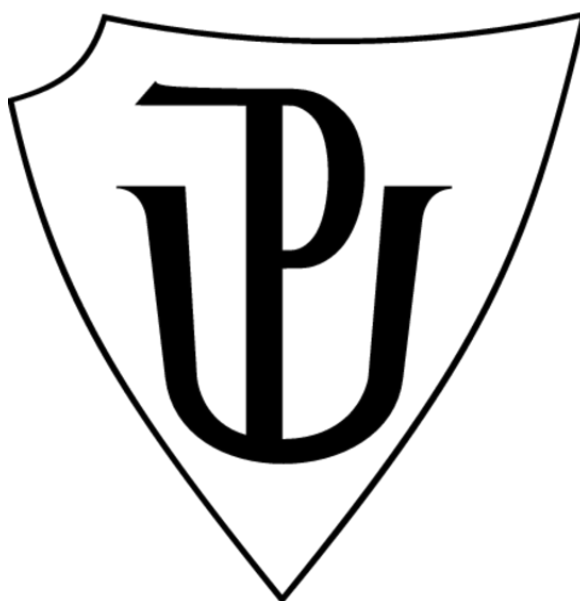


Univerzita Palackého v Olomouci  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra experimentální fyziky



## Diplomová práce

# Detekce bakteriálních původců pro rychlou diagnózu meningitidy

Autor:	<b>Bc. Jakub Dlabka</b>
Studijní program:	N1701 Fyzika
Studijní obor:	3942T001 Nanotechnologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Ariana Opletalová, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	5. 8. 2019

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou prací vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Ariany Opletalové, Ph.D., a s použitím informačních zdrojů, které uvádím v seznamu použité literatury na konci práce.

V Olomouci dne .....

.....  
podpis

## **Poděkování**

Děkuji mé vedoucí Mgr. Arianě Opletalové, Ph.D. za pomoc a trpělivost při vypracování této diplomové práce. Také děkuji Mgr. Anně Balzerové, Ph.D. za přípravu magnetického biosenzoru a Ústavu mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého za poskytnutí bakteriálních lyzátů a likvoru pro naše experimenty.

## Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Jakub Dlabka
Název práce	Detekce bakteriálních původců pro rychlou diagnózu meningitidy
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra experimentální fyziky
Vedoucí práce	Mgr. Ariana Opletalová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Cílem této diplomové práce bylo praktické využití diagnostického nástroje pracujícího na principu magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS) pro rychlé odhalení bakteriální meningitidy. Experimentální část byla soustředěna na selektivní detekci a identifikaci bakterií <i>Neisseria meningitidis</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> a <i>Streptococcus agalactiae</i>. Na základě porovnání SERS spekter vzorků obsahujících samotné senzory a spekter vzorků s těmito senzory aplikovanými na lyzáty daných bakterií, současně ve spojení s diskriminační analýzou týchž spekter, jsme schopni nejen rozhodnout, zda je přítomna infekce, ale především určit, o jakou bakterii se jedná. Stejným postupem byla měření zopakována pro vzorky v likvoru.</p>
Klíčová slova	Nanočástice stříbra, magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie, bakterie, diagnostika, meningitida.
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	český

## **Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Jakub Dlabka
Title	Detection of bacterial agents for the rapid diagnosis of meningitis
Type of thesis	Master
Department	Department of Experimental Physics
Supervisor	Mgr. Ariana Opletalová, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>The goal of this thesis was practical utilization of diagnostical tool based on a principle of magnetic assisted surface-enhanced Raman spectroscopy (MA-SERS) for rapid detection of bacterial meningitis. The experimental section has been focused on selective detection and identification of bacteria <i>Neisseria meningitidis</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Haemophilus influenzae</i> and <i>Streptococcus agalactiae</i>. By comparing spectra of samples only containing sensor with spectra of these sensors applied to bacteria lysates, together with discriminant analysis we have not only been able to detect infection but also determine which bacteria was present. The same process was repeated for liquor samples.</p>
Keywords	Silver nanoparticles, Magnetically Assisted Surface-enhanced Raman Spectroscopy, bacteria, diagnosis, Meningitis.
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	czech

# Obsah

Úvod .....	7
Teoretická část .....	9
1. Ramanova spektroskopie .....	10
1.1. Ramanův jev .....	10
1.2. Ramanova spektroskopie .....	12
1.3. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie .....	13
1.4. Přehled postupů a možností měření pomocí SERS .....	14
1.5. SERS analýza bakteriálních a jiných biologických vzorků .....	15
1.6. Magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie .....	17
2. Meningitida .....	19
2.1. Diagnóza a metody detekce .....	19
Experimentální část .....	23
3. Přístrojové vybavení .....	24
4. Použité chemikálie a příprava vzorků .....	24
5. Příprava vzorků pro SERS experimenty .....	25
Výsledky a diskuze .....	26
6. Vyhodnocení naměřených MA-SERS spekter .....	27
6.1. <i>Neisseria meningitidis</i> .....	27
6.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	32
6.3. Směs senzorů .....	37
6.4. <i>Haemophilus influenzae</i> a <i>Streptococcus agalactiae</i> .....	38
Závěr .....	46
Seznam použitých zkratk .....	47
Seznam použité literatury .....	48

# Úvod

Nanotechnologie a nanočástice nalézají stále větší uplatnění ve všech odvětvích vědy. Ve svých nano rozměrech mohou vykazovat naprosto odlišné vlastnosti oproti jejich makroskopickým protějškům, což otevírá cestu celé řadě nových aplikací. V neposlední řadě nalézají široké uplatnění i v oblastech biologie a medicíny. V těchto oborech se mimo jiné uplatňují nanočástice ušlechtilých kovů, zejména pak nanočástice stříbra. Kromě jejich antibakteriálních účinků, využívaných v humánní i veterinární medicíně, mají nanočástice stříbra díky jejich optickým vlastnostem velký potenciál využití i v analytických metodách, mezi které patří Ramanova spektroskopie. Nicméně citlivost Ramanovy spektroskopie je značně omezená. Tento nedostatek lze řešit zesílením Ramanova signálu na povrchu kovových materiálů. Pomocí SERS – povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie je možné snížit mez detekce až o několik řádů a získat tak informace o biologicky významných molekulách.

Včasná detekce je u většiny infekčních nemocí, včetně zánětu mozkových blan – meningitidy, kterému se věnuje tato diplomová práce, naprosto zásadní. Hlavními nedostatky standardních kultivačních technik k určení přítomnosti bakterií v biologických vzorcích je omezení citlivosti, specifčnosti a délky trvání analýzy. Velice přesná a citlivá metoda pro detekci meningitidy je PCR (z anglického polymerase chain reaction) [1]. Tato metoda má však nevýhodu složitější obsluhy, a především vyšších nákladů, což značně omezuje použití této metody v rozvojových zemích [2].

S rozvojem nanotechnologií vznikly i nové možnosti detekce a identifikace patogenních bakterií v biologických vzorcích. SERS aktivní substráty v podobě nanočástic stříbra umožňujících dosáhnout značně vysokého faktoru zesílení Ramanova signál [3-5] a současně aplikace magnetických částic funkcionalizovaných antigenem stanovené bakterie vede k vysoké selektivitě a specifitě díky snadné magnetické separaci požadovaného analytu ze složité biologické matrice. Kombinací SERS s biofunkcionalizovanými magnetickými nanočásticemi získáváme vysoce citlivý, selektivní a velice rychlý diagnostický nástroj k identifikaci patogenních bakterií, tzv. magneticky asistovanou SERS (MA-SERS) techniku.

Předložená experimentální část diplomové práce se věnuje detekci a identifikaci bakteriálních původců zánětu mozkových blan metodou magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie (MA-SERS) ze vzorku mozkomíšního moku (likvoru). Konkrétně byly studované bakterie *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*. K MA-SERS detekci byl použit kompozit na bázi magnetických nanočástic oxidu železa funkcionalizovaných jednotlivými protilátkami

na konkrétní bakterie, které byly následně konjugovány s nanočásticemi stříbra. Nejprve byla metoda MA-SERS detekce a identifikace bakteriálních patogenů vyvíjena na lyzátech bakterií *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae*, Následně bylo provedeno testování biosenzoru na vzorcích likvoru, infikovaného příslušnými bakteriemi. Pomocí této techniky bylo možné detekovat a identifikovat přítomnost bakterií ve vzorcích likvoru během několika málo desítek minut od získání vzorku, a to již při velice nízkých koncentracích. Stejně použití metody bylo dále otestováno na bakteriích *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*, jakožto další významné patogeny způsobující toto závažné onemocnění.



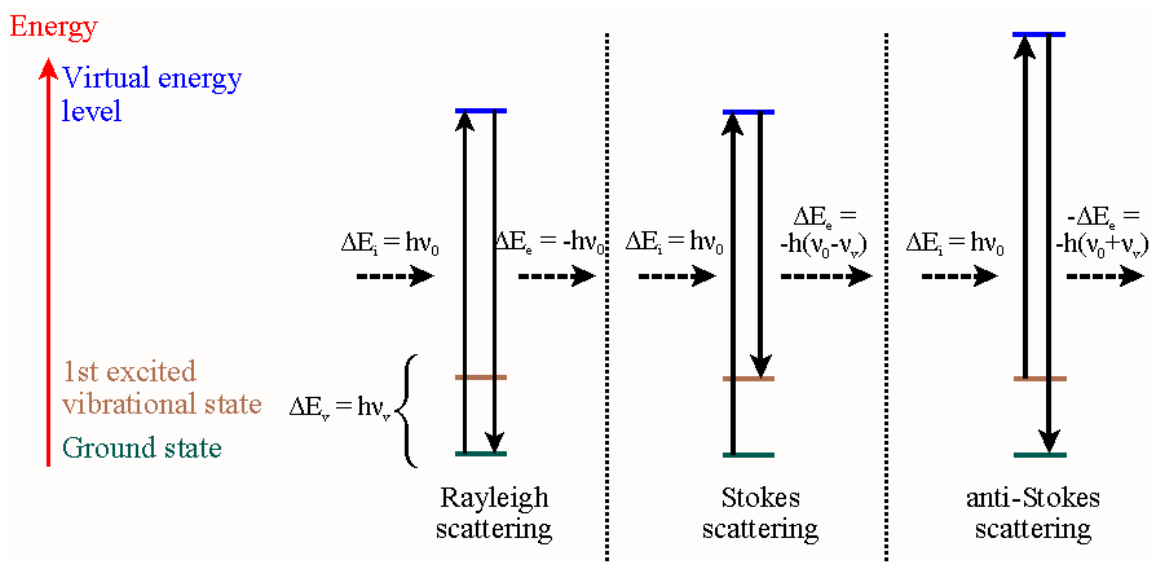
# **Teoretická část**

# 1. Ramanova spektroskopie

Ramanův jev byl předpovězen již v roce 1923 rakouským fyzikem Adolfem Smekalem [5]. Experimentálně byl potvrzen roku 1928 sirem Chandrasekhara Venkata Ramanem (společně s K. S. Krišnanem) [5, 6], po němž tato metoda nese svůj název. Ve stejné době byl tento jev nezávisle potvrzen ruskými vědci G. S. Landsbergem a L. I. Mandelstamem. Prof. Raman roku 1930 obdržel za tento objev Nobelovu cenu za fyziku [7].

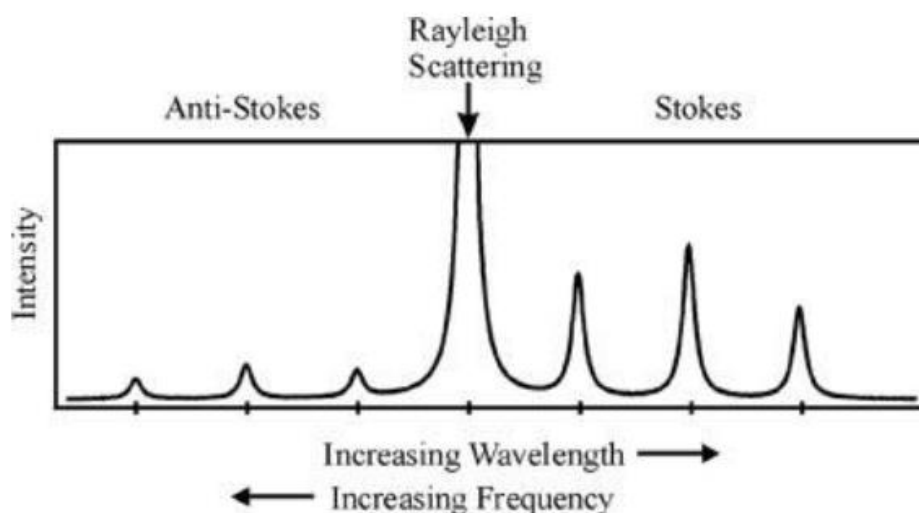
## 1.1. Ramanův jev

Při interakci monochromatického koherentního záření (generovaného laserem) se vzorkem dojde částečně k absorpci záření, část záření projde nebo se odrazí, a u části dojde k rozptylu záření. Při rozptylu záření dochází k tomu, že dopadající záření excituje elektron do virtuální vyšší energetické hladiny. Následně dojde ke spontánní emisi fotonu při relaxaci elektronu na nižší energetickou hladinu. Dojde-li k návratu na původní energetickou hladinu, hovoříme o pružném (neboli elastickém) Rayleigh rozptylu. Frekvence fotonu, vyzářeného při relaxaci na původní energetickou hladinu, je v tomto případě stejná jako frekvence původního excitujícího fotonu. Elastický rozptyl je v materiálech nejvíce pravděpodobný, a tedy nejvíce intenzivní [8]. V případě, že se elektron vrátí na jinou energetickou hladinu než jeho výchozí, hovoříme o nepružném rozptylu. Tento jev je oproti pružnému rozptylu velice nepravděpodobný. Uvádí se, že k nepružnému rozptylu dochází zhruba v jednom z  $10^6$  případů [5, 7]. Dále u nepružného rozptylu rozlišujeme Stokesův rozptyl a anti-Stokesův rozptyl. Při Stokesově rozptylu se při relaxaci vrací excitovaný elektron na vibrační hladinu, která je energeticky vyšší než hladina výchozí. Aby platil zákon o zachování energie, musí mít vyzářený foton nižší frekvenci než původní excitační foton. Naopak při anti-Stokesově rozptylu dochází k relaxaci na energetickou hladinu nižší, než byla hladina výchozí. Vyzářený foton tak bude mít vyšší frekvenci než excitační foton. Aby k takovému rozptylu došlo, musí se excitovaný elektron při dopadu excitačního záření již nacházet ve vybuzeném stavu (např. teplem) [7]. Vlivem toho je anti-Stokesův rozptyl o několik řádů méně intenzivní, než Stokesův rozptyl. Jednotlivé druhy rozptylů jsou schematicky zobrazeny na obrázku 1.



Obrázek 1: Ukázka pružného Rayleigh rozptylu a nepružných Sokesových a Anti-Stokesových rozptylů. Převzato z [9].

Pro látky s vibračními módy aktivními v Ramanově spektru budeme pozorovat dva průběhy Ramanova signálu, které budou symetrické podle linie Rayleigh rozptylu, jak je ukázáno na obrázku 2.



Obrázek 2: Zobrazení symetrie Ramanova spektra. Převzato z [10].

Jak bylo již zmíněno, anti-Stokesova spektra jsou výrazně méně intenzivní. Z toho důvodu se ve většině případů zaznamenávají pouze spektra v oblasti Stokesova rozptylu.

## 1.2. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie nalézá široké uplatnění v mnoha oborech jako nástroj pro strukturní analýzu. Mezi tyto obory patří mimo jiné například různá odvětví chemie, především organické chemie, mineralogie, detekce látek znečišťujících životní prostředí a v neposlední řadě i biochemie a lékařství [3, 5, 6, 10-13].

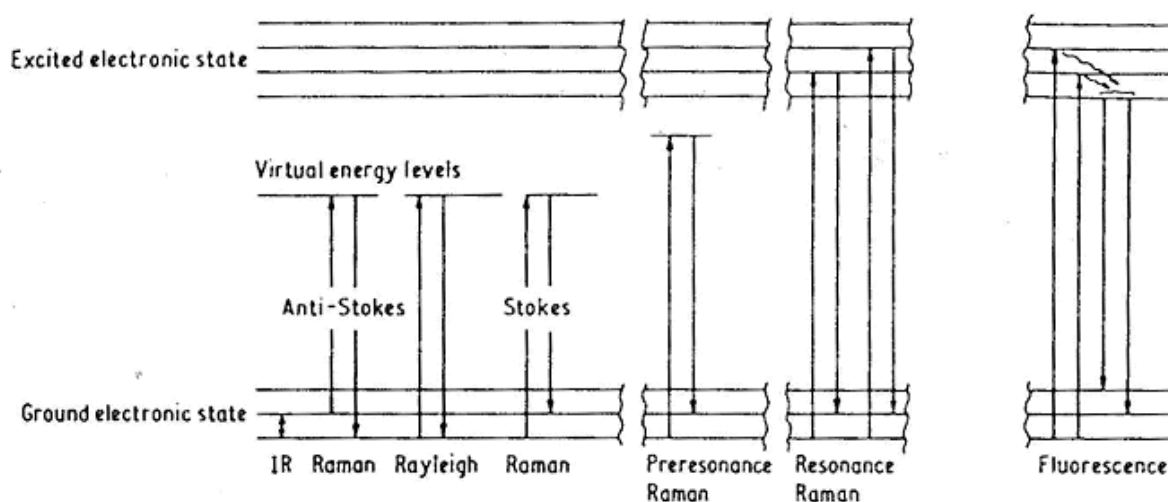
Ramanovo spektrum, které je výstupem této metody, odráží chemické složení a chemické vlastnosti zkoumaného analytu. Obdobně jako infračervená spektroskopie, poskytuje Ramanovo spektrum informaci o vibračních stavech molekul a atomů. Základním výběrovým pravidlem pro Ramanovu spektroskopii je nenulová změna polarizovatelnosti. Jinými slovy, Ramanovy linie budou vznikat pro látky se silnou odezvou na působení elektrického pole. Tato odezva se projevuje přeskupením nábojů v látce. Naměřená frekvence vibrací je zcela nezávislá na tom, zda měříme infračervenou spektroskopií, nebo Ramanovou spektroskopií (hodnoty frekvencí pro většinu významných vazebných frekvencí lze nalézt v tabulkách). Značně lišit se však budou jejich intenzity. Intenzita vibrací v infračervené spektroskopii je závislá na druhé mocnině změny dipólového momentu, kdežto u Ramanovy spektroskopie je intenzita vibrací závislá na druhé mocnině změny polarizovatelnosti. V praxi tak lze Ramanovou spektroskopií měřit především nepolární části molekul, zatímco v infračervené spektroskopii budou intenzivní vibrace polárních částí molekul (např. -OH, C=O, -NO<sub>2</sub>) [4, 10]. Intenzita závisí také značně na symetrii molekul. Symetrické molekuly budou aktivní v Ramanově spektru, zvláště výrazné budou potom linie násobných symetrických vazeb (např. -C=C-, -C≡C-, -N≡N-) [10]. Oba druhy vibračních spekter jsou často komplementární. Vazby výrazné v infračervené spektroskopii se neprojeví v Ramanově spektru a naopak.

