, v značenom imunosenzore je začlenená citlivo detekovateľná značka. Imunokomplex je teda citlivo určený meraním značky. Protilátka alebo antigén je imobilizovaný na pevnej matrici. Pevná matrica by mala byť dostatočne citlivá na detekciu tvorby imunokomplexu. Na konštrukciu neznačených imunosenzorov možno použiť elektródy, membrány, piezoelektrický materiál alebo povrchy opticky aktívneho materiálu. Antigén alebo protilátka, ktorá sa má stanoviť, sa rozpustí v roztoku a reaguje s komplementárnou maticou naviazanou protilátkou alebo antigénom za vzniku imunokomplexu. Značené imunosenzory sú v podstate navrhnuté tak, aby imunochemická komplexácia prebiehala na povrchu matrice senzora. Medzi týmito značkami poskytujú chemickú amplifikáciu enzýmy, katalyzátory

a lipozómy. Začlenením týchto značiek môžu byť navrhnuté vysoko citlivé imunosenzory [21].

Pri konštrukcii imunosenzora s dobrým výkonom existujú dva hlavné body. Prvým je fixácia biomolekúl a druhým dobre navrhnutá snímacia sonda [22].

Vďaka dobrej biokompatibilite, veľkému špecifickému povrchu a vynikajúcej stabilite, môžu byť nanomateriály použité na efektívne zlepšenie imobilizácie biomolekúl na imunosenzoroch. Pomocou jedinečných optických vlastností alebo enzýmovej aktivity niektorých nanomateriálov, ich možno použiť ako snímacie sondy na zlepšenie stability a citlivosti snímačej platformy. So zavedením nanomateriálov sa design imunosenzora stáva bohatším a flexibilnejším [22].

3.3 Nanovláknový detektor

Rýchly pokrok v oblasti nanotechnológií otvoril široké obzory pre ich aplikácie v elektrochémii. Elektródy na báze nanomateriálov ponúkajú, oproti konvenčným elektródam, mnohé výhody. Je to napríklad lepšia stabilita, vyššia citlivosť, nižšie detekčné limity, zníženie detekčných potenciálov prostredníctvom elektrokatalytického efektu (v prípade nanočastíc) alebo zníženie prúdovej hustoty na povrchu elektródy (v prípade nanorúrok). V mnohých prípadoch prinášajú elektródy na báze nanomateriálov do separačných metód aj výhodu vyššej separačnej účinnosti a maximálnej kapacity. Analytíci chemici a separační vedci považujú nanomateriály za veľmi perspektívne komponenty na konštrukciu vysoko výkonných elektrochemických detektorov [23].

Elektrochemické biosenzory a zariadenia v zdravotníctve sú analytickým systémom, ktorý sa používa v prípade potreby rýchlych výsledkov na mieste

v lekárskej diagnostike. Taktiež sa využíva pri kontrole potravín, pri ochrane životného prostredia, kontrole procesov, čistení odpadových vôd a výskume v oblasti prírodných vied. Najlepším príkladom je senzor glukózy, glukometer, ktorý používajú diabetickí pacienti [24]. Glukometre slúžia na meranie množstva glukózy v krvi u pacientov. Sú to najrozšírenejšie senzory nepoužívané profesionálne v zdravotníctve. V posledných desaťročiach sa nanomateriály využili aj na vývoj senzorov močoviny [24].

Nanoštruktúrované materiály sa môžu taktiež použiť ako povrch prevodníka pre enzymatické biosenzory, kde môžu poskytnúť veľkú plochu na pripojenie enzýmov, a to vedie k vysokej enzýmovej aktivite [25].

Detektory založené na nanomateriáloch sú tiež ideálne na detekciu tekutín, hormónov (sérotónín), infekčných bakteriálnych agens (*Streptococcus agalactiae*) alebo na detekciu mikrobiálnej kontaminácie. Dajú sa využiť na monitorovanie vzdušného znečistenia alebo na včasnú diagnostiku rakoviny [23].

Elektrochemická detekcia ponúka inherentné možnosti miniaturizácie, potenciál úplnej integrácie elektrochemických detektorov a kontrolných prístrojov, extrémne nízke náklady, nízke požiadavky na spotrebu energie a vysokú kompatibilitu s pokročilými technológiami mikroobrábania a mikrovýroby [23].

3.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) je gramnegatívna baktéria, z čeľade *Enterobacteriaceae*. Je najrozšírenejším komenzálnym obyvateľom gastrointestinálneho traktu ľudí a teplokrvných živočíchov, ako aj jedným z najdôležitejších patogénov. Ako komenzál žije vo vzájomne prospešnom spolunažívaní s hosťiteľmi a zriedka spôsobuje choroby. Výnimku tvoria imunokompromitovaní hosťitelia

alebo prostredia, kde sú porušené normálne gastrointestinálne bariéry – ako napríklad pri peritonitíde. Zvláštne vlastnosti *Escherichie coli*, ako je jednoduchosť manipulácie, dostupnosť kompletnej sekvencie genómu a jej schopnosť rásť za aeróbnych aj anaeróbných podmienok, z nej robí dôležitý hostiteľský organizmus v biotechnológii. Používa sa v širokej škále aplikácií v priemyselnej aj medicínskej oblasti [26, 27].

Rast a prežitie baktérie v prírodnom prostredí môže byť ovplyvnené biotickými a abiotickými faktormi. Abiotické faktory zahŕňajú teplotu, vodu a dostupnosť živín, pH a slnečné žiarenie. Biotické zahŕňajú prítomnosť iných mikroorganizmov a schopnosť *E. coli* získavať živiny, súťažiť s inými mikroorganizmami a vytvárať biofilmy v prirodzenom prostredí [28].

3.4.1 Enteropatogénna *E. coli*

Enteropatogénna *Escherichia coli* (EPEC) patrí do skupiny patogénov, ktoré spôsobujú výrazné lézie v čreve hostiteľa, označované ako prichytávacie (attaching-effacing – A/E) lézie. A/E lézia je charakterizovaná lokalizovanou deštrukciou (vymazaním) mikrokľkov kefového lemu, tesným pripojením bacila k plazmatickej membráne hostiteľskej bunky a vytvorením základnej podstavcovej štruktúry v hostiteľskej bunke. Všetky bakteriálne gény potrebné na tvorbu A/E lézií sú prítomné vo veľkom ostrove patogenity, ktorý sa nazýva lokus vymazania enterocytov alebo LEE [29].

3.4.2 Enterotoxigénna *E. coli*

Enterotoxigénne kmene *Escherichia coli* (ETEC) patria medzi najčastejšie príčiny detskej hnačky a cestovateľskej hnačky [30]. Baktéria kolonizuje črevo a adheruje na epitel pomocou rôznych hostiteľských špecifických kolonizačných faktorov (CF). Kolonizácia ETEC produkuje jeden alebo oba z dvoch

enterotoxínov; tepelne stabilné (ST) a tepelne labilné (LT) toxíny, ktoré sú oba schopné spôsobiť hnačku. Regulácia génov virulencie v ETEC počas infekcie ľudského čreva je prevažne neznáma [31]. LT je exprimovaných 50–66 % kmeňov ETEC v endemických oblastiach. Zdá sa, že prirodzená imunita chráni pred ochorením ETEC [32].

3.4.3 Enteroinvazívna *E. coli*

Enteroinvazívne *Escherichia coli* (EIEC) sú skupinou hnačkových *E. coli* biochemicky, geneticky a patogeneticky príbuzných *Shigella*. Oba patogény majú schopnosť napadnúť epitel hrubého čreva v dôsledku prítomnosti génov umiestnených na veľkých invazívnych plazmidoch a na bakteriálnom chromozóme. Patogenéza infekcie EIEC zahŕňa penetráciu epiteliálnych buniek hrubého čreva, lýzu endocytovej vakuoly, intracelulárnu multiplikáciu a rozšírenie do susedných epitelových buniek. Táto sekvencia udalostí vyvoláva charakteristický syndróm úplavice, charakterizovaný prítomnosťou krvi, hlienu a leukocytov v stolici [33].

3.4.4 Enterohemoragická *E. coli*

Enterohemoragická *E. coli* (EHEC) spôsobuje rôzne ochorenia, ako je akútna gastroenteritída, hemoragická kolitída a hemolyticko-uremický syndróm. Patogenita tejto baktérie je spôsobená jej kolonizáciou v hrubom čreve, ako aj produkciou rôznych typov toxínov, ako sú Shiga toxíny (Stx) [34]. Ide o závažný ľudský patogén, ktorý môže spôsobiť život ohrozujúce ochorenia, t.j. hemoragickú kolitídu (krvavú hnačku) a hemolyticko-uremický syndróm (HUS), ktorý je najčastejšou príčinou akútneho zlyhania obličiek u malých detí. EHEC môže spôsobiť neurologické komplikácie ako sú záchvaty, mŕtvica a kóma u 25 % pacientov s HUS a chronické renálne následky, zvyčajne mierne, u približne 50 % preživších [35].

4 METODIKA

V tejto kapitole sú detailne opísané systémy, metódy a postupy aplikované k dosiahnutiu výsledkov a splneniu cieľa práce tejto bakalárskej práce.

4.1 Technické vybavenie a materiál

Pre účely bakalárskej práce boli využité materiály a prístroje uvedené v Tabuľke 1.

