

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Bc. Kateřina Čížová

**Optimalizace metody izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou pro
testování vzorků pacientů s akutní infekcí horních cest dýchacích**

Optimization of a loop-mediated isothermal amplification method for testing samples of
patients with acute upper respiratory tract infection

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Petr Jeřábek, Ph.D.

Konzultantka: doc. RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

PRAHA 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 17. 5. 2023

.....

Bc. Kateřina Čížová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Petru Jeřábkovi, PhD. za možnost vypracovat diplomovou práci na zajímavé téma. Děkuji za jeho odborné vedení, cenné rady a pomoc, kterou mi při zpracování diplomové práce poskytl. Ráda bych také poděkovala paní doc. RNDr. Markétě Martínkové, PhD. za její velkou ochotu, čas, který si na mě vždy našla a za poskytnuté rady ke zpracování diplomové práce. Děkuji také mé rodině a partnerovi za jejich nekonečnou podporu v průběhu celého mého studia.

Vypracování této diplomové práce bylo podpořeno a umožněno grantem 8F20011 MŠMT v rámci mezinárodního konsorcia studujícího prevenci antibiotikové rezistence zaměřením na správnou léčbu pneumonií u dětí, konkrétně “Prevention of antibiotic resistance by TARGEd Treatment of pneumonia in children (TARGET)“.

Abstrakt

Bakterie *Staphylococcus aureus* je v současnosti jednou z nejčastěji detekovaných patogenních bakterií v laboratorní praxi. Problematická je zejména z pohledu antimikrobiální rezistence. Důležitým nástrojem v boji s tímto patogenním mikroorganismem je vhodná metoda jeho detekce, kterou by mohla být metoda izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou. Předkládaná diplomová práce se zabývá optimalizací této metody pro detekci genu *nuc* bakterie *Staphylococcus aureus*. Byl zaveden protokol pro detekci bakterie *Staphylococcus aureus* pomocí izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou využívající nově navržené „primery“ cílící na gen *nuc*. S cílem zlepšit limit detekce metody a bojovat s falešnou pozitivitou negativní kontroly byly provedeny kroky vedoucí k optimalizaci metody. Metodou jsme byli schopni během 20 minut bezpečně odlišit vzorky obsahující templátovou DNA o koncentraci 0,05 pg/μl od vzorku negativního. Prostřednictvím optimalizovaného protokolu bylo možné spolehlivě identifikovat bakterii *Staphylococcus aureus* v klinických vzorcích odebraných z dechu pacientů. Výsledkem práce byl nový, rychlý a spolehlivý způsob detekce bakterie *Staphylococcus aureus* metodou izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou.

Klíčová slova: izotermální amplifikace DNA zprostředkovaná smyčkou (LAMP), *Staphylococcus aureus*, gen *nuc*

Abstract

The bacterium *Staphylococcus aureus* is currently one of the most frequently detected pathogenic bacteria in laboratory practice. It is particularly problematic when it comes to antimicrobial resistance. An important tool in the fight against this pathogenic microorganism is a suitable method of its detection, which could be the loop-mediated isothermal amplification method. The presented diploma thesis deals with the optimization of this method for the detection of the *nuc* gene of the *Staphylococcus aureus* bacterium. A protocol was established for the detection of *Staphylococcus aureus* bacteria using loop-mediated isothermal amplification method using newly designed "primers" targeting the *nuc* gene. To improve the detection limit of the method and to combat false positives of the negative control, steps were taken to optimize the method. Using the method, we were able to safely distinguish samples containing template DNA with a concentration of 0.05 pg/μl from a negative sample within 20 minutes. Using an optimized protocol, it was possible to reliably identify the bacterium *Staphylococcus aureus* in clinical samples taken from the breath of patients. The result of the work was a new, fast, and reliable method of detecting the bacterium *Staphylococcus aureus* using the loop mediated isothermal amplification method.

Key words: loop mediated isothermal DNA amplification (LAMP), *Staphylococcus aureus*, gene *nuc*

[IN CZECH]

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	10
1 Úvod	12
1.1 Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP)	13
1.1.1 Princip metody LAMP	13
1.1.2 <i>Bst</i> polymerasa	17
1.1.3 „Primery“ pro LAMP metodu a klíčová kritéria pro jejich návrh	18
1.1.4 Detekce a vizualizace výsledných produktů LAMP.....	19
1.1.4.1 Horizontální agarosová elektroforéza	20
1.1.4.2 Turbidimetrické stanovení	20
1.1.4.3 Detekce pomocí kalceinu.....	20
1.1.4.4 Fluorescenční detekce	21
1.1.4.5 Detekce pomocí acidobazických indikátorů	21
1.1.5 Výhody a nevýhody LAMP	21
1.1.6 Optimalizace metody LAMP	22
1.2 Charakterizace bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	23
1.2.1 Patogeneze a faktory virulence bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.2.2 Identifikace bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> prostřednictvím LAMP	24
2 Cíle diplomové práce	26
3 Přístroje, materiál a použité metody.....	27
3.1 Použité přístroje	27
3.2 Použitý materiál a chemikálie.....	27
3.2.1 Chemikálie	27
3.2.2 Templátová DNA <i>SA</i>	27
3.2.3 „Primery“ pro LAMP.....	28
3.3 Použité metody	31
3.3.1 Návrh a design LAMP „primerů“	31
3.3.2 Fluorescenční detekce průběhu LAMP reakce	32
3.3.3 Vliv koncentrace hořčnatých iontů na průběh LAMP reakce.....	34
3.3.4 Vliv přídavku fluorescenčního barviva na průběh LAMP reakce	35

3.3.5	Metoda LAMP s fluorescenční detekcí <i>SA</i> v klinických vzorcích pacientů	35
3.3.6	Vizuální detekce produktů LAMP reakce	35
3.3.7	Analýza „primerů“ sady SAs3	36
4	Výsledky	37
4.1	Tvorba konsenzuální sekvence genu <i>nuc</i> bakterie <i>SA</i> pro návrh LAMP „primerů“ pomocí programu Jalview	37
4.2	Návrh LAMP „primerů“ cílících na gen <i>nuc</i> bakterie <i>SA</i>	37
4.3	Primární testování osmi navržených sad LAMP „primerů“ pro detekci genu <i>nuc</i> bakterie <i>SA</i>	39
4.4	Sekundární testování navržených sad „primerů“	40
4.4.1	Sada „primerů“ SAs0	40
4.4.2	Sada „primerů“ SAs1	41
4.4.3	Sada „primerů“ SAs2	42
4.4.4	Sada „primerů“ SAs3	42
4.4.5	Sada „primerů“ SAs4	43
4.4.6	Sada „primerů“ SAs5	44
4.4.7	Sada „primerů“ SAs6	45
4.4.8	Sada „primerů“ SAs7	46
4.5	Optimalizace koncentrace „primerů“ sady SAs7 v LAMP reakční směsi	47
4.6	Kontaminace produkty LAMP reakce využívající „primery“ sady SAs7	49
4.7	Optimalizace sekvencí „primerů“ sady SAs3	50
4.8	Optimalizace koncentrace hořčnatých iontů v LAMP reakční směsi se sadou „primerů“ SAs3	53
4.8.1	8 mM koncentrace hořčnatých iontů	53
4.8.2	7 mM koncentrace hořčnatých iontů	53
4.8.3	5 mM koncentrace hořčnatých iontů	54
4.8.4	4 mM koncentrace hořčnatých iontů	55
4.9	Optimalizace LAMP protokolu přidavkem fluorescenčního barviva SYTO TM 82 a EvaGreen [®]	56

4.10	Optimalizace teploty a objemu LAMP reakční směsi se sadou „primerů“ SAs3	58
4.10.1	Teplota 65 °C, objem 25 a 50 µl	58
4.10.2	Teplota 67 °C, objem 10, 25 a 50 µl	60
4.10.3	Teplota 69 °C, objem 10, 25 a 50 µl	63
4.11	Detekce bakterie <i>SA</i> v klinických vzorcích metodou LAMP	66
4.12	LAMP experimenty využívající již publikované sekvence „primerů“ pro detekci DNA bakterie <i>SA</i>	68
4.13	Vizuální detekce produktů LAMP reakce a porovnání s jejich teplotou tání .	70
4.14	Analýza „primerů“ sady SAs3	72
5	Diskuse	74
6	Závěr	82
	Seznam použité literatury	83

Seznam zkratk a symbolů

AT	poměr bází adenin a thymin
B3	zadní vnější „primer“
BIP	zadní vnitřní „primer“
BL	zadní smyčkový „primer“
bp	páry bází
<i>Bst</i> polymerasa	DNA polymerasa izolovaná z bakterie <i>Geobacillus stearothermophilus</i>
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTPs	deoxyribonukleotidtrifosfáty
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
F3	přední vnější „primer“
FIP	přední vnitřní „primer“
FL	přední smyčkový „primer“
GC	poměr bází guanin a cytosin
LAMP	izotermální amplifikace DNA pomocí smyček
<i>mecA</i>	gen <i>S. aureus</i> pro protein vázající penicilin 2a
NASBA	amplifikace založená na sekvenci nukleové kyseliny
<i>nuc</i>	gen <i>S. aureus</i> pro thermonukleasu
PCR	polymerasová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
<i>SA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T_m	teplota tání [°C]

UV

ultrafialové záření

ΔG

Gibbsova volná energie [kcal/mol]

1 Úvod

Amplifikace nukleových kyselin je jednou z možných a poměrně dobře dostupných způsobů detekce patogenních mikroorganismů. Nejpoužívanější metodou amplifikace nukleových kyselin je metoda polymerasové řetězové reakce (PCR, z angl. *polymerase chain reaction*). V současnosti se ale kromě metody PCR, ať už pro detekci bakterií či virů, nabízí i množství dalších alternativ založených na různých, ale často podobných principech jako právě PCR. Jedná se například o metody jako je amplifikace s vytěšňováním řetězce [1], transkripční amplifikační systém [2], NASBA (z angl. *nucleic acid sequence-based amplification*) [3], amplifikace závislá na helikase [4] nebo metoda izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou (LAMP, z angl. *loop mediated isothermal amplification*). Metoda LAMP je molekulárně-biologický přístup vhodný pro detekci bakteriálních a virových patogenů, který je přístrojově nenáročný, velmi citlivý a specifický [5]. Detailnímu popisu metody LAMP se věnuji zejména v teoretické části předkládané diplomové práce.

V praktické části diplomové práce navazuji na část teoretickou a věnuji se metodě LAMP pro detekci bakterie *Staphylococcus aureus* (dále označovaná jako *SA*), která způsobuje akutní infekce horních cest dýchacích. Bakterie *SA* se mimo jiné vyznačuje zvýšenou rezistencí na antibiotika [6]. Antibiotická rezistence je podle Světové zdravotnické organizace, amerického Střediska pro kontrolu a prevenci nemocí a dalších světových organizací jedním z hlavních problémů 21. století [7–9]. Jedním ze způsobů, jak dané rezistenci předcházet, je včasná a správná detekce patogenu umožňující nasazení správné terapie. Vhodnou metodou detekce by mohla být právě metoda LAMP. Cílem praktické části tak bylo otestovat již navržené „primery“ pro detekci bakterie *SA*, následně navrhnout „primery“ vlastní a optimalizovat metodu LAMP tak, aby byla vhodná pro detekci bakterie *SA* ve vzorcích pacientů s akutní infekcí horních cest dýchacích.

1.1 Izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP)

V roce 1998 japonská společnost Eiken Chemical Co., Ltd. vyvinula a následně v roce 2000 publikovala metodu LAMP. Jedná se o metodu amplifikace nukleových kyselin navazující na metodu PCR [5]. Amplifikační reakce probíhá při konstantní teplotě 60-70 °C, což činí metodu výhodnou z hlediska přístrojové nenáročnosti – není nutné použití termocykleru jako např. při PCR. Zachování konstantní teploty je umožněno díky vlastnostem speciální polymerasy, jako je např. *Bst* polymerasa, která je schopná oddělit od sebe vlákna dvoušroubovice DNA za současné syntézy řetězce nového (tzv. dislokázová aktivita). Není tedy nutné zvýšení teploty pro denaturaci dvoušroubovice DNA a následné střídání teplot tak, jako je tomu v případě PCR [5].

Kromě nukleové kyseliny, kterou chceme amplifikovat a *Bst* polymerasy, obsahuje standardní reakční směs pro LAMP ještě deoxynukleotidtrifosfáty (dNTPs), pufr, MgSO₄ a sadu čtyř „primerů“ neboli krátkých sekvencí oligonukleotidů rozpoznávající specifické úseky na vlákně templátové DNA [5]. Pro urychlení reakce můžeme navíc přidat jeden až dva tzv. smyčkové „primery“ [10].

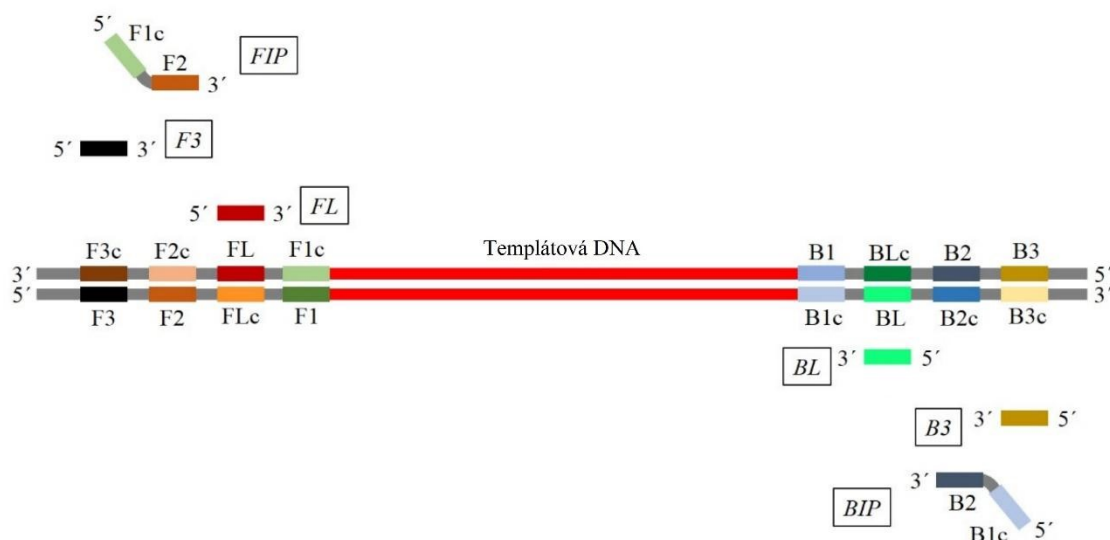
Výhodami metody jsou již zmíněná přístrojová nenáročnost, provedení reakce v uzavřené zkumavce za konstantní teploty a vyšší specifita reakce [11,12]. Metoda LAMP také nabízí množství přístupů, jak produkty amplifikace detekovat. Produkty amplifikace tak můžeme detekovat například turbidimetricky [13], fluorescenčně [14] či kolorimetricky, kdy můžeme pozorovat změnu barvy indikátorů následkem změny pH reakční směsi [15]. V současnosti probíhá intenzivní výzkum v oblasti použitelnosti metody nejen pro detekci bakteriálních patogenů, a to jak v medicíně, tak i v potravinářství [12].

1.1.1 Princip metody LAMP

V průběhu LAMP reakce dochází ke střídání několika fází – iniciační, cyklické amplifikační, elongační a recyklační fáze. Pro pochopení principu, jak amplifikační reakce probíhá, je nejprve nutné popsat „primery“ a sekvence, které jednotlivé „primery“ rozpoznávají na vláknech templátové DNA. „Primery“ pro základní LAMP reakci byly v původní práci čtyři [5], může jich ale být až šest přidáním smyčkových „primerů“ [10]. Hovoříme tedy o dvou „primerech“ vnitřních, které označujeme pomocí zkratk FIP (z angl. *forward inner primer*) a BIP (z angl. *backward inner primer*), a dvou „primerech“ vnějších, označovaných pomocí zkratk F3 (z angl. *forward outer*

primer) a B3 (z angl. *backward outer primer*). Smyčkové „primery“ označujeme jako FL (z angl. *forward loop*) a BL (z angl. *backward loop*). Vnitřní „primery“ FIP a BIP obsahují standardně 45-49 párů bází (bp, z angl. *base pair*). „Primer“ FIP se skládá ze dvou částí, a to F1c a F2. „Primer“ BIP se rovněž skládá ze dvou částí, a to B1c a B2. Vnější „primery“ F3 a B3 standardně obsahují 21-24 bp a v reakční směsi se nacházejí v nižší koncentraci než FIP a BIP [5].

Sekvence na vláknech DNA, se kterými jsou „primery“ komplementární, označujeme následovně: ve směru od 3'-5' tj. na nekódujícím řetězci je označujeme jako F3c, F2c, FL, F1c a ve směru od 5'-3' konci, tj. na kódujícím řetězci, je označujeme jako B1c, BL, B2c a B3c [5]. Znázornění rozmístění rozpoznávacích sekvencí na vláknech templátové DNA a „primery“ k sekvencím komplementární je na obrázku 2.1.

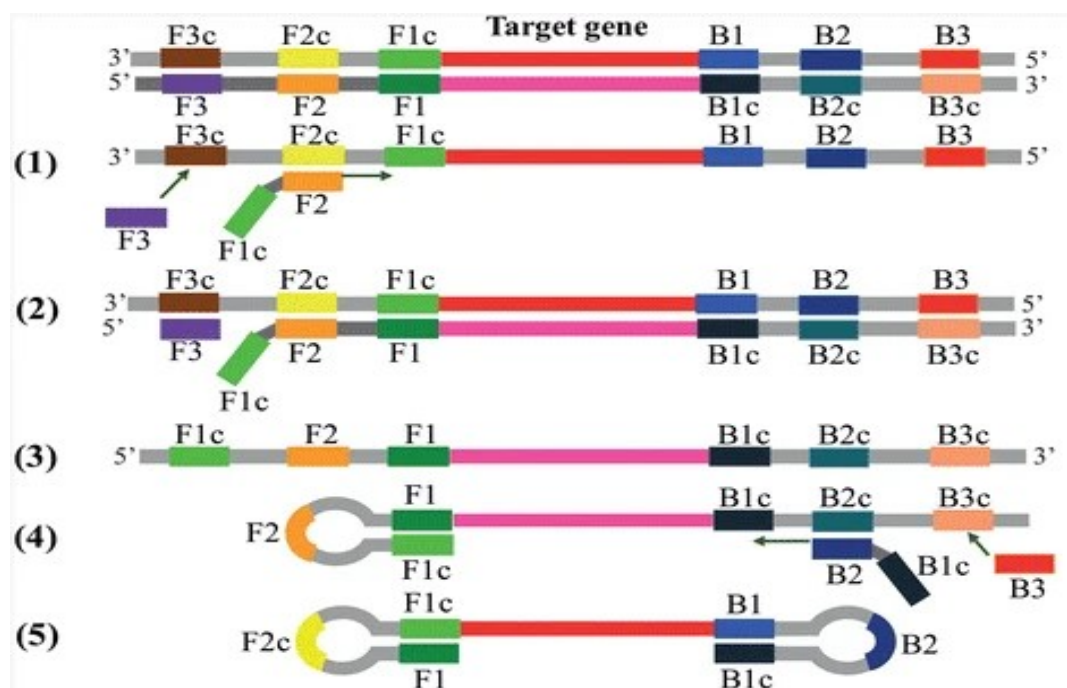


Obr. 1.1 Schéma rozmístění rozpoznávacích sekvencí na kódujícím a nekódujícím vlákně templátové DNA a znázornění „primerů“. Na nekódujícím vlákně templátové DNA se nacházejí rozpoznávací sekvence F3c, F2c, FL a F1c. Na vlákně kódujícím se nacházejí rozpoznávací sekvence B1c, BL, B2c a B3c. FIP se skládá ze sekvencí F1c a F2. F2 část FIP „primeru“ rozpoznává sekvenci F2c na vlákně templátové DNA. BIP se skládá ze sekvencí B1c a B2. B2 část BIP „primeru“ rozpoznává sekvenci B2c na vlákně templátové DNA. „Primer“ F3 rozpoznává na vlákně templátové DNA sekvenci F3c a „primer“ B3 rozpoznává sekvenci B3c. „Primer“ FL rozpoznává sekvenci FLc, „primer“ BL rozpoznává sekvenci BLc. Obrázek převzat a upraven z [16].

Pro zjednodušení reakčního mechanismu uvažujeme jedno vlákno templátové DNA od 3'-5' konci a reakci využívající čtyři „primery“. Pro druhé vlákno je průběh reakce analogický. Amplifikace DNA pomocí *Bst* polymerázy (viz. obrázek 2.2 na straně 15) je zahájena rozpletením vláken dvoušroubovice a hybridizací F2 části vnitřního FIP „primeru“ se sekvencí F2c na vlákně templátové DNA a polymerasa začne syntetizovat

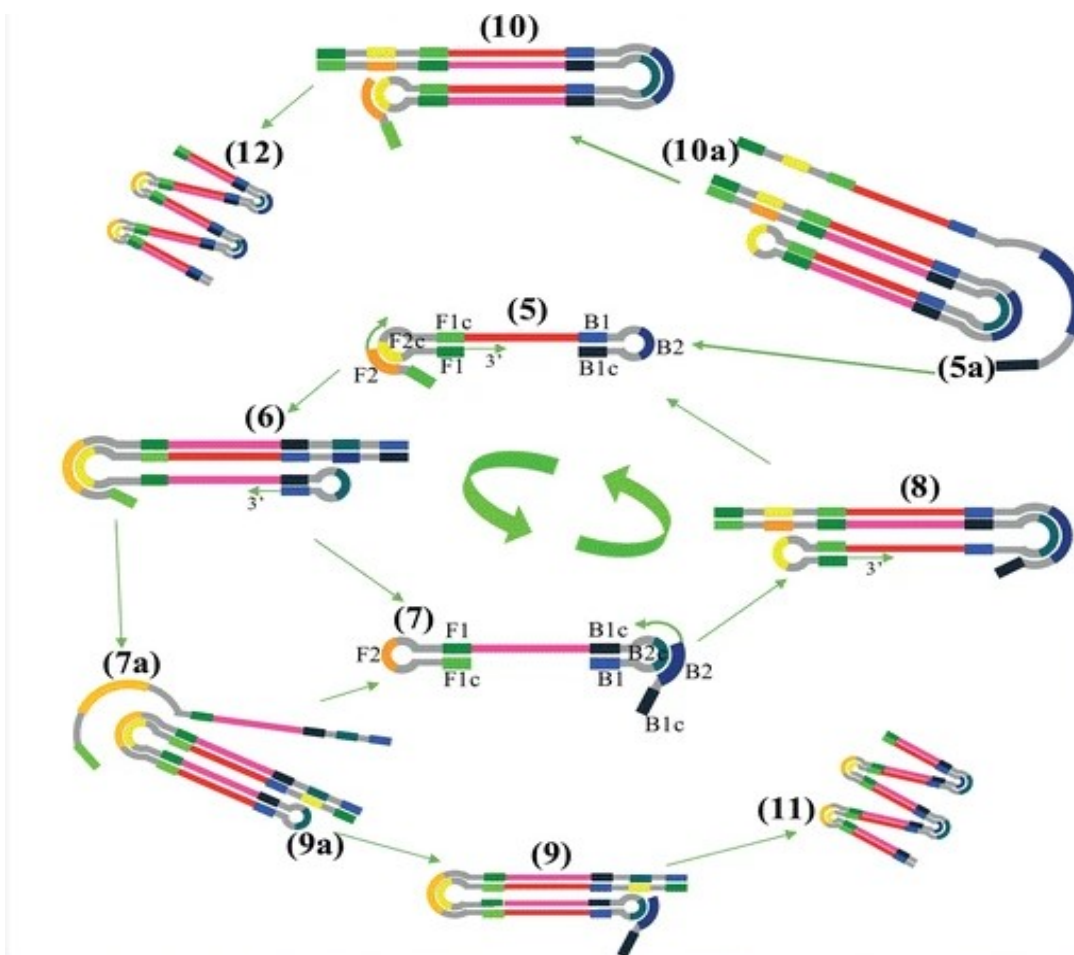
vlákno komplementární ve směru od 5'-3' konci (krok 1). Vnější „primer“ F3 následně hybridizuje se sekvencí F3c na vlákně templátové DNA a dochází k vytěsnění vlákna vytvořeného FIP „primerem“ (kroky 2 a 3). Vytěsněné jednovlákně pak vytvoří smyčku na 5' konci (krok 4) [5].