Pro kvalitativní posouzení spekter lze využít srovnání s rozsáhlou knihovnou spekter. Za dodržení stejných podmínek se Ramanovo spektrum chová jako „otisk palce“, odrážející chemický a fyzikální stav analytu. Kvantitativní analýza je v Ramanově spektroskopii také možná, bývá však zpravidla složitější a obtížnější. Intenzita obvykle nemá jednoduchou lineární závislost na koncentraci zkoumaného vzorku, jako např. u absorpčních spektroskopií. Intenzitu ovlivňuje spousta faktorů jako např. stabilita výkonu laseru, resorpce rozptýleného záření nebo fluorescence. Také může docházet k překryvům jednotlivých pásů. Ke kvantitativní analýze je tedy nutné použití složitějších kalibračních metod s velkým počtem standardů [10].

Jak již bylo řečeno, Ramanova spektroskopie nalézá široké uplatnění, a to z důvodu celé řady výhod. Měření je bezkontaktní, což umožňuje měřit celou škálu vzorků od pevných látek přes tenké vrstvy, kapaliny, gely, koloidní roztoky, biologické vzorky až po plyny [4, 5, 10]. Voda má v Ramanově spektru velice malou intenzitu, to umožňuje měření vodných roztoků.

Velkou výhodou je i nedestruktivní průběh většiny měření s výjimkou některých citlivých vzorků (především vzorků malých velikostí), které mohou být poškozeny měřícím laserovým svazkem. Při vhodném uspořádání měření vyžaduje pouze velice malé množství vzorku, v případě roztoků lze měřit již několik mikrolitrů. Další výhodou je časová nenáročnost měření.

Jak bylo zmíněno dříve, Ramanovo spektrum je často ovlivněno fluorescencí, která může být způsobena např. nečistotami vzorku nebo samotným vzorkem. Přítomnost fluorescence tak může zvýšit nároky na čistotu a optické vlastnosti vzorku. Další velká nevýhoda Ramanovy spektroskopie je nízká intenzita, která plyne z poměrně nízké pravděpodobnosti Ramanova rozptylu. Tuto nevýhodu lze však kompenzovat použitím vhodného způsobu zesílení. Velmi častou metodou je rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS). Princip spočívá v použití excitačního záření s energií blízkou energii potřebné k přechodu elektronu zkoumaného analytu do vyšší energetické hladiny. Použití této rezonanční frekvence budícího záření může vést k velkému zesílení signálu. Nevýhodou této metody je však zvýšená fluorescence a větší riziko fotodegradace vzorku [14-16]. Další důležitou metodou zesílení je povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS z anglického „surface enhanced Raman spectroscopy“), o které pojednává následující podkapitola.



Obrázek 3: Ilustrace rezonančního efektu rezonanční Ramanovy spektroskopie Převzato z [16].

### 1.3. Povrchem zesílená Ramanova spektroskopie

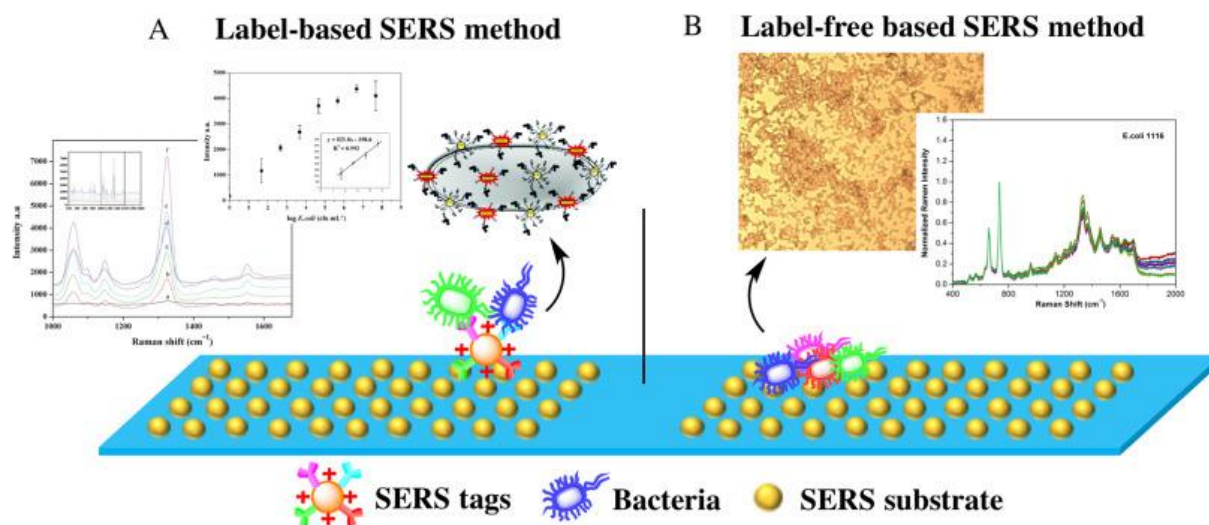
Metoda SERS umožňuje výjimečné zesílení signálu, typicky lze dosáhnout zesílení  $10^6$ – $10^8$  [3, 15]. Počátky metody sahají do sedmdesátých let 20. století. Poprvé byl tento jev necíleně pozorován v roce 1974 M. Fleischmannem. Fleischmann pozoroval silné zesílení

Ramanova signálu monovrstvy pyridinu nanesené na zdrsňené stříbrné elektrodě [17]. Tento jev byl tehdy přiřazován velkému povrchu elektrody a vyšší lokální koncentraci pyridinu. Roku 1977 Van Duyne došel k závěru, že za zesílení signálu je zodpovědné rozhraní mezi pyridinem a zdrsňenou Ag elektrodou a zavedl termín povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (SERS) [18]. K zesílení signálu dochází při interakci elektromagnetického záření s nanostrukturami plasmonických kovů (nejčastěji Ag a Au, ale i Cu, nebo Pt) [4, 5, 19] s molekulami analytu lokalizovanými na jejich površích či v jejich těsné blízkosti [5].

Dnes obecně přijímané vysvětlení je, že k zesílení Ramanova signálu dochází dvěma základními mechanismy, které můžeme označit jako elektromagnetický a chemický [3]. Z těchto dvou mechanismů je dominantní elektromagnetický, který poskytuje mnohem větší příspěvek k zesílení Ramanova signálu než mechanismus chemický. Elektromagnetický mechanismus působí také na delší vzdálenost mezi vzorkem a povrchem kovu (zhruba do 10 nm [20]) než chemický. Absorbací elektromagnetického záření dojde k vybuzení povrchového plasmonu a tedy k rozkmitání vodivostních elektronů. Tyto elektrony vytvoří oscilující dipól, který následně emituje elektromagnetické záření, jehož intenzita je rovna čtvrté mocnině velikosti vzniklého dipólu. Zároveň klesá intenzita vzniklého elektromagnetického pole s rostoucí vzdáleností [5]. Chemický mechanismus působí na bližší vzdálenosti mezi vzorkem a povrchem kovu. Dochází při něm k přenosu náboje mezi analytem a povrchem kovového adsorbentu. Tato interakce se podílí mnohonásobně méně na zesílení Ramanova signálu [21].

#### ***1.4. Přehled postupů a možností měření pomocí SERS***

Metoda SERS se dá rozdělit na tzv. přímou (label-free) nebo nepřímou (label-enabled, názorné schéma je zobrazeno na obr. 4) [3, 5, 22]. Během přímého měření interaguje analyt přímo se SERS aktivním substrátem a je měřeno jedinečné spektrum analytu (tzv. spektrální otisk prstu) [3]. Výhodou tohoto měření je, že nám poskytne informace o struktuře analytu [5]. Biologické vzorky jsou však zpravidla velice komplexní systémy a často se skládají ze směsi mnoha různých látek. Ve výsledném SERS spektru tak může docházet k překryvům a nerozlišitelnosti jednotlivých pásů. O tom, které pásy budeme v SERS spektru pozorovat, rozhoduje také z velké části to, která molekula nebo část molekuly se bude nacházet na, nebo v blízkosti povrchu substrátu [2]. Často se proto volí nepřímá metoda, ve které se analyt stanovuje pomocí interakce s tzv. „reporter“ molekulou. Často se jedná o SERS aktivní molekulu, která se naváže na specificky připravený substrát (například nanočástice funkcionalizované příslušným antigenem, nebo jiným receptorem) [3, 5].



Obrázek 4: Schematické zobrazení nepřímé SERS metody (B) a nepřímé metody (A). Převzato z [22].

Výsledná spektra ovlivňuje celá řada faktorů. Důležitým faktorem je chemické složení, velikost a tvar použitého SERS substrátu. Mezi nejčastější a nejjednodušší patří použití koloidních částic nebo tenkých vrstev. Jsou však používány i jiné tvary jako tyčinky, krychle, hvězdy a jiné [23,24]. Lze vytvářet také složitější komplexy, např. s využitím magnetických nanočástic [6, 11, 12], kterým se blíže věnuje kapitola 1.6. Měření ovlivňuje i volba vhodné vlnové délky budícího laseru. Volbu vlnové délky ovlivňuje druh použitého substrátu. Používají se např. lasery svítící na vlnových délkách 325 nm, 514 nm, ale nejčastěji se používají lasery svítící na vlnových délkách 633 nm a 785nm. Výhoda těchto vyšších vlnových délek je mimo jiné nižší úroveň fluorescence, která bývá běžným problémem u Ramanových spekter [2, 4].

### 1.5. SERS analýza bakteriálních a jiných biologických vzorků

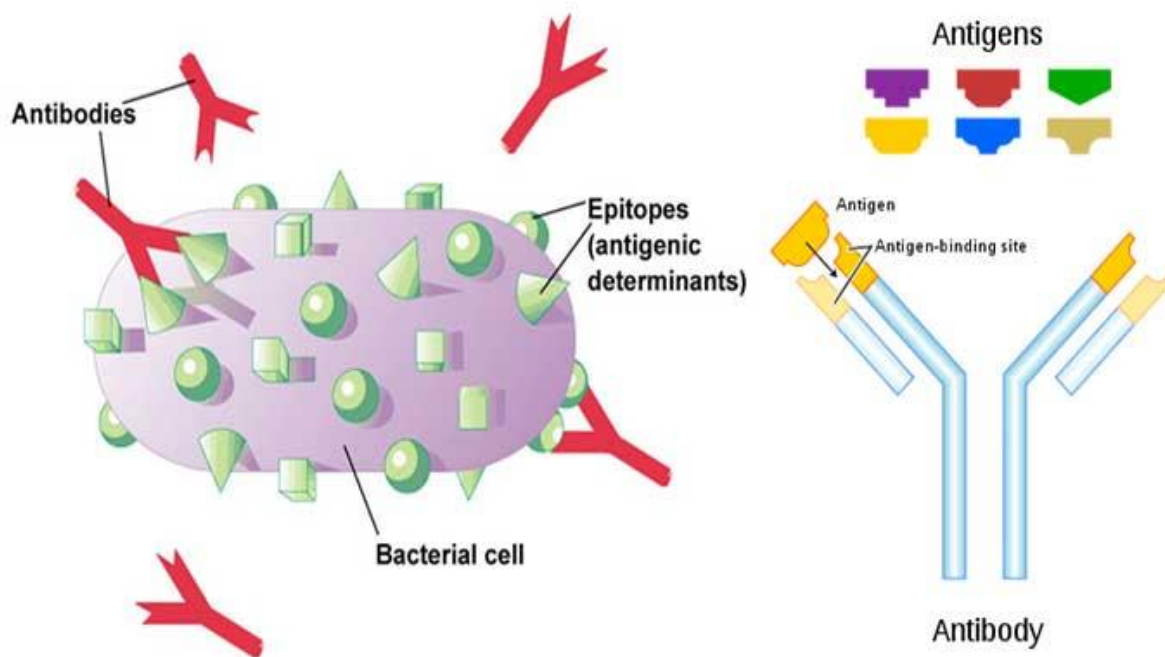
Jak už bylo zmíněno, biologické vzorky jsou obecně velice komplexní a fyzikálně-chemicky složité systémy [4]. Např. u bakteriálních vzorků je naměřené Ramanovo spektrum mimo jiné ovlivněno typem stanovovaných bakterií, především druhem jejich cytoplazmatické membrány. Podle chemického složení a struktury cytoplazmatické membrány se bakterie dělí na dvě hlavní skupiny – bakterie s gramnegativní membránou a grampozitivní membránou [25]. Stříbro a zlato také vykazují antimikrobiální vlastnosti. Tyto vlastnosti se mohou velice lišit např. podle velikosti, distribuce velikostí nebo morfologie částic a mohou se také projevit změnou v Ramanových spektrech [2].

Získání konkrétní informace z takto složitého systému nemusí být zcela triviální [4]. Touto informací může být např. přítomnost a koncentrace stanovovaného polutantu ve vzorku, biomarkeru, bakterie nebo jiného patogenu. Např. Cabello a spol. [26] demonstrovali použití koloidních Ag@Cu nanočástic jako SERS substrátu k detekci několika organických molekul. Přímou metodou byli schopni detekovat v koncentraci  $10^{-8}$  M například cholesterol, propanil, acetaminophen nebo dopamin.

Pro měření bakteriálních vzorků bylo vyvinuto několik různých metod. První způsob měření je růst Ag/Au přímo na bakterii nebo uvnitř bakterie. Nukleace během růstu Ag/Au částic probíhá na určitých místech buněčné stěny (tzv. hot „spots“). Jednou z metod použitých k přípravě koloidního stříbra (nebo zlata) přímo na bakterii, bylo namočit bakterie v roztoku borohydrátu sodného, a potom pomocí centrifugy a promýváním vodou odstranit přebytečný borohydrát. Bakterie byly potom umístěny do roztoku dusičnanu stříbrného nebo kyseliny chlorzlatité. Takto připravené vzorky vykazovaly velice malou změnu mezi Ramanovými spektry dvou různých bakterií, a to i při různém Gramově typu buněčných stěn těchto bakterií. Podobnost těchto spekter byla vysvětlena přítomností flavinů, které pro Ag/Au částice fungují jako efektivní nukleační centra [2]. Jiný způsob měření je umístění bakterie na zdrsňený Ag/Au povrch. Lze použít např. sklíčko se zdrsňenou tenkou vrstvou zlata. Kamińska a spol. [27] použili substrát vytvořený z tenké vrstvy zlata nanesené na tenkou vrstvu oxidu zinečnatého na křemíkové podložce k detekci zvýšených koncentrací neopterinu, spojovaných s přítomností stanovovaných bakterií. Další způsob je použití koloidních roztoků. Směs vzorku a koloidního roztoku lze měřit např. přímo po smíchání v kapalném stavu, na sklíčku v kapce v kapalném stavu, nebo po zaschnutí na sklíčku (vytvořením tenké vrstvy) [2, 6, 11].

K zajištění specifčnosti analýzy lze využít tzv. antigenů. Antigeny jsou látky, které se běžně podílí na imunitních reakcích aktivací příslušných lymfocytů [28]. Obecně se jedná o látky, které díky svému tvaru a struktuře reagují pouze se svou příslušnou protilátkou [23]. Díky své specifčnosti bývá tato interakce připodobňována k zapadnutí klíče do zámku (vazba je schematicky zobrazena na obrázku 5). Dále má každý druh bakterie svůj specifický antigen. Díky tomu můžeme připravit biosenzory, které budou reagovat jen a pouze na přítomnost dané bakterie. K vytvoření biosenzoru lze využít i magnetické nanočástice, které značně usnadní měření a manipulaci se vzorkem. SERS metodu využívající takto připravené částice lze označit jako magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie (MA-SERS) a bude blíže popsána v následující kapitole.