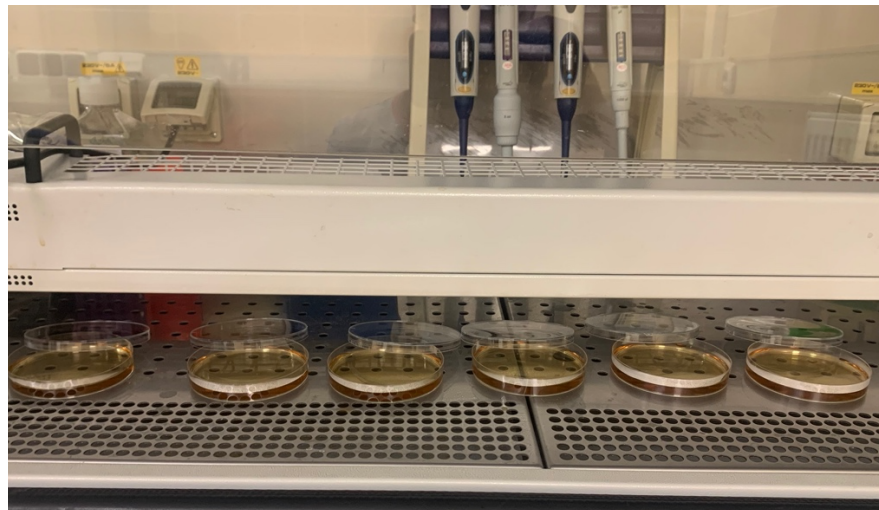
Tabuľka 1 – Zoznam použitých materiálov a prístrojov

Obchodný názov	Firma
Hefeextrakt	Carl Roth (Nemecko)
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth (Nemecko)
Chlorid sodný p.a.	Lach-Ner (Česká republika)
Peptone from meat, bacteriological	Sigma-Aldrich (USA)
Spektrofotometer UV-3600	Shimanzu (Japonsko)

4.2 Príprava agarového média

Na prípravu agarového média bolo použitých 500 ml destilovanej vody, 5 g mäsového extraktu, 5 g peptonu, 2,5 g NaCl a 10 g agaru. Všetky zložky boli zmiešané za vzniku homogénnej zmesi. Pripravená zmes bola preliata do 80ml uzatvárateľných nádobiek. Viečko bolo zatvorené, ale nie úplne dotiahnuté. Takto pripravené nádobky boli vložené do autoklávu, kvôli sterilizácii. Bol spustený program na 30 minút pri teplote 121 °C.

Po skončení programu bol najprv z autoklávu vypustený pretlak a potom voda. Autokláv bol opatrne otvorený a pomocou ochrannej rukavice, ktorá slúži ako ochrana proti vysokej teplote, boli všetky nádoby vybraté. Všetky boli dotiahnuté a jemne premiešané tak, aby nevznikli bubliny alebo pena. Teplé médium bolo preliate, v laminárnom boxe, na pripravené Petriho misky ako je na Obrázku 3. Po zaschnutí média boli misky zatvorené a prelepené parafilmom. Takto pripravené agarové médiá v Petriho miskách boli uložené do chladničky, sklom hore nohami.



Obrázok 3 – Teplé médium naliate v Petriho miskách [vlastná tvorba]

4.3 Testovanie nanovláknenného detektora

Proces prípravy baktérie na kultiváciu a celkové zaobchádzanie s ňou bolo vykonané v laminárnom boxe, z dôvodu bezpečnosti.

4.3.1 Kultivácie baktérie

Baktéria *Escherichia coli* bola preočkovaná pomocou vyžihanej sterilnej kľučky zo staršieho substrátu a bola uložená do inkubátora pri teplote 37 °C.

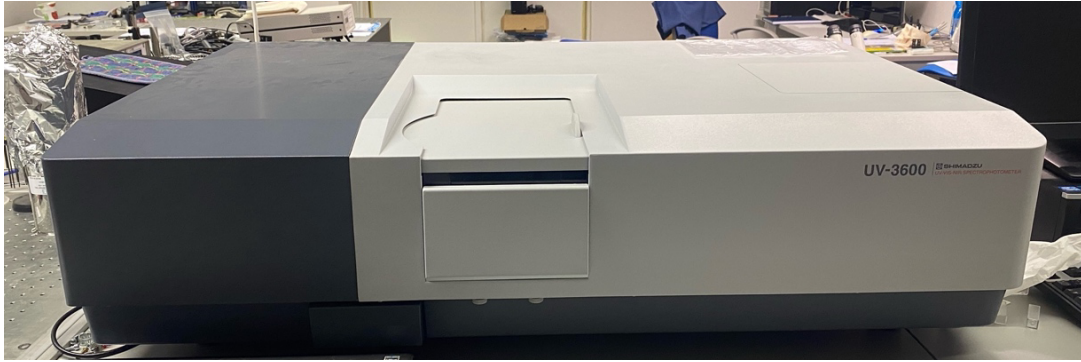
Po 20 hodinách bola narastená bakteriálna kultúra z inkubátora vybraná ako vidno na Obrázku 4.



Obrázok 4 – *E. coli* po 20 hodinovej kultivácii v inkubátore [vlastná tvorba]

4.3.2 Tvorba bakteriálnej suspenzie

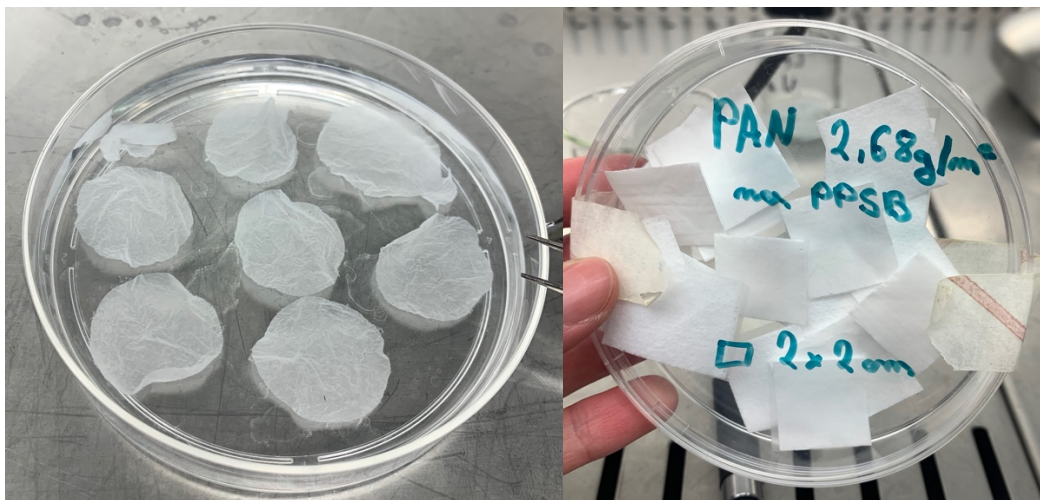
V skúmavke bolo pripravených 15 ml destilovanej vody. Vyžíhanou kľučkou bola bakteriálna kolónia prenesená z agarového média do skúmavky. Skúmavka bola poriadne premiešaná pomocou vortexu a následne Pasteurovou pipetou bola odobratá vytvorená bakteriálna suspenzia (3 ml) do spektrofotometrickej kyvety. Pomocou spektrofotometru (Obrázok 5) bola nameraná optická hustota – množstvo baktérií v pripravenej bakteriálnej suspenzii. Ako kontrolná vzorka bola použitá destilovaná voda. Zvyšná suspenzia (12 ml) bola prenesená do nádobky nebulizéra.



Obrázok 5 – Spektrofotometer UV-3600, Shimadzu (Japonsko) [vlastná tvorba]

4.3.3 Detekcia *E. coli*

Na zachytenie baktérií pri filtrácii vzduchu boli použité špeciálne upravené funkcionalizované PAN nanovlákná. Bolo pripravených 9 terčiekov o priemere 2x2 cm. Boli použité nanovlákná s naviazanou protilátkou – funkcionalizované a nanovlákná bez protilátky – nemodifikované (Obrázok 6).



Obrázok 6 – Funkcionalizované nanovlákná v destilovnej vode (vľavo) a nenavlhčené funkcionalizované nanovlákná (vpravo) [vlastná tvorba]

S oboma druhmi nanovlákien boli prevedené 2 typy testovania. V prvej časti bola testovaná účinnosť funkcionalizovaných nanovlákien. Druhá časť

sa zaoberala nutnosťou udržovania podmienok vhodných pre protilátky naviazané na nanovlákennej membráne.

Testovanie účinnosti funkcionalizácie

Pripravené nanovlákenné terčičky boli postupne prenesené na držiak, uchytené a uzatvorené do filtračnej komôrky (Obrázok 7).

Pomocou nebulizéra bola naplnená nádoba na vzorky, o objeme 1,5 litra, bakteriálnou suspenziou. Následne, pomocou mechanickej pumpy, bol prefiltrovaný vzduch s aerosólom cez nanovlákenný terčik.

Po filtrácii bol každý nanovlákenný terčik premytý v ultrazvukovej čističke po dobu 180 sekúnd. Po premytí boli nanovlákenné terčičky prenesené na Petriho misku s novým agarovým médiom a inkubované 21 hodín pri teplote 37 °C.