Tato jednovláknová DNA se smyčkou na 5' konci obsahuje rozpoznávací sekvenci pro BIP „primer“. B2 část BIP „primeru“ hybridizuje s B2c rozpoznávací sekvencí na vlákně DNA, je zahájena syntéza vlákna komplementárního za současného otevření smyčky na 5' konci (krok 4). Následně „primer“ B3 hybridizuje s B3c rozpoznávací sekvencí na vlákně vytvořeném FIP „primerem“, dochází k amplifikaci a oddělení vlákna syntetizovaného BIP „primerem“ (krok 4). Oddělené vlákno vytvořené BIP „primerem“ vytvoří na 3' a 5' konci smyčky díky přítomnosti komplementárních sekvencí a struktura takto získaného DNA produktu připomíná svým tvarem činku (krok 5) [5].



Obr. 1.2 Schéma iniciační fáze LAMP. Na obrázku „primer“ FIP hybridizuje svou F2 částí s F2c cílovou sekvencí templátové DNA a dochází k syntéze komplementárního vlákna (kroky 1 a 2). Následně dochází k hybridizaci F3 „primeru“ s rozpoznávací sekvencí F3c a je zahájena syntéza komplementárního vlákna (krok 2), přičemž dochází k oddělení vlákna syntetizovaného FIP „primerem“ (krok 3). Dochází k tvorbě smyčky na 5' konci a k nasednutí B2 částí BIP „primeru“ na B2c rozpoznávací sekvenci na templátové DNA (krok 4). Zároveň dochází k nasednutí B3 „primeru“ na jednovlákně a oddělování vlákna syntetizovaného BIP „primerem“ (krok 4). Vzniká produkt připomínající svým tvarem činku (krok 5). Obrázek převzat z [17].

Po vytvoření iniciačního produktu připomínajícího svým tvarem činku, přichází na řadu další fáze amplifikace, tzv. cyklická elongační fáze (viz. obrázek 2.3). Na cyklické elongační fázi se podílejí zejména „primery“ FIP a BIP. Na 3' konci „činkového“ produktu iniciační fáze hybridizuje F2 část FIP „primeru“ s cílovou sekvencí F2c a následná syntéza probíhá až k sekvenci B1c (krok 5). Zároveň probíhá syntéza vedená FIP „primerem“ od rozpoznávací sekvence F1 (kroky 5 a 8). Analogická situace nastává na 5' konci, kde je syntéza vlákna zahájena hybridizací B2 částí BIP „primeru“ s rozpoznávací sekvencí a zároveň probíhá syntéza vedená BIP „primerem“ od rozpoznávací sekvence B1 (kroky 6 a 7). Opakované nasedání FIP a BIP „primeru“ na produkty iniciační fáze amplifikace generuje „amplikony“, ze kterých vznikají další produkty různých velikostí podle počtu vzniklých smyček (kroky 9 a 10) [5].



Obr. 1.3 Schematické znázornění cyklické elongační fáze LAMP. Na 3' konec produktu iniciační fáze nasedá FIP „primer“ svou F2 částí a na 5' konci BIP „primer“ svou B2 částí (kroky 5 a 7). Vzniká dvojlákno a na něm dochází k syntéze vedené FIP „primerem“ od rozpoznávací sekvence F1 a BIP „primerem“ od rozpoznávací sekvence B1 (kroky 6 a 8). Následně dochází k opakovanému nasedání FIP a BIP „primeru“ (kroky 9 a 10). Dochází k masivní amplifikaci, a dále ke vzniku množství produktů s různým počtem smyček. Obrázek převzat z [17].

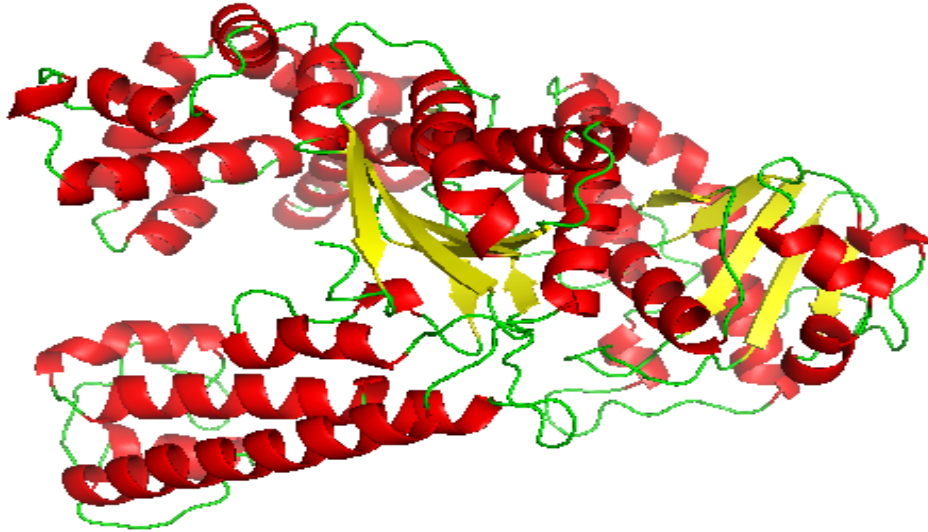
Metoda LAMP s použitím čtyř „primerů“ poskytuje výsledky amplifikace přibližně do 30 minut. Podle popsaného mechanismu reakce je výsledkem amplifikace množství produktů o různé délce, která závisí na počtu vytvořených smyček [5].

Na stejných principech je založena i metoda se šesti „primery“. Reakce probíhá stejným mechanismem až do elongační a recyklační fáze jako metoda se čtyřmi „primery“. Smyčkové „primery“ dosedají na smyčky vytvořené v elongační a recyklační fázi (podobně jako „primery“ FIP a BIP) a dochází k elongaci vláken s těmito „primery“ za vzniku nových struktur. Smyčkové „primery“ pak prokazatelně snižují dobu reakce na méně než polovinu původního času [10].

1.1.2 *Bst* polymerasa

Důležitou součástí pro průběh LAMP reakce je speciální DNA polymerasa, která umožňuje průběh reakce za izotermálních podmínek. *Bst* polymerasa je izolována z bakterie *Geobacillus stearothermophilus*. Prostorová struktura *Bst* polymerasy je znázorněna na obrázku 2.4 na straně 18). Jedná se o DNA polymerasu typu I, která se vyznačuje schopností rozvolňovat vlákna dvoušroubovice DNA při teplotním optimu enzymu, tj. 65 °C za současné syntézy vlákna komplementárního, tedy disponuje tzv. „dislokasovou aktivitou“ [18]. *Bst* polymerasa je stabilní do teploty kolem 70 °C [18,19]. Mimo jiné má *Bst* polymerasa schopnost reverzní transkripce [20]. Schopnost reverzní transkripce *Bst* polymerasy je poměrně slabá, proto se pro detekci virové RNA do reakční směsi spolu s *Bst* polymerasou přidává ještě reverzní transkriptasa a oba enzymy jsou inkubovány při stejné teplotě [21].

Byly vyvinuty konstrukty *Bst* polymerasy, které jsou termostabilnější, mají vyšší efektivitu amplifikace, reakční rychlost či vyšší toleranci vůči inhibitorům [19,22]. Divoký typ *Bst* polymerázy disponuje 5'-3' exonukleasovou aktivitou, ale v komerčně dostupných konstruktech doména s exonukleasovou aktivitou často chybí [18,23].



Obr. 1.4 Prostorová struktura *Bst* polymerasy. Struktura *Bst* polymerasy byla vytvořena programem Pymol 1.7.4.5 Edu. Kód v PDB databázi 1XWL [18].

1.1.3 „Primery“ pro LAMP metodu a klíčová kritéria pro jejich návrh

Pro návrh „primerů“ je nejprve nutné vybrat část sekvence DNA, kterou chceme prostřednictvím LAMP amplifikovat. Nejvhodnější je volit sekvence o délce maximálně 200 bp, protože délka amplifikované sekvence je limitována dislokasovou aktivitou *Bst* polymerasy. Platí, že čím delší je sekvence amplifikované DNA, tím je výtěžek amplifikace nižší [5]. V případě, že chceme pomocí LAMP diagnostiky identifikovat konkrétní mikroorganismus, je vhodné vybírat gen specifický pro daný mikroorganismus a zároveň je nutné, aby sekvence byla dostatečně konzervovaná pro všechny existující kmeny daného mikroorganismu [24].

Návrh „primerů“ pro LAMP je poměrně komplikovaný, protože musíme brát v potaz škálu kritérií, jako je například délka „primeru“, teplota tání „primerů“ (T_m , z angl. *melting temperature*), % zastoupení GC párů, stabilita 3' a 5' konce, či tvorba sekundárních struktur a možnost vzájemné hybridizace mezi jednotlivými „primery“. Pro zjednodušení návrhu „primerů“ často využíváme různé počítačové softwary, jako je například PrimerExplorer (dostupný z <https://primerexplorer.jp/e/>) nebo NEB LAMP Primer Design Tool (dostupný z <https://lamp.neb.com/#!/>) [16,25,26].

Jak už bylo zmíněno, důležitý parametr nejen pro LAMP „primery“, ale například i pro PCR „primery“ je obsah tzv. GC párů v závislosti na sekvenci bází templátové DNA. Pokud je templátová DNA bohatá na GC báze, pak by „primery“ pro LAMP měly

obsahovat 50–60 % GC bází. Pokud je naopak templátová DNA bohatá na AT báze, pak by „primerů“ měly obsahovat 40–50 % GC bází [27].

Kritérium obsahu GC nebo AT bází je důležité i pro T_m , která v kontextu nukleových kyselin znamená teplotu, při které je polovina dané DNA ve formě dvouvláknové a druhá polovina ve formě jednovláknové. Sekvence a délka jednotlivých „primerů“ je pak volena tak, aby jejich T_m spadala do určitého rozmezí, daného nejen počtem GC nebo AT párů, ale také teplotním optimem *Bst* polymerasy. V případě, že je daný „primer“ bohatý na GC páry, měla by jeho T_m F2 a B2 částí FIP a BIP „primerů“ spadat do rozmezí 60–65 °C, což je zároveň teplotní optimum *Bst* polymerasy. V opačném případě je-li „primer“ bohatý na AT páry, měla by jeho T_m spadat do teplotního rozmezí 55–60 °C [5, 27]. Při návrhu „primerů“ je také zohledněna T_m specifických sekvencí DNA, a to B1c a F1c, která by měla být o něco vyšší než B2 a F2. Tato T_m je zohledněna z toho důvodu, aby došlo k okamžitému vytvoření smyčky hned po uvolnění jednovláknové DNA z templátu během amplifikace. Pro vnější „primery“ F3 a B3 se volí T_m o něco nižší, a zároveň je nižší i jejich koncentrace v reakční směsi, abychom zvýšili pravděpodobnost, že k syntéze DNA bude nejdříve docházet od vnitřních „primerů“ FIP a BIP [5].

Při návrhu „primerů“ je také důležité zohlednit 3' konec „primeru“, který by neměl obsahovat velké množství AT bází a neměl by být komplementární k jiným „primerům“. Zamezením takovéto komplementarity můžeme předcházet vzájemné hybridizaci mezi „primery“, kdy může docházet k nespecifické amplifikaci, která je možným zdrojem falešné pozitivy. K falešné pozitivě může docházet při nespecifické amplifikaci homo nebo heterodimerů „primerů“ nebo sekundárních struktur na vlákně samotného oligonukleotidu [28]. Konce „primerů“ by měly být stabilní a uvádí se, že Gibbsova volná energie ΔG by měla být menší než -4 kcal/mol, protože konec „primeru“ slouží jako výchozí bod pro další syntézu DNA [27].

1.1.4 Detekce a vizualizace výsledných produktů LAMP

Průběh amplifikace DNA metodou LAMP můžeme sledovat několika způsoby: horizontální agarosová elektroforéza [14], turbidimetrická detekce [13], detekce za použití indikátorů hořčnatých iontů [29], fluorescenční detekce [14] či kolorimetrická detekce, založená na změně pH reakční směsi [15].

1.1.4.1 Horizontální agarosová elektroforéza

Horizontální agarosová elektroforéza se tradičně provádí v přítomnosti ethidium bromidu jako interkalačního činidla a je vyhodnocována pod ultrafialovým zářením (UV, z angl. *ultra violet*). Alternativou ethidium bromidu může být např. SYBR Green I nebo PicoGreen [16,30]. Jedná se o analýzu reakční směsi, která je provedena až po proběhnutí LAMP reakce, není tak možné sledovat průběh reakce a vznik produktů v reálném čase. Její nevýhodou je časová náročnost oproti jiným stanovením a nutnost otevřít zkumavku s reakční směsí, čímž může dojít ke kontaminaci produkty předchozí reakce při dalším stanovení a tím k falešně pozitivním výsledkům [31]. Výsledkem analýzy je několik signálů značící přítomnost produktů různé délky, což odlišuje metodu od jiných metod, jako je např. PCR, kde je signál typicky pouze jeden [5,27].

1.1.4.2 Turbidimetrické stanovení

V průběhu LAMP reakce vzniká během amplifikace DNA bílá sraženina difosforečnanu hořečnatého reakcí molekuly pyrofosfátu, která vzniká při navázání nukleosid monofosfátu do řetězce DNA, s hořečnatými ionty, které jsou přítomny v pufru. Tato sraženina může být detekována prostřednictvím turbidimetru nebo spektrofotometru [13]. Detekce typicky probíhá až po skončení LAMP reakce, nicméně vznik sraženiny je možné detekovat i v průběhu reakce, kdy hovoříme o tzv. turbidimetrii v reálném čase. Výhodou turbidimetrie v reálném čase je možnost vzniklý produkt kvantifikovat [32]. Vzhledem k nutnosti použití detekčních přístrojů se jedná o poměrně drahý způsob detekce. Alternativu představuje centrifugace, kdy se sraženina difosforečnanu hořečnatého usadí na dně reakční zkumavky a může být detekována pouhým okem [33].

1.1.4.3 Detekce pomocí kalceinu

Pouhým okem můžeme také sledovat barevnou změnu značící úbytek volných hořečnatých iontů. Dochází ke změně fluorescence chelatačního činidla, jako je například kalcein. Kalcein vstupující do reakce vyžaduje v tomto případě přísadek manganatých iontů, které vazbou na kalcein fluorescenci kalceinu zhasí. V průběhu LAMP reakce jsou manganaté ionty z kalceinu vyvázány uvolněným pyrofosfátem za vzniku difosforečnanu manganatého, což vede ke zvyšování fluorescence kalceinu. Fluorescence kalceinu je navíc umocňována vazbou iontů hořečnatých, které nahradí

ionty manganaté, a je dobře pozorovatelná pod UV zářením nebo ve viditelném spektru barevnou změnou z oranžové barvy na barvu zelenou [29].

1.1.4.4 Fluorescenční detekce

Při pozorování fluorescence reakční směsi můžeme využít i jiné vhodné barvivo, jako je například SYBR Green I. Detekce může být opět provedena i bez použití fluorimetru, a to pouhým okem. V případě SYBR Green I dochází ke změně z oranžového zabarvení na zelené v případě pozitivního výsledku [27]. Změna je nejlépe pozorována pod UV zářením nebo modrým světlem v kombinaci s oranžovým filtrem. Jedná se o rychlý způsob detekce, který je finančně nenáročný. Vzniklý produkt můžeme kvantifikovat za použití interkalačního barviva prostřednictvím fluorimetrie v reálném čase, podobně jako při kvantitativní PCR [34–36]. Toto měření v reálném čase však zvyšuje finanční náročnost metody z důvodu použití instrumentace vhodné pro měření fluorescence.

1.1.4.5 Detekce pomocí acidobazických indikátorů

Kromě odštěpování molekuly pyrofosfátu při připojování dNTPs polymerasou do nově vznikajícího řetězce DNA dochází k uvolnění protonu z hydroxylové skupiny deoxyribosy. Protony, které vznikají během LAMP reakce tak snižují pH reakční směsi. Přidáním vhodného acidobazického indikátoru můžeme pozorovat změnu zabarvení reakční směsi, která indikuje změnu pH. Příkladem takového acidobazického indikátoru je například fenolová nebo kresolová červeň. V případě použití těchto indikátorů pozorujeme změnu zabarvení reakční směsi z růžové na oranžovou až žlutou v případě, že probíhá LAMP reakce [15].

1.1.5 Výhody a nevýhody LAMP

Oblíbenost metody LAMP v posledních letech prudce vzrostla zejména v souvislosti s pandemií COVID-19 [37–39]. Použitím vyššího počtu „primerů“, které cílí na specifickou sekvenci, dosahujeme vyšší specifity a rychlosti reakce než při použití čtyř „primerů“ [5]. Metoda LAMP je v porovnání s PCR 10× až 100× citlivější [40]. Výsledek LAMP je znám obvykle do 30 minut. Vzhledem k izotermálnímu průběhu LAMP reakce je možné použít levný termoblok nebo vodní lázně [5], čímž odpadá nutnost použití finančně nákladného termocycleru. V neposlední řadě vyhodnocení výsledků můžeme provést pouhým okem a bez nutnosti použití složitých a drahých detekčních systémů. Díky svým výhodám je tak LAMP vhodnější pro testování v místě potřeby (tzv. „*point of*

care testing“), jako tomu bylo například během pandemie COVID-19 [41–43]. Pro své nesporné výhody doporučila Světová zdravotnická organizace v roce 2016 LAMP jako vhodnou metodu detekce bakterie *Mycobacterium tuberculosis* [44].

Nevýhodou je již zmíněný náročný návrh „primerů“ a nutnost znalosti sekvence nukleové kyseliny, kterou chceme amplifikovat stejně jako v případě PCR. Oproti PCR, kde jsou typicky potřeba dva „primery“, LAMP vyžaduje čtyři až šest „primerů“ [5]. Správným návrhem „primerů“ ale můžeme částečně předcházet falešné pozitivitě. Falešně pozitivní výsledek je takový výsledek, kdy reakční směs neobsahuje cílovou DNA, ale přesto detekujeme signál značící přítomnost amplifikované DNA. Falešná pozitivita je způsobena buď kontaminací produkty předchozí reakce, nebo nespecifickou amplifikací např. dimerů „primerů“ [28]. Kontaminaci produkty předchozích reakcí však můžeme zabránit především správnou laboratorní praxí. V následující podkapitole 1.1.6 je diskutováno, jak můžeme metodu LAMP optimalizovat, abychom alespoň částečně kompenzovali její nedostatky.

1.1.6 Optimalizace metody LAMP

Možností, jak metodu LAMP optimalizovat je několik. Často stačí upravit teplotu, při které reakce probíhá, tak, aby byla co neoptimálnější pro nasedání „primerů“ a aby zároveň spadala do teplotního optima použité polymerasy. Zvýšením nebo snížením teploty například o jeden stupeň můžeme zamezit nespecifické amplifikaci způsobené „primery“ [45–47]. Kromě teploty můžeme zároveň upravit objem reakční směsi, zatímco koncentrace jednotlivých složek zůstane zachována [48–50].

Kromě teploty a objemu reakční směsi je jedním z parametrů, které můžeme upravit, i koncentrace „primerů“ [45,51]. Je však nezbytné mít na paměti, že je doporučeno, aby byla koncentrace vnějších „primerů“ F3 a B3 nižší než koncentrace vnitřních „primerů“ FIP a BIP [5]. Doporučená koncentrace „primerů“ v reakční směsi je tak většinou udávána výrobcem komerčních souprav, a to tak, že doporučená koncentrace „primerů“ F3 a B3 je 0,2 μM , FIP a BIP 0,8-1,6 μM a smyčkových „primerů“ FL a BL 0,4-1,0 μM [52,53]. Použití nižšího počtu „primerů“, například použitím pěti „primerů“ místo typických šesti „primerů“, můžeme pravděpodobnost nespecifické amplifikace také snížit. Zároveň je ale pravděpodobné, že dojde ke snížení rychlosti amplifikace [54]. Další složkou LAMP, jejíž koncentraci v reakční směsi můžeme upravit, je pak

koncentrace hořečnatých iontů [46,55]. Optimální koncentrace hořečnatých iontů v reakční směsi je pro LAMP stejně důležitá jako pro PCR, zejména pro správnou funkci DNA polymerasy. V případě LAMP reakční směsi, bývá koncentrace hořečnatých iontů 4-8 mM [52,56,57].

Jednou z možností optimalizace je také přidavek některých činidel, jako je například betain [57], dimethylsulfoxid (DMSO) [58] nebo uracil-DNA-glykosylasa [59]. Aminokyselina betain (*N,N,N*-trimethylglycin) je destabilizační agens, který narušuje patrové interakce mezi bázemi a snižuje riziko nescifické amplifikace. Je důležité optimalizovat koncentraci betainu v reakční směsi – příliš nízká koncentrace nemusí mít žádný efekt na snížení falešné pozitivivity, příliš vysoká koncentrace může snižovat efektivitu amplifikace [60]. Podobné vlastnosti jako má betain má i DMSO. Příliš vysoká koncentrace betainu, tak i DMSO však může inhibovat aktivitu *Bst* polymerasy [58]. Falešné pozitivitě můžeme zamezit, mimo použití betainu nebo DMSO, použitím hydrolytického enzymu uracil-DNA-glykosylasa. Tento enzym odstraňuje z DNA uracil, jehož přítomnost v DNA je dána možnou deaminací cytosinu, případně chybnou inkorporací dNTP při syntéze DNA [61,62]. Záměrnou inkorporací uracilu do produktů předchozí LAMP reakce a následnou inkubací s uracil-DNA-glykosylasou tak můžeme snížit riziko kontaminace dalších inkubačních směsí (tzv. *carry-over* kontaminace) [59].

1.2 Charakterizace bakterie *Staphylococcus aureus*

Jedním z nejčastěji identifikovaných patogenů v klinických laboratořích je bakterie *SA*. Je to grampozitivní, nepohyblivý, fakultativně anaerobní kok, který bývá přirozenou součástí bakteriální mikroflóry horních cest dýchacích a kůže [63]. Druhové jméno *aureus* (tzn. zlatý) je odvozeno od žlutého pigmentu, který některé kmeny bakterie produkují [64].

Bakterie *SA* je jedním z hlavních patogenů problematických z pohledu antimikrobiální rezistence. Brzy po objevu penicilinu a jeho používání v klinické praxi bylo zjištěno, že *SA* vykazuje známky rezistence na penicilin a produkuje β -laktamasu hydrolyzující β -laktamový kruh penicilinu [65]. Následovalo používání semi-syntetického penicilinu – methicilinu [66]. Používání methicilinu však také nemělo příliš dlouhého trvání [67]. V současnosti se totiž potýkáme s celosvětovým problémem, kterým je methicilin-rezistentní *SA* [68]. K rezistenci přispívá nejen produkce enzymu β -laktamasy, ale také přítomnost genu *mecA*, který kóduje protein vázající penicilin 2a,

což je transpeptidasa podílející se na tvorbě buněčné stěny, která není methicilinem inhibovaná [66,69].

1.2.1 Patogeneze a faktory virulence bakterie *Staphylococcus aureus*

Přestože *SA* přirozeně osidluje kůži a oblast nosohltanů člověka i zvířat, může při oslabení imunitního systému hostitele vyvolat různá onemocnění, jako jsou například kožní záněty, alimentární onemocnění, pneumonie nebo syndrom toxického šoku, sepse aj. [70]. Produkuje řadu biologicky aktivních látek, jako jsou enzymy a toxiny, které se v patogenezi stafylokokových onemocnění uplatňují. Tyto látky můžeme rozdělit do tří skupin, a to adhezivní faktory, propagační a transportní faktory a toxiny.

Mezi adhezivní faktory řadíme plasmakoagulasu (volná koagulasa) a nebo tzv. shlukovací faktor (vázaná koagulasa), což je antigen na povrchu *SA*, který napomáhá shlukování bakteriálních buněk [71]. Většina virulentních kmenů *SA* produkuje plasmakoagulasu, proto je považována za jeden z rozhodujících znaků při identifikaci bakterie *SA* [64]. Mezi adhezivní faktory také řadíme produkty polysacharidové povahy, které umožňují bakteriím vázat se na povrch a hrají roli v patogenezi, zejména při tvorbě biofilmů [72].

SA produkuje řadu hemolysinů (α , β , γ , δ), které řadíme mezi propagační a transportní faktory [64]. Hlavní roli v patogenezi má α -hemolysin. Jedná se o polypeptid, který porušuje buněčnou membránu eukaryotických buněk [73].

Nesmíme opomenout ochranné faktory a toxiny, jako jsou například exoproteiny chránící *SA* před obrannými mechanismy napadeného organismu, jako je například Panton-Valentinův leukocidin. Ten porušuje integritu buněčné membrány leukocytů tvorbou pórů [74]. Mezi původce toxikóz pak můžeme zařadit třeba exfoliatin [75], toxin syndromu toxického šoku [76] a stafylokokové enterotoxiny, které jsou zodpovědné za vyvolání alimentárního onemocnění [77].