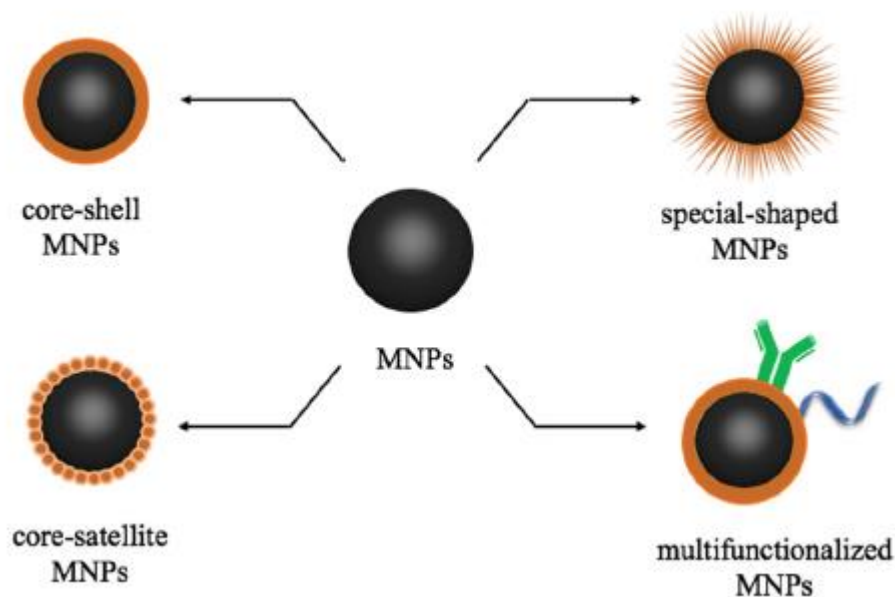




Obrázek 5: Schematické znázornění vazby mezi protilátkou a antigenem. Převzato z [23].

### ***1.6. Magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie***

Využití magnetických nanočástic (MNPs) má celou řadu výhod. Patří mezi ně snadná manipulace se vzorkem, kontrolovatelná tvorba hotspotů, snadná separace a zahuštění, případně extrakce vzorku ze složité matrice [6, 12]. Toto je důležité zejména při stanovování velice nízkých koncentrací a práci s malým množstvím vzorku. Kombinací magnetických vlastností nanočástic jako je například  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  a plasmonických vlastností ušlechtilých kovů lze vytvořit ideální substrát pro SERS analýzu enviromentálních polutantů a biologických vzorků [6]. Jako u jiných SERS substrátů i u MNPs existuje celá řada různých forem, v jakých lze tyto substráty připravit (viz obrázek 6) [6, 11, 12].



Obrázek 6: Příklady tvarů SERS substrátů s jádrem z magnetických nanočástic. Převzato z [6].

Lze například vytvořit core-shell částice s magnetickým jádrem a slupkou z ušlechtilého kovu. Vlastnosti těchto částic lze kontrolovat úpravou rozměrů jádra a slupky nebo povrchovou úpravou. Pro větší stabilitu lze mezi jádro a kovovou slupku nanést oddělovací vrstvu, nejčastěji  $\text{SiO}_2$ . Další možností jsou tzv. core-satellite částice kde magnetické jádro bývá obaleno několika kovovými nanočásticemi. Vlastnosti tohoto substrátu se znovu mohou lišit podle velikosti a tvarů částic. Jelikož intenzita SERS signálu záleží i na tvaru částic, existuje i mnoho nesférických substrátů jako například nanokrychle nebo nanohvězdy [6].

Velice často se MNPs funkcionalizují funkčními skupinami (může se jednat o různé proteiny, aptamery, protilátky aj.), které zprostředkovávají interakci s cílenými látkami. Toto značně zvyšuje selektivitu a citlivost metody. Pro bakteriální analýzu lze například použít protilátky pro danou bakterii. MNPs jsou také často modifikovány dalšími látkami, podle vyžadované funkce (úprava stability, navázání funkčních skupin aj.) [6, 11, 12].

Tato diplomová práce volně navazuje na využití MA-SERS diagnostiky při infekci kloubních náhrad [11]. Dále byla tato MA-SERS metoda úspěšně použita pro detekci již velmi malých koncentrací imunoglobulinu G, jehož hodnoty se stanovují při mnoha různých vyšetřeních [12].

## 2. Meningitida

Meningitida, nebo také zánět mozkových blan, je zánětlivé onemocnění mozkomíšních blan (ochranná membrána chránící mozek a míchu). Toto onemocnění je nejčastěji způsobeno mikroorganismy jako jsou viry a bakterie. Virální meningitida se vyskytuje nejčastěji, má však zpravidla značně mírnější symptomy a často nebývá smrtelná. Bakteriální meningitida, zato bývá značně závažnější s výrazně silnějšími symptomy. Bakteriální meningitida bývá smrtelná u dospělých jedinců v 5-10 % a to již během 24-48 hodin po projevení symptomů. Nejčastějšími bakteriálními původci tohoto onemocnění jsou *Neisseria meningitidis* (známá také jako meningokok) a *Streptococcus pneumoniae* (streptokok). U dospělých jedinců bývají tyto dvě bakterie zodpovědné až za 80 % případů bakteriální meningitidy [1, 27, 29-32]. U novorozenců je nejčastější příčinou *Streptococcus agalactiae* a u dětí do 5 let *Haemophilus influenzae*. [1, 29, 31]. *Streptococcus suis* je významným původcem v částech Asie. U rizikových pacientů, jako jsou starší osoby, alkoholici, diabetici, osoby s oslabenou imunitou, mohou jako původci onemocnění působit bakterie *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* nebo *Listeria monocytogenes* [29].

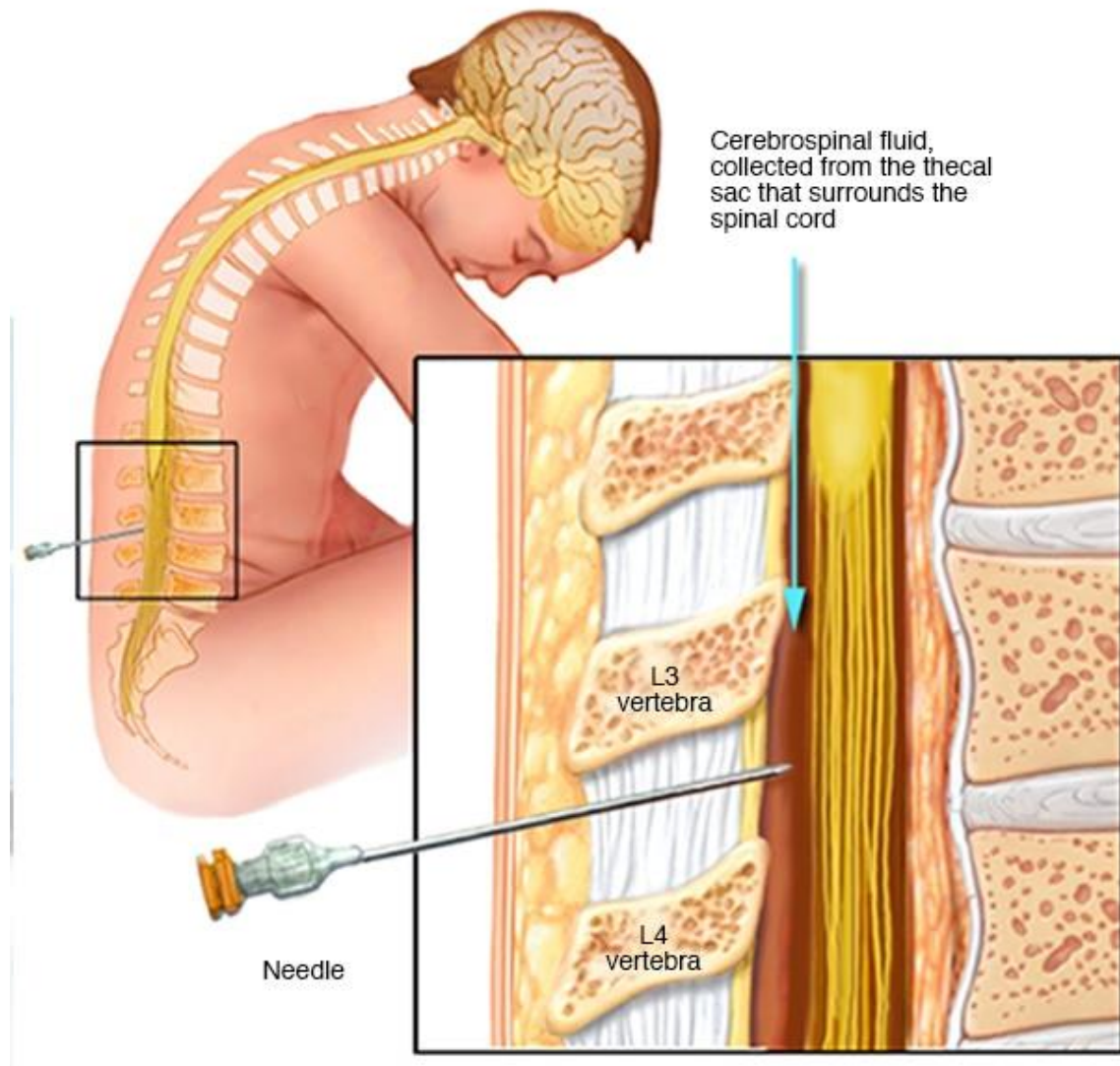
Díky pokrokům ve tvorbě vakcín došlo ke značnému poklesu výskytu meningitidy, především u dětí. Vakcíny jsou však v některých částech světa nedostupné, případně příliš nákladné. Incidence tak zůstává vysoká především v určitých částech Afriky s uváděnou incidencí až 1000 případů na 100 000 lidí (v západní Evropě jsou uváděny 1-2 případy na 100 000 lidí). I přes snížení výskytu případů, úmrtnost této nemoci zůstává stále vysoká, až 30 % u dospělých jedinců ve vyspělých zemích a až 50 % v rozvojových zemích [30]. Léčba ve většině případů probíhá podáním antibiotik a kortikosteroidů. Jedny z významných faktorů přispívajících k vysoké úmrtnosti jsou výskyt bakterií odolných vůči antibiotikům a častá prodleva mezi počátkem a detekcí nemoci [27, 30].

### 2.1. Diagnóza a metody detekce

Mezi hlavní symptomy meningitidy patří především silné bolesti hlavy provázené horečkou, ztuhlostí šíje, často také poruchami vědomí nebo ztrátou sluchu, která může přetrvat i po úspěšném vyléčení nemoci. Dále se může projevovat i zvracením, záchvaty a citlivostí na světlo [1].

Detekce meningitidy probíhá zpravidla analýzou mozkomíšního moku (také označován jako likvor) [27, 30, 33]. Mozkomíšní mok je extrahován pomocí lumbální punkce (extrakce likvoru pomocí tzv. punkční jehly v bederní oblasti páteře za použití lokálního anestetika,

viz obrázek 6) [29]. Lze stanovit řadu parametrů, které mohou indikovat onemocnění. V okamžiku lumbální punkce lze stanovit tlak v mozkomíšním moku, který bývá během onemocnění zvýšený. Dále lze z punktátu stanovit počet bílých krvinek a množství leukocytů. Především lze však stanovit přítomnost výše zmíněných bakterií [1, 27, 30, 33].



Obrázek 6: Lumbální punkce. Procedura pro extrakci mozkomíšního moku pro diagnózu meningitidy. Převzato z [29].

Ke stanovení bakterií se nejběžněji používá mikrobiální kultura, Gramovo zbarvení nebo latexová aglutinace. Mikrobiální kultura je nejčastěji používanou technikou (především v chudších zemích) kvůli její jednoduchosti a malým nákladům. Nevýhodou jsou však dlouhé doby inkubace (typicky 24-48 h) a velké množství falešně negativních výsledků kvůli velké

citlivosti na koncentraci a čistotu vzorku. Další problém, který omezuje detekci většiny konvenčních metod je podání antibiotik pacientům před odebráním mozkomíšního moku. Gramovo zbarvení je také méně nákladná metoda, ale neposkytuje informaci o konkrétním druhu bakterie. Latexová aglutinace je velice rychlá metoda s dobou měření do 15 minut, nicméně má velmi omezenou citlivost. Výše zmíněné použití antibiotik před lumbální punkcí značně omezuje použití této metody [30, 33].

Často se k detekci meningitidy také používá tzv. polymerázová řetězová reakce (PCR). Jedná se o metodu, vyvinutou roku 1984 americkým biochemikem Kary Mullisem, založenou na duplikaci DNA. K tomu dochází pomocí DNA polymerázy za přítomnosti dostatečného množství nukleotidů. Během reakce vzniknou z jednoho DNA fragmentu dvě identické kopie. Množství DNA se tak při každém proběhnutí reakce zdvojnásobí. Počátek kopírovaného úseku určuje tzv. primer. Lze tak selektivně množit určité úseky DNA. Po skončení reakce jsou tradičně namnožené DNA fragmenty stanoveny pomocí gelové elektroforézy. Je uváděno, že lze pomocí této metody detekovat i jedinou molekulu DNA v jinak chemicky a biologicky komplexním systému [33]. Jedná se tedy o velice citlivou a specifickou metodu. Nevýhodou této metody je ale její vysoká pořizovací a provozní cena a nutnost kvalifikované obsluhy, což značně limituje její použití v rozvojových zemích [1, 33].

Často používaná je tzv. real-time PCR, která umožňuje stanovování produktů reakce v reálném čase. Tuto metodu lze kombinovat s tzv. multiplex PCR, která využívá více primerů zároveň k současnemu stanovení více různých úseků DNA [1, 31, 33, 35]. Problémem multiplex PCR bývá zreagování a namnožení nechtěných částí genomů. Corles a spol. [31] použili multiplex real-time PCR k detekci tří nejčastějších původců bakteriální meningitidy *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Haemophilus influenzae*. s citlivostmi 88,4 %, 91,8 % a 100 % proti vzorkům dříve stanoveným mikrobiální kulturou. Jimi použitý set primerů zreagoval pouze s cílenými bakteriemi a zaznamenali tak 100 % specifčnost.

Stejně patogeny byly detekovány i pomocí SERS. Gracie a spol. [32] provedli současné stanovení těchto bakterií pomocí měření SERS DNA jednotlivých bakterií. Použili složitější proces štěpení DNA pomocí  $\lambda$ -exonukleázy a fluorescenčních značek, obsažených v syntetických vláčkách DNA. Produkty štěpení byly stanoveny v roztoku stříbrných nanočástic. Kamińska a spol. [36] pomocí SERS detekovali rovněž tyto tři patogeny a také demonstrovali možnost rychlého rozlišení mezi zdravými a nakaženými pacienty stanovením hodnot neopterinu. Analýzou infikovaných a kontrolních vzorků mozkomíšního moku zjistili, že lze pomocí SERS detekovat zvýšené hladiny neopterinu u infikovaných pacientů. K stanovení neopterinu a tří bakterií použili SERS substrát polyuhlíkatých membrán s různou

velikostí pórů, pokrytých tenkou vrstvou Au-Ag. Různá velikost pórů tohoto substrátu umožnila separaci jednotlivých komponent vzorku a stanovení jejich spekter. Spektra byla potom vyhodnocena pomocí PCA (principal component analysis – analýza hlavních komponent).

Metoda MA-SERS může nabídnout významnou alternativu pro detekci bakteriální meningitidy. Použití specifických antigenů zajišťuje specificitu detekce, zatímco magnetické nanočástice nám umožňují pracovat s velice malým množstvím vzorku a senzoru. Využitím velkého zesílení signálu metody SERS lze dosáhnout vysoké citlivosti. Samotná doba měření se může lišit vlivem mnoha faktorů jako je kvalita vzorku, kvalita a stáří připravených senzorů, instrumentální vybavení apod., řádově však ve většině případů nepřesáhne několik desítek minut [11, 12].

## **Experimentální část**

### 3. Přístrojové vybavení

Měření bylo provedeno na Ramanově mikroskopu DXR Nicolet (Thermo Scientific, U.S.A.). Mikroskop je vybaven integrovaným optickým mikroskopem se sadou objektivů 4x, 10x a 50x zvětšení. Při měření byl k excitaci použit laser o vlnové délce 633 nm. Detekce záření proběhla termoelektricky chlazeným CCD detektorem (-50 °C).

K měření, zobrazení a analýze spekter byl použit software OMNIC 8.2.0.403 od výrobce Thermo Fisher Scientific. S naměřenými spektry byla provedena diskriminační analýza v programu TQ Analyst 8.4.257 od stejného výrobce.

### 4. Použité chemikálie a příprava vzorků

Pro povrchové zesílení Ramanova signálu byly použity nanočástice stříbra připravené modifikovanou Tollensovou metodou, která tkví v redukci amoniakálního komplexu stříbrných iontů  $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$  maltózou. Tyto částice jsou poměrně monodisperzní s průměrnou velikostí částic okolo 28 nm [37]. Při této velikosti jsou tyto částice v roztoku maltózy poměrně stabilní s dlouhou dobou životnosti. Nicméně pro vlastní použití v SERS je však nutné tuto vodnou disperzi nanočástic stříbra aktivovat přidávkem roztoku chloridu sodného, abychom dosáhli požadovaného zesílení Ramanova signálu [38].

K magnetické separaci byly použity nanočástice oxidu železa povrchově modifikované karboxylovými skupinami. Na karboxylové skupiny je následně navázán streptavidin na který se naváže antigen pro příslušnou bakterii.

Použitá metoda měření navazuje na metodu použitou k detekci infekcí kloubních náhrad a využívá stejných biosenzorů pouze s odlišnými antigeny pro bakterie způsobující meningitidu. Detailnější postup přípravy těchto biosenzorů popisuje Fergašová a spol. [11] v článku „Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*“.