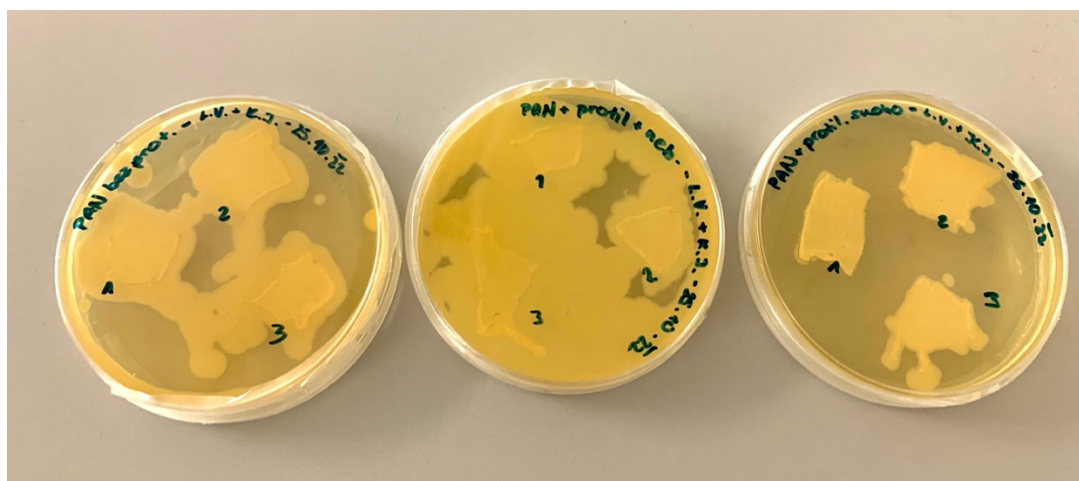
Po inkubácii boli nanovlákenné terčičky (Obrázok 8) prenesené do skúmavky s 10 ml destilovanej vody a obsah skúmavky bol poriadne zhomogenizovaný.

Následne boli 3 ml bakteriálnej suspenzie odobraté do spektrofotometrickej kyvety. Pomocou spektrofotometra UV-3600 Shimadzu, bola pri 600 nm zmeraná optická hustota vzniknutej bakteriálnej suspenzie. Pred tým však bolo nutné spektrofotometer kalibrovať, a to pomocou čistej kyvety s destilovanou vodou, ktorá slúžila ako kontrolná vzorka.

Namerané výsledky pre funkcionalizované a nemodifikované nanovlákená boli medzi sebou porovnané a účinnosť funkcionalizácie bola vyhodnotená.



Obrázok 7 – Nanovláknenný terčik uchytený na držiaku [vlastná tvorba]



Obrázok 8 – Nanovláknenné terčiky na Petriho miske po 21 hodinovej inkubácii
[vlastná tvorba]

Testovanie funkcionalizovaných nanovlákien za odlišných podmienok

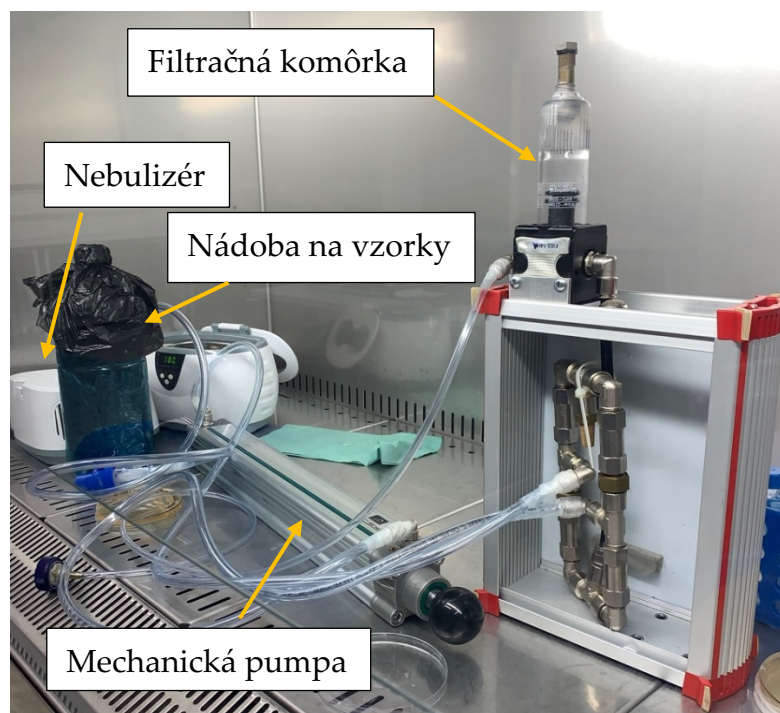
V rámci týchto experimentov došlo k testovaniu funkcionalizovaných membrán pomocou filtrácie suchého a zvlhčeného vzduchu. Filtrácia zvlhčeného vzduchu cez membránu bola prevedená spôsobom vyššie popísanou metódou. Pre filtráciu suchého vzduchu bola nádoba na vzorky naplnená bakteriálnymi

bunkami bez pridanej vlhkosti, čo bolo zaistené odpojením nebulizéra od systému.

Ďalšou modifikáciou oproti skôr popísanej metóde bolo, že nanovlákná neboli následne po filtrácii prečistené ultrazvukovou čističkou, aby sa zabránilo opätovnej aktivácii naviazaných protilátok. Nanovláknenné terčíky boli ihneď po filtrácii rozprestreté na agarové médium a inkubované po dobu 21 hodín pri teplote 37 °C. Tvorba bakteriálnych suspenzií a meranie ich optickej hustoty boli prevedené rovnakým spôsobom ako u pôvodných experimentov.

Tento postup bol zopakovaný na 3 nanovláknach nemodifikovaných a 6 nanovláknach funkcionalizovaných – 3 za použitia nebulizéra a 3 bez použitia nebulizéra.

Sústava na filtráciu vzduchu, ktorá bola využitá pre detekciu, je znázornená a popísaná na Obrázku 9.



Obrázok 9 – Sústava na filtráciu vzduchu [vlastná tvorba]

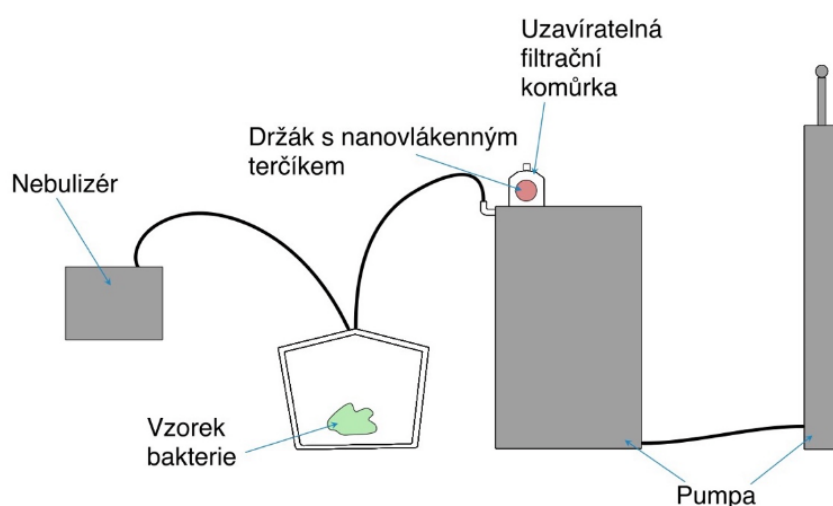
4.4 Sústava na filtráciu vzduchu

Pre filtráciu vzduchu bola využitá sústava vytvorená v rámci diplomovej práce z roku 2021. Sústava v tejto práci bola popísaná ako:

„Pro tvorbu systému pro filtraci vzduchu byla použita aparatura s mechanickou pumpou. Tato aparatura je tvořena pístem, systémem trubic a uzavíratelnou filtrační komůrkou. K této komůrce byla dále pomocí PVC hadičky se zpětným ventilem připojena nádoba na vzorky o objemu 1,5 l.“ [10, s. 27]

Na uchycovanie nanovlákných terčiek bol použitý špeciálny plastový držiak s definovaným účinným prierezom 1 cm.

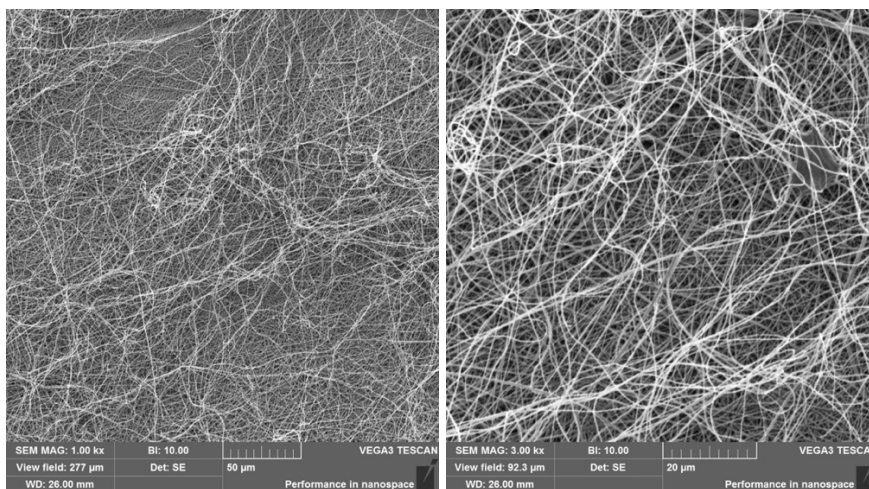
Pre udržanie vhodných podmienok pre protilátku imobilizovanú na nanovláknom terčíku, bol pripojený nebulizér. Nebulizér je prístroj, ktorý premieňa tekutinu (prevažne liečiva) na aerosól a využíva sa predovšetkým v klinickej praxi na liečbu astmy, cystickej fibrózy a iných respiračných chorôb alebo porúch [36]. Schéma celého systému pre filtráciu vzduchu je na Obrázku 10.