1.2.2 Identifikace bakterie *Staphylococcus aureus* prostřednictvím LAMP

Bakterie je v současnosti identifikována prostřednictvím kultivačních metod s posouzením typických znaků a/nebo prostřednictvím biochemických testů. Tato identifikace trvá často až 48 hodin, čímž odkládáme nasazení správné terapie čímž dochází k prodlevě v zahájení účinné léčby [63]. Rychlejší identifikace *SA* je zprostředkována použitím molekulárně biologických metod, zejména prostřednictvím PCR. Zlatý standard detekce *SA* prostřednictvím PCR cílí na již zmíněný gen *mecA* [78].

Přesto byla pro jeho detekci testována také metoda LAMP a do roku 2022 bylo publikováno přibližně 68 studií věnující se LAMP detekci bakterie *SA* cílicí kromě *mecA* i na další geny specifické pro tuto bakterii [79,80].

Pro zavedení metody LAMP jako metody identifikace bakterie *SA* byl vybrán gen *mecA* podobně jako při detekci prostřednictvím PCR. V průběhu let došlo k posunu a vývinu metody a byly popsány další cíle, podle kterých bylo možné bakterii *SA* detekovat. Jednalo se například geny jako je *spa* [80], *femA* [81], *orfX* [82] nebo *nuc* [47]. Pro praktickou část této diplomové práce byl vybrán právě gen *nuc* jako cíl detekce metody LAMP. Gen *nuc* kóduje thermonukleasu, což je enzym, který hydrolyzuje fosfodiesterovou vazbu DNA a RNA na 5' konci [83]. Podle literatury byl limit detekce pro identifikaci bakterie *SA* prostřednictvím LAMP cílicí na gen *nuc* stanoven na 1,47 pg/μl DNA *SA* v LAMP směsi. Prostřednictvím PCR byl pak limit detekce stanoven na 14,7 pg/μl DNA *SA* v PCR směsi, čímž bylo stanoveno, že metoda LAMP je desetkrát citlivější než PCR [47].

2 Cíle diplomové práce

Pro předkládanou diplomovou práci byly stanoveny následující cíle:

1. Shromáždit z literatury a kriticky zhodnotit současné poznatky týkající se metody LAMP a optimálního protokolu LAMP pro detekci genu *nuc* bakterie *SA*.
2. Získat konsenzuální sekvenci genu *nuc* bakterie *SA* pro návrh LAMP „primerů“.
3. Navrhnout a ověřit sady „primerů“ pro LAMP detekci cílící na gen *nuc* bakterie *SA*.
4. Upravit protokol LAMP reakce a optimalizovat reakční podmínky tak, aby reakce poskytovala nejlepší možné výsledky, tj. co nejrychleji detekovat správně pozitivní vzorky a co nejvíce oddálit pozitivitu v případě falešně pozitivních výsledků.
5. Provést reakci LAMP s nejlepší sadou „primerů“ za optimálních reakčních podmínek pro detekci přítomnosti genu *nuc* bakterie *SA* v klinických vzorcích pacientů s infekcí horních cest dýchacích.
6. Otestovat techniku optické vizualizace LAMP produktů pro budoucí využití metody v místě potřeby (tj. bez nutnosti složitého přístrojového vybavení).

3 Přístroje, materiál a použité metody

3.1 Použité přístroje

Centrifuga:	MiniStar whiteline, VWR Collection Spectrafuge Mini-Centrifuge, C1301T, Labnet
Elektroforetická aparatura:	MultiSUB Max, Cleaver Scientific
Laminární box:	BIO 126, Labox
Předvážky:	440-35N, KERN
Suchá lázeň:	myBlock Mini, BSH200, Benchmark
Termocycler:	CFX Connect Real-Time PCR detection System, Bio-Rad
Transiluminátor:	DR-45M, Clare Chemical Research
Zdroj pro elektroforézu:	PowerPac Basic Power Supply, Bio-Rad

3.2 Použitý materiál a chemikálie

3.2.1 Chemikálie

Jena Bioscience:	Saphir Bst Turbo Polymerase 2000 U
Lach-Ner, Česká republika	kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
Sigma-Aldrich, USA:	LAMP „primery“ purifikované odsolením; Tris- EDTA pufr (TE pufr) pH 7,4; EvaGreen® Fluorescent DNA Stain
Thermo Fisher Scientific, USA:	voda bez obsahu nukleas; SYTO™ Orange Fluorescent Nucleic Acid Stain Sampler Kit

3.2.2 Templátová DNA SA

Templátová DNA SA (izolována z kmene NCTC 8178) o výchozí koncentraci 100 ng/μl byla dodána spolupracující laboratoří Dr. Marien de Jonge, Radboud University, Nijmegen, Nizozemsko.

3.2.3 „Primery“ pro LAMP

1. sada „primerů“ (SAs1)

„Primer“	Sekvence
FIP	GCCACGTCCATATTTATCAGTTCAATGCAAAGAAAATTGAAGTCG
BIP	ATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTTGTTCATGTGTATTGTTAGGTT
F3	GCATTTACGAAAAAAAAATGGTAG
B3	TCTTTTTTCGCTTGTGCT
BL	GTTTCGTCAAGGCTTGGCT

2. sada „primerů“ (SAs2)

„Primer“	Sekvence
FIP	ACTAAGCAACTAGTAGCGAAAAAGACTATCAGTAATGTTTCGAAAGG
BIP	TGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCACACTTCTATTTACGCCGTTAT
F3	GTTTCAATATTACTTATAGGGATGG
B3	ACTGTTGGATCTTCAGAAC
FL	AAAACCCTCTTTGCGTATTGC

3. sada „primerů“ (SAs3)

„Primer“	Sekvence
FIP	ACGCTAAGCCACGTCCATATAAATTGAAGTCGAGTTTGACA
BIP	ATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTTGTTCATGTGTATTGTTAGGTT
F3	CGAAAAAAAAATGGTAGAAAATGC
B3	TCTTTTTTCGCTTGTGCT
BL	TCGTCAAGGCTTGGCTAAAG

4. sada „primerů“ (SAs4)

„Primer“	Sekvence
FIP	AACCCTCTTTGCGTATTGCCGTTTCAATATTAATTATAGGGATGG
BIP	TCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTGTTTGTGATGCATTTGCTG
F3	GTGCTGGCATATGTATGG
B3	ACTTCTATTTACGCCGTTAT

FL CTTTCGAAACATTACTGATAG
 BL TTAGTTGTAGTTTCAAGTCT

5. sada „primerů“ (SAs5)

„Primer“	Sekvence
FIP	GCCACGTCCATATTTTATCAGTTCAATGCAAAGAAAATTGAAGTCG
BIP	ATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTTGTTCATGTGTATTGTTAGGTT
F3	GCATTTACGAAAAAAAAATGGTAG
B3	TCTTTTTTCGCTTGTGCT
FL	TTTGACCTTTGTCAAAC
BL	GTTTCGTCAAGGCTTGG

6. sada „primerů“ (SAs6)

„Primer“	Sekvence
FIP	ACTAAGCAACTAGTAGCGAAAAAGACTATCAGTAATGTTTCGAAAGG
BIP	TGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCACACTTCTATTTACGCCGTTAT
F3	GTTTCAATATTACTTATAGGGATGG
B3	ACTGTTGGATCTTCAGAAC
FL	ACCCTCTTTGCGTATT
BL	GCAAATGCATCACAAAC

7. sada „primerů“ (SAs7)

„Primer“	Sekvence
FIP	AAGTTAACTAAGCAACTAGTAGCGTTTCGAAAGGGCAATACG
BIP	TGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCACACTTCTATTTACGCCGTTAT
F3	TAGGGATGGGCTATCAGT
B3	ACTGTTGGATCTTCAGAAC
FL	GAAAAAGAAAAACCCTCTTT
BL	GCAAATGCATCACAAAC

8. sada „primerů“ (SAs0)

modifikace „primerů“ FL a BL na rozdíl od sady 9. jsou zvýrazněny červeně

„Primer“	Sekvence
FIP	ATGTCATTGGTTGACCTTTGTACATAAATTACATAAAGAACCTGCCA
BIP	GTTGATACACCTGAAACAAAGCATCATTTTTTTTCGTAAATGCACTTGC
F3	AACAGTATATAGTGCAACTTCAA
B3	CTTTGTCAAACCTCGACTTCAA
FL	CCGTATCACCATCAATCGCTTTAAT
BL	AGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAA

9. sada „primerů“ [47]

„Primer“	Sekvence
FIP	ATGTCATTGGTTGACCTTTGTACATAAATTACATAAAGAACCTGCCA
BIP	GTTGATACACCTGAAACAAAGCATCATTTTTTTTCGTAAATGCACTTGC
F3	AACAGTATATAGTGCAACTTCAA
B3	CTTTGTCAAACCTCGACTTCAA
FL	GTATCACCATCAATCGCTTT
BL	GGTGTAGAGAAATATGGTCC

10. Sekvence modifikovaných „primerů“ sady SAs3 a cíleně navržený FL

„Primer“	Sekvence
FIPpT	ACGCTAAGCCACGTCCATATTTTTTAAATTGAAGTCGAGTTTGACA
FIPv2	GCATAAATATACGCTAAGCCACGAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGA
FIPpTv2	GCATAAATATACGCTAAGCCACGTTTTTAAGAAAATTGAAGTCGAG TTTGA
BIPpT	ATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTTTTTTTGTTTCATGTGTATTGT TAGGTT
FL	CCATATTTATCAGTTCTTTGACCTTT

3.3 Použité metody

3.3.1 Návrh a design LAMP „primerů“

Pro návrh LAMP „primerů“ vhodných pro detekci *SA* byl zvolen gen *nuc*, kódující enzym thermonukleasa. V databázi UniProt (dostupný z <https://www.uniprot.org/>) byl nalezen záznam pro tento enzym, evidovaný v databázi pod kódem P00644 [83]. V tomto záznamu byla nalezena nukleotidová sekvence genu *nuc* (kód V01281) v databázi European nucleotide archive (dostupný z <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) [84]. Pomocí algoritmu BLAST byly nalezeny bakteriální kmeny *SA* se známou sekvencí [85]. Pro nalezení těchto kmenů byla použita databáze Nucleotide Collection (nr/nt) a vyhledávání bylo omezeno na organismus *SA*. Nalezené sekvence byly dále vybrány tak, aby identita s původní sekvencí byla 90–100 %. Takto získaný soubor sekvencí byl uložen ve FASTA formátu.

Pro identifikaci oblastí genu, které jsou konzervované v rámci jednotlivých kmenů *SA* bylo provedeno mnohonásobné sekvenční porovnávání pomocí algoritmu ClustalOWS [86] se standardními parametry prostřednictvím programu Jalview a byla získána konsenzus sekvence pro návrh „primerů“ [87].

Pro návrh „primerů“ byl použit internetový nástroj NEB LAMP Primer Design Tool (dostupný na <https://lamp.neb.com>) [26]. Jako vstupní sekvence byla vybrána získaná konsenzus sekvence genu *nuc* bakterie *SA*. Sekvence je bohatá na AT páry (69,1 % AT) a tomu byly uzpůsobeny výchozí parametry pro generování LAMP „primerů“ (viz. tabulka 1, straně 32). Oproti automaticky generovaným parametrům byla nejdříve upravena minimální T_m smyčkových „primerů“ na 59 °C, abychom získali sady, které obsahují alespoň jeden smyčkový „primer“. Následně byla minimální T_m smyčkových „primerů“ snížena na 52 °C, abychom získali sady se dvěma smyčkovými „primery“.

Zároveň byla vytvořena modifikovaná sada publikovaných „primerů“ [47] (SAs0). Byly modifikovány smyčkové „primery“ FL a BL prodloužením o pět bp komplementárních k vláknu templátové DNA *SA*. Další „primery“ sady SAs0, tj. F3, B3, FIP a BIP, byly identické jako publikované „primery“ [47].

Pro sadu SAs3 byla vytvořena modifikace „primerů“ FIP a BIP přidáním pěti nukleotidů thyminu a vznikly tak „primery“ označené jako FIPpT a BIPpT. Rovněž byl navržen „primer“ FL pro sadu SAs3. Z důvodu cíleného návrhu FL bylo nutné upravit

„primer“ FIP tak, aby se „primery“ nepřekrývaly a vznikla nová sekvence „primeru“ FIPv2. Zároveň byla pro „primer“ FIPv2, vytvořena modifikace přidáním pěti nukleotidů thyminu a vznikl tak „primer“ FIPpTv2.

Tabulka 1 Výchozí parametry pro návrh „primerů“ sad SAs1 až SAs7 pomocí NEB LAMP Primer Design Tool [26]. Parametry byly generovány programem NEB LAMP Primer Design Tool. Délka „primeru“ udává minimální a maximální počet bází tvořících daný „primer“. T_m udává minimální a maximální teplotu tání „primeru“. V případě sad SAs1, SAs2 a SAs3 byly hodnoty T_m nastaveny na hodnoty 59-66 °C. V případě sad SAs4 až SAs7 byla spodní hranice nastavena na 52 °C. Prahová hodnota ΔG udává stabilitu „primeru“. 5' stabilita udává maximální hodnotu ΔG pro 5' konec „primeru“. 3' stabilita udává maximální hodnotu ΔG pro 3' konec. Hodnoty ΔG „primeru“ musí být nižší než tyto hodnoty. Kontrola dimeru udává minimální hodnotu ΔG a určuje stabilitu mezi kombinací dvou „primerů“. Vzdálenosti udávají minimální a maximální vzdálenost mezi dvěma „primery“ v sekvenci templátové DNA.

Reakční podmínky	Koncentrace Na ⁺ iontů (mM)	10
	Koncentrace Mg ²⁺ iontů (mM)	8
Délka „primeru“ (min/max)	F1c/B1c	20-25 bp
	F2/B2	18-25 bp
	F3/B3	18-25 bp
	FL/BL	15-25 bp
T_m (min/max)	F1c/B1c	60-63 °C
	F2/B2	55-58 °C
	F3/B3	55-58 °C
	*FL/BL	52-66 °C
Zastoupení GC párů	Min/Max	30-65 %
	Min/Max (smyčka)	30-65 %
Prahová hodnota ΔG	5' stabilita	-3 kcal/mol
	3' stabilita	-4 kcal/mol
	3' stabilita smyčky	-2,0 kcal/mol
	kontrola dimeru	-2,5 kcal/mol
	kontrola dimeru (smyčka)	-3,5 kcal/mol
Vzdálenosti mezi „primery“ (mix/max)	F2-B2	120-180 bp
	F1c-F2 (smyčka)	40-60 bp
	F2-F3	0-20 bp
	F1c-B1c	0-100 bp

* pro sady SAs1, SAs2 a SAs3 bylo rozmezí T_m (min/max) „primerů“ LF/LB nastaveno na 59-66 °C

3.3.2 Fluorescenční detekce průběhu LAMP reakce

Před zahájením práce byla pracovní plocha v laminárním boxu (BIO 126, Labox) vydesinfikována 70% ethanolem. Následně bylo veškeré potřebné zařízení (pipety, mikrozkuřavky, stojany, stolní minicentrifuga, pinzety, špičky, stripy aj.) vystaveno

působení UV záření z germicidního záření v laminárním boxu po dobu 30 minut. Všechna manipulace s chemikáliemi a zařízením probíhala v jednorázových rukavicích.

Mimo laminární box byla nejprve připravena ředící řada roztoků templátové DNA *SA*. První roztok ředící řady byl připraven smícháním 5,0 μl zásobního roztoku templátové DNA *SA* o koncentraci 100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ a 45,0 μl vody bez obsahu nukleas. Směs byla promíchána opakovaným nasátím pipetou a centrifugována na stolní centrifuze. Každý další roztok DNA *SA* ředící řady byl desetinásobně zředěn oproti roztoku předchozímu. Takto bylo připraveno celkem sedm roztoků ředící řady. Koncentrace DNA *SA* v jednotlivých roztocích byla následující: 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 0,1 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 0,01 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 1 $\text{pg}/\mu\text{l}$, 0,1 $\text{pg}/\mu\text{l}$, 0,01 $\text{pg}/\mu\text{l}$.

Zásobní roztoky jednotlivých „primerů“ byly připraveny rozpuštěním lyofilizovaných „primerů“ v TE pufru (Tris/EDTA pufr) na výslednou koncentraci 100 μM , podle pokynů dodavatele (Sigma-Aldrich s.r.o.).

Do 200 μl mikrozkušavky byla připravena směs 10 \times koncentrovaného roztoku LAMP „primerů“, zvláště pro každou navrženou sadu (SAs0 až SAs7) a publikovanou sadu „primerů“ [47]. Směs šesti LAMP „primerů“ byla připravena smícháním 2,0 μl F3, 2,0 μl B3, 16,0 μl FIP, 16,0 μl BIP, 4,0 μl FL a 4,0 μl BL. V případě, že byla použita sada obsahující pět „primerů“ byla směs připravena smícháním 2,0 μl F3, 2,0 μl B3, 16,0 μl FIP, 16,0 μl BIP a 4,0 μl BL (pro sady SAs1 a SAs3) a smícháním 2,0 μl F3, 2,0 μl B3, 16,0 μl FIP, 16,0 μl BIP a 4,0 μl FL (pro sadu SAs2).

Následně byla připravena reakční směs obsahující 42,0 μl Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 3,7 μl 1 \times koncentrované směsi příslušné sady šesti LAMP „primerů“ a byla doplněna 38,3 μl vody. V případě, že byla použita sada o pěti „primerech“, byla směs připravena smícháním 42,0 μl 5 \times ředěné Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 3,4 μl 1 \times koncentrované směsi příslušné sady LAMP „primerů“ a byla doplněna 38,6 μl vody. Tyto směsi neobsahovaly přídavek templátové DNA *SA*, tj. byla stanoveny jako negativní kontroly.

Reakční směs pro LAMP experimenty obsahovala 42,0 μl Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 3,7 μl 1 \times koncentrované směsi příslušné sady šesti LAMP „primerů“ a 38,3 μl roztoku templátové DNA *SA* z připravené ředící řady. V případě, že byla použita sada o pěti „primerech“, byla negativní kontrola připravena smícháním 42,0 μl Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 3,4 μl 1 \times koncentrované směsi příslušné sady LAMP

„primerů“ a 38,6 µl vody. Všechny připravené reakční směsi byly řádně promíchány opakovaným nasátím pipetou a centrifugovány na stolní centrifuze.

Takto připravené reakční směsi byly rozděleny po 10 µl do 100µl sterilních mikrozkušavek upevněných do osmizkušavkovém „stripu“. V případě některých experimentů byly reakční směsi rozděleny po 25 a po 50 µl, přičemž koncentrace jednotlivých složek zůstala zachována. Měření probíhalo standardně při 65 °C, není-li uvedeno jinak. Záznam intenzity fluorescence byl pořizován zařízením CFX Connect Real-Time PCR detection System, Bio-Rad každou minutu. Jako pozitivní byl považován vzorek, který vykazoval nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu s rozdílem alespoň 5 minut než nejrychlejší negativní kontrola.

V případě některých experimentů s publikovanými „primery“ a experimentů, při kterých byl testován vliv koncentrace „primerů“ sady SAs7 na průběh LAMP byla použita jiná koncentrace „primerů“ v reakční směsi. V případě, že byla použita dvojnásobná koncentrace všech „primerů“, obsahovala reakční směs 42,0 µl Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 7,4 µl 1× koncentrované směsi příslušné sady LAMP „primerů“ a 34,6 µl roztoku templátové DNA SA z připravené ředící řady (nebo vody v případě negativní kontroly). V dalších experimentech se jednalo o „primery“ FL a BL, kdy jejich koncentrace byla oproti jiným experimentům dvojnásobná. Směs „primerů“ obsahovala 2,0 µl F3, 2,0 µl B3, 16,0 µl FIP, 16,0 µl BIP, 8,0 µl FL, 8,0 µl BL. Reakční směs obsahovala 42,0 µl Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 3,7 µl směsi LAMP „primerů“ a 38,3 µl roztoku templátové DNA SA z připravené ředící řady (nebo vody v případě negativní kontroly).

3.3.3 Vliv koncentrace hořčnatých iontů na průběh LAMP reakce

V případě několika experimentů byla provedena optimalizace LAMP protokolu změnou koncentrace hořčnatých iontů. Komerční roztok Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy obsahuje ve výsledné reakční směsi 6 mM MgSO₄. Čtyři reakční směsi pro tyto experimenty byly připraveny způsobem popsáným v podkapitole 3.3.2, s tím rozdílem, že byla upravena koncentrace hořčnatých iontů tak, aby její výsledná koncentrace v dané reakční směsi byla 8, 7, 5 a 4 mM. Koncentrace hořčnatých iontů byla upravována přidávkem 25 mM MgSO₄ nebo přidávkem 25 mM roztoku kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Měření průběhu LAMP reakce s upravenou koncentrací hořčnatých iontů probíhalo při 65 °C.

3.3.4 Vliv přídavku fluorescenčního barviva na průběh LAMP reakce

V případě několika experimentů byla provedena optimalizace LAMP protokolu změnou koncentrace fluorescenčního barviva. Zásobní komerční roztok Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy standardně obsahuje fluorescenčního barviva EvaGreen® o koncentraci 100 μM . Dvě reakční směsi byly připraveny způsobem popsáním v kapitole 3.3.2 s tím rozdílem, že byl následně v jednom případě proveden přídavek fluorescenčního barviva SYTO™ 82 a přídavek fluorescenčního barviva EvaGreen® v případě druhém tak, aby výsledná koncentrace daného barviva v reakční směsi byla 2 μM . Měření průběhu LAMP reakce s přídavkem fluorescenčního barviva probíhalo při 65 °C.

3.3.5 Metoda LAMP s fluorescenční detekcí SA v klinických vzorcích pacientů

Byly připraveny inkubační směsi pro LAMP detekci SA ve třech klinických vzorcích pacientů označených jako A, B a C. Klinické vzorky byly poskytnuty spolupracující laboratoří Dr. Mariena de Jonge, Radboud University, Nijmegen, Nizozemsko a byly odebírány speciálním dechovým analyzátozem.

K přípravě reakčních směsí obsahujících klinické vzorky bylo nejprve nutno jednotlivé klinické vzorky rozdělit do mikrozkuvek po 20 μl , zahřát na teplotu 95 °C po dobu 15 minut a následně zmrazit při teplotě – 20 °C. Následně byl připraven pracovní roztok směsi „primerů“ sady SAs3, stejným postupem, jako je uveden v kapitole 3.3.2. Všechny reakční směsi byly řádně promíchány a centrifugovány na stolní centrifuze. Celkem bylo připraveno osm 25 μl a čtyři 50 μl inkubační směsi negativní kontroly, šest 25 μl inkubačních směsí každého vzorku (A, B a C), tři 50 μl inkubační směsi vzorku A, čtyři 50 μl inkubační směsi vzorku B a čtyři 50 μl inkubační směsi vzorku C. Mikrozkuvky byly vloženy do termocykleru. Měření probíhalo při 67 °C a záznam změn intenzity fluorescence byl pořizován zařízením CFX Connect Real-Time PCR detection System, Bio-Rad každou minutu. Jako pozitivní byl považován vzorek, který vykazoval nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu s rozdílem alespoň 5 minut než nejrychlejší negativní kontrola.

3.3.6 Vizuální detekce produktů LAMP reakce

Byla připraveny tři LAMP reakční směsi. Reakční směs negativní kontroly obsahovala 42,0 μl Sapphire Bst Turbo DNA polymerasy, 3,4 μl 1 \times koncentrované směsi „primerů“ sady SAs3 a 38,6 μl vody. Druhá ze směsí obsahovala místo vody přídavek

templátové DNA *SA* o koncentraci 1 pg/ μ l, třetí obsahovala místo vody přidavek templátové DNA *SA* o koncentraci 0,1 pg/ μ l.

Reakční směsi byly rozděleny po 10 μ l do tří osmizkumavkových „stripů“, které byly umístěny do suché lázně a inkubovány při teplotě 65 °C po dobu 20 minut. Průběh LAMP reakce byl ukončena zahřátím na teplotu 95 °C po dobu 10 minut v suché lázni. Po ukončení LAMP byly „stripy“ krátce centrifugovány na stolní centrifuze po dobu 10 s, následně byly přeneseny na transiluminátor a byl pořízen fotografický snímek (Apple iPhone 12 mini). Teplota inkubačních směsí při pořizování fotografie byla 95 °C. Následně byl pořízen záznam teplotní křivky při teplotním gradientu od 60 do 95 °C, přičemž teplota byla zvyšována o 0,2 °C každých 5 s.

3.3.7 Analýza „primerů“ sady SAs3

Byly připraveny 100 μ l reakční směsi obsahující jednotlivé „primery“ sady SAs3, tj. F3, B3, FIP, BIP, BL, a jejich kombinace. Reakční směs byla připravena smícháním daného „primeru“, případně kombinace „primerů“, destilované vody a fluorescenčního barviva EvaGreen[®]. „Primery“ měly v inkubační směsi vždy stejnou koncentraci tj. 0,2 μ M F3, 0,2 μ M B3, 1,6 μ M FIP, 1,3 μ M BIP a 0,4 μ M FL. Koncentrace barviva EvaGreen[®] byla v každém vzorku 2 μ M. Celkem bylo připraveno patnáct směsí.