Testování biosenzorů pro včasnou detekci meningitidy bylo prováděno na modelových vzorcích bakteriálních lyzátů *Neisseria meningitidis* (hustota buněk přibližně  $653,9 \times 10^6$  CFU/ml), *Streptococcus pneumoniae* (hustota buněk přibližně  $165,4 \times 10^6$  CFU/ml), *Haemophilus influenzae* (hustota buněk přibližně  $262,9 \times 10^6$  CFU/ml) a *Streptococcus agalactiae* (hustota buněk přibližně  $132,9 \times 10^6$  CFU/ml) jak, ve fyziologickém roztoku, tak i v likvoru, které nám poskytl Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého.



## 5. Příprava vzorků pro SERS experimenty

Pro měření na Ramanově DXR mikroskopu byly vzorky senzorů a lyzátů bakterií připraveny následovně. Pro měření senzoru bylo na podložní sklíčko odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  roztoku funkcionalizovaných magnetických nanočástic. Ty byly poté pomocí vnějšího magnetického pole odseparovány od zbytku matrice, která byla následně ze sklíčka odpipetována. K magnetickým nanočásticím bylo napipetováno 8  $\mu\text{l}$  roztoku nanočástic stříbra (28 nm) a přidány 2  $\mu\text{l}$  4M NaCl pro jejich následnou aktivaci. Tento roztok byl promíchán ve špičce automatické pipety. Nakonec byla pomocí magnetického pole vytvořena sraženina komplexu nanočástic, tz. biosenzoru, na okraji kapky, která byla bezprostředně analyzována Ramanovým mikroskopem.

Při přípravě vzorku bakterie bylo do mikrozkuhavky typu eppendorf odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  lyzátu bakterie a 10  $\mu\text{l}$  roztoku magnetických nanočástic funkcionalizovaných příslušným antigenem. Vzorek byl důkladně promíchán a následovala inkubace po dobu 15 minut. Po uplynutí inkubační doby bylo odpipetováno 10  $\mu\text{l}$  na podložní sklíčko a byl zopakován výše popsáný postup. Vzorky bakterií v likvoru byly připraveny smícháním bakterie a likvoru v poměru 1:9 (likvor ku bakterii), není-li ve výsledcích uvedeno jinak.

Další vzorek byl připraven odpipetováním 10  $\mu\text{l}$  likvoru a 10  $\mu\text{l}$  magnetických nanočástic funkcionalizovaných příslušným antigenem do mikrozkuhavky typu eppendorf. Směs byla důkladně promíchána a následoval stejný postup popsáný výše.

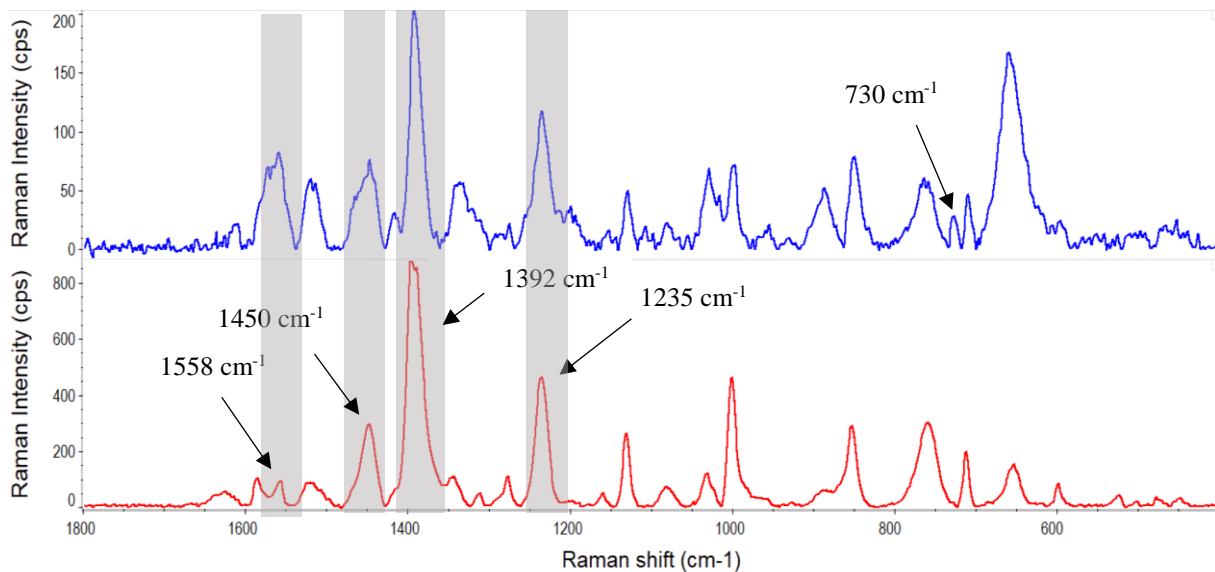
## **Výsledky a diskuze**

## 6. Vyhodnocení naměřených MA-SERS spekter

Možnost použití MA-SERS pro detekci zánětu mozkových blan, za použití antigenem funkcionalizovaných magnetických nanočástic (MNPs), byla testována na bakteriích *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*. U každé bakterie bylo použitím metody MA-SERS nejprve naměřeno spektrum samotného biosenzoru příslušné bakterie (tzv. slepý vzorek). Dále byl biosenzor aplikován na roztok lyzátu této bakterie a bylo zaznamenáno SERS spektrum tohoto vzorku. Na získaných SERS spektrech bylo zkoumáno, zda a jak se toto spektrum změní přítomností zkoumané bakterie oproti slepému vzorku. Po této základní demonstraci funkčnosti připraveného biosenzoru byl stejný postup testován s bakteriálním lyzátem v likvoru, jakožto složité biologické matrice. Za účelem testování citlivosti této metody byla pro bakterie *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae* naměřena rovněž i koncentrační řada, kdy se ředily vzorky jednotlivých bakteriálních lyzátů s likvorem. Pro tyto dvě jednotlivé bakterie bylo také současně testováno použití směsi příslušných biosenzorů v poměru 1:1 za účelem selektivně vázat požadovaný analyt ze vzorku.

### 6.1. *Neisseria meningitidis*

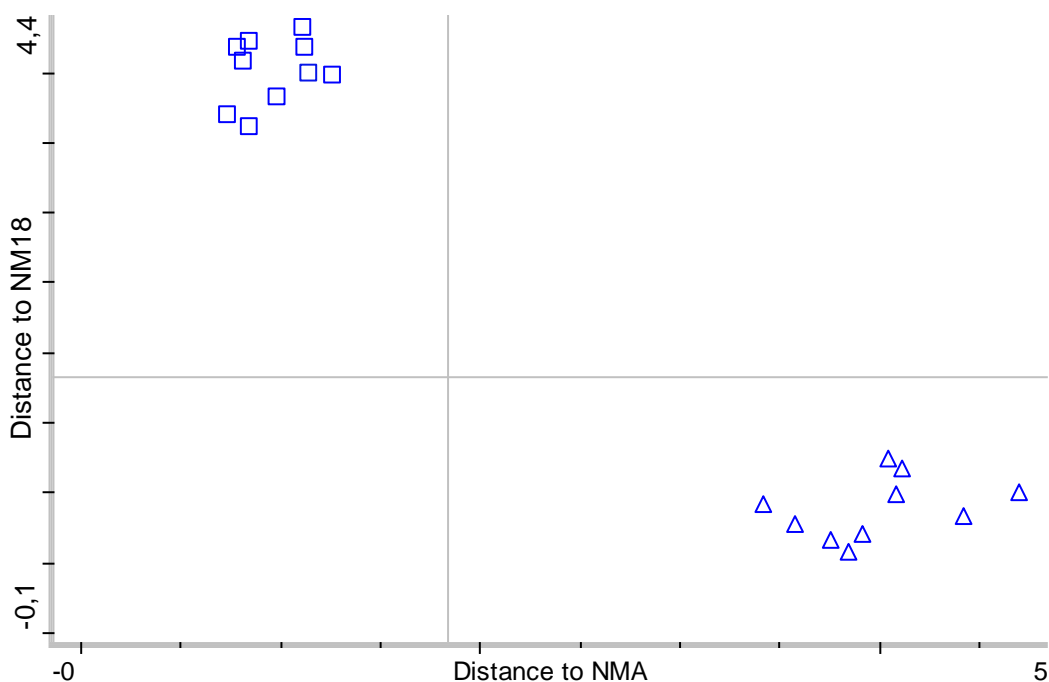
První stanovovaná bakterie byla *Neisseria meningitidis*. Na grafu 1 můžeme vidět rozdíl mezi vybranými spektry slepého vzorku (NMA) a vzorku s bakterií (NM18). Mezi spektry můžeme pozorovat zřetelné rozdíly. Nejvíce se soustředíme na charakteristické pásy odpovídající částem proteinové struktury. Pásy při  $1235\text{ cm}^{-1}$  a při  $1392\text{ cm}^{-1}$  bývají označovány jako Amid III pásy. Jako Amid II pásy jsou potom označovány pásy při  $1558\text{ cm}^{-1}$  a  $1450\text{ cm}^{-1}$ . Další významný pás, indikující přítomnost bakterie, vznikl při  $730\text{ cm}^{-1}$  a je spojován s charakteristickými vibracemi glykosidické vazby v molekulách tvořících buněčné stěny bakterií [10,11]. Jako další významný indikátor přítomnosti bakterie slouží poměr intenzit proteinových pásů  $1392\text{ cm}^{-1}$  a  $1558\text{ cm}^{-1}$ . Poměr  $I_{1392}/I_{1558}$  se označuje jako PBR (z anglického „protein band ratio“). Po úspěšné interakci příslušného biosenzoru s bakteriálním lyzátem *Neisseria meningitidis* došlo k poklesu PBR hodnoty z 8,80 na hodnotu 2,28.



Graf 1: Vzorová SERS spektra analýzy bakterie *Neisseria meningitidis*. Dolní spektrum červenou čarou odpovídá biosenzu (NMA), horní spektrum modrou čarou odpovídá vzorku s lyzátem bakterie (NM18).

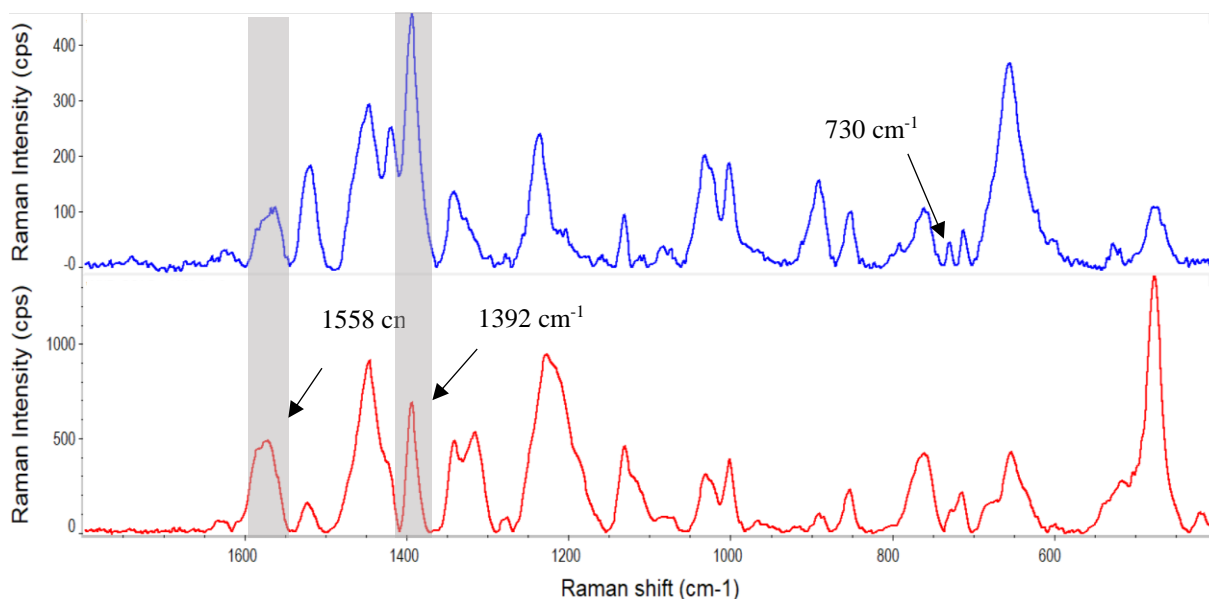
Pro každý vzorek bylo provedeno deset opakovaných měření, které byly následně klasifikovány algoritmem diskriminační analýzy (DA), která umožňuje grafické znázornění odlišnosti (resp. podobnosti) naměřených SERS spekter. Na grafu 2 body označené čtverci představují SERS spektra biosenzoru (každý pod představuje jedno naměřené spektrum) a body označené trojúhelníky představují SERS spektra vzorku obsahující stanovovanou bakterii. Z obrázku je patrné, že obě třídy tvoří jednoznačně oddělené shluky, které můžeme charakterizovat Mahalanobisovými vzdálenostmi. Vnitřní vzdálenost charakterizuje přesnost měření a je žádoucí, aby byla co nejmenší. Naopak velká vzdálenost mezi třídami nám umožňuje od sebe jednoznačně vzorky odlišit a v našem případě tak můžeme říci, zda došlo k úspěšné detekci bakterie či nikoliv.

Průměrná hodnota vzdálenosti uvnitř jednotlivých tříd odpovídá hodnotám 0,97 pro čistý biosenzor (NMA), 0,89 pro biosenzor s navázanou bakterií (NM18). Naopak průměrná hodnota meziklastrové Mahalanobisovy vzdálenosti mezi třídami odpovídá hodnotě 4,00. Z těchto hodnot je tedy patrné, že můžeme použitím DA snadno rozlišit mezi spektry čistého biosenzoru a senzoru s bakteriálním lyzátem.

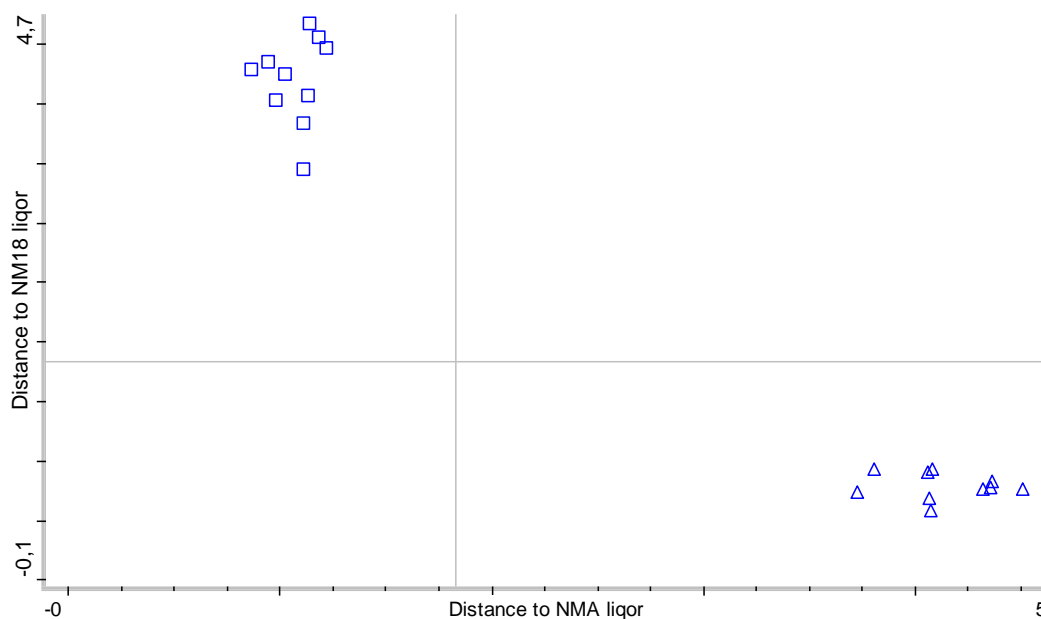


Graf 2: Diskriminační analýza naměřených spekter pro stanovení bakterie *Neisseria meningitidis*. Body označené čtverci představují SERS spektra biosenzoru (NMA) a body označené trojúhelníky představují SERS spektra vzorku s lyzátem bakterie (NM18).

Po demonstrování rozlišitelnosti SERS spekter biosenzoru a lyzátu bakterie, bylo provedeno měření stejného bakteriálního lyzátu v likvoru. Porovnání spekter biosenzoru aplikovaného na čistý likvor (horní spektrum) a biosenzoru aplikovaného na roztok likvoru inokulovaného lyzátem bakterie *Neisseria meningitidis* v koncentraci  $588,51 \times 10^6$  CFU/ml (dolní spektrum) lze vidět na grafu 3. Průměrná hodnota PBR se snížila z 4,45 u biosenzoru aplikovaného na čistý likvor (NMA1q) na 1,79 pro vzorek likvoru inokulovaného bakterií (NM181q). Při klasifikování těchto vzorků diskriminační analýzy (graf 4) odpovídají průměrné vnitřní vzdálenosti hodnotám 1,07 pro biosenzor (NMA1q) a 0,78 pro biosenzor s navázanou bakterií (NM181q). Průměrná meziklastrová vzdálenost pak odpovídá hodnotě 2,43.