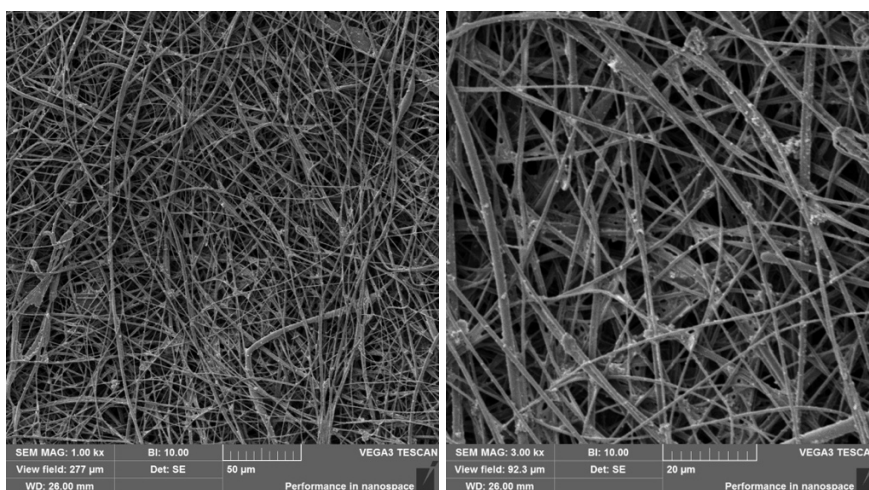
Obrázok 10 – Schéma sústavy na filtráciu vzduchu [10]

5 VÝSLEDKY

PAN nanovlákná – funkcionizované a nemodifikované – boli vyrobené na zákazku. Z dôvodu budúcej modifikácie nebolo možné proces ich výroby vidieť. Bolo však možné prakticky sa zoznámiť s výrobou iných PVA nanovláknien. Vyrobené PAN nanovlákná boli vizualizované elektrónovým mikroskopom na Obrázku 11 a Obrázku 12.



Obrázok 11 – Fotka nemodifikovaného nanovlákná pri zväčšení 1000x (vľavo) a pri zväčšení 3000x (vpravo) [vlastná tvorba]



Obrázok 12 – Fotka funkcionizovaného nanovlákná pri zväčšení 1000x (vľavo) a pri zväčšení 3000x (vpravo) [vlastná tvorba]

V prvej časti bola testovaná účinnosť protilátky – testovanie účinnosti funkcionalizácie. Namerané výsledky pre funkcionalizované a nemodifikované nanovláčna boli zapísané a medzi sebou porovnané. Namerané výsledky sú uvedené v Tabuľkách 1, 3 a 5.

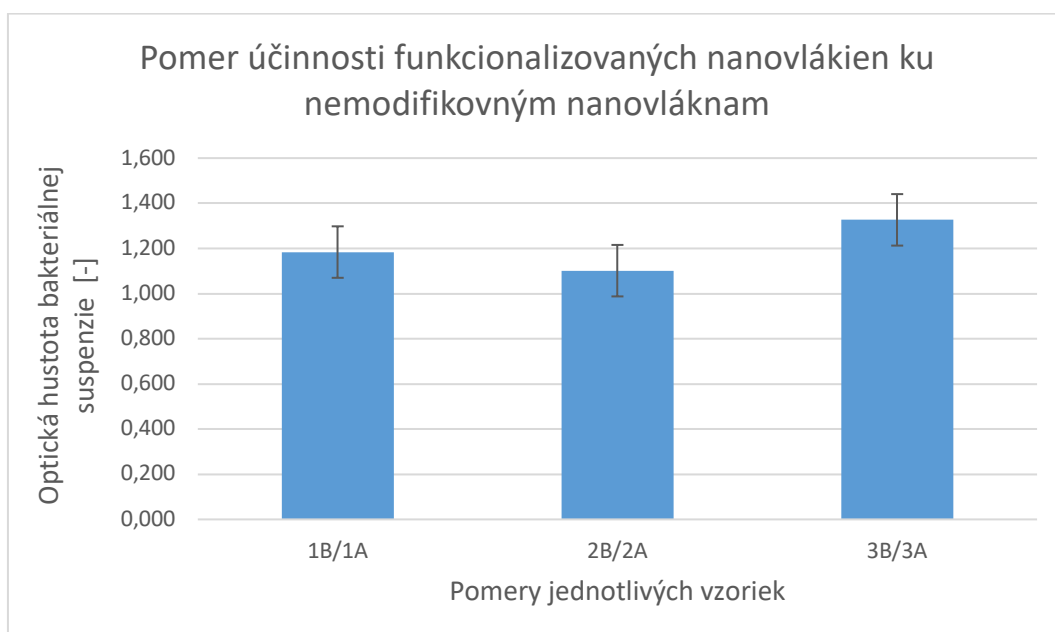
Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie pri prvom meraní: **A = 0,193**

Tabuľka 1 – Výsledky optickej hustoty nanovláknenných terčiek po 21 hodinovej inkubácii, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
1B	1,067	1,068	1,070	1,071	1,071	1,071	1,070
2B	0,887	0,888	0,889	0,890	0,892	0,891	0,890
3B	0,804	0,805	0,806	0,807	0,808	0,808	0,806
1A	0,897	0,904	0,903	0,904	0,906	0,907	0,904
2A	0,810	0,809	0,806	0,805	0,806	0,809	0,808
3A	0,609	0,609	0,608	0,607	0,608	0,606	0,608

Tabuľka 2 – Vyhodnotenie výsledkov z prvého merania

Pomer B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)			Priemer pomerov	Smerodajná odchýlka
1,070/0,904	0,890/0,808	0,806/0,608		
1,184	1,102	1,327	1,204	0,114



Obrázok 13 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)

V Tabuľke 2 sú zapísané výsledky, kde sú uvedené pomery medzi optickými hustotami dvoch rôznych vzoriek z prvého merania. Obrázok 13 vyjadruje grafické znázornenie toho, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

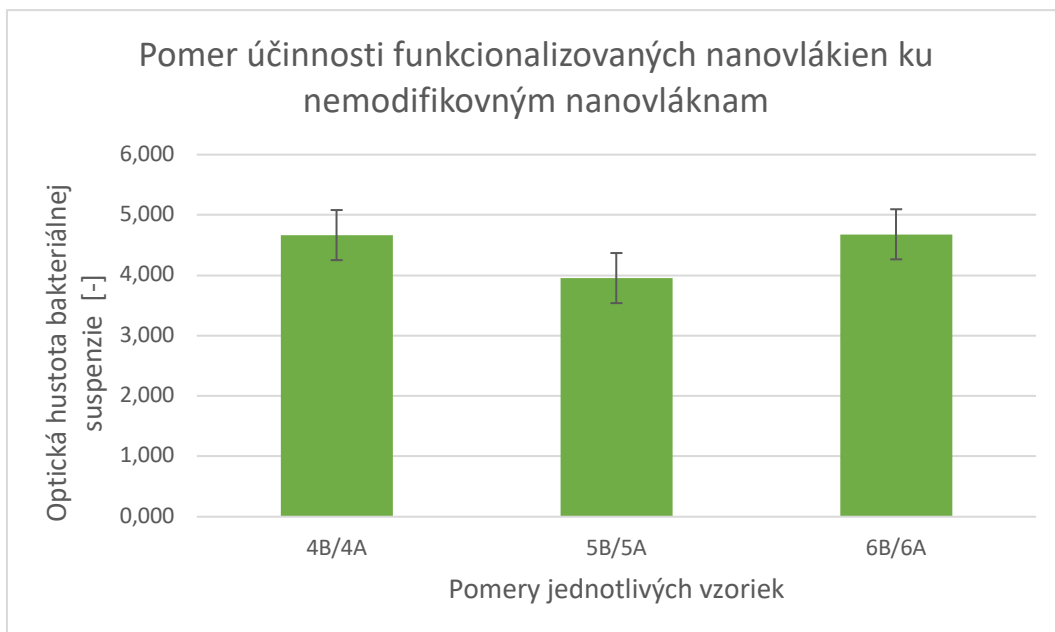
Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie pri druhom meraní: **A= 0,096**

Tabuľka 3 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčikov bez inkubácie, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
4B	0,010	0,012	0,011	0,021	0,022	0,022	0,016
5B	0,017	0,017	0,013	0,013	0,014	0,013	0,015
6B	0,017	0,017	0,022	0,021	0,020	0,020	0,020
4A	0,006	0,005	0,003	0,002	0,003	0,002	0,004
5A	0,005	0,004	0,003	0,004	0,003	0,003	0,004
6A	0,005	0,004	0,003	0,005	0,004	0,004	0,004

Tabuľka 4 – Vyhodnotenie výsledkov z druhého merania

Pomer B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)			Priemer pomerov	Smerodajná odchýlka
0,016/0,004	0,015/0,004	0,020/0,004		
4,667	3,955	4,680	4,434	0,415



Obrázok 14 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)

V Tabuľke 4 sú zapísané výsledky, kde sú pomery medzi optickými hustotami dvoch rôznych vzoriek z druhého merania. Obrázok 14 vyjadruje grafické znázornenie toho, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