Měření bylo provedeno v duplikátech. Jednotlivé směsi byly rozděleny po 10 μ l vždy do dvou mikrozkuvek a mikrozkuvky byly vloženy do suché lázně a zahřívány na 65 °C po dobu 20 minut. Následně byly mikrozkuvky z termobloku vyjmuty, krátce centrifugovány na stolní centrifuze a přeneseny na transiluminátor. Byl pořízen fotografický snímek (Apple iPhone 12 mini) pro pozdější vyhodnocení při pokojové teplotě.

4 Výsledky

4.1 Tvorba konsenzuální sekvence genu *nuc* bakterie *SA* pro návrh LAMP „primerů“ pomocí programu Jalview

Postupem uvedeným v kapitole 3.3.1 na straně 31 byla nalezena sekvence genu *nuc* bakterie *SA*. Programem BLAST bylo nalezeno 1455 nukleotidových sekvencí tohoto genu různých kmenů bakterie *SA*. Ze souboru sekvencí použitých pro sekvenční porovnání v programu Jalview byly vyloučeny čtyři nejkratší sekvence. Získané sekvence byly porovnány pomocí algoritmu ClustalOWS a výsledné mnohonásobné porovnání sekvencí bylo použito pro konstrukci konsenzuální sekvence o délce 982 bp (obrázek 4.1).

```
TGTCTCGATATGATAGTCTGCAACGATTCATGTTGTAGGCTTTTTAATTTTACAAATAAGGCTA
AATTATATAAGTTCTGACACCTAAAATATAGAAAATACATACATAAAGTAAGTATAGTTATTTT
ATTATAATTATTAATTTTTATTAATTAATTGTA AAAATGTAGAATTATAATTAATTAACGTTT
AAAATATTTAAATTAACATAAAAAGAAAGAGGTGTTAGTTATGACAGAATAATACTTATTAAGTG
CTGGCATATGTATGGCAATTGTTTCAATATTACTTATAGGGATGGGCTATCAGTAATGTTTCGA
AAGGGCAATACGCAAAGAGGGTTTTCTTTTTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTG
TAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGG
TTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGAC
ATTAATTAAAGCGATTGATGGTGATACGGTTAAATTAATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTC
AGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAAAAAGGTGTAGAGAAATATGGTC
CTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTGCAGTTTG
ACAAAGGTCAAAGAAGTATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGGAAAAAT
GGTAAACGAAGCTTTAGTTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAACCAAT
ACACATGAACAACCTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAGCGAAAAAAGAGAAATTAATATTTGTT
GGAGCGAAGACAACGCTGATTCAGGTCAATAATGCTCATTGTAAAAGTGTCACTGCTGCTAGTG
GCACTTTTATAATTTTGTAGATC
```

Obr. 4.1 Konsenzuální sekvence genu *nuc* získaná na základě mnohonásobného sekvenčního porovnání genu *nuc* různých kmenů bakterie *SA*.

4.2 Návrh LAMP „primerů“ cílicích na gen *nuc* bakterie *SA*

Pomocí internetového nástroje OligoAnalyzer byla konsenzuální sekvence identifikována jako sekvence bohatá na AT páry (69,1 %), na základě čehož byly nastaveny parametry pro návrh „primerů“ v programu NEB LAMP Primer Design Tool (viz. tabulka 1, kapitola 3.3.1 na straně 32).

Pro cílový gen *nuc* bakterie *SA* bylo navrženo celkem sedm sad LAMP „primerů“ označených SAs1 až SAs7 (zkratka „SA“ označuje organismus, písmeno „s“ označuje sadu). Sady SAs0, SAs4, SAs5, SAs6 a SAs7 sestávaly ze všech šesti „primerů“ (F3, B3, FIP, BIP, FL, BL) (viz. obrázky 4.2, 4.6, 4.7, 4.8 a 4.9). V případě sad SAs1,

SAs3 chyběl „primer“ FL (viz. obrázky 4.3. a 4.5) a v případě sady SAs2 „primer“ BL (viz. obrázek 4.4). Sekvence všech „primerů“ jsou uvedeny v kapitole 3.2.3 na straně 28.

AGCTCAGCAAATGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATATA
 GTGCAACTTCAAATAAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGACATTAAATTAAGCGATTGATGGTGATACGG
 TTAAATTAATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCA
 TCCTAAAAAAGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAACAAGTGCATTTACGAAAAAAAATGGTAGAAAATGC
 AAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAAGAAGTGCATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATT

Obr. 4.2 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs0. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL a červeně „primeru“ FL.

TGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTGA
 AGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAAAGACTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGGA
 AAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAACATA
 CACATGAACAACCTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAGCGAAAAAAGA GAAATTAATATTTGTTGGAGCGA

Obr. 4.3 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs1. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL.

GGCATATGTATGGCAATTGTTTCAATATTACTTATAGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCGAAAGGCAA
 TACGCAAAGAGGGTTTTCTTTTTTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTA
 AGTAGCTCAGCAAATGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGTCTCTGAAGATCCAACAGTAT

Obr. 4.4 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs2. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, červeně „primeru“ FL.

CATCCTAAAAAAGGTGTAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAAATGGTAGAAAAT
 GCAAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGACAAGGTCAAAGAAGTGCATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATA
 TTTATGCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTA
 TAAACCTAACAAATACACATGAACAACCTTTTAAGAAAAAGTGAAGCACAAGCGAAAAAAGA GAAATTAAT

Obr. 4.5 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs3. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL.

TGACAGAATAACTTATTAAATGTGCTGGCATATGTATGGCAATTGTTTCAATATTACTTATAGGGATGGG
 CTATCAGTAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAAGAGGGTTTTCTTTTTTCGCTACTAGTTGCTTAGTGT
 TAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCACAAACAGATAACGGCGTAAATAG
 AAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGAC

Obr. 4.6 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs4. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL a červeně „primeru“ FL.

CTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAAAATGGTAGAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGACAAAG
 GTCAAAAGACTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGC
 TTTAGTTTCGTCAAGGCTTGGCTAAAGTTGCTTATGTTTATAAACCTAACAAATACACATGAACAACCTTTTA
 AGAAAAAGTGAAGCACAAGCGAAAAAAGA GAAATTAATATTTGTTGGAGCGAAGACAACGCTGATTCAG

Obr. 4.7 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs5. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL a červeně „primeru“ FL.

AAAAAGAAAGAGGTGTTAGTTATGACAGAATAATACTTATTAAGTGCTGGCATATGTATGGCAATTGTTT
 CAATATTACTTATAGGGATGGGCTATCAGTAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAAGAGGGTTTTCTTTT
 TTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCAC
 AAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAAAA

Obr. 4.8 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs6. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL a červeně „primeru“ FL.

CAATATTACTTATAGGGATGGGCTATCAGTAAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAGAGGGTTTTCTTT
 TTCGCTACTAGTTGCTTAGTGTTAACTTTAGTTGTAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCAC
 AAACAGATAACGGCGTAAATAGAAGTGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAAAA

Obr. 4.9 Část konsenzuální sekvence genu *nuc*. Barevně zvýrazněny jsou cílové sekvence, na které cílily „primery“ sady SAs7. Žlutě zvýrazněna je cílová sekvence „primeru“ FIP, zeleně „primeru“ BIP, modře „primeru“ F3, fialově „primeru“ B3, šedě „primeru“ BL a červeně „primeru“ FL.

4.3 Primární testování osmi navržených sad LAMP „primerů“ pro detekci genu *nuc* bakterie *SA*

Schopnost navržených sad LAMP „primerů“ detekovat přítomnost genu *nuc* bakterie *SA* byla testována metodou fluorescenční detekce v reálném čase podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 na straně 32. Byly sledovány LAMP reakce se sérií roztoků templátové DNA *SA* o koncentraci 0,5 ng/μl – 5,0 fg/μl k následnému přibližnému stanovení limitu detekce, tj. nejnižší koncentrace templátové DNA *SA*, kterou jsme schopni spolehlivě detekovat v dané inkubační směsi. Pro každou sadu „primerů“ bylo provedeno testování také negativní kontroly, která neobsahovala templátovou DNA *SA*. Všechna měření byla prováděna v duplikátech. Průměrné časy, společně s výběrovými směrodatnými odchylkami, ve kterých byly LAMP reakce vyhodnoceny jako pozitivní jsou uvedeny v tabulce 2 na straně 40.

Tabulka 2 Výsledky testování navržených sad LAMP „primerů“ pro gen *nuc* bakterie *SA*. Uvedeny jsou průměrné časy, za které byly obdrženy pozitivní signály v podobě nárůstu intenzity fluorescence nad detekční mez.

	SAs0	SAs1	SAs2	SAs3	SAs4	SAs5	SAs6	SAs7
Průměrný čas ± směrodatná odchylka (min)								
Negativní kontrola	206 ± 18	123 ± 8	139 ± 24	178 ± 38	105 ± 5	132 ± 6	84 ± 8	70 ± 3
0,5 ng/μl	14 ± 2	11 ± 1	8 ± 0	9 ± 2	15 ± 0	11 ± 0	9 ± 1	7 ± 0
0,05 ng/μl	11 ± 1	13 ± 1	-	-	22 ± 2	12 ± 0	10 ± 0	8 ± 0
5,0 pg/μl	12 ± 0	28 ± 9	18 ± 1	13 ± 0	33 ± 8	16 ± 1	16 ± 3	10 ± 1
0,5 pg/μl	79 ± 51	174 ± 4	126 ± 20	45 ± 28	138 ± 16	67 ± 23	62 ± 46	45 ± 28
0,05 pg/μl	85 ± 1	177 ± 25	119 ± 8	112 ± 16	169 ± 8	138 ± 8	123 ± 6	43 ± 28
0,005 pg/μl	107 ± 8	134 ± 15	119 ± 12	96 ± 34	177 ± 1	106 ± 2	105 ± 32	86 ± 1

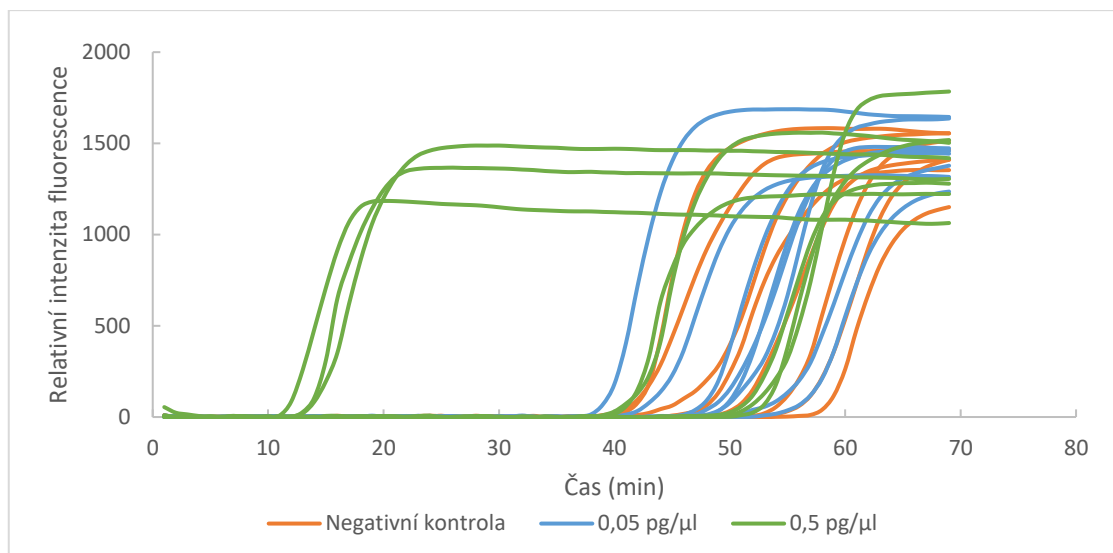
- Nebylo měřeno z důvodu chyby v pipetování

4.4 Sekundární testování navržených sad „primerů“

Podle primárního testování (viz. kapitola 4.3) byla jako limit detekce stanovena koncentrace templátové DNA *SA* 0,5 pg/μl. Pro sekundární testování byly vybrány dvě koncentrace templátové DNA *SA*, které hraničily s limitem detekce (0,5 pg/μl a 0,05 pg/μl), které jsme nebyli schopni detekovat se 100% přesností při primárním testování. Cílem testování bylo zvýšit počet paralelních měření, získat tak statisticky významnější výsledky a získat nejlepší sadu pro LAMP detekci bakterie *SA*. Inkubační směsi s koncentracemi templátové DNA *SA* 0,5 a 0,05 pg/μl byly testovány v osmi paralelních měření. Pro každou sadu bylo rovněž provedeno měření osmi negativních kontrol, které neobsahovaly přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.1 Sada „primerů“ SAs0

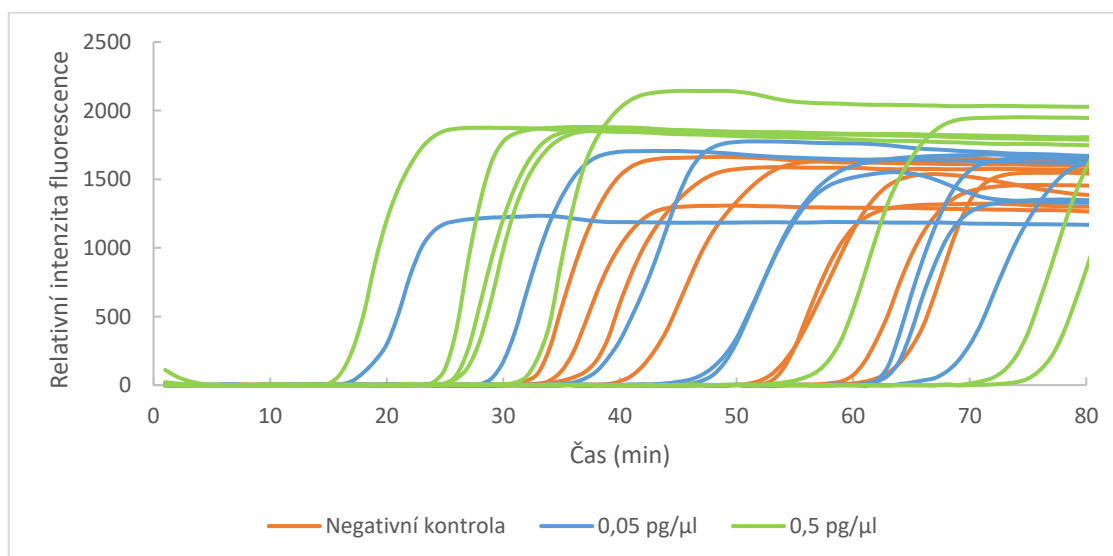
V případě sady SAs0 byly pozitivní tři inkubační směsi z osmi, obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, časovém intervalu 12 až 14 minut. Osm z osmi inkubační směsi obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo pravděpodobně falešně pozitivních v časovém intervalu 39 až 54 minut. Osm z osmi negativních kontrol bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 41 až 57 minut (viz. obrázek 4.10).



Obr. 4.10 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs0 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.2 Sada „primerů“ SAs1

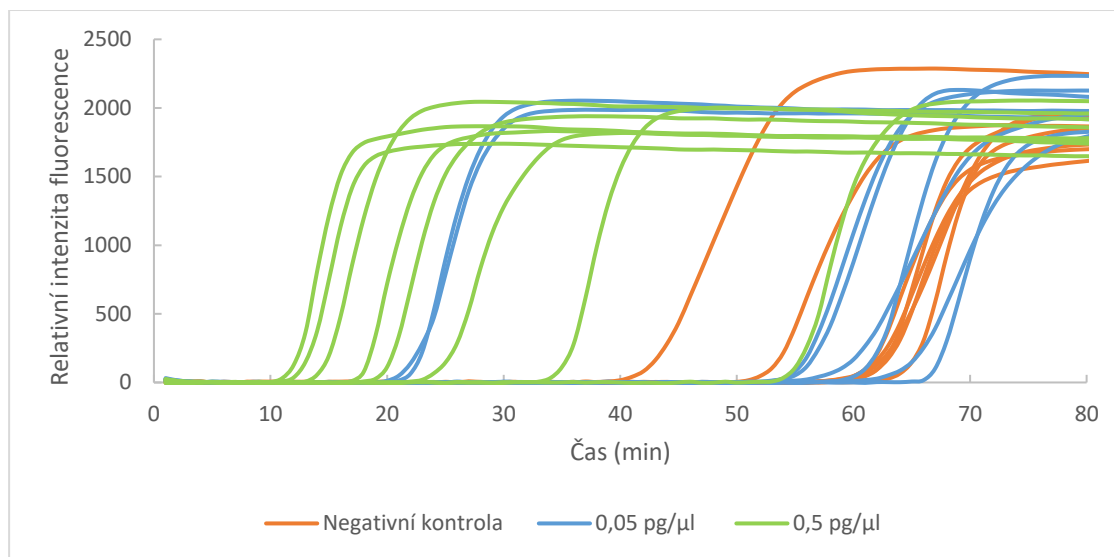
Sada SAs1 poskytla čtyři pozitivní inkubační směsi z osmi s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 15 až 25 minut. Dále byla jako pozitivní vyhodnocena jedna z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl v čase 17 minut. Osm z osmi negativních kontrol bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 33 až 62 minut (viz. obrázek 4.11).



Obr. 4.11 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs1 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce s „primery“ byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* v inkubační směsi – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.3 Sada „primerů“ SAs2

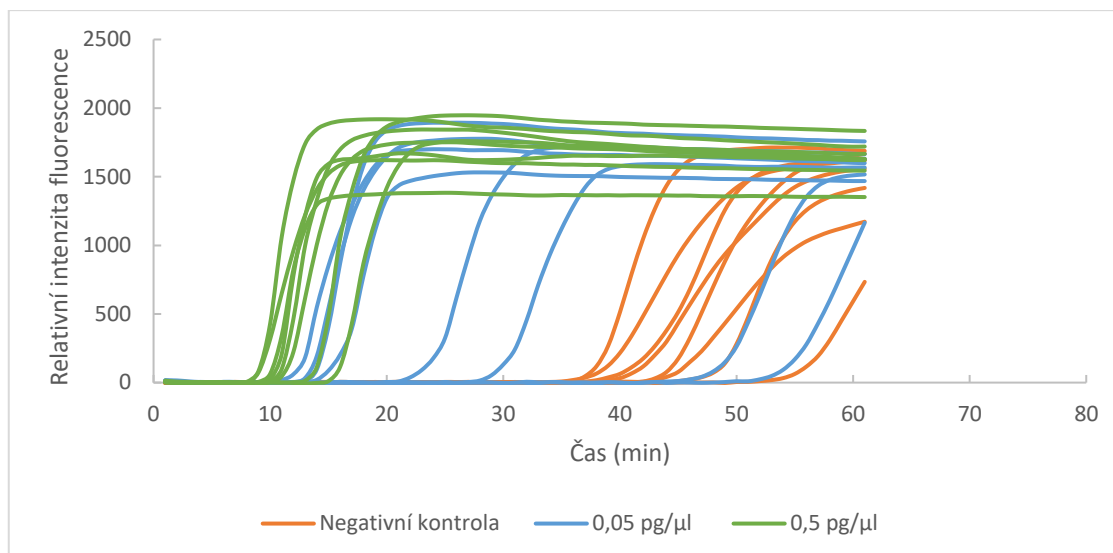
LAMP reakce s „primery“ sady SAs2 poskytla sedm pozitivních inkubačních směsí z osmi, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 11 až 34 minut. V případě inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly zaznamenány dva pozitivní výsledky z osmi, a to nárůstem intenzity fluorescence ve 22 minutě. Osm z osmi inkubačních směsí obsahující negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 41 až 63 minut (viz. obrázek 4.12).



Obr. 4.12 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs2 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.4 Sada „primerů“ SAs3

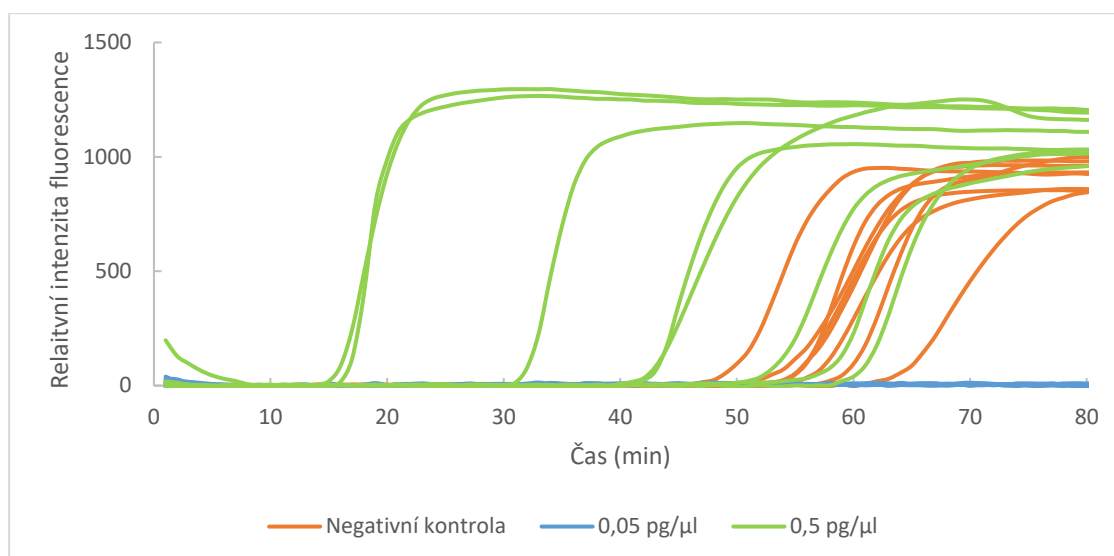
LAMP reakce s „primery“ sady SAs3 poskytla osm pozitivních inkubačních směsí z osmi, obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém intervalu 9 až 15 minut. V případě inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly zaznamenány čtyři pozitivní výsledky z osmi v časovém intervalu 11 až 29 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 37 až 53 minut. (viz. obrázek 4.13).



Obr. 4.13 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs3 cílí na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* v inkubační směsi – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.5 Sada „primerů“ SAs4

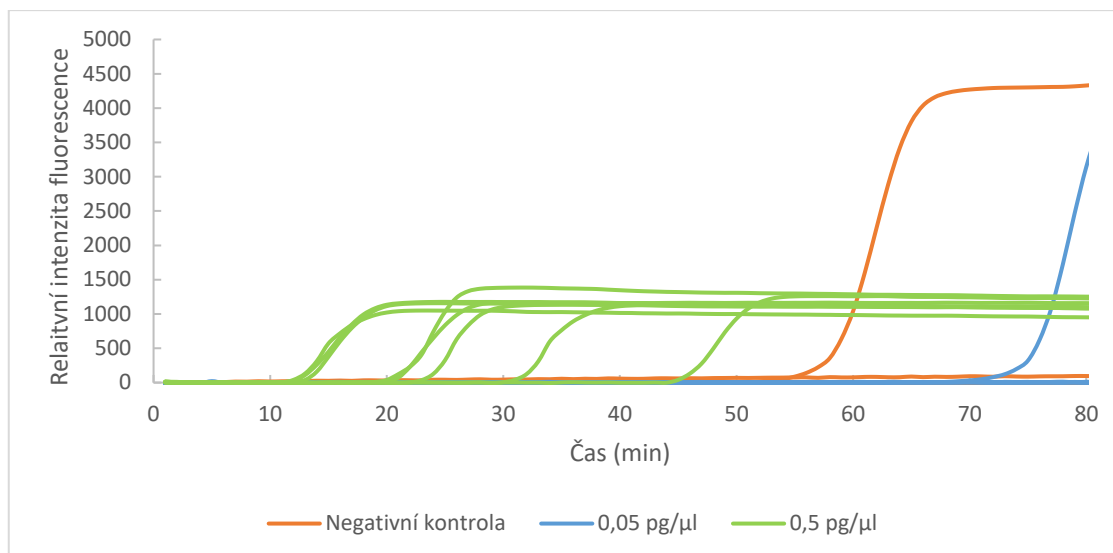
LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs4 poskytla pět pozitivních inkubačních směsí z osmi, obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 16 až 42 minut. V případě inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl nebyl do 80 minuty kdy byla reakce ukončena, zaznamenán žádný pozitivní výsledek. Osm z osmi inkubačních směsí obsahující negativní kontrolu bylo falešně pozitivní v časovém intervalu 48 až 63 minut (viz. obrázek 4.14).