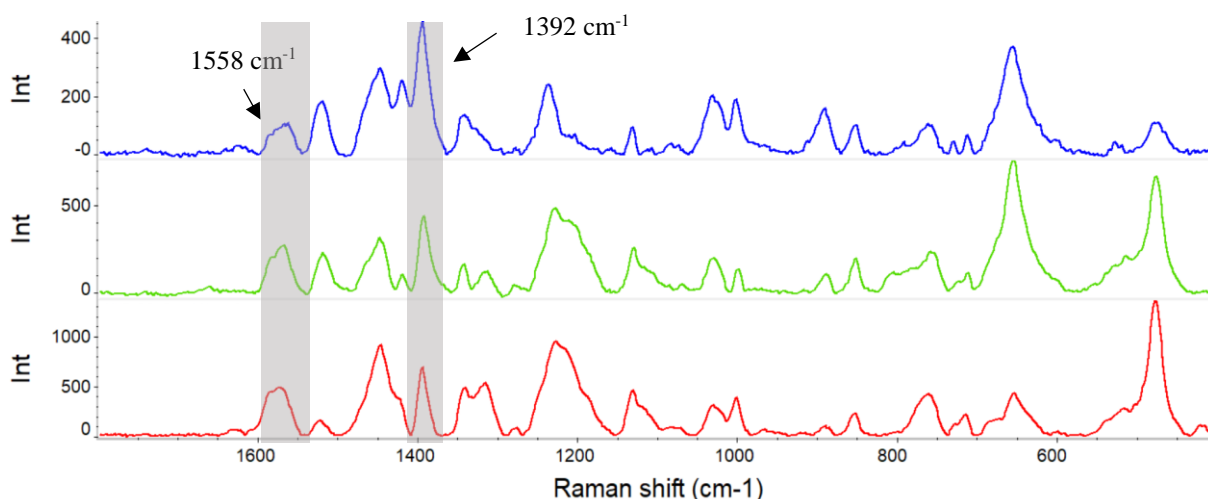


Graf 3: Vzorová SERS spektra analýzy bakterie *Neisseria meningitidis* v roztocích likvoru. Dolní spektrum červenou čarou odpovídá biosenzu aplikovaného na čistý likvor (NMA1q) a horní spektrum modrou čarou odpovídá roztoku likvoru inokulovaného lyzátem dané bakterie (NM181q).

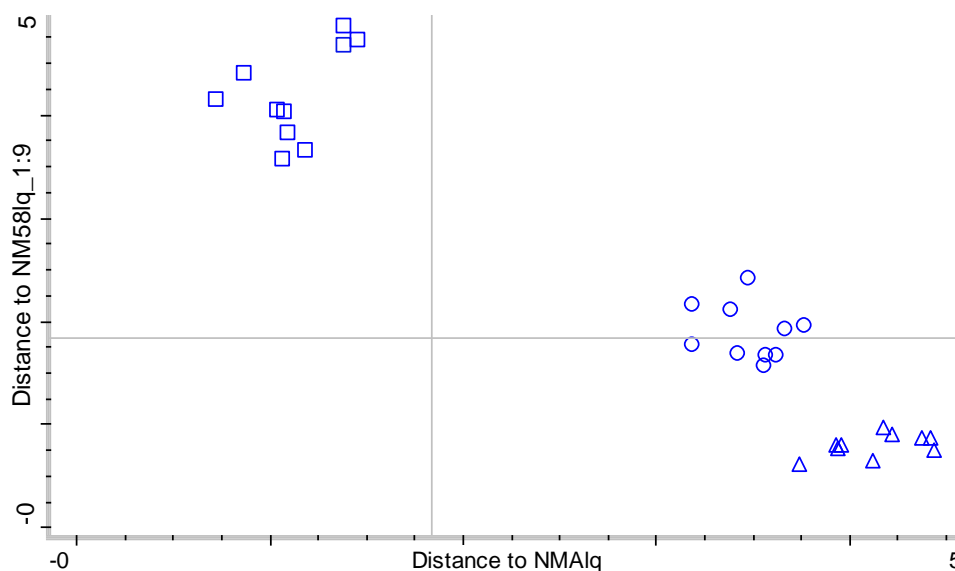


Graf 4: Diskriminační analýza naměřených spekter pro stanovení bakterie *Neisseria meningitidis* v roztocích likvoru. Body označené čtverci představují SERS spektra biosenzoru aplikovaného na čistý likvor aplikovaného na čistý likvor (NMA1q) a body označené trojúhelníky představují SERS spektra roztoku likvoru inokulovaného lyzátem dané bakterie (NM181q).

Je zjevné, že i v roztoku likvoru bylo možné jednoznačně rozlišit mezi SERS spektry biosenzoru a vzorkem bakterie. Pro bakterii *Neisseria meningitidis* byla následně naměřena koncentrační řada. Nejkoncentrovanější roztok lyzátu s bakterií byl zhotoven s koncentrací  $588,51 \times 10^6$  CFU/ml. Postupně byly měřeny nižší koncentrace až po nejnižší naměřenou koncentraci  $16,35 \times 10^6$  CFU/ml. Pro ilustraci jsou na grafu 5 zobrazena spektra vzorků o těchto koncentracích v porovnání se spektrem biosenzoru aplikovaného na čistý likvor. Jak je již uvedeno výše, průměrná hodnota PBR biosenzoru se snížila z 4,45 na 1,79 u vzorku s nejvyšší koncentrací a na 1,57 u vzorku o koncentraci  $16,35 \times 10^6$  CFU/ml. Na grafu 6 je ukázána DA všech tří koncentrací s vnitřními vzdálenostmi odpovídajícími 1,07 pro biosenzor, 0,90 pro vzorek v koncentraci  $588,51 \times 10^6$  CFU/ml a 0,82 pro vzorek v koncentraci  $16,35 \times 10^6$ . Vzdálenosti mezi klastry odpovídají 3,20 mezi biosenzorem a vzorkem vysoké koncentrace, 2,90 mezi biosenzorem a vzorkem nízké koncentrace a 1,74 mezi vzorkem s vysokou a vzorkem s nízkou koncentrací. Na DA a srovnání spekter můžeme vidět, že i po značném zředění původního roztoku byl roztok bakterie jednoznačně identifikovatelný.



Graf 5: Srovnání SERS spekter různých koncentrací bakterie *Neisseria meningitidis* v roztocích likvoru. Červenou čarou je zobrazeno spektrum čistého biosenzoru, modrou čarou spektrum vzorku o koncentraci  $588,51 \times 10^6$  CFU/ml a zelenou čarou vzorek o koncentraci  $16,35 \times 10^6$  CFU/ml.

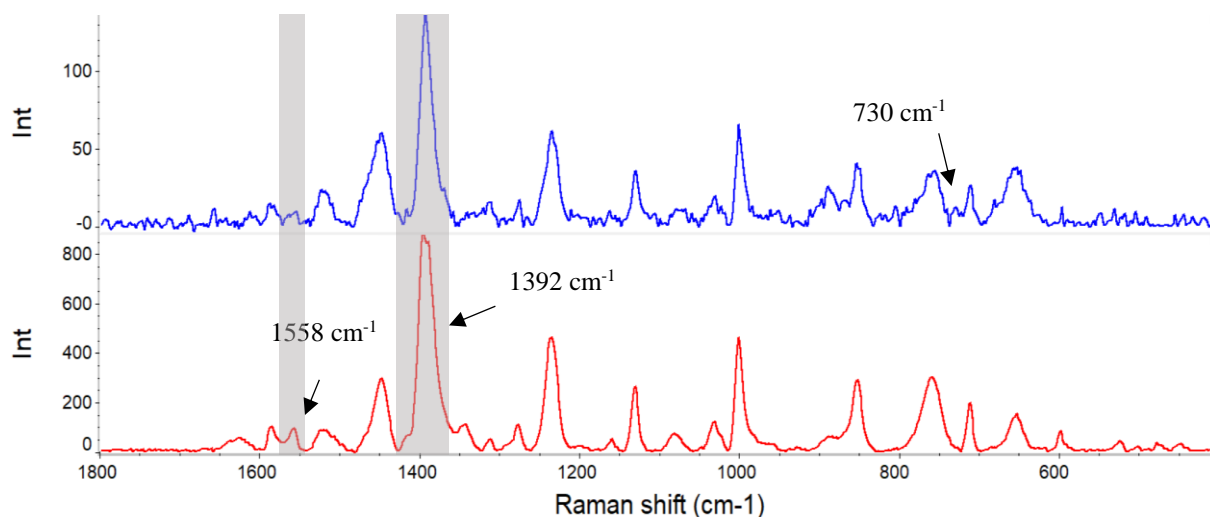


Graf 6: Diskriminační analýza pro stanovení bakterie *Neisseria meningitidis* v roztocích likvoru o různých koncentracích. Čtverce reprezentují spektra čistého biosenzoru, kolečka spektra vzorku o koncentraci  $588,51 \times 10^6$  CFU/ml a trojúhelníky vzorek o koncentraci  $16,35 \times 10^6$  CFU/ml.

## 6.2. *Streptococcus pneumoniae*

Obdobná analýza byla provedena i pro vzorky lyzátů bakterie *Streptococcus pneumoniae*. V grafu 7 můžeme opět pozorovat znatelné rozdíly mezi SERS spektry biosenzoru (SPA) a spektry biosenzoru aplikovaného na lyzát bakterie (SP58). Stejně jako v případě bakterie *Neisseria meningitidis* můžeme i v případě *Streptococcus pneumoniae* pozorovat ve spektrech charakteristické proteinové pásy Amid II a Amid III a změnu jejich poměrů. V tomto případě vzrostla hodnota PBR z 8,91 pro biosenzor na 10,56 pro vzorek bakterie. Stejně tak můžeme v SERS spektru vzorku bakterie vidět poněkud méně výrazný charakteristický pás vibrace glykosidické vazby při  $730 \text{ cm}^{-1}$ .

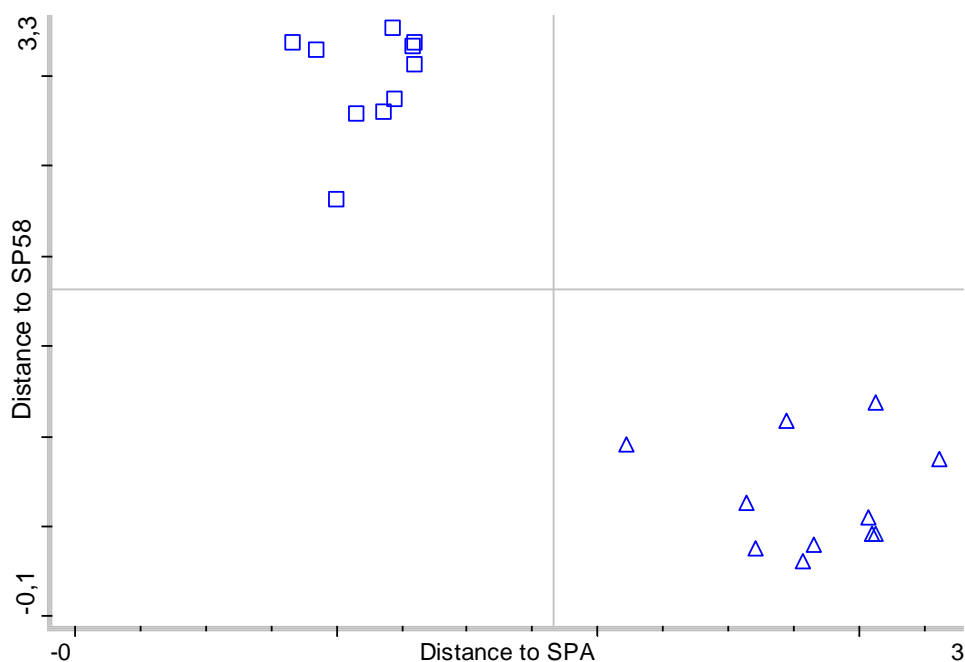




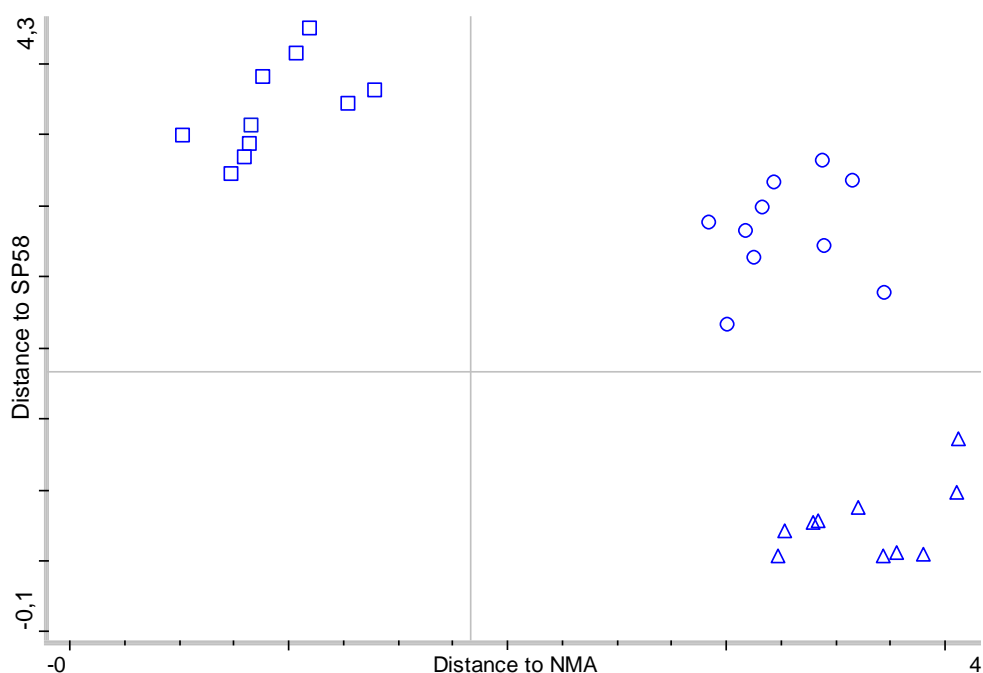
Graf 7: Ukázková SERS spektra pro bakterii *Streptococcus pneumoniae*. Dolní spektrum červenou čarou odpovídá biosenzoru pro danou bakterii a horní spektrum modrou čarou odpovídá biosenzoru aplikovanému na lyzát této bakterie.

V grafu 8 je uvedena DA pro samotný biosenzor (SPA) a biosenzor aplikovaný na vzorek lyzátu bakterie (SP58). Vnitřní vzdálenosti tříd odpovídají 1,12 pro biosenzor a 0,66 pro vzorek bakterie. Meziklastrová vzdálenost pak odpovídala hodnotě 2,89. Stejně jako v předchozím případě i tyto výsledky jasně demonstrují funkčnost MA-SERS biosenzoru.

Graf 9 ukazuje pro ilustraci DA, která vedle sebe zobrazuje třídy biosenzoru bakterie *Neisseria meningitidis* (NMA), vzorek této bakterie po aplikaci biosenzoru (NM18) a vzorek bakterie *Streptococcus pneumoniae* po aplikaci příslušného biosenzoru (SP58). Vnitřní vzdálenosti tříd odpovídají v pořadí, v jakém jsou uvedeny, hodnotám 1,06, 0,87 a 0,78. Vzdálenosti mezi klastry odpovídají 4,33 mezi NMA a NM18, 2,3 mezi NMA a SP58 a 2,83 mezi NM18 a SP58. Jasně rozlišení všech třech tříd poukazuje na úspěšnost této MA-SERS metody detekce a identifikace infekce mozkomíšního moku.



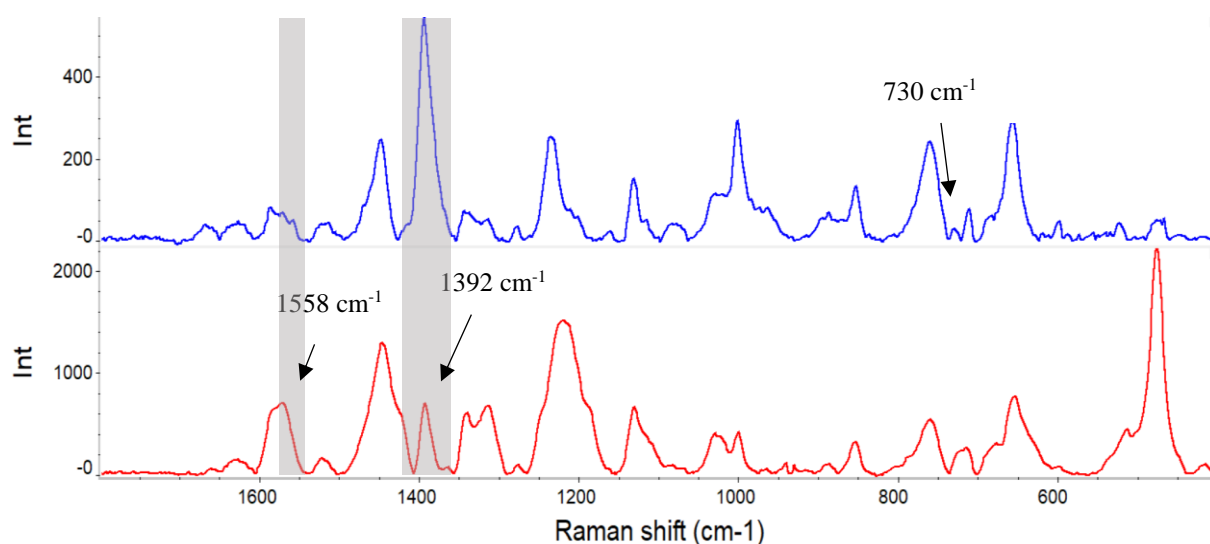
Graf 8: Diskriminační analýza pro bakterii *Streptococcus pneumoniae*. Body označené čtverci představují SERS spektra biosenzoru pro tuto bakterii (SPA) a body označené trojúhelníky představují spektra biosenzoru aplikovaného na lyzát této bakterie (SP58).