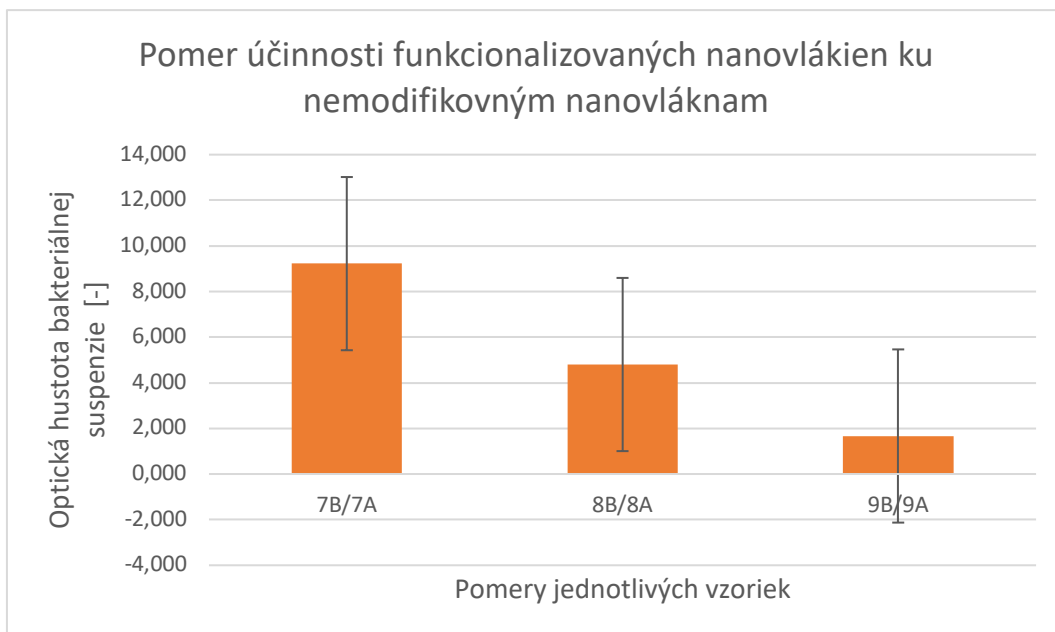
Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie pri treťom meraní: **A= 0,072**

Tabuľka 5 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčikov bez inkubácie, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
7B	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014
8B	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
9B	0,020	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019
7A	0,002	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002
8A	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
9A	0,010	0,011	0,011	0,012	0,012	0,013	0,012

Tabuľka 6 – Vyhodnotenie výsledkov z tretieho merania

Pomer B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)			Priemer pomerov	Smerodajná odchýlka
0,014/0,002	0,016/0,003	0,019/0,012		
9,222	4,800	1,667	5,230	3,796



Obrázok 15 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)

V Tabuľke 6 sú zapísané výsledky, kde sú pomery medzi optickými hustotami dvoch rôznych vzoriek z tretieho merania. Obrázok 15 vyjadruje grafické znázornenie toho, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

V druhej časti bola testovaná funkčnosť nášho systému a potreba nebulizéra pri experimente – testovanie funkcionalizovaných nanovlákien za odlišných podmienok. Namerané výsledky boli zapísané a medzi sebou porovnané. Namerané výsledky sú uvedené v Tabuľkách 7, 8, 10 a 12.

Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie, pri prvom meraní: **A = 0,193**

Tabuľka 7 – Výsledky optickej hustoty nanovláknenných terčiek po 21 hodinovej inkubácii, B – PAN + protilátka + nebulizér, C – PAN + protilátka + sucho

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
1B	1,067	1,068	1,070	1,071	1,071	1,071	1,070
2B	0,887	0,888	0,889	0,890	0,892	0,891	0,890
3B	0,804	0,805	0,806	0,807	0,808	0,808	0,806
1C	1,148	1,149	1,145	1,148	1,149	1,155	1,149
2C	0,844	0,845	0,850	0,851	0,850	0,840	0,847
3C	0,770	0,771	0,772	0,772	0,773	0,773	0,772

Nový pokus pre B a C

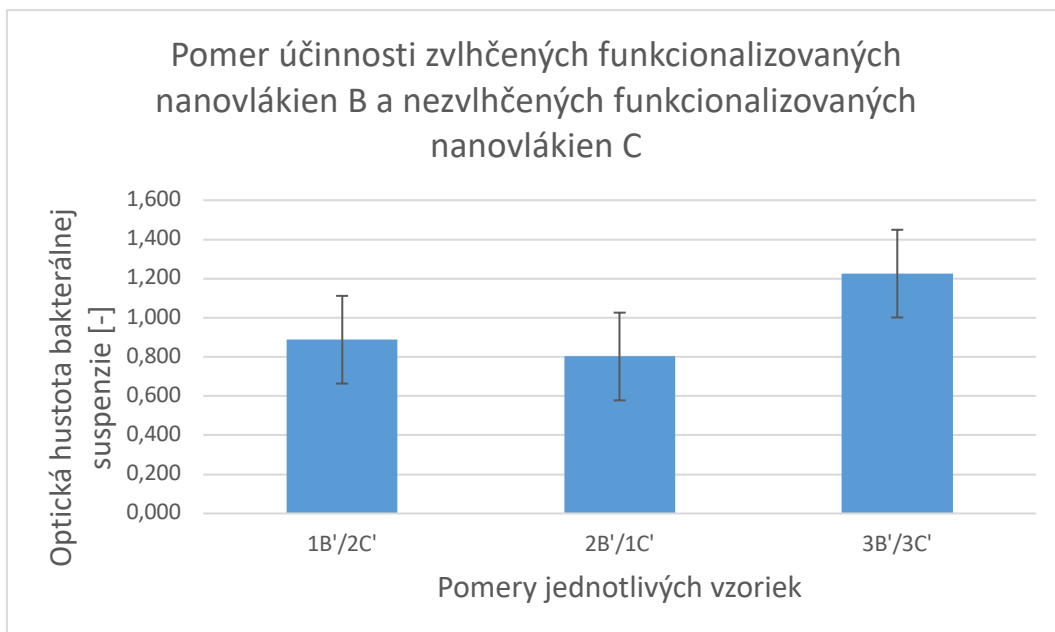
Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie, pri prvom meraní, nový pokus: **A = 0,010**

Tabuľka 8 – Výsledky optickej hustoty nanovláknenných terčikov po 21 hodinovej inkubácii, B' – PAN + protilátka + nebulizér, C' – PAN + protilátka + sucho

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
1B'	1,042	1,043	1,045	1,046	0,042	0,042	0,710
2B'	1,062	1,060	1,062	1,061	1,064	1,062	1,062
3B'	1,072	1,071	1,072	1,070	1,069	1,072	1,071
1C'	0,803	0,803	0,803	0,802	0,801	0,799	0,802
2C'	0,799	0,800	0,801	0,800	0,800	0,800	0,800
3C'	0,875	0,874	0,875	0,874	0,874	0,873	0,874

Tabuľka 9 – Vyhodnotenie výsledkov z prvého merania

Pomer B' (PAN + protilátka + nebulizér) ku C' (PAN + protilátka + sucho)			Priemer pomerov	Smerodajná odchýlka
0,710/0,800	1,062/0,802	1,071/0,874		
0,888	0,802	1,225	0,972	0,224



Obrázok 16 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)

V Tabuľke 9 sú zapísané výsledky, kde sú pomery medzi optickými hustotami dvoch rôznych vzoriek z prvého merania. Obrázok 16 vyjadruje grafické znázornenie toho, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

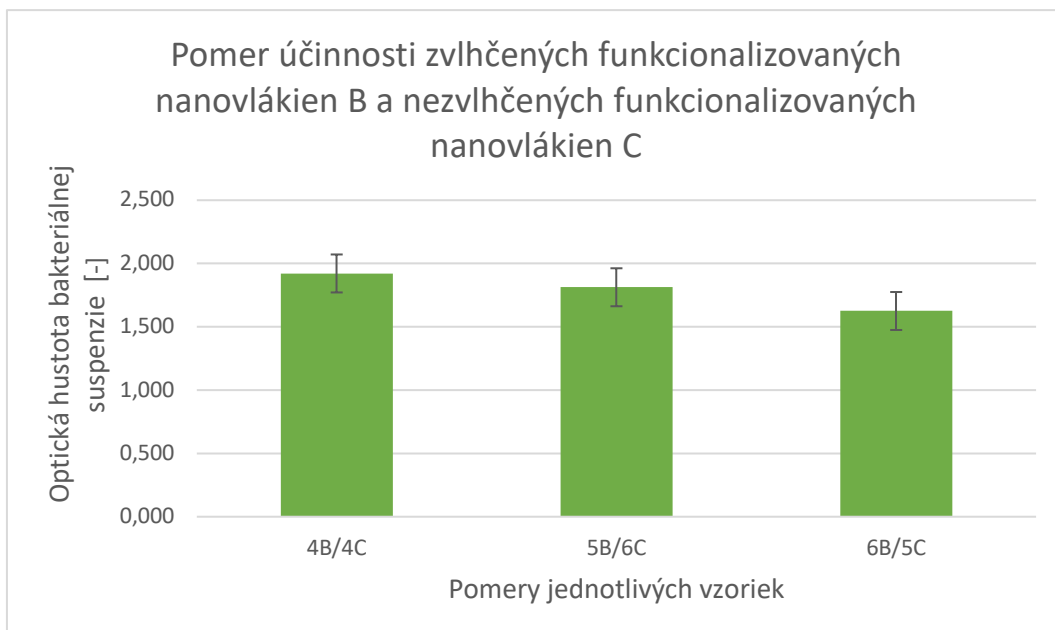
Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie pri druhom meraní: **A= 0,096**

Tabuľka 10 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčikov bez inkubácie,
B – PAN + protilátka + nebulizér, C – PAN + protilátka + sucho

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
4B	0,010	0,012	0,011	0,021	0,022	0,022	0,016
5B	0,017	0,017	0,013	0,013	0,014	0,013	0,015
6B	0,017	0,017	0,022	0,021	0,020	0,020	0,020
4C	0,009	0,008	0,009	0,009	0,008	0,008	0,009
5C	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012
6C	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008	0,008