Obr. 4.14 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs4 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.6 Sada „primerů“ SAs5

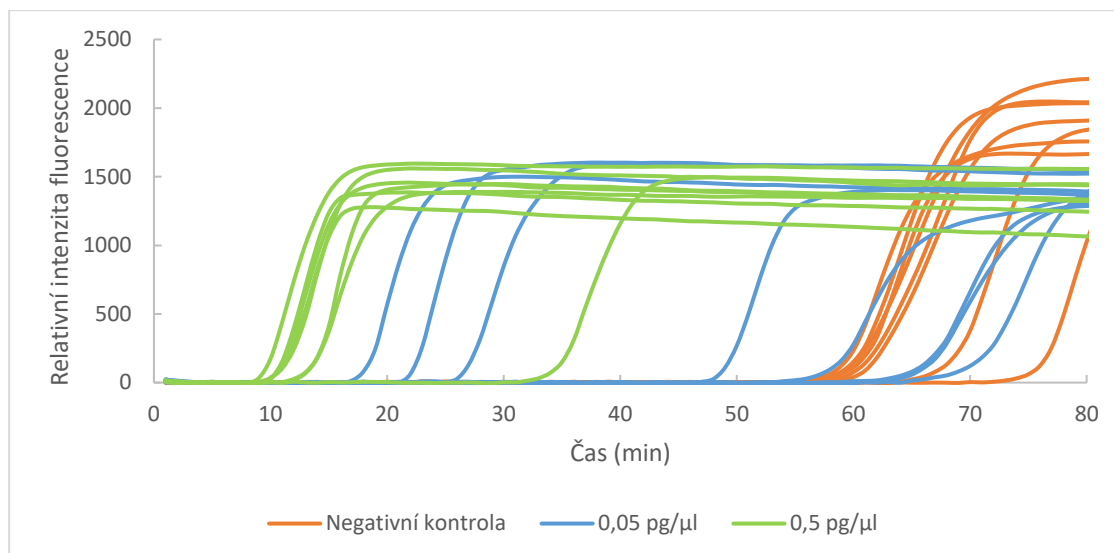
V případě sady „primerů“ SAs5 bylo jako pozitivní vyhodnoceno osm z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém intervalu 12 až 46 minut. Byl zaznamenán jeden, pravděpodobně falešně pozitivní výsledek, z osmi pro inkubační směs obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl v čase 73 minut. V případě zbylých sedmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl nedošlo k nárůstu intenzity fluorescence do času 80 minut, kdy byla reakce ukončena. V 53 minutě byla zaznamenána jedna falešně pozitivní inkubační směs negativní kontroly, z osmi. V případě zbylých sedmi inkubačních směsí negativní kontroly nedošlo k nárůstu intenzity fluorescence do času 80 minut, kdy byla reakce ukončena. (viz. obrázek 4.15).



Obr. 4.15 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs5 cílí na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.7 Sada „primerů“ SAs6

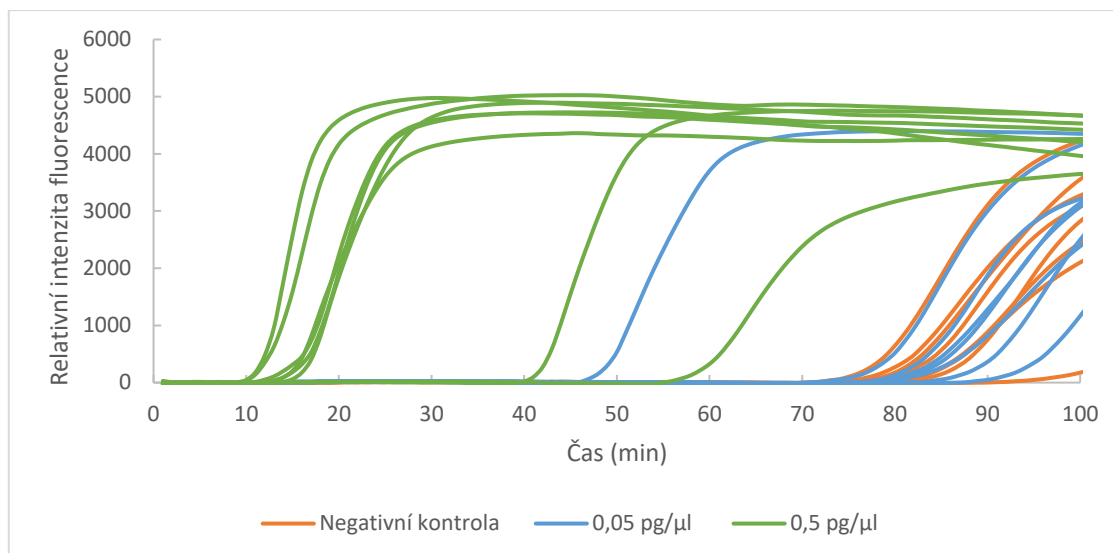
LAMP reakce s „primery“ sady SAs6 poskytla osm pozitivních inkubačních směsí z osmi, obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 10 až 34 minut. V případě inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly zaznamenány čtyři pozitivní výsledky z osmi v časovém intervalu 18 až 48 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahující negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 58 až 74 minut (viz. obrázek 4.16).



Obr. 4.16 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs6 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.4.8 Sada „primerů“ SAs7

V případě sady SAs7 bylo jako pozitivní vyhodnoceno osm z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém intervalu 11 až 57 minut. V čase 48 minut byla zaznamenána jedna pozitivní inkubační směs obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl, z osmi. Osm z osmi inkubačních směsí obsahující negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 75 až 97 minut (viz. obrázek 4.17).

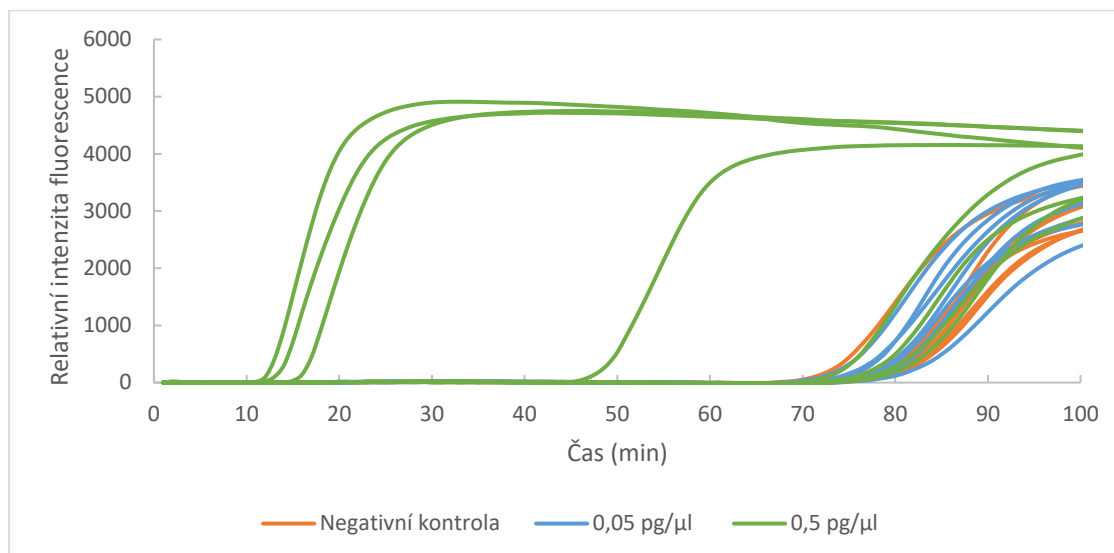


Obr. 4.17 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs7 cílí na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.5 Optimalizace koncentrace „primerů“ sady SAs7 v LAMP reakční směsi

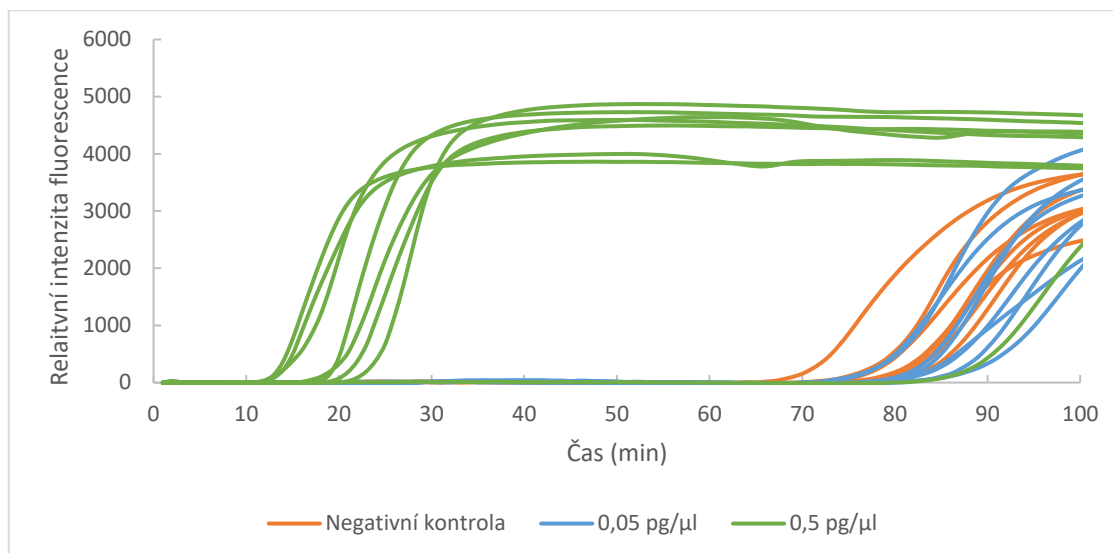
Pro detekci genu *nuc* bakterie *SA* metodou LAMP byla sada SAs7 vyhodnocena jako nejlepší ze všech testovaných sad. S cílem zlepšit limit detekce a zvýšit rychlost LAMP reakce využívající tuto sadu „primerů“, byla testována a) dvojnásobná koncentrace všech LAMP „primerů“ a b) dvojnásobná koncentrace pouze smyčkových LAMP „primerů“ v inkubační směsi podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 na straně 32. Pro obě varianty byla LAMP reakce provedena s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 a 0,05 pg/μl a bylo provedeno osm paralelních měření. Zároveň bylo pro obě koncentrace „primerů“ provedeno měření osmi negativních kontrol, které neobsahovaly přídavek templátové DNA *SA*.

V případě dvojnásobného přídavku směsi všech „primerů“ sady SAs7 byly pozitivní čtyři inkubační směsi z osmi, obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 11 až 47 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pravděpodobně falešně pozitivních v časovém intervalu 72 až 77 minut, stejně jako osm z osmi falešně pozitivních inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu (viz. obrázek 4.18).



Obr. 4.18 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce inkubačních směsí obsahující dvojnásobnou koncentraci všech „primerů“ sady SAS7. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

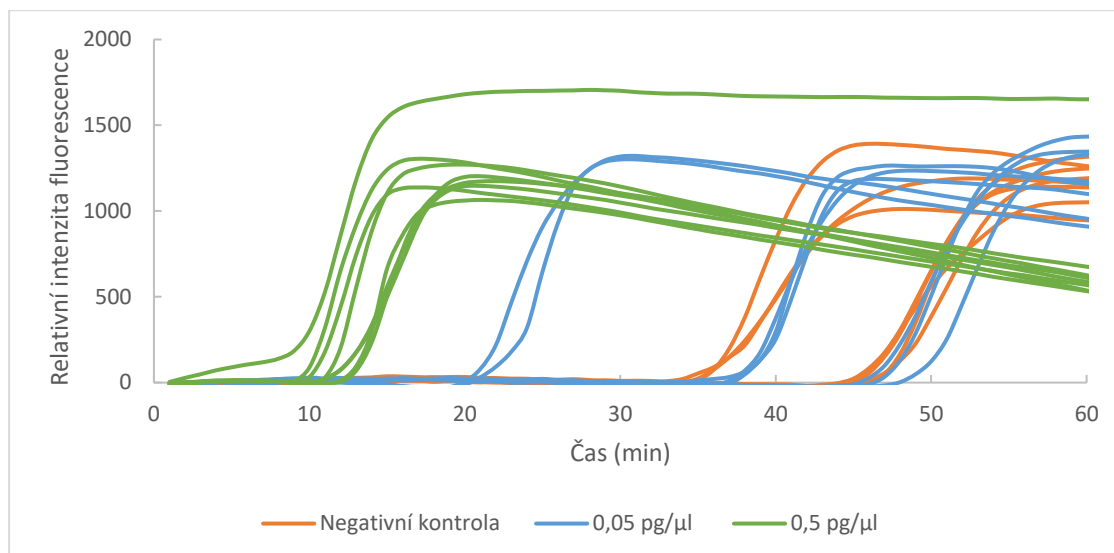
LAMP reakce s dvojnásobnou koncentrací smyčkových „primerů“ sady SAS7 poskytla osm pozitivních výsledků inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 11 až 21 minut. V případě inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo osm z osmi inkubačních směsí pravděpodobně falešně pozitivních v časovém intervalu 75 až 85 minut. Osm z osmi inkubačních směsí negativní kontroly bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 67 až 81 minut (viz. obrázek 4.19).



Obr. 4.19 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase reakční směsi obsahující dvojnásobnou koncentraci smyčkových „primerů“. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.6 Kontaminace produkty LAMP reakce využívající „primery“ sady SAs7

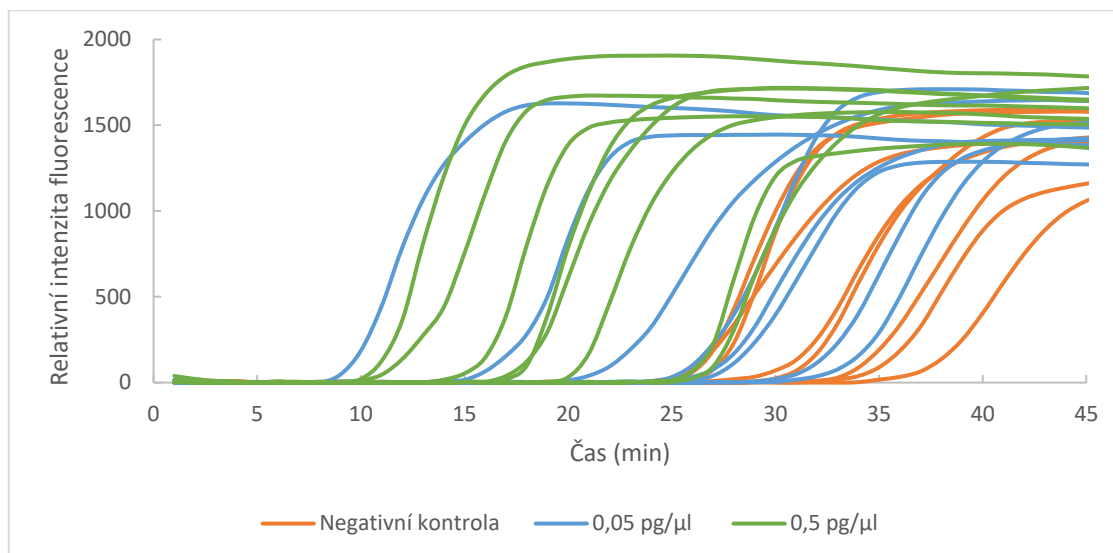
Bylo provedeno opakování LAMP experimentu se sadou „primerů“ SAs7 a výsledky byly porovnány s výsledky získanými při sekundárním testování (viz. kapitola 4.4.8 na straně 46). Osm z osmi inkubačních směsí obsahující negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 36 až 46 minut. Bylo zjištěno, že čas, ve kterém se negativní kontrola jeví jako falešně pozitivní je o 50 minut dříve než v případě původního sekundárního testování. Zároveň byly testovány inkubační směsi obsahující dvě nejnižší koncentrace templátové DNA *SA* tj. 0,5 pg/μl a 0,05 pg/μl. Všechny osm inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivních, a to v časovém intervalu 10 až 13 minut. Dvě inkubační směsi obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly pozitivní v čase 21 minut (viz. obrázek 4.20).



Obr. 4.20 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs7 cílící na gen *nuc* bakterie *SA* – opakování experimentu. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

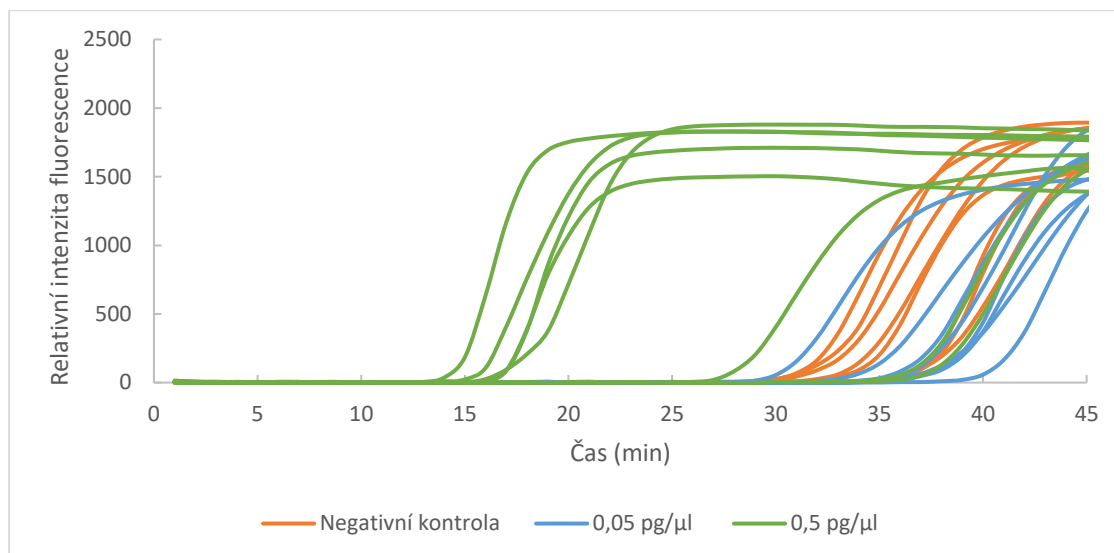
4.7 Optimalizace sekvencí „primerů“ sady SAs3

Byly provedeny LAMP experimenty s upravenou sadou „primerů“ SAs3 podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 na straně 32. Sada SAs3 obsahovala místo „primerů“ FIP a BIP „primery“ FIPpT a BIPpT (sekvence FIPpT a BIPpT viz kapitola 3.2.3 na straně 28). Při tomto experimentu bylo detekováno šest pozitivních inkubačních směsí z osmi, obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, v časovém intervalu 11 až 20 minut. Tři z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl, byly pozitivní v časovém intervalu 9 až 20 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 26 až 35 minut (viz. obrázek 4.21).



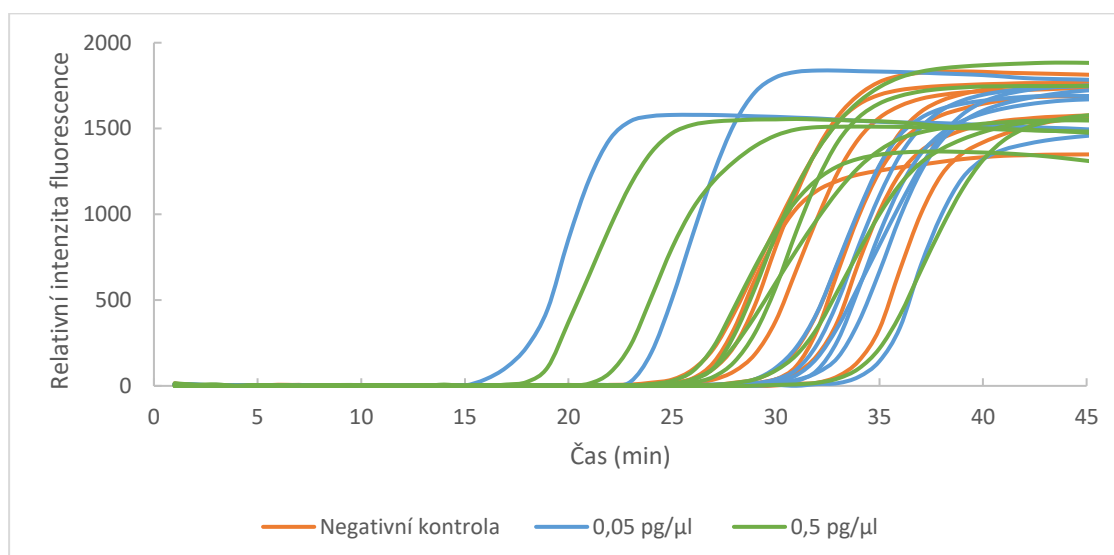
Obr. 4.21 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs3, která obsahovala FIPpT a BIPpT „primery“. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

LAMP reakce s „primery“ sady SAs3, která obsahovala navržený „primer“ FL, který není součástí původní sady a „primer“ FIPv2 poskytla následující výsledky: pět inkubačních směsí z osmi, s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl, bylo pozitivních v časovém intervalu 14 až 17 minut. V čase 30 minut byla pravděpodobně falešně pozitivní jedna z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 31 až 37 minut (viz. obrázek 4.22).



Obr. 4.22 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAS3 obsahující „primery“ FL a FIPv2. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *S4* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *S4*.

LAMP reakce s „primery“ sady SAS3, která obsahovala „primery“ FL, FIPpTv2 a BIPpT poskytla následující výsledky: dvě z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *S4* o koncentraci 0,5 pg/μl, bylo pozitivních v časovém intervalu 18 až 21 minut. V čase 16 minut byla zaznamenána jedna pozitivní inkubační směs z osmi s templátovou DNA *S4* o koncentraci 0,05 pg/μl. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontroly bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 26 až 34 minut (viz obrázek 4.23).



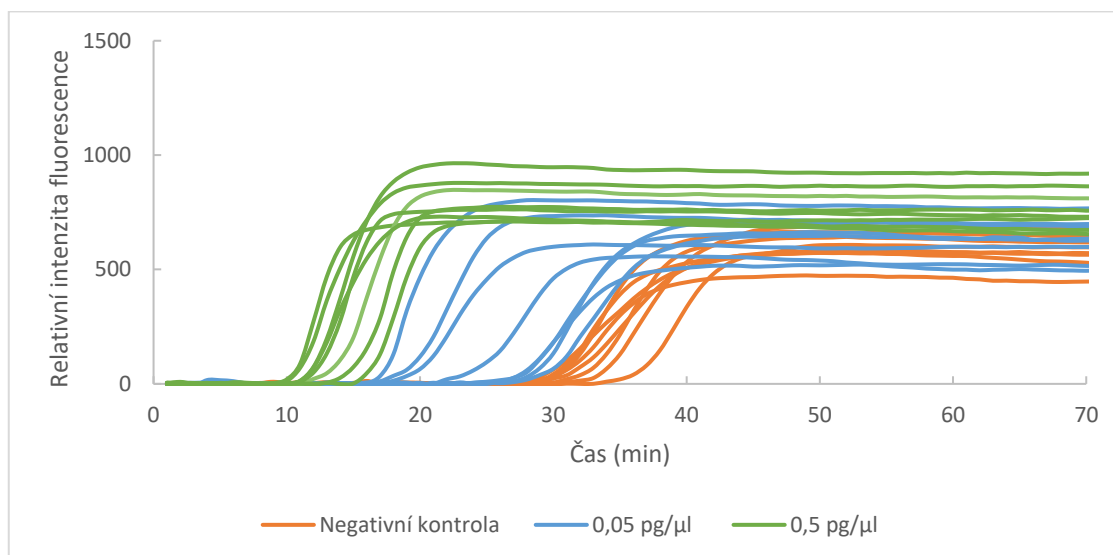
Obr. 4.23 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAS3 s „primery“ FIPv2pT, BIPpT a FL. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *S4* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *S4*.

4.8 Optimalizace koncentrace hořčnatých iontů v LAMP reakční směsi se sadou „primerů“ SAs3

Byly provedeny LAMP experimenty s upravenou koncentrací hořčnatých iontů podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.3 na straně 34. Celkem byl testován vliv čtyř různých koncentrací hořčnatých iontů (8, 7, 5 a 4 mM) v 10 µl inkubační směsích.