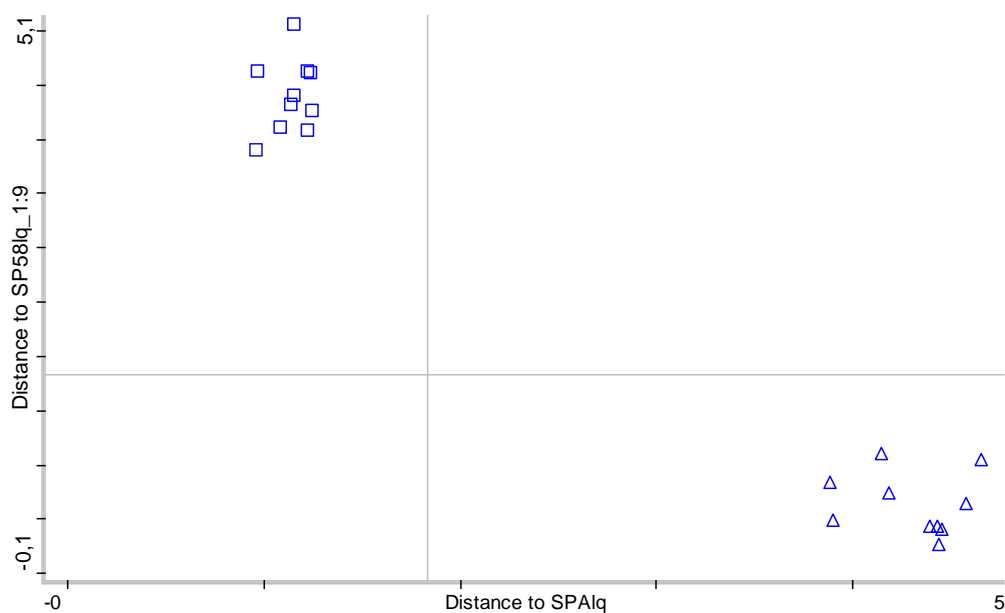
Graf 9: Ilustrace rozlišitelnosti bakterií pomocí DA. Body označené čtverci představují SERS spektra biosenzoru bakterie *Neisseria meningitidis* (NMA), body označené trojúhelníky vzorek této bakterie po aplikaci biosenzoru (NM18) a body označené kolečky označují vzorek bakterie *Streptococcus pneumoniae* po aplikaci příslušného biosenzoru (SP58).

Vzorová SERS spektra vzorků biosenzorů v likvoru (SPA1q) a roztoku lyzátu bakterie *Streptococcus pneumoniae* v likvoru v koncentraci  $148,84 \times 10^6$  CFU/ml (SP581q\_1:9) jsou ukázána v grafu 10. Hodnota PBR vzrostla 1,05 pro SPA1q a 6,68 pro SP581q\_1:9. Diskriminační analýza je zobrazena v grafu 11 s vnitřními vzdálenostmi odpovídajícími 1,12 pro SPA1q, 0,71 pro SP581q a vzdáleností mezi klastry 2,79. I v tomto případě lze jednoznačně rozeznat vzorky s bakterií v likvoru od čistého biosenzoru.

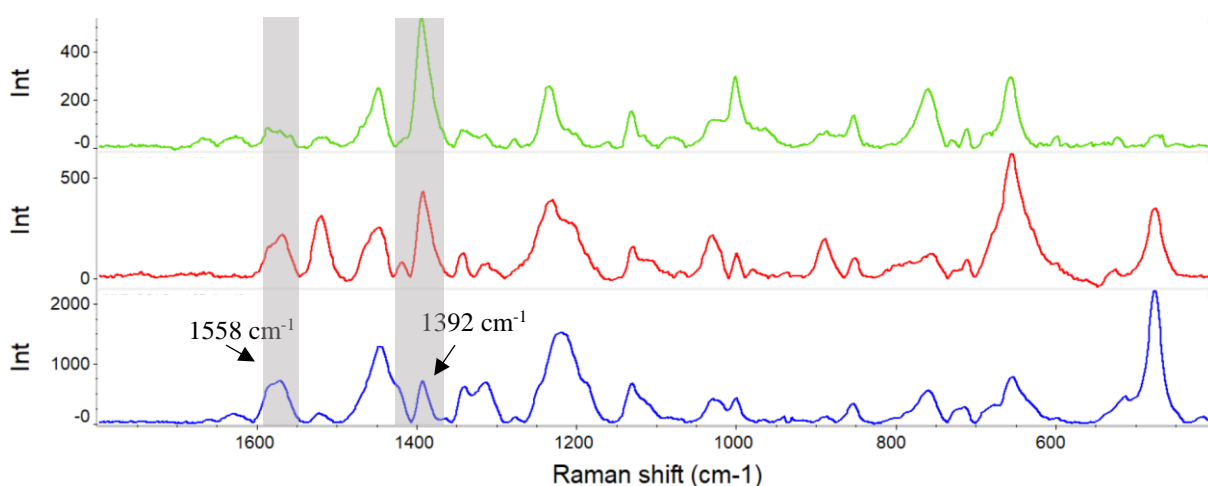
Koncentrační řada byla zhotovena i pro tuto bakterii s nejnižší připravenou koncentrací  $4,13 \times 10^6$  CFU/ml (SP581q\_39:1). Ze spekter v grafu 12 a DA zobrazené v grafu 13 opět vidíme, že jsme schopni bakterie rozlišit i při tomto zředění. Mahalabisonovy vzdálenosti u DA odpovídaly hodnotám 1,26 pro SPA1q, 0,79 pro SP58\_1:9 a 0,62 pro SP58\_39:1. Vzdálenosti mezi klastry odpovídaly 3,67 mezi SPA1q a SP58\_1:9, 2,85 mezi SPA1q a SP58\_39:1 a 1,80 mezi SP58\_1:9 a SP58\_39:1.



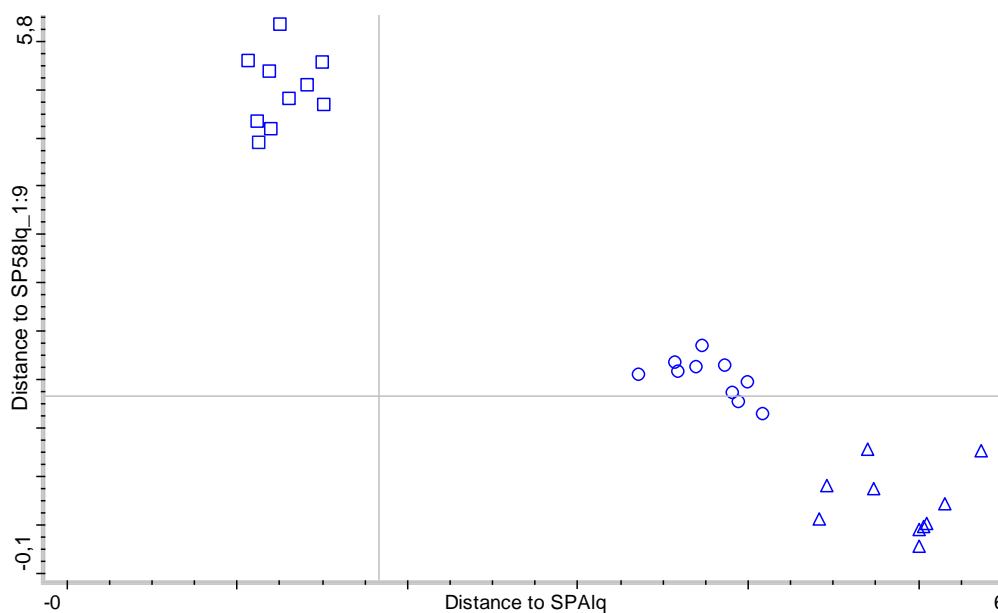
Graf 10: Příklad SERS spekter pro analýzu bakterie *Streptococcus pneumoniae* v roztocích likvoru. Dolní spektrum červenou čarou odpovídá biosenzu aplikovaného na čistý likvor (SPA1q) a horní spektrum modrou čarou odpovídá roztoku likvoru aplikovaného na lyzáty dané bakterie (SP581q\_1:9).



Graf 11: Diskriminační analýza naměřených spekter pro stanovení bakterie *Streptococcus pneumoniae* v roztocích likvoru. Body označené čtverci představují SERS spektra biosenzoru aplikovaného na čistý likvor aplikovaného na čistý likvor (SPAIq) a body označené trojúhelníky představují SERS spektra roztoku likvoru inokulovaného lyzátem dané bakterie (SP58lq\_1:9).



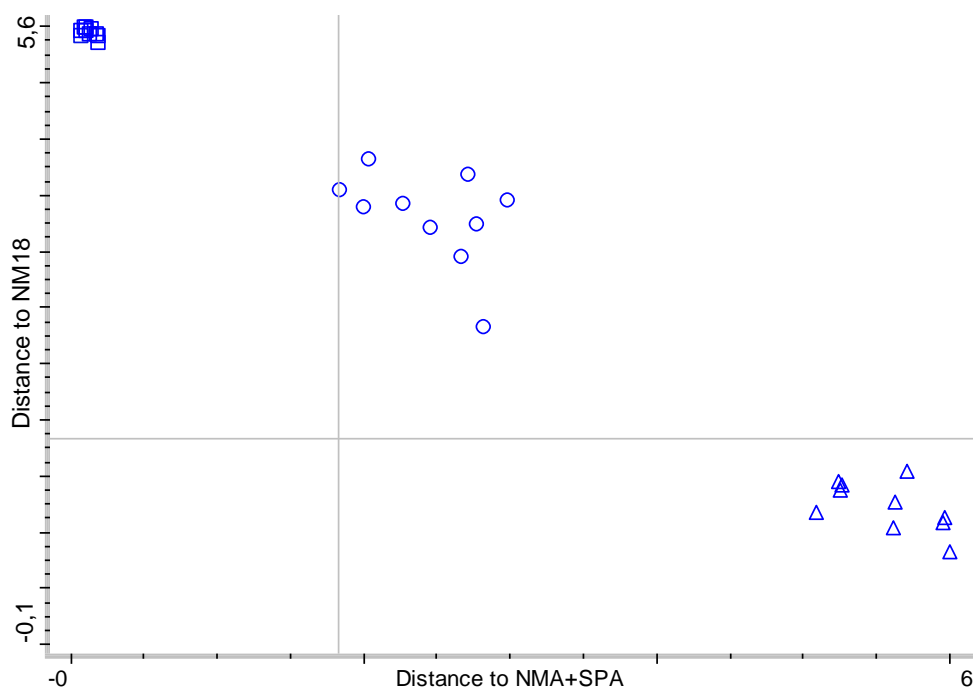
Graf 12: Srovnání SERS spekter různých koncentrací bakterie *Streptococcus pneumoniae* v roztocích likvoru. Modrou čarou je zobrazeno spektrum čistého biosenzoru (SPAIq), červenou čarou spektrum vzorku o koncentraci  $148,84 \times 10^6$  CFU/ml (SP58lq\_1:9) a zelenou čarou vzorek o koncentraci  $4,13 \times 10^6$  CFU/ml (SP58lq\_39:1).



Graf 13: Diskriminační analýza pro stanovení bakterie *Streptococcus pneumoniae* v roztocích likvoru o různých koncentracích. Čtverce reprezentují spektra čistého biosenzoru, kolečka spektra vzorku o koncentraci  $148,84 \times 10^6$  CFU/ml a trojúhelníky vzorek o koncentraci  $4,13 \times 10^6$  CFU/ml.

### 6.3. Směs senzorů

Pro praktickou aplikaci analytických metod, je vždy ceněna univerzálnost metody. Testovat vzorek na jednotlivé bakterie může být časově náročné. Proto byla připravena směs senzorů pro bakterii *Neisseria meningitidis* (NMA) a *Streptococcus pneumoniae* (SPA) v poměru 1:1 a pomocí této byly změřeny jednotlivé vzorky příslušných bakterií. Z DA v grafu 14 můžeme vidět, že i pomocí směsi obou senzorů lze jednoznačně rozlišit třídy pro senzor a třídy jednotlivých bakterií. Vnitřní vzdálenosti odpovídají 0,13 pro směs senzorů, 1,23 pro směs senzorů aplikovanou na lyzát bakterie *Neisseria meningitidis* (NM) a 0,99 pro směs senzorů aplikovanou na lyzát bakterie *Streptococcus pneumoniae* (SP). Vzdálenosti mezi klastry odpovídají 4,29 mezi směsí senzorů a vzorkem NM ,2,06 mezi směsí senzorů a vzorkem SP a 3,03 mezi vzorky bakterií.

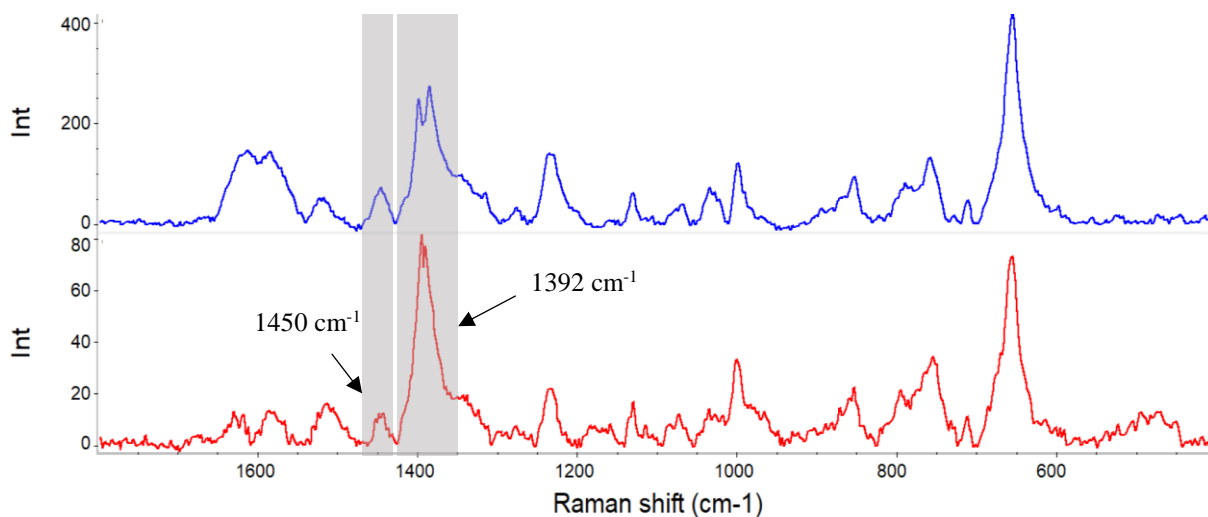


Graf 14: Body označené čtverci představují jednotlivá SERS spektra směsi senzorů bakterií *Neisseria meningitidis* (NMA) a *Streptococcus pneumoniae* (SPA), kolečka představují spektra směsi senzorů aplikované na lyzát bakterie *Neisseria meningitidis* a body označené trojúhelníky představují spektra směsi senzorů aplikované na lyzát bakterie *Streptococcus pneumoniae*.

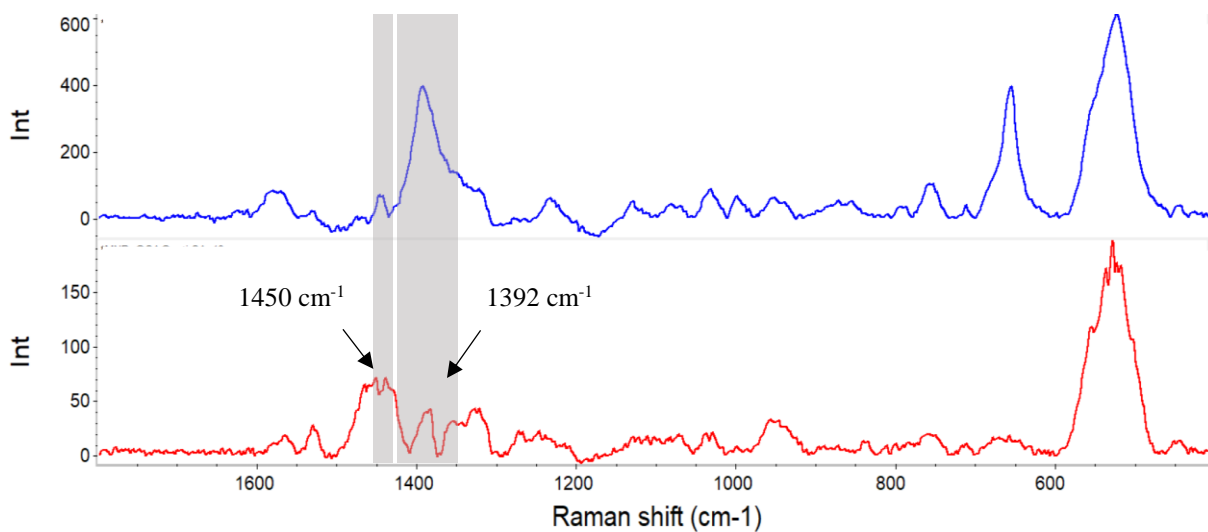
#### 6.4. *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*

Jako poslední byly testovány bakterie *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*. Srovnání SERS spekter pro tyto dvě bakterie nalezneme v grafech 15 a 16. Na rozdíl od předchozích bakterií nebyl v těchto spektrech výrazný proteinový pás při  $1558\text{ cm}^{-1}$ . Z toho důvodu byl místo něj pro výpočet hodnoty PBR využit spektrální pás ležící při  $1450\text{ cm}^{-1}$  v poměru  $I_{1392}/I_{1450}$ . V tomto poměru došlo u bakterie *Haemophilus influenzae* ke změně z hodnoty 2,92 pro biosenzor (HIA) na hodnotu 4,74 pro vzorek bakterie (HI1). U bakterie *Streptococcus agalactiae* došlo ke zvýšení PBR hodnoty z 1,16 u biosenzoru (SAA) na 4,08 u vzorku lyzátu bakterie (SA39).