Tabuľka 11 – Vyhodnotenie výsledkov z druhého merania

Pomer B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)			Priemer pomerov	Smerodajná odchýlka
0,016/0,009	0,015/0,008	0,020/0,012		
1,922	1,183	1,625	1,786	0,150



Obrázok 17 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)

V Tabuľke 11 sú zapísané výsledky, kde sú pomery medzi optickými hustotami dvoch rôznych vzoriek z druhého merania. Obrázok 17 vyjadruje grafické znázornenie toho, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

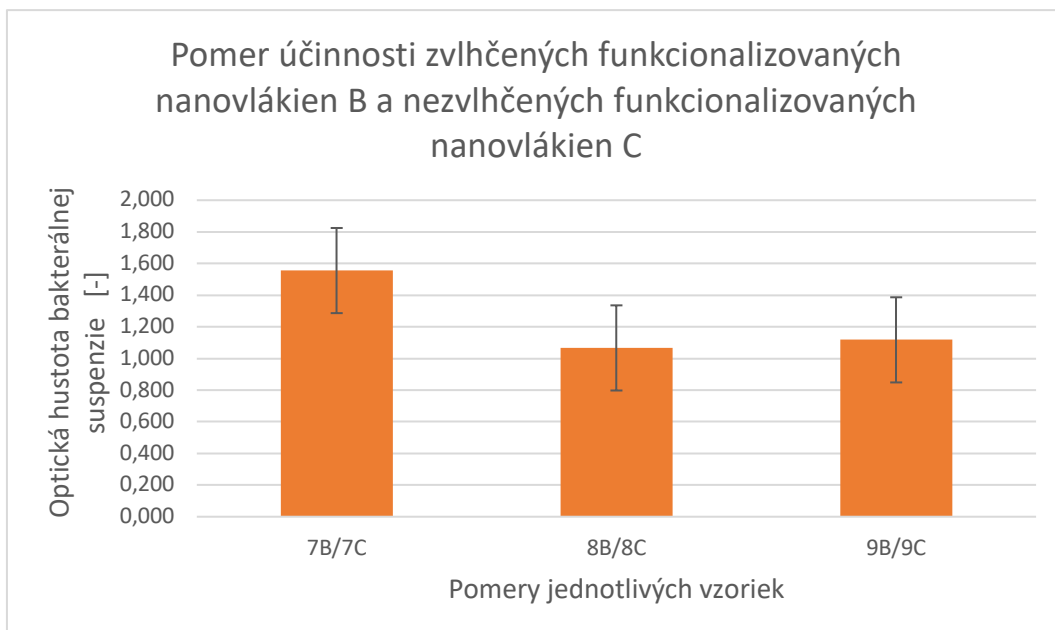
Priemer optickej hustoty bakteriálnej suspenzie pri treťom meraní: **A= 0,072**

Tabuľka 12 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčikov bez inkubácie,
A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér

Terčik	1.	2.	3.	4.	5	6.	Priemer
7B	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014	0,013	0,014
8B	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016	0,016
9B	0,020	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019	0,019
7C	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
8C	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015	0,015
9C	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017	0,017

Tabuľka 13 – Vyhodnotenie výsledkov z tretieho merania

Pomer B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)			Priemer pomerov	Smerodajná odchýlka
0,014/0,009	0,016/0,015	0,019/0,017		
1,556	1,067	1,118	1,247	0,269



Obrázok 18 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)

V Tabuľke 13 sú zapísané výsledky, kde sú pomery medzi optickými hustotami dvoch rôznych vzoriek z prvého merania. Obrázok 18 vyjadruje grafické znázornenie toho, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

6 DISKUSIA

Hlavným predmetom praktickej časti bakalárskej práce bolo testovanie nanovláknenného detektora pre detekciu baktérií. Pred začiatkom celého experimentu bolo potrebné pripraviť na agarovom médiu kultúru baktérie *Escherichia coli*.

Pri detekcii baktérie *E. coli*, pri každom pokuse bola zakaždým použitá nová bakteriálna kultúra, pretože tým, ako je kultúra baktérií udržiavaná v chladničke, jej metabolizmus sa spomaľuje, čo by mohlo ovplyvniť výsledky. Nová bakteriálna kultúra bola vždy pripravená zo staršej, prenesením na nové agarové médium, a bola uložená do inkubátora pri teplote 37 °C po dobu 20 hodín.

Na detekciu boli použité funkcionalizované PAN nanovlákná. PAN nanovlákná s imobilizovanou protilátkou bolo potrebné udržiavať vo vlhkom prostredí. V suchu totiž dochádza k narušeniu väzby protilátky na nanovlákná. Pred použitím boli tieto nanovlákná pomocou pinzety prenesené na Petriho misku s destilovanou vodou a následne premyté. Premývanie bolo nutné kvôli pridanému azidu sodnému, ktorý bol pridaný na udržanie kvality nanovláknien, proti ich znehodnoteniu, najmä plesňou. Premyté nanovlákná boli potom prenesené na držiak a použité na testovanie.

Pri prvom meraní boli nanovláknenné terčičky po filtrácii inkubované 21 hodín, a až potom bola zmeraná optická hustota bakteriálnej suspenzie. Pomocou pinzety bol nanovláknenný terčič prenesený do skúmavky s destilovanou vodou (10 ml) a dôkladne zhomogenizovaný. Pomocou Pasteurovej pipety bola potom časť suspenzie prenesená do spektrofotometrickej kyvety. Hodnoty z tohoto prvého merania nevychádzali podľa očakávania, tak ku zvyšným ml suspenzie bolo pridaných 4 ml destilovanej vody. S týmto množstvom bol prevedený pokus 2 a 3. Po druhom pokuse boli hodnoty stále neuspokojivé. Príčinou bol rozpad

nanovlákných terčikov, ktorý spôsobil zvyšovanie optickej hustoty. Pri treťom pokuse sa nechali vzorky sedimentovať, aby došlo k usadeniu nežiadúcich častíc, uvoľnených z nanovláknien. Išlo prevažne o vzorky C. Zapísané výsledky boli použité z tretieho merania. Z jednej vzorky boli 3x pripravené kyvety na 3 rôzne pokusy. Na každý pokus sa používali nové kyvety.

V ďalšom pokuse pre vzorky B a C (Tabuľka 8), bola novo pripravená bakteriálna suspenzia. Po prefiltrovaní boli nanovlákné terčiky presunuté hneď na Petriho misku a inkubované 21 hodín.

Z dôvodu zistenia citlivosti detektora (množstva zachytených bakteriálnych buniek počas filtrácie) neboli nanovlákné terčiky pri druhom a treťom meraní inkubované. Ich optická hustota bola zmeraná hneď po prefiltrovaní. V tomto prípade došlo k hodnoteniu priamo zachytených baktérií bez ovplyvnenia výsledkov inkubáciou, a to vzhľadom k tomu, že rast baktérií je závislý na dostatočnom množstve nutričných faktorov na médiu. V prípade premnoženia bakteriálnej kultúry, nutričné faktory časom ubúdajú, čo by mohlo mať za následok nežiadúce ovplyvnenie výsledkov. Ako je možné vidieť v Tabuľkách 2, 4 a 6, výsledky experimentov bez inkubácie po filtrácii sú až 4,34- krát lepšie ako s inkubáciou.

Pri druhom meraní bola vyskúšaná inkubácia v kyvetách bez nanovlákného terčika, len suspenzia. Inkubácia bola 55 minút a optická hustota v kyvetách bola opäť premeraná na spektrofotometre. Po premeraní spektrofotometrom výsledky ostali nezmenené. Potvrdilo to, že inkubácia pôvodné výsledky nijako neovplyvnila. Pri ďalších meraniach už preto nanovlákná neboli inkubované týmto spôsobom.

Z výsledkov meraní v prvej časti – testovanie účinnosti funkcionalizácie, je možné vyhodnotiť, že nanovlákná s naviazanou protilátkou dokážu zachytiť

približne 5-krát viac bakteriálnych buniek ako nanovlákná bez protilátky, ako bolo na začiatku očakávané. Pomery PAN + protilátka + nebulizér ku PAN bez protilátky v tabuľkách ukazujú to, koľkokrát je nanovlákná s protilátkou účinnejšie ako nanovlákná bez protilátky. Čím je hodnota pomeru vyššia ako 1, tým je nanovlákná s protilátkou účinnejšie. Smerodajná odchýlka v stĺpcových grafoch taktiež znázorňuje, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi y sú namerané optické hustoty a na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

V druhej časti bola testovaná funkčnosť nášho systému a potreba zvlhčovania prostredia pomocou nebulizéra pri experimente. Testovanie funkcionalizovaných nanovlákní za odlišných podmienok malo za cieľ dokázať, že pokiaľ nanovlákná nie je zvlhčené, dochádza k narušeniu väzby protilátky na nanovlákná, inaktivácii protilátky. Aby mohlo dôjsť k správne naviazaniu antigénu na protilátku, je potrebné vodné médium. Vodné médium obsahuje vodíkové mostíky, ktoré sa na väzbe protilátka-antigén podieľajú. Bez vodíkových mostíkov by protilátka stratila svoju štruktúru a tým schopnosť rozpoznať a viazať antigén [37, 38, 39, 40, 41]. To znamená, že funkcionalizované nanovlákná by sa bez pridanej vlhkosti správalo ako nanovlákná nemoifikované. Pomery PAN + protilátka + nebulizér ku PAN + protilátka + sucho v tabuľkách ukazujú, koľkokrát zvlhčené nanovlákná nebulizérom s protilátkou je účinnejšie ako nanovlákná s protilátkou bez zvlhčenia.