4.8.1 8 mM koncentrace hořčnatých iontů

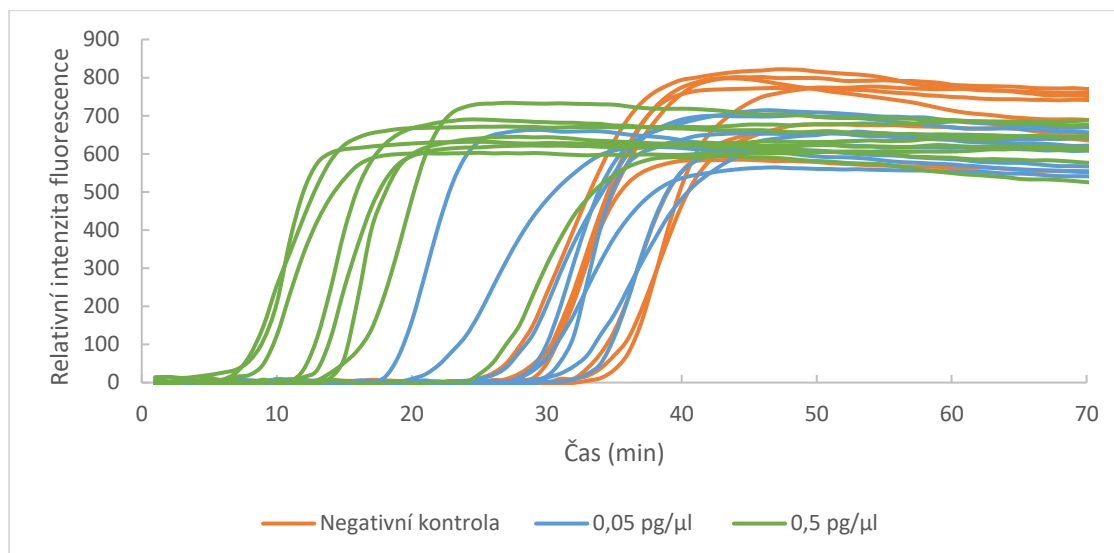
V případě koncentrace DNA *SA* 0,5 pg/µl bylo všech osm reakcí pozitivních v časovém intervalu 10 až 15 minut. Čtyři z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/µl byly pozitivní v časovém intervalu 16 až 23 minut. Všechny negativní kontroly byly falešně pozitivní v časovém intervalu 28 až 33 minut (viz. obrázek 4.24).



Obr. 4.24 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou „primerů“ SAs3 a 8 mM koncentrací hořčnatých iontů v jednotlivých inkubačních směsích. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/µl (modrá křivka) a 0,5 pg/µl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.8.2 7 mM koncentrace hořčnatých iontů

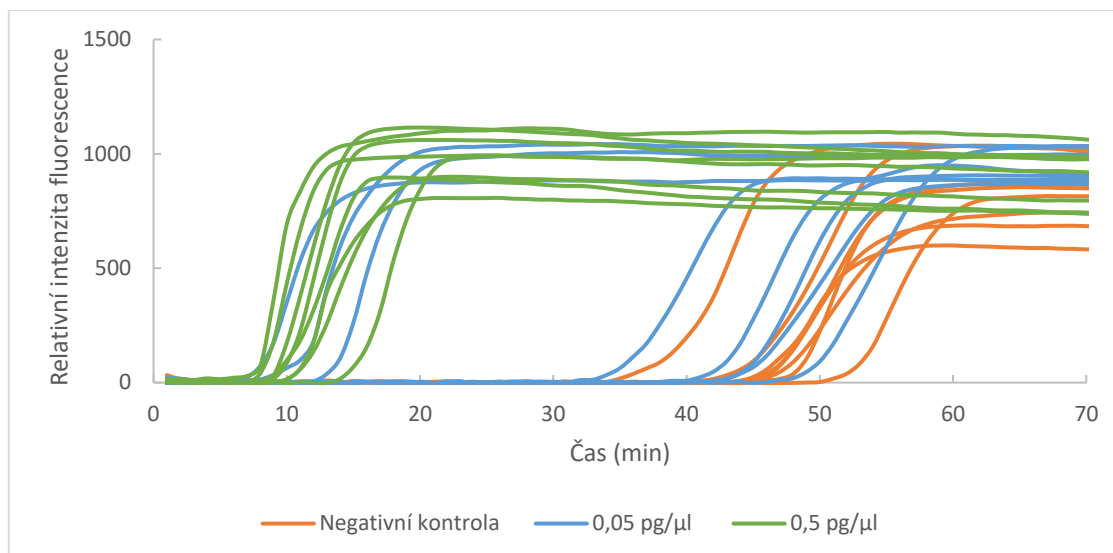
Inkubační směsi se 7 mM koncentrací hořčnatých iontů poskytly následující výsledky: sedm z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/µl bylo pozitivních v časovém intervalu 8 až 14 minut. Dvě z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/µl byly pozitivní v časovém intervalu 18 až 20 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 26 až 33 minut (viz. obrázek 4.25).



Obr. 4.25 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce s „primery“ sady SAs3 a 7 mM koncentrací hořčnatých iontů v jednotlivých inkubačních směsích. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.8.3 5 mM koncentrace hořčnatých iontů

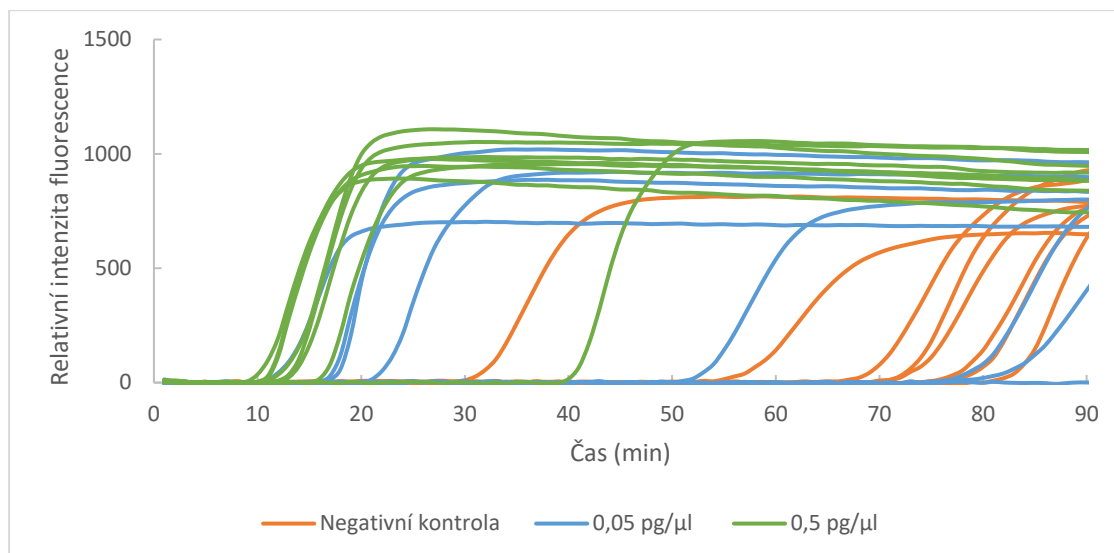
V případě inkubačních směsí s 5 mM koncentrací hořčnatých iontů a templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo zaznamenáno osm pozitivních výsledků z osmi v časovém intervalu 7 až 14 minut. Tři z osmi inkubačních směsí s 5 mM koncentrací hořčnatých iontů a templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly pozitivní v časovém intervalu 8 až 13 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 36 až 51 minut (viz. obrázek 4.26).



Obr. 4.26 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce s „primery“ sady SAs3 a 5 mM koncentrací hořčnatých iontů v jednotlivých inkubačních směsích. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.8.4 4 mM koncentrace hořčnatých iontů

Inkubační směsi se 4 mM koncentrací hořčnatých iontů poskytly následující výsledky: sedm z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 11 až 16 minut. Čtyři z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly pozitivní v časovém intervalu 12 až 22 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 31 až 81 minut (viz. obrázek 4.27).

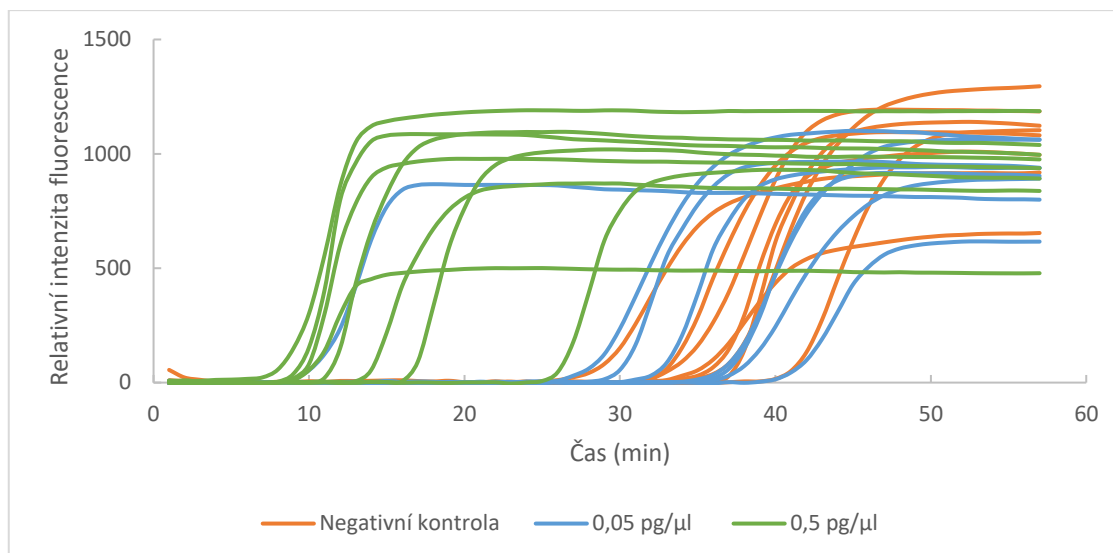


Obr. 4.27 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce s „primery“ sady SAs3 a 4 mM koncentrací hořčičných iontů v jednotlivých inkubačních směsích. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

4.9 Optimalizace LAMP protokolu přídavkem fluorescenčního barviva SYTO™ 82 a EvaGreen®

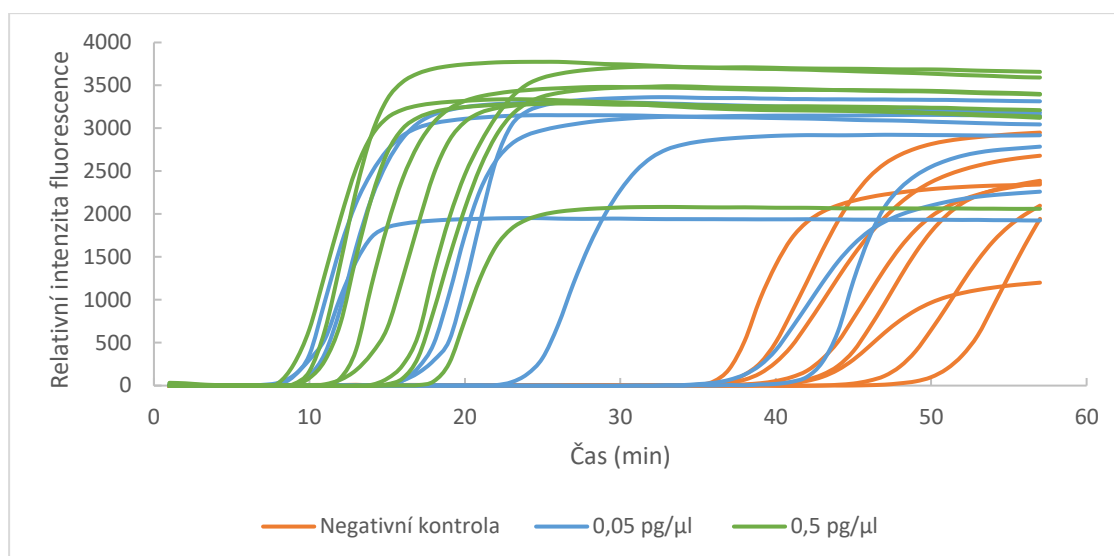
Byly provedeny LAMP experimenty s přídavkem fluorescenčního barviva do reakční směsi podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4 na straně 35. Byl testován vliv přídavku barviva SYTO™ 82 a EvaGreen® na průběh LAMP reakce.

V případě, kdy do reakční směsi bylo přidáno barvivo SYTO™ 82 bylo dosaženo následujících výsledků: pro inkubační směsi s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl a daného fluorescenčního barviva bylo pozitivních sedm z osmi testovaných v časovém intervalu 9 až 16 minut. Jedna z osmi inkubačních směsí, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byla pozitivní v čase 10 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 29 až 40 minut (viz. obrázek 4.28).



Obr. 4.28 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce s „primery“ sady SAs3 a přidavkem fluorescenčního barviva SYTO™ 82 do inkubační směsi. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přidavek templátové DNA *SA*.

V případě přidavku barviva EvaGreen® bylo pozitivních osm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém intervalu 9 až 18 minut. Šest z osmi inkubačních směsí, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 10 až 24 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 37 až 49 minut (viz. obrázek 4.29).



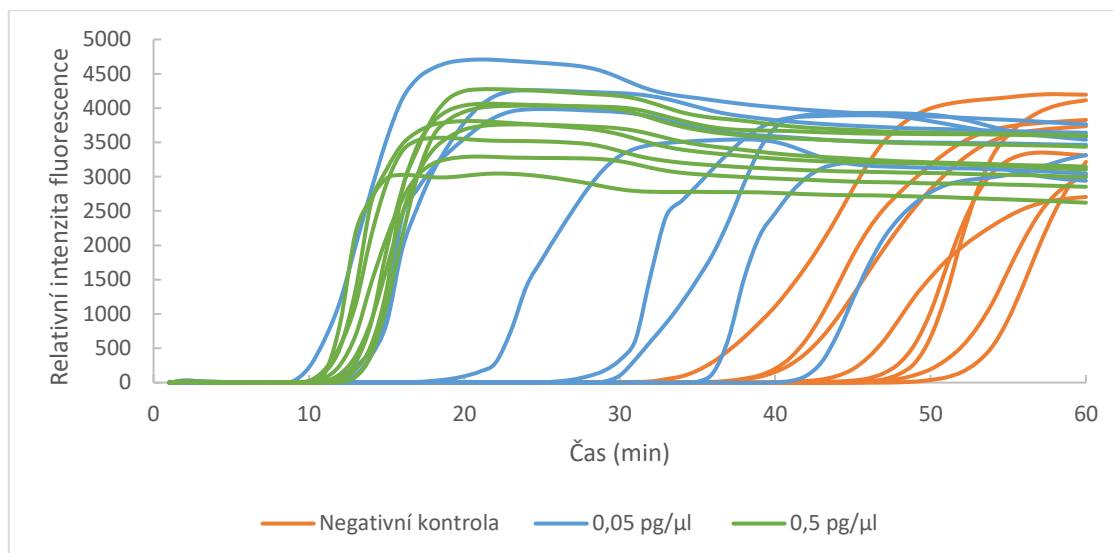
Obr. 4.29 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce s „primery“ sady SAs3 přidavkem fluorescenčního barviva EvaGreen® do inkubační směsi. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přidavek templátové DNA *SA*.

4.10 Optimalizace teploty a objemu LAMP reakční směsi se sadou „primerů“ SAs3

Byly provedeny LAMP experimenty podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 na straně 32. Těmito experimenty byl testován vliv teploty a objemu inkubační směsi na průběh LAMP. Celkem byly testovány tři různé teploty, při kterých reakce probíhala, a to 65, 67 a 69 °C. Zároveň byl testován průběh LAMP při těchto teplotách ve třech různých objemech inkubačních směsí, a to 10, 25 a 50 μl.

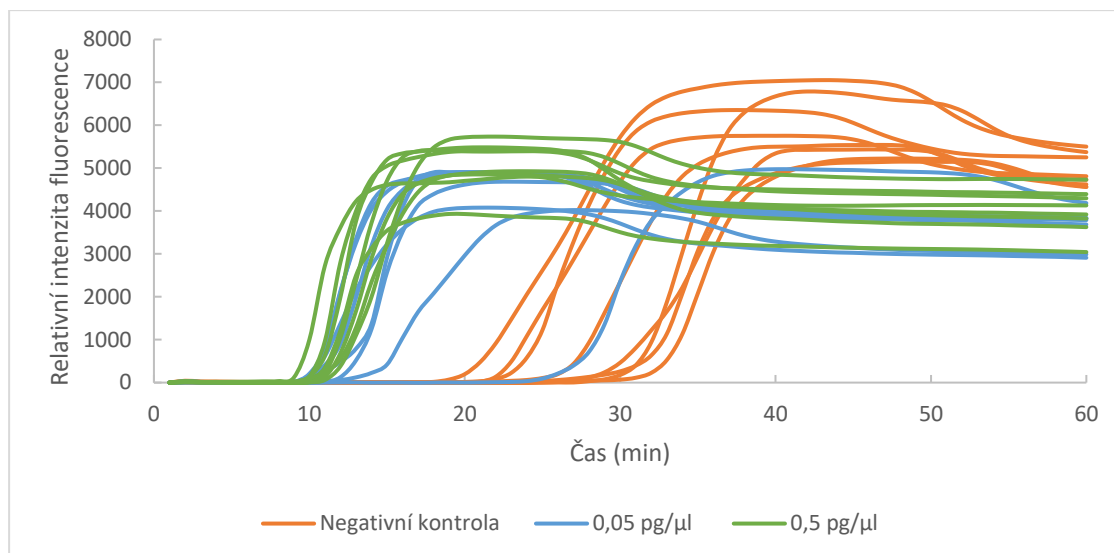
4.10.1 Teplota 65 °C, objem 25 a 50 μl

Nejdříve byly provedeny experimenty se zvýšeným objemem inkubační směsi na 25 a 50 μl, při teplotě 65 °C. V případě LAMP experimentů při 65 °C a objemu inkubační směsi 25 μl byly zaznamenány následující výsledky: pro inkubační směsi obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivních osm z osmi směsí v časovém intervalu 9 až 12 minut. Pět inkubačních směsí z osmi, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 9 až 28 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 33 až 50 minut (viz. obrázek 4.30).



Obr. 4.30 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 65 °C a 25μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAS3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

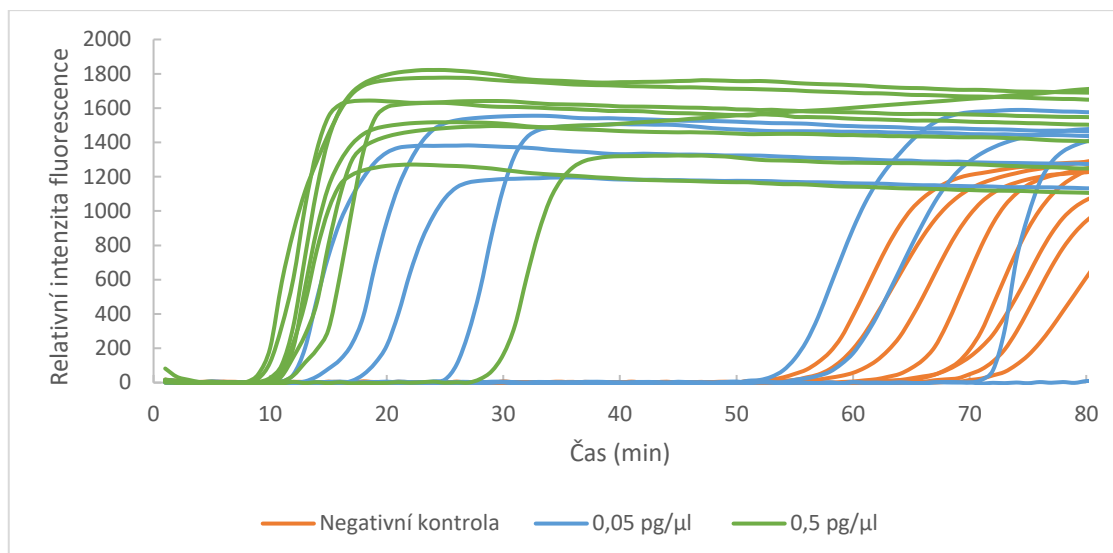
V případě LAMP experimentu při teplotě 65 °C a 50μl objemu inkubační směsi bylo zaznamenáno osm z osmi pozitivních inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém intervalu 8 až 10 minut. Sedm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 8 až 11 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 19 až 29 minut (viz. obrázek 4.31).



Obr. 4.31 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 65 °C a 50μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAs3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

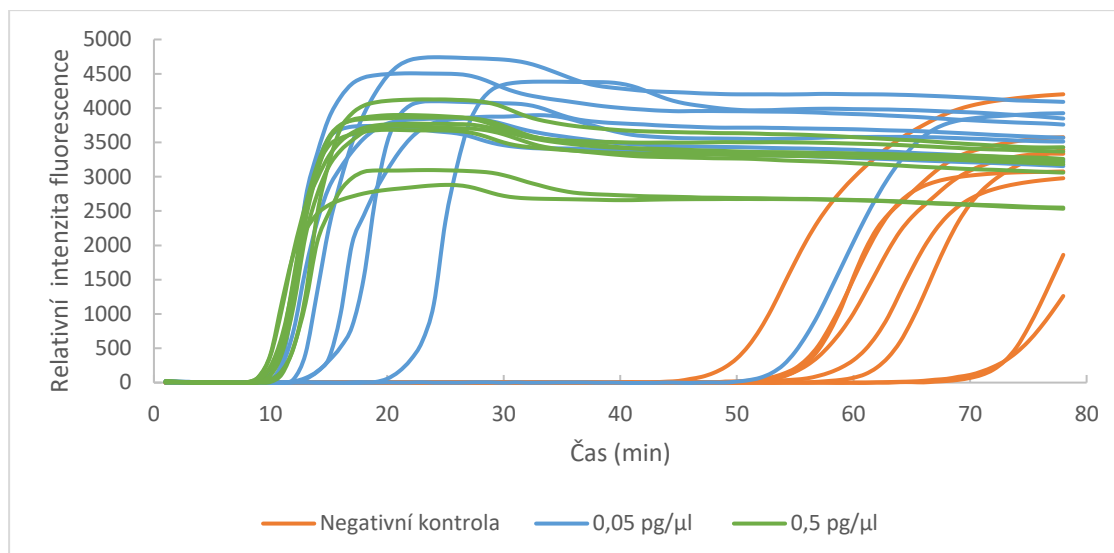
4.10.2 Teplota 67 °C, objem 10, 25 a 50 μl

Následovala sada experimentů při teplotě 67 °C a objemech inkubačních směsí 10, 25 a 50 μl. V případě 67 °C a 10μl objemu inkubačních směsí bylo pozitivních osm z osmi směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém rozmezí 9 až 28 minut. V případě inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly zaznamenány čtyři pozitivní směsi z osmi, v časovém intervalu 13 až 26 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 55 až 71 minut (viz. obrázek 4.32).



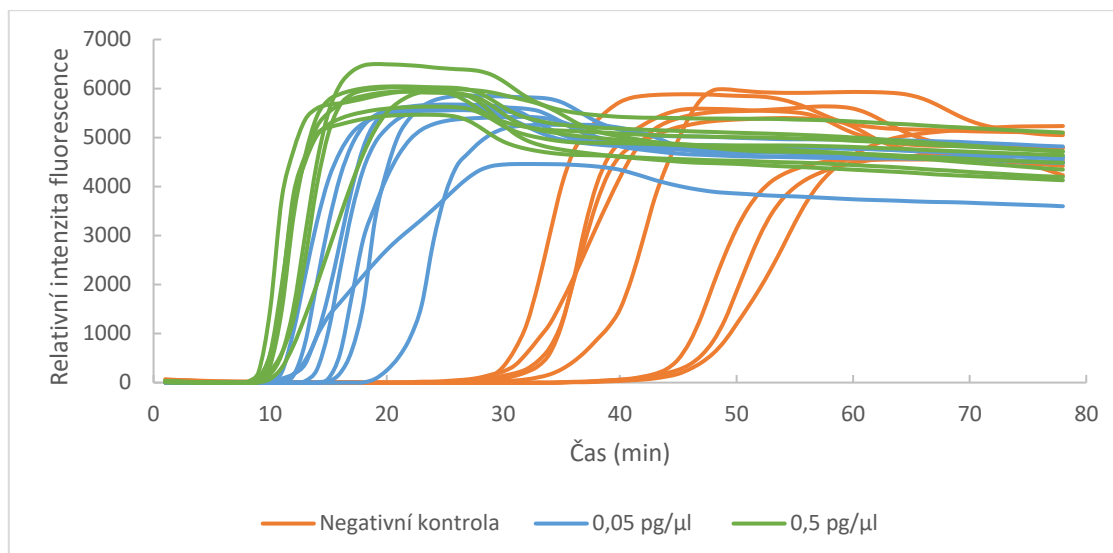
Obr. 4.32 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 67 °C a 10 μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAS3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

LAMP experimenty při teplotě 67 °C a objemu 25 μl poskytly následující výsledky: osm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivní v časovém intervalu 9 až 10 minut. Sedm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo pozitivních v časovém rozmezí 8 až 19 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 48 až 71 minut (viz. obrázek 4.33).