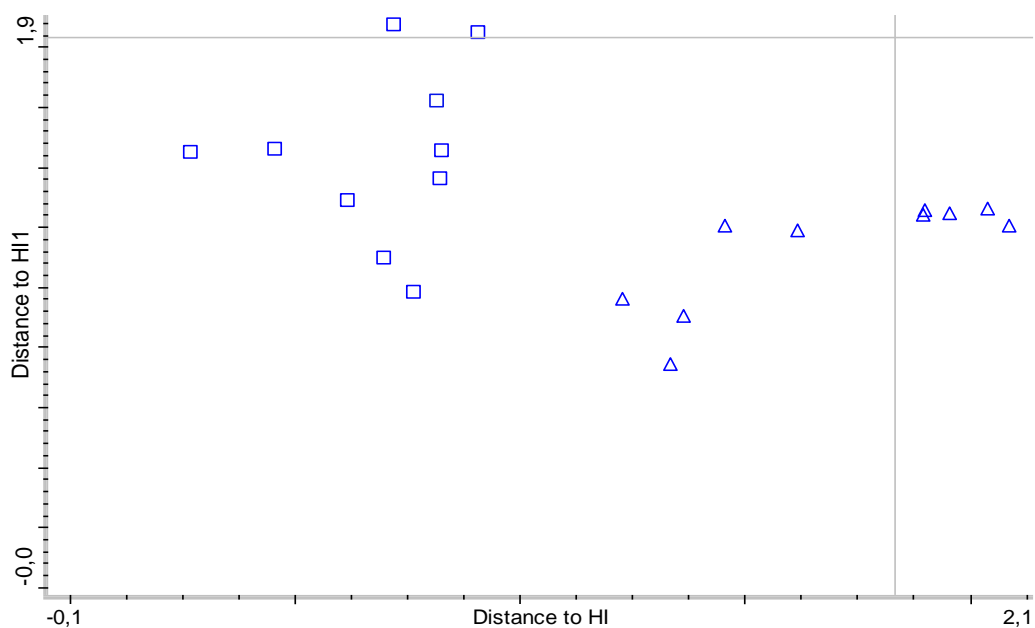
Jako v předchozích případech byla pro obě bakterie zhotovena diskriminační analýza (DA). U *Haemophilus influenzae* (graf 17) odpovídají vnitřní vzdálenosti 0,69 pro HIA, 1,12 pro HI1 a vzdálenost mezi klastry odpovídá 1,44. Pro *Streptococcus agalactiae* (graf 18) odpovídají vnitřní vzdálenosti 0,67 pro SAA, 1,06 pro SA39 a vzdálenost mezi třídami odpovídá 2,46. Můžeme vidět, že rozdíl mezi spektry biosenzoru a bakterie je u těchto bakterií poněkud méně výrazný (zejména u *Haemophilus influenzae*), nicméně stále rozlišitelný.



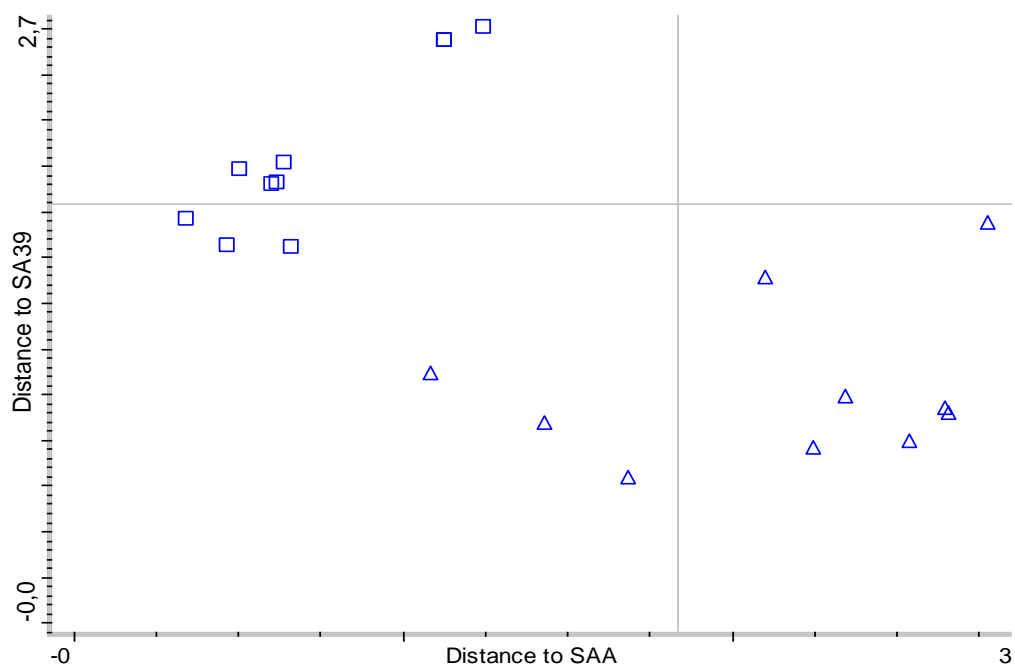
Graf 15: Srovnání vzorových SERS spekter bakterie *Haemophilus influenzae*. Dolní spektrum červenou barvou náleží samotnému biosenzoru (HIA) a horní spektrum modrou barvou náleží biosenzoru aplikovaného na lyzát bakterie (HI1)



Graf 16: Vybraná spektra bakterie *Streptococcus agalactiae*. Dolní spektrum červenou čarou reprezentuje spektrum biosenzoru (SAA) a horní spektrum modrou čarou reprezentuje spektrum biosenzoru aplikovaného na lyzát bakterie (SA39).



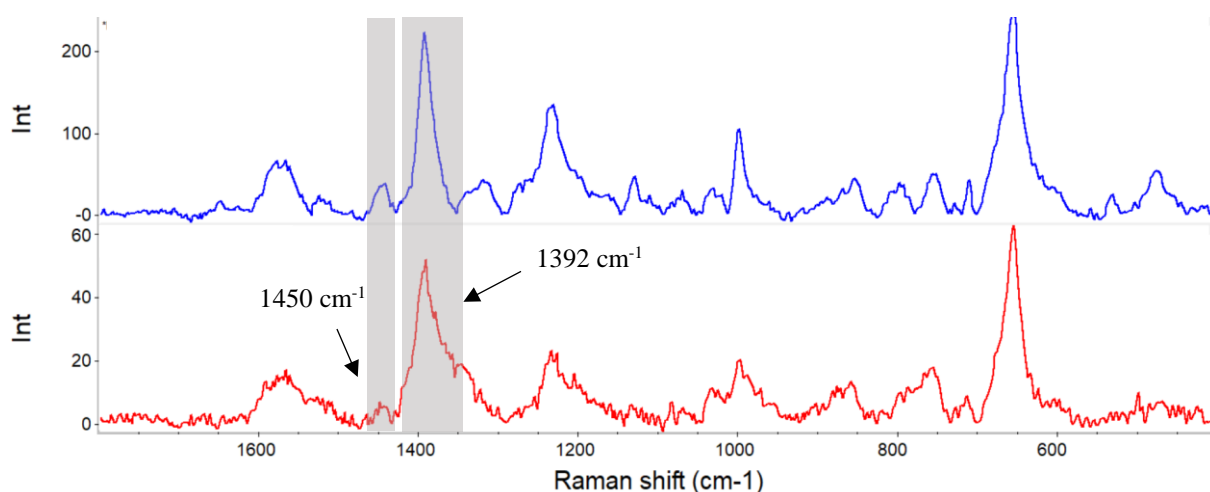
Graf 17: Diskriminační analýza bakterie *Haemophilus influenzae*. Body označené čtverci představují jednotlivá spektra biosenzoru (HIA) a body označené trojúhelníky představují spektra vzorků bakterie po aplikaci biosenzoru(HI1).



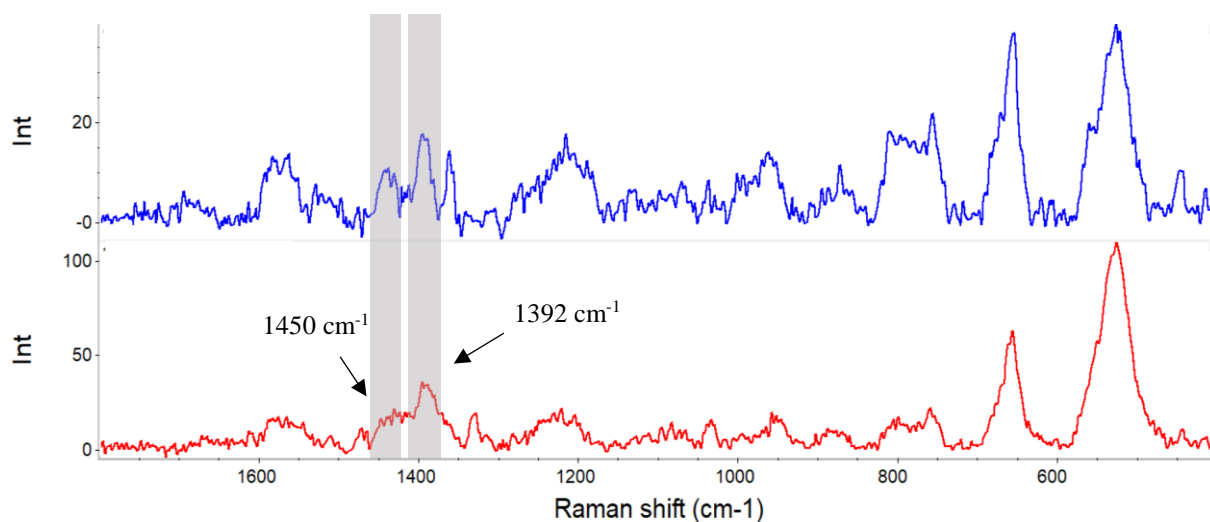
Graf 18: Diskriminační analýza pro *Streptococcus agalactiae*. Body označené čtverci představují jednotlivá spektra biosenzoru pro tuto bakterii (SA) a body označené trojúhelníky představují spektra vzorků bakterie po aplikaci tohoto biosenzoru (SA39).



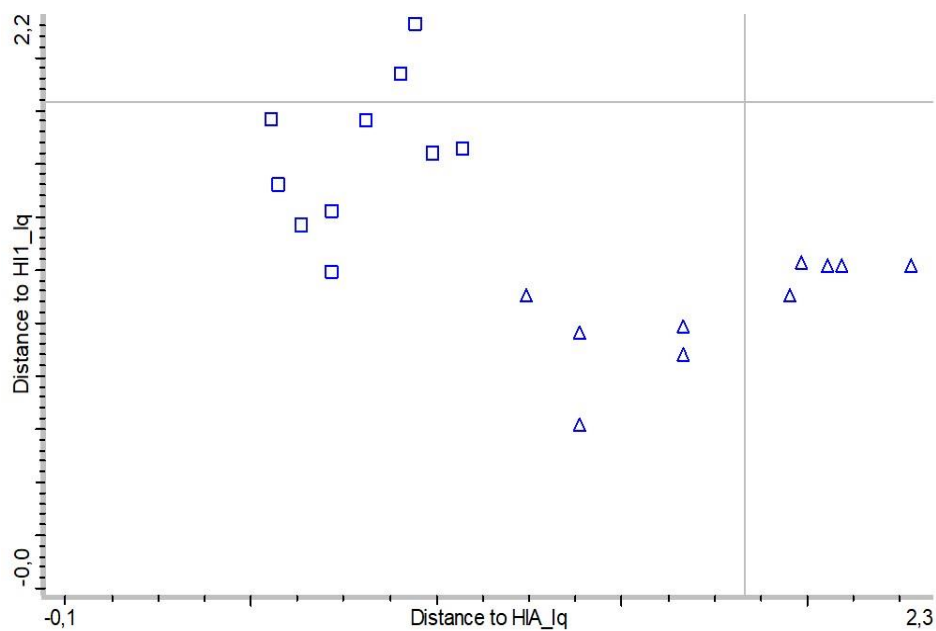
Dále, jako v předchozích případech, byla změřena spektra pro roztoky likvoru. Srovnání vzorových spekter nalezneme na grafech 19 a 20. Pro stanovení PBR byl opět použit poměr  $I_{1392}/I_{1450}$ . U *Haemophilus influenzae* došlo ke snížení hodnoty PBR ze 6,55 pro biosenzor v roztoku likvoru (HIA\_lq) na 5,04 pro vzorek bakterie v likvoru (HI1\_lq) v koncentraci  $263 \times 10^6$  CFU/ml (výchozí koncentrace lyzátu byla  $525,8 \times 10^6$  CFU/ml). U bakterie *Streptococcus agalactiae* došlo ke změně hodnoty PBR z 2,17 pro biosenzor v roztoku likvoru (SAA\_lq) na 3,16 pro vzorek bakterie v likvoru (SA39\_lq) o koncentraci  $119,61 \times 10^6$  CFU/ml (s původní koncentrací lyzátu  $132,9 \times 10^6$  CFU/ml). Diskriminační analýzy pro obě bakterie jsou zobrazeny v grafech 21 a 22. Vnitřní vzdálenostmi odpovídají 0,79 pro HIA\_lq, 1,05 pro HI1\_lq, 0,88 pro SAA\_lq, 0,94 pro SA39\_lq a vzdálenosti mezi klastry odpovídají hodnotám 1,64 mezi HIA\_lq a HI1\_lq a 1,52 mezi SAA\_lq a SA39\_lq.



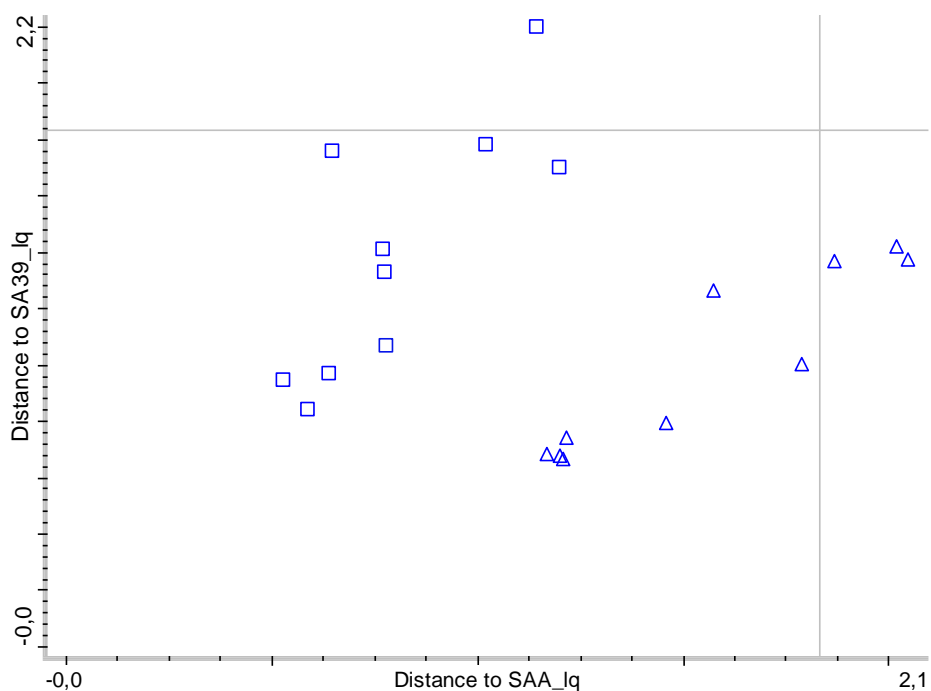
Graf 9: Srovnání vzorových SERS spekter bakterie *Haemophilus influenzae*. Dolní spektrum červenou barvou reprezentuje roztok biosenzoru v likvoru (HIA\_lq) a horní spektrum modrou barvou reprezentuje roztok bakterie v likvoru po aplikaci biosenzoru (HI1\_lq).



Graf 20: Srovnání vybraných SERS spekter bakterie *Streptococcus agalactiae*. Dolní spektrum červenou barvou představuje biosenzor (SAA\_lq) a horní spektrum modrou barvou představuje vzorek bakterie v likvoru (SA39\_lq).



Graf 21: Diskriminační analýza pro roztok bakterie *Haemophilus influenzae* v likvoru. Body označené čtverci představují jednotlivá spektra roztoku senzoru v likvoru (HIA\_lq) a body označené trojúhelníky představují spektra vzorků bakterie v likvoru (HI1\_lq).



Graf 21: Diskriminační analýza pro roztok bakterie *Streptococcus agalactiae* v likvoru. Body označené čtverci představují jednotlivá spektra roztoku senzoru v likvoru (SAA\_lq) a body označené trojúhelníky představují spektra vzorků bakterie v likvoru (SA39\_lq).

Pro přehlednost byly výsledky předchozích kapitol shrnuty v následujících tabulkách. Tabulka č. 1 obsahuje výsledky pro bakterie *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae*. Tabulka č. 2 shrnuje výsledky bakterií *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*.

