

IMUNOCHEMICKÁ DETEKCE RODU *Cronobacter*

BARBORA JAVŮRKOVÁ, MARTINA
BLAŽKOVÁ, LADISLAV FUKAL
a PAVEL RAUCH

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

Došlo 3.2.11, přijato 23.2.11.

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

Úvod

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

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

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

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

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

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

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

Experimentální část

Materiál

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

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

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

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

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

Metody

Příprava vzorků

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

Enzymová imunoanalýza

Příprava konjugátu protilátky s peroxidasou

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

Postup ELISA

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

Vyhodnocení metody ELISA

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

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

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

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

Imunochromatografická detekce kronobakterů

Příprava nitrocelulózové membrány

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

Příprava konjugátu protilátka-uhlíkové nanočástice

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

Sestavení testu

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

Výsledky a diskuse

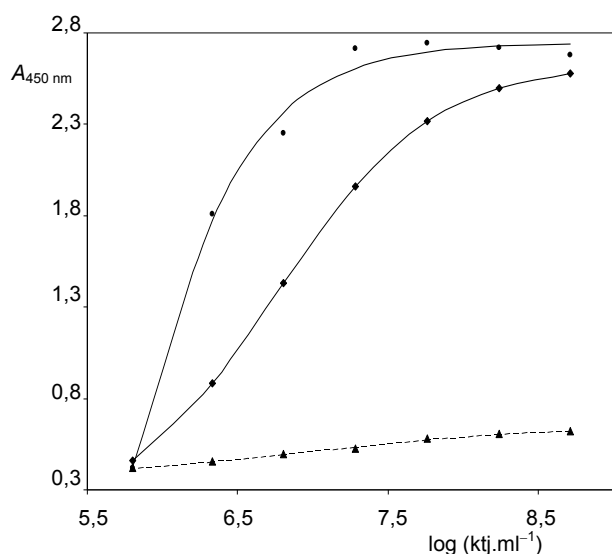
K sestavení nových imunochemických metod byl používán kmen *Cronobacter sakazakii* (Cb44) a nikoliv kmen, kterým bylo imunizováno. K ověření interakce s jinými bakteriemi byl používán zástupce rodu *Enterobacter* kmen *Enterobacter cloacae* (Eb 22).

Enzymová imunoanalýza

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

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

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



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

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

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

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

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

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

Imunochromatografická detekce

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

Tabulka I

Vybrané (optimální) podmínky pro enzymovou imunoanalýzu (ELISA)

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

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

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

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

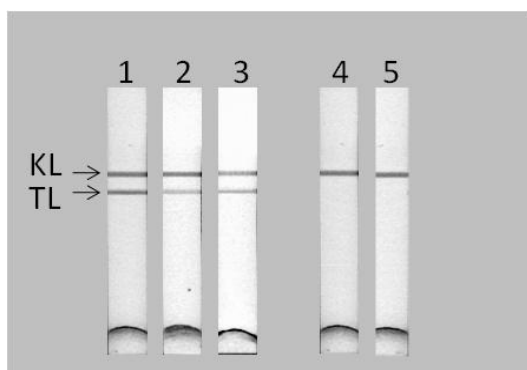
^a n – počet testovaných kmenů

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

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

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

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



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

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

Výběr vhodných podmínek detekce

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

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

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

Imunodetekce vybraných sbírkových kmenů

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

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

Závěr

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

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

LITERATURA

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

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

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

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