Opäť platí, že čím je hodnota pomeru vyššia ako 1, tým je zvlhčené nanovlákná s protilátkou účinnejšie. Pri prvom meraní pomery však nie sú väčšie ako 1, no blížiac sa k číslu 1. Išlo o prvé meranie, kedy nám, ako bolo už spomínané, hodnoty nevychádzali podľa očakávania. Bolo potrebné spraviť nový pokus a zistiť príčinu, z akého dôvodu boli hodnoty neuspokojivé. Napriek tomu, na Obrázku 16 je možné v grafe vidieť, že zvlhčené nanovlákná je účinnejšie

ako nanovláknno bez zvlhčenia. Smerodajná odchýlka v stĺpcových grafoch taktiež znázorňuje, koľkokrát je jedna vzorka schopná zachytiť viac baktérií ako tá druhá. Na osi y sú namerané optické hustoty a na osi x je pomer konkrétnych vzoriek.

7 ZÁVER

Testovaním baktérie *Escherichie coli* na nanovláknennom detektore bol určený pomer účinnosti funkcionalizovaného nanovláknna s naviazanou protilátkou a nemodifikovaného nanovláknna bez protilátky. Bolo preukázané, že funkcionalizované PAN nanovláknna s naviazanou protilátkou sú v priemere účinnejšie až o 5,23-krát ako nemodifikované nanovláknna, a to vďaka špecifickému zachyteniu bakteriálnych buniek.

V rámci práce bola testovaná aj funkčnosť zhotoveného systému. Testovaním sa ukázalo, že funkcia systému pre filtráciu vzduchu doplneného nebulizérom bola dostačujúca, a tak nebolo nutné vylepšovať konštrukciu a design vyvíjaného prístroja na detekciu. Z výsledkov je zreteľné, že zvlhčené funkcionalizované PAN nanovláknna sú schopné zachytiť až 2-krát viac bakteriálnych buniek ako vlákna nezvlhčené. Táto skutočnosť priamo poukazuje na inaktiváciu protilátky spôsobenú neudržovaním vhodných vonkajších podmienok (dostatočná vlhkosť).

Z celkových výsledkov meraní vyšlo, že detekcia zo vzduchu je možná ako s funkcionalizovanými, tak s nemodifikovanými nanovláknami, použitými pri našom testovaní. Úspešné špecifické zachytenie bakteriálnych buniek, ktoré je zaistené imobilizovanými protilátkami, umožňuje citlivejšiu a účinnejšiu detekciu ako mechanické zachytenie. Pre použitie funkcionalizovaných nanovláknien je však nutné striktne dodržiavať vhodné podmienky ako je pH, teplota a najmä vlhkosť (nebulizér).

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ELISA Enzyme-linked immuno sorbent assay

PCR (Polymerase chain reaction) Polymerázová reťazová reakcia

PAN Polyakrylonitril

E. coli *Escherichia coli*

PEO Polyetylénoxid

PLC Polykaprolaktón

PVP Polyvinylpyrolidon

PVA Polyvinylalkohol

PVAc Polyvinylacetát

PMMA Polymetakrylát

A/D Analógovo-digitálny

EPEC Enteropatogénna *Escherichia coli*

A/E Attaching-effacing

LEE (Locus of enterocyte effacement) Lokus vymazania enterocytov

ETEC Enterotoxigénna *Escherichia coli*

CF (Colony factors) Kolonizačné faktory

ST (Heat stable) Tepelne stabilné

LT (Heat labile) Tepelne labilné

EIEC Enteroinvazívna *Escherichia coli*

EHEC Enterohemoragická *Escherichia coli*

Stx Shiga toxin

HUS Hemolyticko-uremický syndróm

NaCl Chlorid sodný

PVC Polyvinylchlorid

9 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. O nanovláknach. *NAFIGATE Park s.r.o.* [online]. Česká republika: Nafigate Park, c2021 [cit. 2023-05-02]. Dostupné z: <https://www.nafigatepark.cz/o-nanovlaknech/>
2. LIM, Chwee Teck. Nanofiber technology: current status and emerging developments. *Progress in Polymer Science* [online]. 2017, **70**, 1-17 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2017.03.002
3. LOU, Lihua, Odia OSEMWEIGIE a Seshadri S. RAMKUMAR. Functional Nanofibers and Their Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2020, **59**(13), 5439–5455 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.iecr.9b07066
4. WANG, Xiaoying, Fentian CHEN, Kehui ZHU, Qian XU a Meng TANG. Novel electrochemical biosensor based on functional composite nanofibers for sensitive detection of p53 tumor suppressor gene. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **765**, 63-69 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2012.12.037
5. HAIDER, Adnan, Sajjad HAIDER a Inn-Kyu KANG. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. *Arabian Journal of Chemistry* [online]. 2018, **11**(8), 1165-1188 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.arabjc.2015.11.015
6. ABD RAZAK, Saiful Izwan, Izzati Fatimah WAHAB, Fatirah FADIL, Farah Nuruljannah DAHLI, Ahmad Zahran MD KHUDZARI a Hassan ADELI.

- A Review of Electrospun Conductive Polyaniline Based Nanofiber Composites and Blends: Processing Features, Applications, and Future Directions. *Advances in Materials Science and Engineering* [online]. 2015, **2015** [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1155/2015/356286
7. PAVINATTO, Adriana, Luiza A. MERCANTE, Murilo H.M. FACURE, Rafaella B. PENA, Rafaela C. SANFELICE, Luiz H.C. MATTOSO a Daniel S. CORREA. Ultrasensitive biosensor based on polyvinylpyrrolidone/chitosan/reduced graphene oxide electrospun nanofibers for 17α – Ethinylestradiol electrochemical detection. *Applied Surface Science* [online]. 2018, **458**, 431-437 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2018.07.035
8. MORADI, Sara, Maryam AZIZI-LALABAD, Vahid BAGHERI a Ehsan SADEGHI. Fabrication of electrospun sensor based on a synthesized component doped into PAN (polyacrylonitrile) nanofibers for electrochemical detection of zearalenone mycotoxin in foods simulant. *Sensing and Bio-Sensing Research* [online]. 2020, **28** [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/j.sbsr.2020.100321
9. ZHANG, Huijuan, Chengming JIN, Shihao LV, Feiyue REN a Jing WANG. Study on electrospinning of wheat gluten: A review. *Food Research International* [online]. 2023, **56** [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112851
10. NEMČOVSKÝ, Bc. Jakub. *PŘÍPRAVA KERAMICKÝCH VLÁKEN ELEKTROSTATICKÝM ZVLÁKŇOVÁNÍM*. Brno, 2017. Diplomová práce. VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ. Vedoucí práce Doc. Ing. Klára Částková, Ph.D.

11. LI, Shaofeng, Kexin LONG, Xianke SUN, Honglei YUAN a Wei LI. Activities in photocatalytic hydrogen evolution of In₂O₃/In₂S₃ heterostructure and In₂O₃/In₂S₃@PAN nanofibers. *Ceramics International* [online]. 2023 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ceramint.2023.05.006
12. ALI, Nisar, Muhammad BILAL, Adnan KHAN, Farman ALI, Hamayun KHAN, Hassnain Abbas KHAN a Hafiz M.N. IQBAL. Chapter 4 - Fabrication strategies for functionalized nanomaterials. *Nanomaterials: Synthesis, Characterization, Hazards and Safety* [online]. 2021, 55-95 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-823823-3.00010-0
13. VARVAŘOVSKÁ, Bc. Leontýna. *Konstrukce a testování specifického bionanosenzoru pro detekci bakterie Staphylococcus aureus*. Kladno, 2021. Diplomová práce. ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE. Vedoucí práce RNDr. Taána Jarošíková, CSc.
14. HUNT, Neil John. Chapter 29 - Handbook of surface-functionalized nanomaterials: safety and legal aspects. *Handbook of Functionalized Nanomaterials for Industrial Applications* [online]. 2020, 945-982 [cit. 2023-03-11]. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-816787-8.00029-6
15. YOON, Jeong-Yeol. *Introduction to biosensors: from electric circuits to immunosensors*. New York: Springer, c2013. ISBN 978-1-4419-6021-4.
16. SAWICKA, Katarzyna, Perena GOUMA a Sanford SIMON. Electrospun biocomposite nanofibers for urea biosensing. *Sensors and Actuators B: Chemical* [online]. 2005, **108**(1–2), 585-588 [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.snb.2004.12.013

17. GUVEN, Nese, Roxana-Mihaela APETREI a Pinar CAMURLU. Next step in 2nd generation glucose biosensors: Ferrocene-loaded electrospun nanofibers. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2021, **128** [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.msec.2021.112270
18. MAO, Kang, Hua ZHANG, Yuwei PAN a Zhugen YANG. Biosensors for wastewater-based epidemiology for monitoring public health. *Water Research* [online]. 2001, **191** [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.watres.2020.116787
19. MERCANTE, Luiza A., Adriana PAVINATTO, Tamires S. PEREIRA, Fernanda L. MIGLIORINI, Danilo M. DOS SANTOS a Daniel S. CORREA. Nanofibers interfaces for biosensing: Design and applications. *Sensors and Actuators Reports* [online]. 2021, **3** [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: doi:10.1016/j.snr.2021.100048
20. GIZELI, Electra a Christopher R LOWE. Immunosensors. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 1996, **7**(1), 66-71 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:10.1016/S0958-1669(96)80097-8
21. AIZAWA, Masuo. Immunosensors for Clinical Analysis. *Advances in Clinical Chemistry* [online]. 1994, **31**, 247-275 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:10.1016/S0065-2423(08)60337-6
22. HUANG, Juanjuan, Fenghuang WEI, Yuling CUI, Li HOU a Tianran LIN. Fluorescence immunosensor based on functional nanomaterials and its application in tumor biomarker detection. *RSC Advances* [online]. 2022, **12**, 31369-31379 [cit. 2023-03-17]. Dostupné z: doi:10.1039/D2RA04989A