Tabulka 1(a)		Tabulka 1(b)	
vzorek	PBR ( $I_{1392}/I_{1558}$ )	vzorek	PBR ( $I_{1392}/I_{1450}$ )
NMA	8,80	HIA	2,92
NM18	2,28	HI1	4,74
NMA_lq	4,45	HIA_lq	6,55
NM18_lq 1:9	1,79	HI1_lq 1:9	5,04
SPA	8,91	SAA	1,16
SP58	10,56	SA39	4,08
SPA_lq	1,05	SAA_lq	2,17
SP58_lq 1:9	6,68	SA39_lq 1:9	3,16

Tabulka 1: Souhrn výsledků hodnot PBR pro jednotlivé vzorky. Pro bakterie *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae* byl pro výpočet PBR použit poměr  $I_{1392}/I_{1558}$  (a) a pro bakterie *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae* byl použit poměr  $I_{1392}/I_{1450}$  (b).

Tabulka 2 (a)		
HIA; HI1	Vnitřní vzdálenosti	Vzdálenosti mezi třídami
HIA	0,69	
HI1	1,12	
HI – HI1		1,44
HIA_lq; HI1_lq 1:9		
HIA_lq	0,79	
HI1_lq 1:9	1,05	
HI_lq - HI1_lq 1:9		1,64
SAA; SA39		
SAA	0,67	
SA39	1,06	
SA – SA39		2,46
SAA_lq; SA39_lq 1:9		
SAA_lq	0,88	
SA39_lq 1:9	0,94	
SA_lq - SA39_lq 1:9		1,52

Tabulka 2 (b)		
NMA; NM18	Vnitřní vzdálenosti	Vzdálenosti mezi třídami
NMA	0,97	
NM18	0,89	
NMA – NM18		4,00
NMA_lq; NM18_lq 1:9		
NMA_lq	1,07	
NM18_lq 1:9	0,78	
NMA_lq - NM18_lq 1:9		2,43
NMA_lq; NM18_lq 1:9; NM18_lq 39:1		
NMA_lq	1,07	
NM18_lq 1:9	0,90	
NM18_lq 39:1	0,82	
NMA_lq - NM18_lq 1:9		3,20
NMA_lq - NM18_lq 39:1		2,90
NM18_lq 1:9 - NM18_lq 39:1		1,74
SPA; SP58 1:9		
SPA	1,12	
SP58	0,66	
SPA – SP58		2,89
SPA_lq; SP58_lq		
SPA_lq	1,12	
SP58_lq 1:9	0,71	
SPA_lq – SP58_lq 1:9		2,79
SPA_lq; SP58_lq 1:9; SP58_lq 39:1		
SPA_lq	1,26	
SP58_lq 1:9	0,79	
SP58_lq 39:1	0,62	
SPA_lq - SP58_lq 1:9		3,67
SPA_lq - SP58_lq 39:1		2,85
SP58_lq 1:9 - SP58_lq 39:1		1,80
NMA + SPA; NM18; SP58		
NMA + SPA	0,13	
NM18	1,23	
SP58	0,99	
[NMA + SPA] – NM18		4,29
[NMA + SPA] – SP58		2,06
NM18 – SP58		3,03

Tabulka 2: Výsledky Mahalabinosonových vzdáleností pro DA spekter bakterií bakterie *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae* (a) a *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae* (b).

## Závěr

Tato práce se zabývá vývojem analytické metody pro rychlou diagnostiku bakteriální meningitidy detekováním a identifikováním bakteriálních patogenů pomocí magneticky asistované povrchem zesílené Ramanovy spektroskopie. I přes značné pokroky v medicíně v oblasti vakcinace a léčby, zůstává meningitida stále velice závažným onemocněním s vysokou mortalitou. Současné běžné metody detekce mají často dlouhé doby měření, které mohou vést ke komplikaci léčby. Naše analytická metoda se tak snaží nabídnout jednoduchou a časově nenáročnou alternativu k detekci meningitidy. Analyzovány byly nejčastější bakterie způsobující meningitidu, konkrétně *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae*.

Pro MA-SERS byly použity magnetické nanočástice funkcionalizované antigenem příslušné bakterie. K zesílení Ramanova signálu byly použity nanočástice stříbra aktivované roztokem NaCl. Nejdříve byly testovány lyzáty výše zmíněných bakterií. Po úspěšných výsledcích bylo provedeno měření roztoku lyzátu v likvoru. Pro bakterie *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae* byla změřena koncentrační řada a byla také otestována možnost detekce bakterií za použití směsi senzorů těchto dvou bakterií.

Ve všech případech jsme byli schopni rozlišit přítomnost bakterií díky rozdílným hodnotám PBR a statistickým rozdělením pomocí diskriminační analýzy. Nejlepší výsledky jsme zaznamenali u bakterií *Neisseria meningitidis* a *Streptococcus pneumoniae*. Výsledky u bakterií *Haemophilus influenzae* a *Streptococcus agalactiae* byly více zatížené šumem a fluorescencí, nicméně i přes horší výsledky i spektra těchto bakterií byly rozlišitelné od spekter slepých vzorků.

Pro praktické použití této metody je třeba dalšího výzkumu, zejména aplikace na vzorky mozkomíšního moku reálných pacientů. Nicméně výsledky této práce demonstrují velký potenciál, který má tato metoda jako rychlý a snadný analytický nástroj pro diagnózu závažného infekčního onemocnění mozkových blan – meningitidy.

## Seznam použitých zkratek

DA	diskriminační analýza
HIA	senzor pro bakterii <i>Haemophilus influenzae</i>
HI1	vzorek lyzátu bakterie <i>Haemophilus influenzae</i>
HIA_lq	senzor pro bakterii <i>Haemophilus influenzae</i> v likvoru
HI1_lq	vzorek lyzátu bakterie <i>Haemophilus influenzae</i> v likvoru
MA-SERS	magneticky asistovaná povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
MNPs	magnetické nanočástice
NM	<i>Neisseria meningitidis</i>
NM18	vzorek lyzátu bakterie <i>Neisseria meningitidis</i>
NM18lq	vzorek lyzátu bakterie <i>Neisseria meningitidis</i> v likvoru
NMA	senzor pro bakterii <i>Neisseria meningitidis</i>
NMA_lq	senzor pro bakterii <i>Neisseria meningitidis</i> v likvoru
NPs	nanočástice
PBR	<i>protein band ratio</i> ; poměr proteinových pásů
PCR	polymerázová řetězová reakce
SAA	senzor pro bakterii <i>Streptococcus agalactiae</i>
SA39	vzorek lyzátu bakterie <i>Streptococcus agalactiae</i>
SAA_lq	senzor pro bakterii <i>Streptococcus agalactiae</i> v likvoru
SA39_lq	vzorek lyzátu bakterie <i>Streptococcus agalactiae</i> v likvoru
SERS	<i>surface enhanced Raman spectroscopy</i> ; povrchem zesílená Ramanova spektroskopie
SP	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SP58	vzorek lyzátu bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SP58lq	vzorek lyzátu bakterie <i>Streptococcus pneumoniae</i> v likvoru
SPA	senzor pro bakterii <i>Streptococcus pneumoniae</i>
SPA_lq	senzor pro bakterii <i>Streptococcus pneumoniae</i> v likvoru

## Seznam použité literatury

- [1] NOUR, N. a A. ALAIDAROUS. *Clinical usefulness and accuracy of polymerase chain reaction in the detection of bacterial meningitis agents in pediatric cerebrospinal fluid* [online]. 2018 [cit. 2019-07-07].
- [2] MOSIER-BOSS, Pamela A. Review on SERS of Bacteria. *Biosensors* [online]. 2017 [cit. 2019-02-28]. ISSN 2079-6374.
- [3] HAMM, Logan, GEE, Amira, DE SILVA, Indrasekara, Swarnapali. *Recent Advancement in the Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-Based Biosensors for Infectious Disease Diagnosis* [online]. 2019 [cit. 2019-07-02].
- [4] WITKOWSKA, Evelin, Krzysztof NICIŃSKI, Dorota KORSAK, Tomasz SZYMBORSKI a Agnieszka KAMIŃSKA. *Sources of variability in SERS spectra of bacteria: comprehensive analysis of interactions between selected bacteria and plasmonic nanostructures*[online]. 2019 [cit. 2019-07-02].
- [5] CHISANGA, Malama, Howbeer MUHAMADALI, David I. ELLIS a Royston GOODACRE. *Enhancing Disease Diagnosis: Biomedical Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering*. 2019.
- [6] SONG, Dan, Rong YANG, Feng LONG a Anna ZHU. Applications of magnetic nanoparticles in surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of environmental pollutants. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2018 [cit. 2019-07-02].
- [7] Raman Spectroscopy. *Omega Optical* [online]. [cit. 2019-07-02]. Dostupné z: <https://www.omegafilters.com/applications/raman-spectroscopy>
- [8] REICHL, Jaroslav a Martin VŠETIČKA. Rozptyl světla v optickém vlákně. *Encyklopedie fyziky* [online]. [cit. 2018-12-12]. Dostupné z: <http://fyzika.jreichl.com/main.article/view/1671-rozptyl-svetla-v-optickem-vlaknu>
- [9] In: *ResearchGate* [online]. [cit. 2019-07-02]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Illustration-showing-Rayleigh-scattering-Stokes-Raman-scattering-and-Anti-Stokes\\_fig7\\_274567896](https://www.researchgate.net/figure/Illustration-showing-Rayleigh-scattering-Stokes-Raman-scattering-and-Anti-Stokes_fig7_274567896).
- [10] DENDISOVÁ, Marcela, Pavel ŽVÁTORA a Pavel MATĚJKA. *RAMANOVA SPEKTROMETRIE* [online]., 22 [cit. 2017-12-12]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>.



- [11] FARGAŠOVÁ, Ariana, Anna BELZNEROVÁ, Robert PRUCEK, Radek ZBOŘIL, RANC, Miroslava Htoutou SEDLÁKOVÁ, Milan KOLÁŘ a Václav RANC. Detection of Prosthetic Joint Infection Based on Magnetically Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Analytical chemistry*. 2017, (89), 6598–6607.
- [12] BALZEROVÁ, Anna, Ariana FARGAŠOVÁ, Zdenka MARKOVÁ, Václav RANC a Radek ZBOŘIL. Magnetically-Assisted Surface Enhanced Raman Spectroscopy (MASERS) for Label-Free Determination of Human Immunoglobulin G (IgG) in Blood Using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Ag Nanocomposite. *Analytical chemistry*. 2014, (86), 11107–11114.
- [13] WEBER, I., U. BÖTTGER, S. G. PAVLOV a H.-W. HÜBERS. *Mineralogical and Raman spectroscopy studies of natural olivines exposed to different planetary environments* [online]. 2014 [cit. 2019-07-02].
- [14] *Resonant vs. Nonresonant Raman Spectroscopy* [online]. [cit. 2019-07-07]. Dostupné z:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational\\_Spectroscopy/Raman\\_Spectroscopy/Resonant\\_vs.\\_Nonresonant\\_Raman\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Resonant_vs._Nonresonant_Raman_Spectroscopy).
- [15] TUSCHEL, David. *Resonant vs. Nonresonant Raman Spectroscopy* [online]. 2018 [cit. 2019-07-07]. Dostupné z:  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\\_Textbook\\_Maps/Supplemental\\_Modules\\_\(Physical\\_and\\_Theoretical\\_Chemistry\)/Spectroscopy/Vibrational\\_Spectroscopy/Raman\\_Spectroscopy/Resonant\\_vs.\\_Nonresonant\\_Raman\\_Spectroscopy](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Vibrational_Spectroscopy/Raman_Spectroscopy/Resonant_vs._Nonresonant_Raman_Spectroscopy).
- [16] What is Raman Spectroscopy?. *About Sickle Cell Disease* [online]. 2004 [cit. 2019-07-15]. Dostupné z: <http://www.sicklecellinfo.net/raman.htm>.
- [17] FLEISCHMANN, M., HENDRA, P.J., MCQUILLAN, A.J. *Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode*. 1974, 163–166 [cit. 2019-07-02].
- [18] JEANMAIRE, D.L., VANDUYNE, R.P. *Surface Raman spectroelectrochemistry. I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic-amines adsorbed on anodized silver electrode*. 1977, 1–20 [cit. 2019-07-02].
- [19] *The Science of Plasmonics* [online]. [cit. 2019-07-03]. Dostupné z: <https://nanocomposix.com/pages/the-science-of-plasmonics#target>.

- [20] Single-Domain Antibody-Conjugated Nanoaggregate-Embedded Beads for Targeted Detection of Pathogenic Bacteria. *Chemistry – A European Journal* [online]. 2009, **15**(37), 9330-9334 [cit. 2019-07-03]. DOI: 10.1002/chem.200901397. ISSN 09476539. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.200901397>.
- [21] SCHLUCKER, S. *Surface-enhanced Raman spectroscopy: Concepts and chemical applications*. 2014. [cit. 2019-07-03]
- [22] LIU, Yu, Haibo ZHOU, Ziwei HU, Guangxia YU, Danting YANG a Jinshun ZHAO. *Label and label-free based surface-enhanced Raman scattering for pathogen bacteria detection: A review* [online]. [cit. 2019-07-06].
- [23] MURPHY, C.J., SAU, T.K., GOLE, A.M., ORENDORFF, C.J., GAO, J., GOU, L., HUNYADI, S.E., LI, T. *Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications*. 2005 [cit. 2019-07-03]
- [23] SAGAR, Aryal. Introduction to Antigen. *Microbiology Notes* [online]. 2017 [cit. 2019-07-15]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/introduction-to-antigen/>
- [24] INDRASEKARA, A.S.D.S., MEYERS, S., SHUBEITA, S., FELDMAN, L.C., GUSTAFSSON, T., FABRIS, L. *Gold nanostar substrates for SERS-based chemical sensing in the femtomolar regime*. 2014. [cit. 2019-07-03]
- [25] *Gram Stain Technique* [online]. 2011 [cit. 2019-07-07]. Dostupné z: <https://vlab.amrita.edu/?sub=3&brch=73&sim=208&cnt=1>.
- [26] CABELLO, Gema, Kenneth C. NWOKO, José F. MARCO, María SÁNCHEZ-ARENILLAS, Ana María MÉNDEZ-TORRES, Jorg FELDMANN, Claudia YÁÑEZ a Tim A. D. SMITH. *Cu@Au self-assembled nanoparticles as SERS-active substrates for (bio)molecular sensing* [online]. 2019 [cit. 2019-07-04].
- [27] WALUK, Jacek. Highly efficient SERS-based detection of cerebrospinal fluid neopterin as a diagnostic marker of bacterial infection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, 2016, **408**(16), 4319-4327 [cit. 2019-07-07]. DOI: 10.1007/s00216-016-9535-7. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-016-9535-7>.
- [28] *Encyclopedia Britannica: Antigen* [online]. 2016 [cit. 2019-03-01]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/antigen>
- [29] Meningitis. *Mayo Clinic* [online]. [cit. 2018-05-09]. Dostupné z: <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/meningitis/symptoms-causes/syc-20350508>.

- [30] MCGILL, Fiona, Robert S HEYDERMAN, Stravos PANAGIOTOU, Allan R TUNKEL a Tom SOLOMON. *Acute bacterial meningitis in adults* [online]. 2011 [cit. 2019-07-07].
- [31] CORLESS, C. E., M. GUIVER, R. BORROW, V. FOX a E. B. KACZMARSKI. Simultaneous Detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in Suspected Cases of Meningitis and Septicemia Using Real-Time PCR. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY* [online]. 2001, 1553–1558 [cit. 2019-07-16].
- [32] GRACIE, Kirsten, Elon CORREA, Samuel MABBOTT, Jennifer A. DOUGAN, Duncan GRAHAM, Royston GOODACRE a Karen FAULDS. Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chem. Sci* [online]. 2014, **5**(3), 1030-1040 [cit. 2019-07-17]. DOI: 10.1039/C3SC52875H. ISSN 2041-6520. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C3SC52875H>
- [33] BASPINAR, Emel Ödemis, Saim DAYAN, Muhammed BEKCIBASI, Recep TEKIN, Özcan DEVECI a Salih HOSOGLU. *Comparison of culture and PCR methods in the diagnosis of bacterial meningitis* [online]. 2016 [cit. 2019-07-07].
- [35] SOLANKI, Gaurav. POLYMERASE CHAIN REACTION. *International Journal of Pharmacological Research* [online]. 2012 [cit. 2019-07-16].
- [36] KAMIŃSKA, Agnieszka, Evelin WITKOWSKA, Aneta KOWALSKA, Anna SKOCZYŃSKA, Patrycja RONKIEWICZ, Tomasz SZYMBORSKI a Jacek WALUK. Rapid detection and identification of bacterial meningitis pathogens in ex vivo clinical samples by SERS method and principal component analysis. *Analytical Methods* [online]. 2016, **8**(22), 4521-4529 [cit. 2019-07-18]. DOI: 10.1039/C6AY01018K. ISSN 1759-9660. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY01018K>
- [37] PANÁČEK, Aleš, Libor KVÍTEK, Robert PRUCEK, et al. Silver Colloid Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Their Antibacterial Activity. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2006, **110**(33), 16248-16253 [cit. 2019-07-30]. DOI: 10.1021/jp063826h. ISSN 1520-6106. Dostupné z: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp063826h>

- [38] PRUCEK, Robert, Aleš PANÁČEK, Ariana FARGAŠOVÁ, Václav RANC, Vlastimil MAŠEK, Libor KVÍTEK a Radek ZBOŘIL. Re-crystallization of silver nanoparticles in a highly concentrated NaCl environment—a new substrate for surface enhanced IR-visible Raman spectroscopy. *CrystEngComm* [online]. 2011, **13**(7) [cit. 2019-08-03]. DOI: 10.1039/c0ce00776e. ISSN 1466-8033. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0ce00776e>