Obr. 4.33 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 67 °C a 25μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAs3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

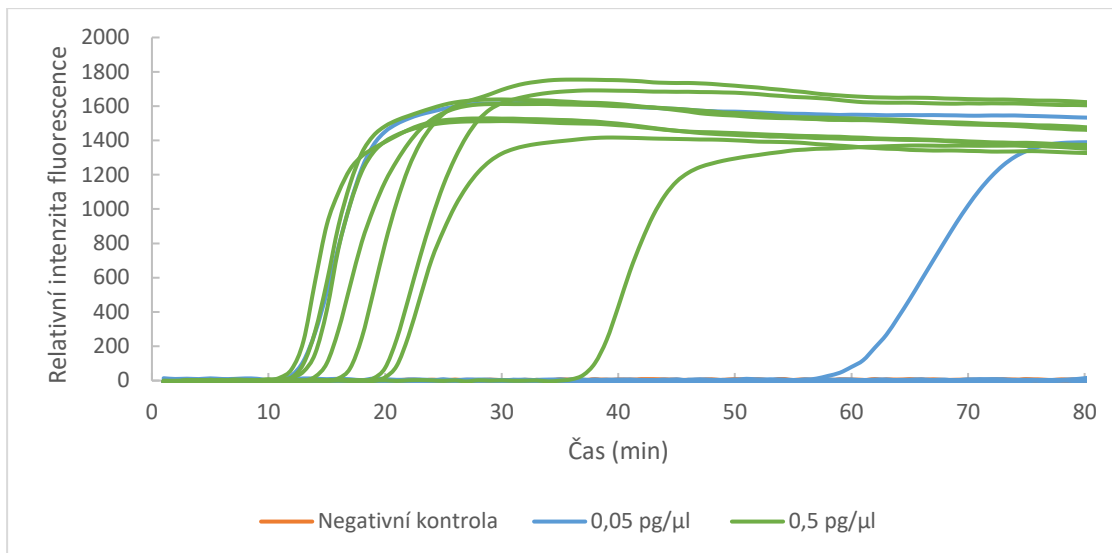
Při průběhu LAMP reakce při 67 °C a 50μl objemu inkubačních směsí bylo pozitivních osm z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v časovém intervalu 8 až 10 minut. Osm z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl v časovém intervalu 10 až 19 minut. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících negativní kontrolu bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 30 až 44 minut (viz. obrázek 4.34).



Obr. 4.34 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 67 °C a 50 μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAs3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

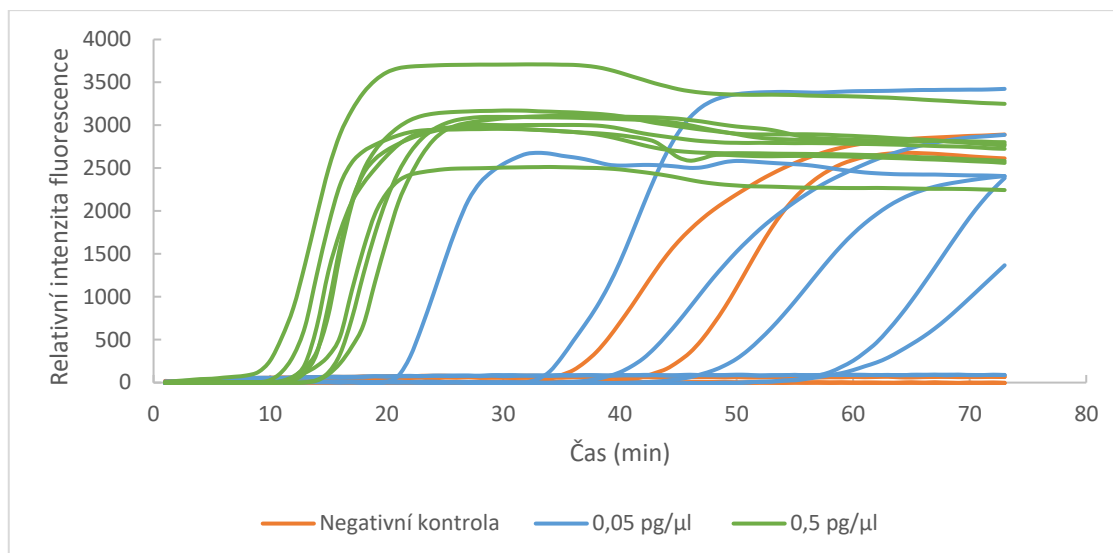
4.10.3 Teplota 69 °C, objem 10, 25 a 50 μl

Následovaly LAMP experimenty při teplotě 69 °C ve třech různých objemech inkubačních směsí a to 10, 25 a 50 μl. První experimenty při teplotě 69 °C a 10 μl objemu inkubační směsi poskytly následující výsledky: osm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 12 až 37 minut. Jedna z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byla pozitivní v čase 60 minut. Do 80 minuty, kdy byla reakce ukončena, nebyla zaznamenána žádná falešně pozitivní inkubační směs negativní kontroly (viz. obrázek 4.35).



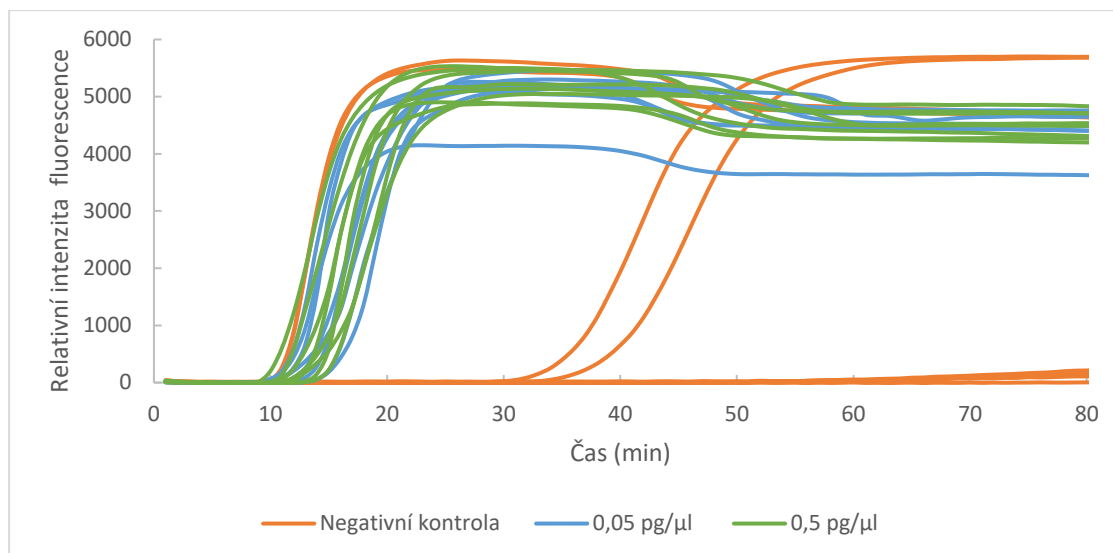
Obr. 4.35 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 69 °C a 10 μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAs3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

Následovalo zvýšení objemu inkubačních směsí na 25 μl a průběh LAMP při teplotě 69 °C. Osm z osmi inkubačních směsí, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 10 až 13 minut. Jedna z osmi inkubačních směsí, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byla pozitivní v čase 21 minut. Dvě z osmi inkubačních směsí negativní kontroly byly falešně pozitivní v časovém intervalu 37 až 43 minut (viz. obrázek 4.36).



Obr. 4.36 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 69 °C a 25 μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAs3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

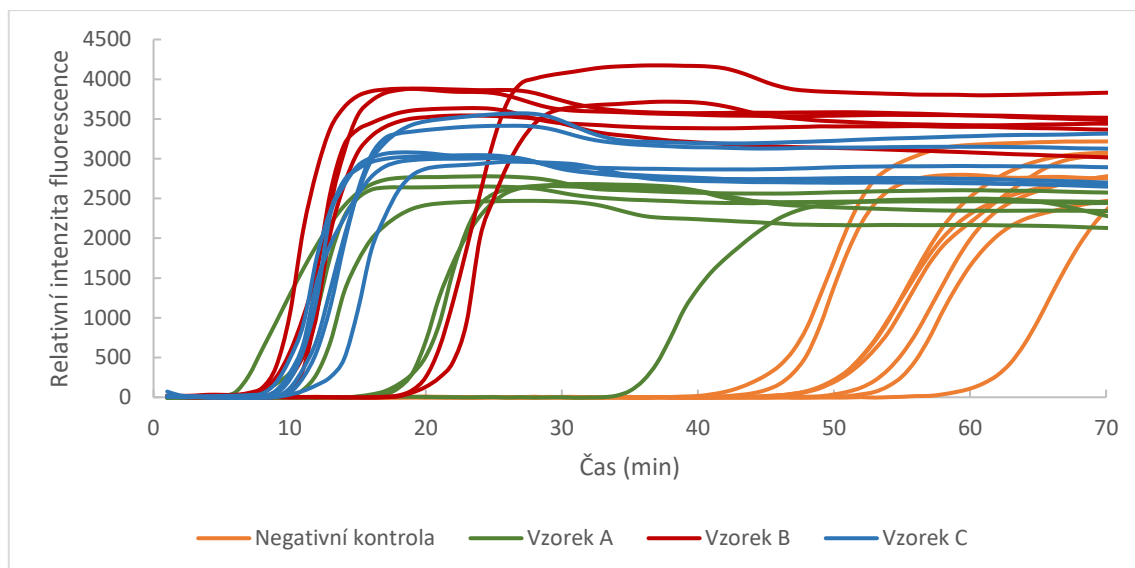
Objem reakční směsi byl navýšen z 25 μl na 50 μl a LAMP experiment probíhal při 69 °C. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pravděpodobně falešně pozitivních v časovém intervalu 10 až 13 minut. Zároveň bylo pravděpodobně falešně pozitivních osm z osmi inkubačních směsí, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl, v časovém intervalu 11 až 15 minut. Čtyři inkubační směsi negativní kontroly z osmi byly falešně pozitivní v časovém intervalu 11 minut až 35 minut (viz. obrázek 4.37).



Obr. 4.37 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce probíhající při 69 °C a 50 μl objemu inkubační směsi se sadou „primerů“ SAs3 cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

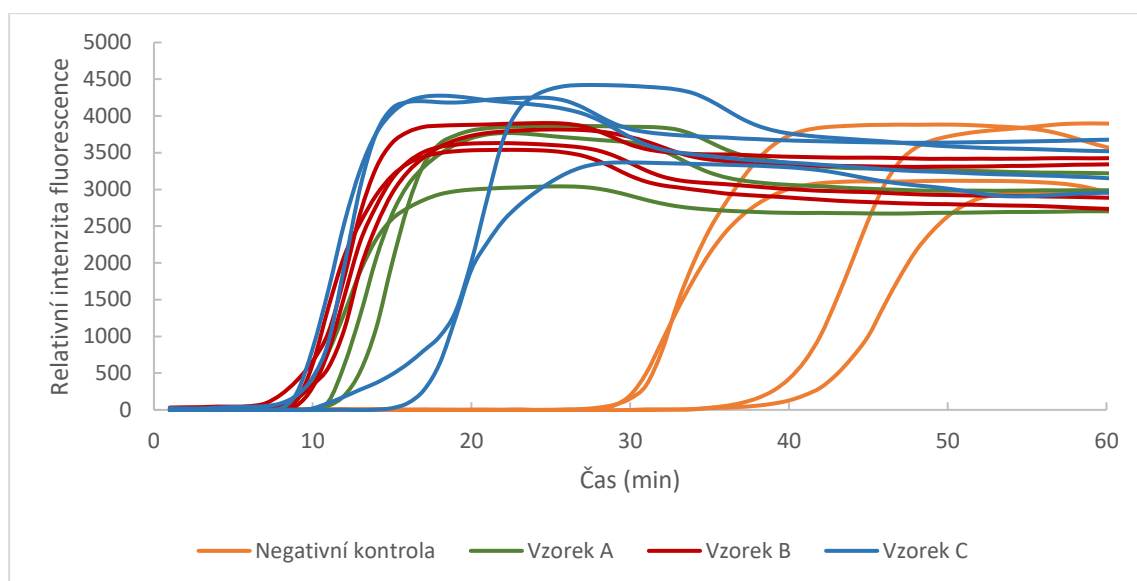
4.11 Detekce bakterie *SA* v klinických vzorcích metodou LAMP

Podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.5 na straně 35 byly připraveny inkubační směsi se vzorky tří pacientů pro LAMP detekci bakterie *SA*. V prvním kole testování měly inkubační směsi výsledný objem 25 μl. V případě inkubačních směsí obsahujících negativní kontroly bylo falešně pozitivních osm z osmi inkubačních směsí v časovém intervalu 43 až 58 minut. LAMP reakce dále proběhla ve všech šesti inkubačních směsích s klinickým vzorkem A, přičemž nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu v byl zaznamenán časovém intervalu 7 až 33 minut. LAMP reakce proběhla rovněž ve všech šesti inkubačních směsích se vzorkem klinického pacienta B, přičemž nárůst intenzity fluorescence nad prahovou byl zaznamenán v časovém intervalu 8 až 19 minut. V případě inkubačních směsí obsahujících klinický vzorek pacienta C byl zaznamenán nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu pro všech šest testovaných inkubačních směsí v časovém intervalu 9 až 11 minut (viz. obrázek 4.38).



Obr. 4.38 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce 25 μ l inkubačních směsí. Inkubační směsi negativní kontroly (oranžové křivky) neobsahovaly přídavek DNA *SA*. Inkubační směsi obsahující vzorek A (zelené křivky), vzorek B (červené křivky) a vzorek C (modré křivky) byly až na jednu výjimku pozitivní do 20 minut.

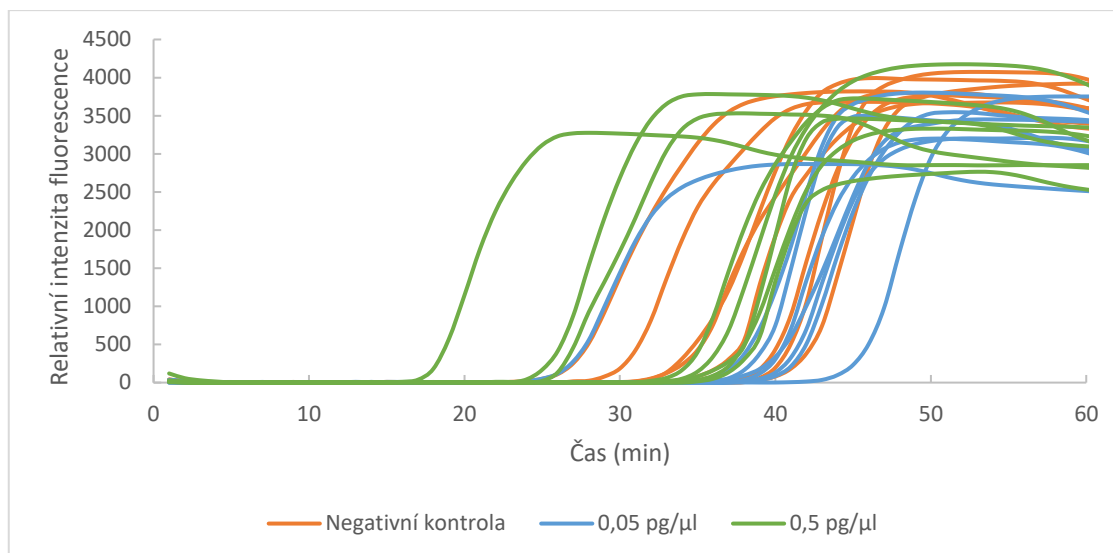
Následovalo testování LAMP detekce *SA* v klinických vzorcích pacientů v inkubačních směsích o objemu 50 μ l. Byly testovány čtyři inkubační směsi obsahující negativní kontrolu a nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu všech směsí byl zaznamenán v časovém intervalu 30 až 37 minut. LAMP reakce proběhla ve všech třech 50 μ l inkubačních směsí se vzorkem klinického pacienta A, přičemž nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu byl zaznamenán v časovém intervalu 9 až 11 minut. V případě vzorku klinického pacienta B proběhla LAMP reakce ve všech čtyřech 50 μ l inkubačních směsích a nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu byl zaznamenán v časovém intervalu 8 až 9 minut. LAMP reakce proběhla rovněž ve všech čtyřech inkubačních směsích se vzorkem klinického pacienta C a nárůst intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu byl zaznamenán v časovém intervalu 9 až 16 minut (viz. obrázek 4.39).



Obr. 4.39 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce 50 μ l inkubačních směsí. Inkubační směsi negativní kontroly (oranžové křivky) neobsahovaly přídavek DNA *SA*. Inkubační směsi obsahující vzorek A (zelené křivky), vzorek B (červené křivky) a vzorek C (modré křivky) byly pozitivní do 20 minut.

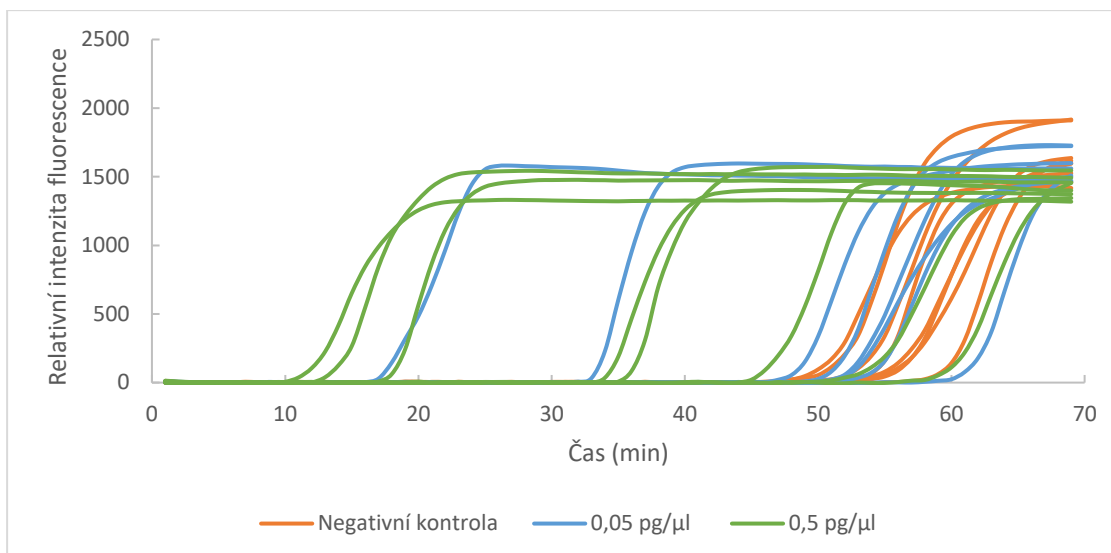
4.12 LAMP experimenty využívající již publikované sekvence „primerů“ pro detekci DNA bakterie *SA*

Byly provedeny dva LAMP experimenty využívající již publikované „primery“ pro detekci DNA bakterie *SA* podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.2 na straně 32. V prvním ze dvou experimentů byly podmínky podobné jako v publikaci Wang a kol. [47], tj. objem inkubační směsi 25 μ l a průběh při teplotě 62 °C. Jedna z osmi inkubační směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/ μ l byla pozitivní v čase 17 minut. Jedna z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/ μ l byla pravděpodobně falešně pozitivní ve 26 minutě. Osm z osmi inkubačních směsí negativní kontroly bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 26 až 39 minut (viz. obrázek 4.40).



Obr. 4.40 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou publikovaných „primerů“ cílící na gen *nuc* bakterie *SA*. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

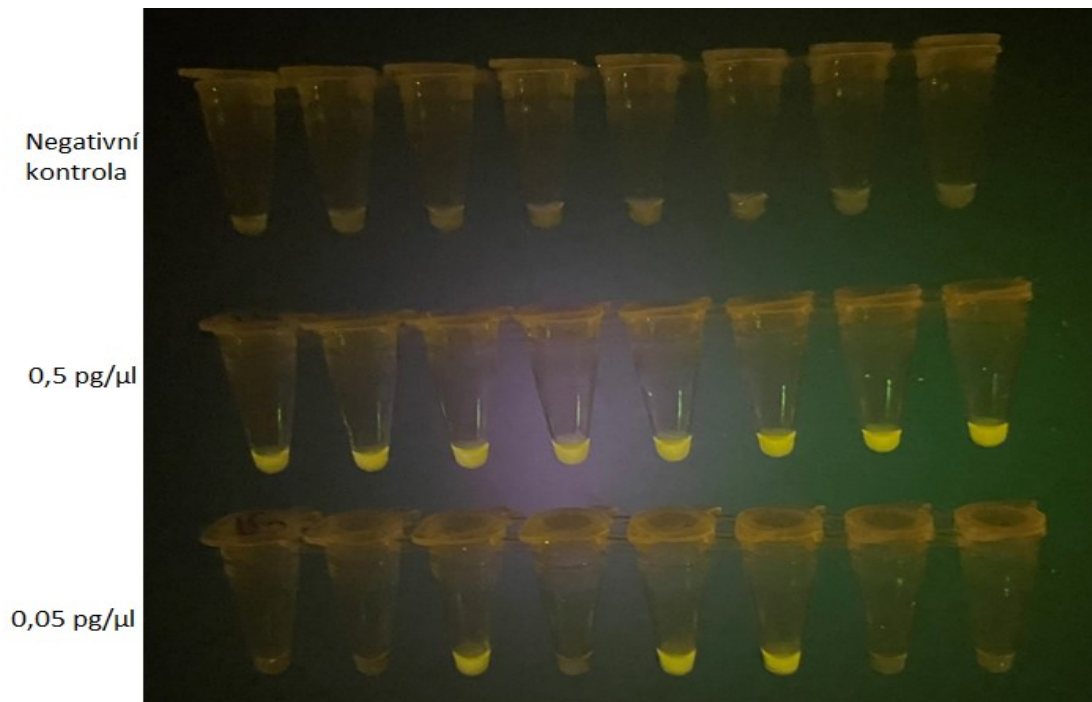
Následoval druhý LAMP experiment se stejnými „primery“, který probíhal při stejných podmínkách a koncentracích jako experimenty, jejichž výsledky jsou uvedeny v kapitole 4.4 na straně 40. Pět z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 11 až 36 minut. Dvě z osmi inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl bylo pozitivních v časovém intervalu 17 až 33 minut. Osm z osmi inkubačních směsí negativní kontroly bylo falešně pozitivních v časovém intervalu 50 až 59 minut (viz. obrázek 4.41).



Obr. 4.41 Závislost relativní intenzity fluorescence na čase v průběhu LAMP reakce se sadou publikovaných „primerů“ cílící na gen *nuc* bakterie *SA* při teplotě 65 °C. LAMP reakce byla provedena pro dvě koncentrace templátové DNA *SA* – 0,05 pg/μl (modrá křivka) a 0,5 pg/μl (zelená křivka). Negativní kontrola (oranžová křivka) neobsahovala přídavek templátové DNA *SA*.

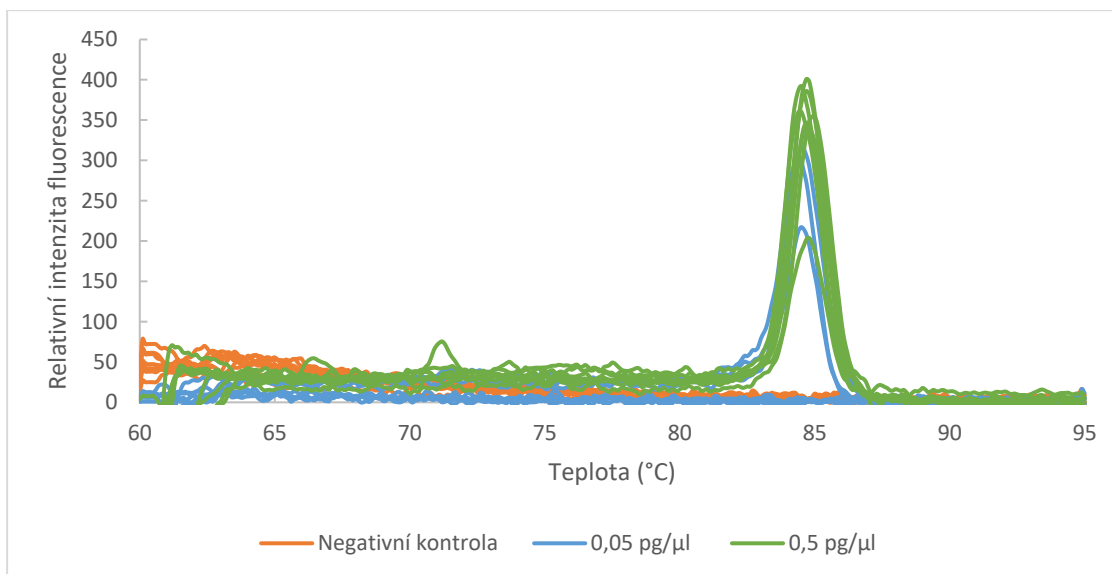
4.13 Vizuální detekce produktů LAMP reakce a porovnání s jejich teplotou tání

Vizuální detekce byla testována pro budoucí možné použití metody LAMP pro detekci bakterie *SA* v místě potřeby. LAMP reakce byla provedena podle postupu uvedeného v kapitole 3.3.6 na straně 36. Osm z osmi inkubačních směsí obsahujících templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl se při vizualizaci po ukončení LAMP reakce při teplotě 95 °C jeví jako pozitivní a to tak, že zabarvení inkubačních směsí bylo mnohem intenzivnější v porovnání s negativní kontrolou. V případě inkubačních směsí, které obsahovaly templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl byly pozorovány tři pozitivní inkubační směsi z osmi, a to opět na základě zvýšené intenzity zabarvení směsí. V případě negativní kontroly nebyla po ukončení LAMP reakce při teplotě 95 °C okem pozorovatelná zvýšená intenzita zabarvení (viz. obrázek 4.42).