23. PUMERA, Martin a Alberto ESCARPA. Nanomaterials as electrochemical detectors in microfluidics and CE: Fundamentals, designs, and applications. *ELECTROCHEMISTRY IN MICROFLUIDICS AND CAPILLARY ELECTROPHORESIS* [online]. 2009, **30**(19), Pages 3315-3323 [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: doi:10.1002/elps.200900008
24. LOU, Lihua, Odia OSEMWEKIE a Seshadri S. RAMKUMAR. Functional Nanofibers and Their Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2020, **59**(13), 5439–5455 [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: doi:10.1021/acs.iecr.9b07066
25. MIGLIORINI, Fernanda L., Rafaela C. SANFELICE, Luiza A. MERCANTE, Rafaela S. ANDRE, Luiz H.C. MATTOSO a Daniel.S. CORREA. Urea impedimetric biosensing using electrospun nanofibers modified with zinc oxide nanoparticles. *Applied Surface Science* [online]. 2018, **443**, 18-23 [cit. 2023-03-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.apsusc.2018.02.168
26. KAPER, James B., James P. NATARO a Harry L. T. MOBLEY. *Pathogenic Escherichia coli* [online]. 2004, 123-140 [cit. 2022-11-05]. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro818
27. ALLOCATI, Nerino, Michele MASULLI, Mikhail F. F. ALEXEYEV a Carmine DI ILIO. Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2013, 25 November 2013, **2013**(10), 6236-6254 [cit. 2022-11-05]. ISSN ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph10126235
28. JANG, J., H.-G. HUR, M.J. SADOWSKY, M.N. BYAPPANAHALLI, T. T. YAN a S. ISHII. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2017,

2017, **123**(3), 570-581 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1364-5072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13468

29. PATEL, Amit, Nicola CUMMINGS, Miranda BATCHELOR, Phillip J. HILL, Thierry DUBOIS, Kenneth H. MELLITS, Gad FRANKEL a Ian CONNERTON. Host protein interactions with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC): 14-3-3 τ binds Tir and has a role in EPEC-induced actin polymerization. *Cellular microbiology* [online]. 2006, **8**(1), 55-71 [cit. 2022-11-07]. ISSN 1462-5814. Dostupné z: doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00600.x
30. NANDRE, Rahul M., Qiangde DUAN, Yin WANG a Weiping ZHANG. Passive antibodies derived from intramuscularly immunized toxoid fusion 3xSTaN12S-dmLT protect against STa+ enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) diarrhea in a pig model. *Vaccine*[online]. 2017, **35**(4), 552-556 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2016.12.021
31. SJÖLING, Åsa, Firdausi FIRDAUSI, Matilda NICKLASSON, Yasmin Ara BEGUM, Gudrun WIKLUND a Ann-Mari SVENNERHOLM. In vivo expression of the heat stable (estA) and heat labile (eltB) toxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Microbes and Infection* [online]. 2006, **8**(12-13), 2797-2802 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2006.08.011
32. MCKENZIE, Robin, A. Louis BOURGEOIS, Sarah A. FRECH, David C. FLYER, Arlene BLOOM, Kazem KAZEMPOUR a Gregory M. GLENN. Transcutaneous immunization with the heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): Protective efficacy in a double-blind, placebo-controlled challenge study. *Vaccine* [online]. 2007, **25**(18), 3684-3691 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2007.01.043

33. ESCHER, M., G. SCAVIA, S. MORABITO, et al. A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. *Epidemiology & Infection* [online]. 2014, **142**(12), 2559 - 2566 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.1017/S0950268814000181
34. KOUPAEI, Maryam, Horieh SADERI, Seyed Mahmoud Amin MARASHI, Hadis FATHIZADEH a Parviz OWLIA. Evaluation of the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the expression of enterotoxin genes in *Escherichia coli* O157: H7 (EHEC) and *Escherichia coli* H10407 (ETEC). *Microbial Pathogenesis* [online]. 2022, **164**, 1-5 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2022.105450
35. EBRAHIMI, Mir-Morteza Sadat, Nina DOHM, Mareike MÜLLER, Bernd JANSEN a Holger SCHÖNHERR. Self-reporting hydrogels rapidly differentiate among enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and non-virulent *Escherichia coli* (K12). *European Polymer Journal* [online]. 2016, **81**, 257-265 [cit. 2022-11-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.eurpolymj.2016.06.010
36. VECELLIO, L. The mesh nebuliser: a recent technical innovation for aerosol delivery. *Breathe* [online]. 2002, **2**(3), 253-260 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1183/18106838.0203.252
37. WANG, Jingyun, Brian YIU, Jaclyn OBERMEYER, Carlos D. M. FILIPE, John D. BRENNAN a Robert PELTON. Effects of Temperature and Relative Humidity on the Stability of Paper-Immobilized Antibodies. *Biomacromolecules* [online]. 2012, **13**(2), 559-564 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1021/bm2017405

38. VAN OSS, C.J., R.J. GOOD a M.K. CHAUDHURY. Nature of the antigen-antibody interaction: Primary and secondary bonds: Optimal conditions for association and dissociation. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*[online]. 1986, **376**(11), 111-119 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(00)80828-2
39. JANEWAY JR., Charles A., Paul TRAVERS, Mark WALPORT a Mark J. SHLOMCHIK. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition*. [online]. 2001. New York: Garland Publishing, 2001 [cit. 2023-05-07]. ISBN 0 8153 3642 X. Dostupné z: <https://livresbioapp.files.wordpress.com/2015/07/janeway-c-travers-p-walport-m-shlomchik-m-immunobiology-2001.pdf>
40. HOLFORD, Timothy R.J., Frank DAVIS a Séamus P.J. HIGSON. Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2012, **34**(1), 12-24 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/j.bios.2011.10.023
41. BORREBAECK, Carl A.K. Antibodies in diagnostics – from immunoassays to protein chips. *Immunology Today* [online]. 2000, **21**(8), 379-382 [cit. 2023-05-07]. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-5699(00)01683-2

10 ZOZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKOV

Obrázok 1 – Schéma systému elektrostatického zvlákňovania [6].....	13
Obrázok 2 – Schéma biosenzora [vlastná tvorba]	15
Obrázok 3 – Teplé médium naliate v Petriho miskách [vlastná tvorba]	23
Obrázok 4 – E. coli po 20 hodinovej kultivácii v inkubátore [vlastná tvorba]	24
Obrázok 5 – Spektrofotometer UV-3600, Shimanzu (Japonsko) [vlastná tvorba]	25
Obrázok 6 – Funkcionalizované nanovlákná v destilovnej vode (vľavo) a nenavlhčené funkcionalizované nanovlákná (vpravo) [vlastná tvorba].....	25
Obrázok 7 – Nanovláknenný terčik uchytený na držiaku [vlastná tvorba].....	27
Obrázok 8 – Nanovláknenné terčiky na Petriho miske po 21 hodinovej inkubácii [vlastná tvorba]	27
Obrázok 9 – Sústava na filtráciu vzduchu [vlastná tvorba]	28
Obrázok 10 – Schéma sústavy na filtráciu vzduchu [10].....	29
Obrázok 11 – Fotka nemodifikovaného nanovlákná pri zväčšení 1000x (vľavo) a pri zväčšení 3000x (vpravo) [vlastná tvorba].....	30
Obrázok 12 – Fotka funkcionalizovaného nanovlákná pri zväčšení 1000x (vľavo) a pri zväčšení 3000x (vpravo) [vlastná tvorba].....	30
Obrázok 13 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)	32
Obrázok 14 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)	34
Obrázok 15 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku A (PAN bez protilátky)	36
Obrázok 16 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)	39
Obrázok 17 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B (PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho)	41

Obrázok 18 – Graf pre porovnanie výsledkov pomeru jednotlivých vzoriek B
(PAN + protilátka + nebulizér) ku C (PAN + protilátka + sucho) 43

11 ZOZNAM POUŽITÝCH TABULIEK

Tabuľka 1 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek po 21 hodinovej inkubácii, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér	31
Tabuľka 2 – Vyhodnotenie výsledkov z prvého merania	32
Tabuľka 3 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek bez inkubácie, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér.....	33
Tabuľka 4 – Vyhodnotenie výsledkov z druhého merania.....	33
Tabuľka 5 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek bez inkubácie, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér.....	35
Tabuľka 6 – Vyhodnotenie výsledkov z tretieho merania	35
Tabuľka 7 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek po 21 hodinovej inkubácii, B – PAN + protilátka + nebulizér, C – PAN + protilátka + sucho	37
Tabuľka 8 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek po 21 hodinovej inkubácii, B' – PAN + protilátka + nebulizér, C' – PAN + protilátka + sucho.....	38
Tabuľka 9 – Vyhodnotenie výsledkov z prvého merania	38
Tabuľka 10 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek bez inkubácie, B – PAN + protilátka + nebulizér, C – PAN + protilátka + sucho	40
Tabuľka 11 – Vyhodnotenie výsledkov z druhého merania.....	40
Tabuľka 12 – Výsledky optickej hustoty nanovlákných terčiek bez inkubácie, A – PAN bez protilátky, B – PAN + protilátka + nebulizér.....	42
Tabuľka 13 – Vyhodnotenie výsledkov z tretieho merania.....	42