Obr. 4.42 Vizualizace produktů LAMP reakce pro sadu „primerů“ SAs3 pomocí transluminátoru. Fotografie byla pořízena po ukončení LAMP experimentu a následném zahřátí všech inkubačních směsí na teplotu 95 °C v suché lázni po dobu 10 minut. Pozitivní inkubační směsi vykazují intenzivnější zbarvení.

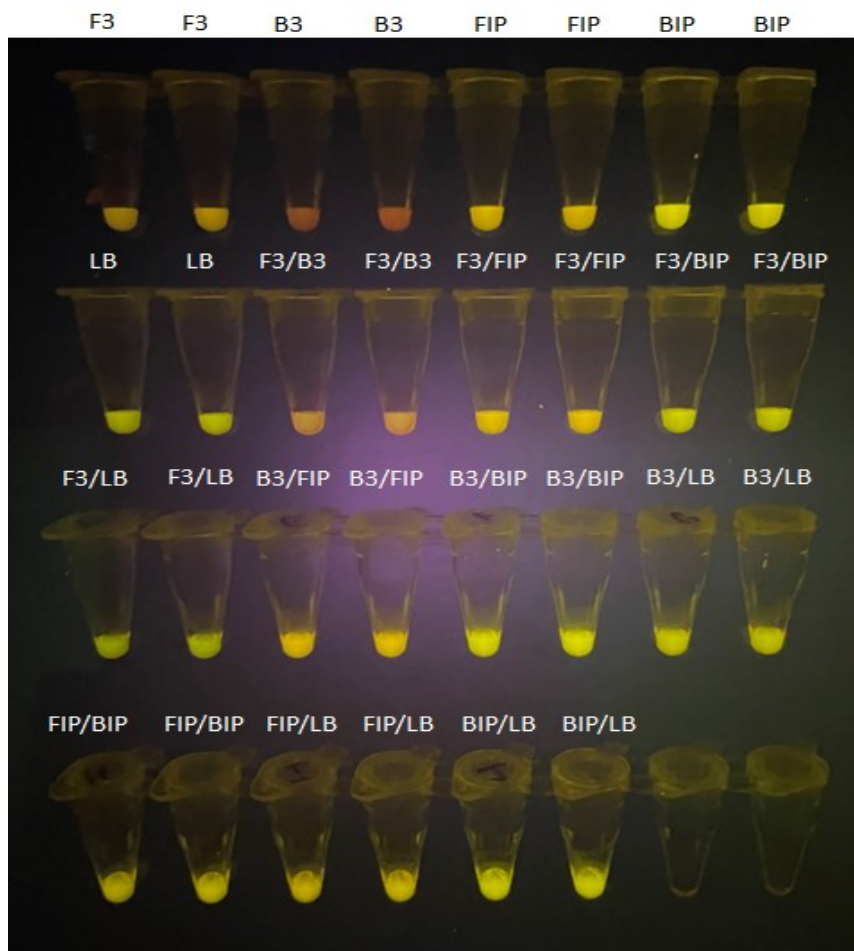
Po ukončení experimentu a analýze na transluminátoru byla pro všechny inkubační směsi změřena křivka teploty tání produktů LAMP reakce. V případě všech negativních kontrol byla získány pouze křivky tání struktur, které tvoří LAMP „primery“ v rozmezí teplot od 60 do 70 °C. Teplotní křivky inkubačních směsí obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl vykazovalo osm inkubačních směsí z osmi teplotu tání v rozmezí teplot od 84,4 °C do 85,0 °C, značící přítomnost amplifikovaného produktu. Tři inkubační směsi obsahující templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl z osmi vykazovaly teplotu tání v rozmezí 84,3 a 84,6 °C (viz. obrázek 4.43).



Obr. 4.43 Křivky teploty tání inkubačních směsí po průběhu LAMP se sadou „primerů“ SAs3. Analýza teplotní křivky negativní kontroly (oranžové křivky) po průběhu LAMP neposkytla v případě osmi inkubačních směsí z osmi žádný výkyv, který by značil přítomnost amplifikovaného produktu. V případě osmi inkubačních směsí s templátovou DNA SA o koncentraci 0,5 pg/μl (zelené křivky) byly zaznamenány křivky tání struktur, které tvoří LAMP produkty. V případě tří inkubačních směsí s templátovou DNA SA o koncentraci 0,05 pg/μl (modré křivky) byly zaznamenány křivky tání značící přítomnost LAMP produktů.

4.14 Analýza „primerů“ sady SAs3

Testování „primerů“ sady SAs3 bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.3.7 na straně 36. Byl testován příspěvek „primerů“, jejich homo a heterodimerů, k relativní intenzitě fluorescence. Při optické vizualizaci modrým světlem přes oranžový filtr (viz. obrázek 4.44) byla pozorována stejná intenzita zabarvení všech inkubačních směsí „primerů“ a jejich kombinací. Výjimku tvořily „primery“ F3 a B3 a jejich vzájemná kombinace, které v porovnání s ostatními vzorky byly mnohem méně intenzivněji zabarvené.



Obr. 4.44 Vizualizace roztoků jednotlivých „primerů“ a jejich kombinací na transiluminátoru. Jednotlivé inkubační směsi obsahovaly „primery“ nebo jejich vzájemné kombinace, fluorescenční barvivo a vodu. Fotografie byla pořízena při laboratorní teplotě inkubačních směsí. Intenzita zbarvení jednotlivých směsí byla srovnatelná, výjimku tvořily „primery“ F3, B3 a jejich vzájemná kombinace F3/B3.

5 Diskuse

V období globální pandemie onemocnění COVID-19 vzrostla poptávka po specifické, rychlé, levné a přístrojově nenáročné metodě detekce patogenů. S rozvojem izotermálních amplifikačních metod se vyčlenila metoda LAMP, která takové požadavky splňuje a zdá se být vhodným nástrojem detekce patogenních mikroorganismů. Předpokládáme, že použití metody LAMP, a tedy správná detekce a cílená léčba onemocnění způsobeného bakteriálními a virovými patogeny a může hrát roli v prevenci antibiotické rezistence takových patogenů.

Cílem projektu TARGET, jehož součástí je i předkládaná diplomová práce, je mimo jiné přispět k zavedení metody LAMP pro detekci bakteriálních patogenů způsobujících infekce horních cest dýchacích, a to zejména pro použití v rozvojových zemích, a nebo v místě potřeby. Příkladem takového patogenu je bakterie *SA*, která je jedním z nejčastěji detekovaných patogenů v klinické praxi. Široce používanou metodou její detekce je PCR, která je však instrumentálně velmi náročná [78]. Naproti tomu je metoda LAMP mnohem méně finančně nákladná a má tak potenciál metodu PCR nahradit. Na základě literární rešerše byl vybrán gen *nuc* jako cíl LAMP detekce bakterie *SA*. Studované LAMP experimenty byly většinou prováděny s využitím fluorescenční detekce. Cílem práce bylo metodu zavést do praxe v naší laboratoři a optimalizovat ji tak, abychom byli schopni spolehlivě detekovat bakterii *SA* v klinických vzorcích pacientů.

Pro návrh vhodných LAMP „primerů“ bylo nejdříve nutné získat konsenzuální sekvenci tak, abychom byli schopni pokrýt co možná nejvíce kmenů bakterie *SA*, kterým je lidská populace vystavena. Mnohonásobným sekvenčním porovnáváním byla získána konsenzuální sekvence genu *nuc* o délce 982 bp (viz. kapitola 4.1 na straně 37). Při návrhu „primerů“ jsme vzali v potaz, že největší účinnost má metoda LAMP v případě, že je zahrnuto šest „primerů“, což znamená, že kromě základních „primerů“ F3, B3, FIB a BIP obsahuje reakční směs také smyčkové „primery“ FL a BL [10]. Standardní nastavení programu pro generování „primerů“ pro AT bohaté sekvence však umožnilo nalézt pouze sady se čtyřmi základními „primery“. Proto bylo nutné zmírnit kritéria pro generování smyčkových „primerů“, tj. délka primerů, teplota tání a obsah GC párů. Celkem tak bylo získáno pět sad se všemi šesti „primery“ a tři sady s pěti „primery“. Výsledný návrh LAMP „primerů“ cílících na gen *nuc* bakterie *SA* tak poskytl celkem osm sad k dalšímu testování (viz. kapitola 4.2 na straně 37).

Se všemi sety navržených „primerů“ byly provedeny LAMP experimenty, tzv. primární testování (viz. kapitola 4.3 na straně 39). V průběhu primárního testování bylo možné sledovat závislost mezi počátečním množstvím templátové DNA *SA* a časem pozitivní odezvy v podobně nárůstu intenzity fluorescence nad prahovou hodnotu. S klesající koncentrací templátové DNA *SA* v inkubační směsi zároveň klesala spolehlivost získaných výsledků, což se projevilo zvýšenou hodnotou směrodatné odchylky pro hodnotu času, kdy dojde k prudkému nárůstu intenzity fluorescence v testované směsi, tj. pozitivní odezvě reakce. V případě negativních kontrol jsme se ve všech paralelních reakcích setkali s falešně pozitivní odezvou, ale naštěstí až po dlouhém čase (kterou budeme diskutovat níže). U většiny sad „primerů“ jsme byli schopni spolehlivě detekovat templátovou DNA *SA* o koncentraci 5,0 pg/μl do přibližně 20 minut, s výjimkou sad SAs1 a SAs4. Jednotlivé sady LAMP „primerů“ se od sebe lišily rychlostí tvorby amplikonů (jak bylo detekováno měřením nárůstu fluorescence) a citlivostí (schopností detekce i velmi zředěných roztoků templátové DNA *SA*). První experimenty napovídaly, že nejvhodnější sada pro detekci genu *nuc* bakterie *SA* bude SAs7. Negativní kontrola sice vykazovala falešnou pozitivitu již v 70 minutě, což bylo nejdříve ze všech ostatních sad, ale bylo pravděpodobné, že budeme naopak schopni detekovat nejnižší koncentrace templátové DNA *SA* v inkubační směsi, v porovnání s ostatními sadami.

Na základě porovnání výsledků sekundárního testování (viz. kapitola 4.4 na straně 40) byla podle předpokladu vybrána jako nejvhodnější sada SAs7. Byli jsme schopni detekovat templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl ve všech osmi paralelních inkubačních směsích, a tedy s vysokou mírou spolehlivosti. Jako limit detekce, tedy nejnižší koncentrace templátové DNA *SA*, kterou lze spolehlivě detekovat v dané inkubační směsi, tak byla stanovena koncentrace templátové DNA *SA* 0,5 pg/μl. Kontrola byla falešně poprvé pozitivní až v 75 minutě. Diagnostické okno, tedy časový interval, ve kterém jsme schopni odlišit správně pozitivní inkubační směs s nejnižší koncentrací templátové DNA *SA* od první falešně pozitivní negativní kontroly, bylo 18 minut. Přistoupili jsme tedy k další optimalizaci této metody, abychom byli schopni detekovat produkty LAMP reakce v kratším čase, prodloužili diagnostické okno a eventuálně dále snížili limit detekce. V průběhu optimalizace LAMP reakce jsme se zaměřili na několik parametrů jako byla (i) koncentrace LAMP „primerů“ a (ii) hořčnatých iontů, (iii) sekvence některých „primerů“, (iv) teplota, při které LAMP reakce probíhala a (v) objemy inkubačních směsí.

Zajímalo nás, jak se změní průběh LAMP reakce, změníme-li koncentraci „primerů“ sady SAs7 (viz. kapitola 4.5 na straně 47). Ani zvýšená výsledná koncentrace všech „primerů“ v inkubační směsi, ani zdvojnásobena koncentrace pouze smyčkových „primerů“ FL a BL sady SAs7 nevedla k zásadnímu zvýšení citlivosti LAMP reakce, ale spíše naopak. Zdá se tedy, že koncentrace „primerů“ zvolené dle doporučení dodavatele Sapphire Bst Turbo polymerasy (firma Jena Bioscience) nezbytné pro LAMP reakci je pro naše účely optimální.

Díky opakovaným experimentům se sadou „primerů“ SAs7 neuniklo naší pozornosti, že čas, ve kterém se negativní kontrola jeví jako falešně pozitivní se s opakovanými experimenty zkracuje, a to až přibližně o 30 minut (viz. kapitola 4.6 na straně 49). Přestože došlo k dekontaminaci pracovního prostoru a byly použity nové zásobní roztoky, problém přetrvával. Bylo konstatováno, že došlo k pravděpodobné kontaminaci, kterou nebylo možno odhalit a odstranit. Bohužel ke kontaminaci je LAMP metoda velmi citlivá a v jiných kvalifikačních pracích již byly hledány způsoby, jak ji předejít [88,89]. Proto jsme přistoupili k nové analýze primárního a sekundárního testování navržených sad „primerů“ a byla vybrána sada SAs3, která měla stejný limit detekce jako sada SAs7 (0,5 pg/μl) a zároveň cílila na jiný úsek v genu *nuc* než sada SAs7 (viz. Obr. 4.5 na straně 38 a 4.13 na straně 43). Cílit na jinou část genu *nuc* bylo důležité, neboť původcem kontaminace byly pravděpodobně produkty předchozí LAMP reakce, tudíž použití sady „primerů“, která by se částečně překrývala se sadou SAs7 by mohlo opět vést k dřívější falešné pozitivitě negativní kontroly. V případě sady SAs3 se sice negativní kontrola jeví jako falešně pozitivní o přibližně 40 minut dříve než v případě sady SAs7, avšak dvacetiminutové diagnostické okno zůstalo zachováno (viz. obrázek 4.13 na straně 43).

V případě sady SAs7 nebyl zaznamenán pozitivní vliv na průběh LAMP v použití vyšší koncentrace „primerů“. Považujeme tento jev za obecný, a proto nebyl tento experiment v případě sady SAs3 opakován. Na druhou stranu, je známo, že sekvence jednotlivých „primerů“, jejich tendence tvořit vlásenky a homo- nebo heterodimery má zásadní vliv na průběh LAMP [28]. Proto byly dále navrženy dle literatury [90] „primery“ FIP a BIP, ve kterých byly části „primerů“ F1c-F2 a B1c-B2 propojeny pěti nukleotidy thyminu (FIPpT a BIPpT) (viz. kapitola 4.7 na straně 50). Navzdory očekávání, takto modifikované „primery“ nevedly ke zlepšení průběhu LAMP reakce (viz. obrázek 4.21 na straně 51).

Druhý způsob, který zahrnoval modifikaci „primerů“ bylo vytvoření smyčkového FL „primeru“, který v sadě SAs3 chyběl. Přítomnost obou smyčkových „primerů“ může vést k zlepšení LAMP reakce [10]. Proto, aby bylo možné „primer“ FL vytvořit, bylo také nutné provést úpravu (posunutí) FIP „primeru“ tak, aby se „primery“ nepřekrývaly. Vznikl tak „primer“ FIPv2. Výsledná sada „primerů“, obsahující nově přidaný FL a modifikovaný FIPv2 „primer“ však rovněž, bohužel, nevedla k lepšímu výsledku v porovnání s původní sadou SAs3 (viz. obrázek 4.22 na straně 52).

Třetí pokus o modifikaci „primerů“ spočíval v přidání pěti nukleotidů thyminu také k nově vytvořenému „primeru“ FIPv2 (FIPv2pT), který byl společně s „primerem“ BIPpT testován v přítomnosti FL „primeru“ (viz. obrázek 4.23 na straně 52). Avšak ani tato modifikace „primerů“ nevedla k lepšímu výsledku, proto jsme se při další optimalizaci LAMP reakce zaměřili na reakční podmínky za použití původní sady „primerů“ SAs3, která obsahovala kromě základních čtyř „primerů“ pouze jeden smyčkový „primer“ BL.

Průběh LAMP je závislý na hořčnatých iontech, které jsou důležité pro funkci *Bst* polymerasy a stabilitu dvoušroubovice DNA [55,57]. Koncentrace hořčnatých iontů byla v případě použité reakční soupravy 6 mM, proto byly dále testovány koncentrace 8, 7, 5 a 4 mM (viz. kapitola 4.8 na straně 53). Byl pozorován částečný trend, kdy s rostoucí koncentrací hořčnatých iontů v inkubační směsi byl průběh LAMP rychlejší, avšak se zrychlující se LAMP reakcí došlo také ke zrychlení reakce, která vedla k falešné pozitivitě negativních kontrol. Při 4 mM koncentraci hořčnatých iontů v inkubační směsi došlo ke snížení limitu detekce, proto tato koncentrace nebyla vhodná pro další používání (viz. obrázek 4.27 na straně 56). Rozdíl v průběhu LAMP reakce s 6 mM a 5 mM koncentrací hořčnatých iontů byl zanedbatelný, proto byly další experimenty nadále prováděny s 6 mM koncentrací hořčnatých iontů, která je optimální.

Parametr, který může ovlivnit LAMP reakci je kromě koncentrace hořčnatých iontů i koncentrace fluorescenčního barviva v inkubační směsi. Fluorescenční barvivo může průběh reakce inhibovat, anebo naopak může vést ke zvýšení citlivosti, jako tomu bylo u jiných experimentů v naší laboratoři s další patologickou bakterií *Streptococcus pneumoniae* [91]. Experimenty s přídatkem SYTOTM 82 a EvaGreen[®] neprojevil významný vliv na průběh LAMP, a proto byla i nadále zachována původní koncentrace

barviva EvaGreen[®], které je součástí komerční soupravy Sapphire Bst Turbo polymerasy (firma Jena Bioscience) (viz. kapitola 4.9 na straně 56).

Dalšími testovanými parametry, které by mohly mít zásadní vliv na průběh LAMP reakce, byly teplota a objem reakční směsi. LAMP reakce byla provedena při teplotách 65, 67 a 69 °C a objemech 10, 25 a 50 µl (viz. kapitola 4.10 na straně 58). Vliv teploty a objemu inkubační směsi byl porovnáván se standardním experimentem při 65 °C v 10µl inkubační směsi provedeném se sadou „primerů“ SAs3 během sekundárního testování (viz. 4.4.4 na straně 42). Teplota 65 °C je doporučena výrobcem komerční soupravy Sapphire Bst Turbo polymerasy (firma Jena Bioscience), kterou jsme v rámci této práce používali. Se zvyšující se teplotou docházelo k prodlužování doby, za kterou byl zaznamenán nárůst fluorescence nad detekční mez v případě negativních kontrol, avšak docházelo také k prodlužování času v případě reakcí v inkubačních směsích obsahujících templátovou DNA *SA*. Naopak zvyšování reakčního objemu vedlo ke zkracování průměrných časů v případě reakcí, ve kterých byla přítomna templátová DNA *SA*. V případě koncentrace 0,05 pg/ul docházelo navíc při zvyšování objemu také ke zvyšování počtu pozitivních reakcí. V případě 50µl LAMP reakce, která byla inkubována při 67 °C došlo dokonce ke snížení limitu detekce této metody o jeden řád, tj. na 0,05 pg/ul, neboť všechny paralelní reakce byly pozitivní (viz. obrázek 4.33 na straně 62). Avšak rozdíl časů nejpomalejší správně pozitivní reakce a nejrychlejší falešně pozitivní kontroly se zkrátil na deset minut. Do budoucna by bylo vhodné také vyzkoušet např. objemy 30 nebo 40 µl, kde je možné očekávat prodlužující se časy nástupu falešně pozitivní negativních kontrol, a tak zvětšit diagnostické okno metody. Na místě by bylo také blíže prozkoumat teplotní optimum reakce, např. průběh při teplotě 66 a nebo 67 °C.

LAMP metoda navržená na základě předchozích výsledků (sada „primerů“ SAs3, teplota 67 °C, objem inkubační směsi 25, respektive 50 µl pro klinické vzorky), byla dále testována na třech vzorcích získaných od pacientů, u kterých byla infekce horních cest dýchacích bakterií *SA* prokázána ve stejných vzorcích metodou PCR (viz. kapitola 4.11 na straně 66). Vzorky, které byly odebrány speciálním dechovým analyzátozem poskytla spolupracující laboratoř Dr. Mariena de Jonge z Radboud University, Nizozemsko. Ve všech třech vzorcích byla navrženou metodou detekována bakterie *SA* do 20 minut. Zároveň jsme získali přibližně dvacetiminutové okno, než byla zaznamenána první falešně pozitivní negativní kontrola (viz. obrázek 4.38 na straně 67). Zvýšením objemu inkubační směsi pro testování klinických vzorků pacientů na 50 µl došlo k urychlení

LAMP reakce o přibližně 10 minut, takže pozitivní klinický vzorek jsme detekovali do přibližně 10 minut při zachování dvacetiminutového diagnostického okna (viz. obrázek 4.39 na straně 68). Zdá se tedy, že navržená metoda LAMP bude použitelná i v klinické praxi, což je zásadní přínos této předkládané práce.

V naší laboratoři byla také studována LAMP detekce bakterie *SA*, založena na „primerech“ s již publikovanou sekvencí [47] (viz. kapitola 4.12 na straně 68). V publikaci Wang a kol. uvádějí detekční limit templátové DNA *SA* o koncentraci 1,47 pg/μl do 60 minut [47]. Při simulaci podobných podmínek v naší laboratoři, tj. průběh reakce při 62 °C a dvojnásobné koncentraci smyčkových „primerů“ FL a BL, nebylo dosaženo stejného výsledku jako uváděli autoři článku. Pozitivní byla pouze jedna z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl a negativní kontrola byla pozitivní již ve 26 minutě (viz. obrázek 4.40 na straně 69). Musíme ovšem připustit, že nebyla použita stejná detekční souprava a detekce nebyla provedena turbidimetricky ani kolorimetricky, jako tomu bylo v publikaci, ale fluorescenčně. O něco lepších výsledků při experimentech s touto sadou „primerů“ bylo dosaženo při zvýšení teploty na 65 °C a snížení koncentrace smyčkových „primerů“. V tomto případě bylo pozitivních pět z osmi inkubačních směsí s templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl a negativní kontrola se stala falešně pozitivní v 50 minutě (viz. obrázek 4.41 na straně 70). Usuzujeme, že námi použitá detekční souprava a způsob detekce není vhodný pro detekci bakterie *SA* v kombinaci s těmito publikovanými „primery“. Každopádně s námi navrženou a optimalizovanou metodou LAMP pro detekci *SA* dosahujeme výrazně větší citlivosti, reprodukovatelnosti, rychlosti a spolehlivosti než v případě dané publikované metody [47].

Jak již bylo zmíněno, cílem projektu TARGET je použití LAMP metody bez nákladného vybavení pro detekci patogenů způsobujících akutní infekce horních cest dýchacích v rozvojových zemích a/nebo v místě potřeby. Proto bylo vyhodnocení míry fluorescence po určitém časovém intervalu, který jsme již znali z předchozích detailních experimentů (ve kterých jsme míru fluorescence sledovali kontinuálně), provedeno také vizuálně (viz. kapitola 4.13 na straně 70). Experimenty byly provedeny v 10μl inkubačních směsích při 65 °C, což mělo vliv na limit detekce. Byli jsme schopni detekovat templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,5 pg/μl v osmi případech z osmi do 20 minut. Templátovou DNA *SA* o koncentraci 0,05 pg/μl jsme byli schopni detekovat ve třech případech z osmi, tj. limit detekce tohoto provedení byl 0,5 pg/μl templátové DNA

SA. Tato vizuální detekce je předmětem dalšího testování společně s aplikací metody LAMP pro testování dalších patogenů, kterými se projekt TARGET zabývá.

V případě inkubačních směsí, které byly vyhodnoceny vizuální detekcí fluorescence bylo provedeno také měření teplot tání dvoušroubovicových struktur DNA s cílem nezávisle ověřit přítomnost produktů LAMP reakce, jejichž teplota tání spadá do úzkého teplotního rozmezí. Bylo zjištěno, že inkubační směsi, které byly vyhodnoceny jako pozitivní pomocí vizuální detekce fluorescence, obsahovaly struktury DNA, jejichž teplota tání odpovídala teplotám tání LAMP produktů (viz. obrázek 4.43 na straně 72). V případě reakcí, které byly vyhodnoceny jako negativní byly zaznamenány pouze struktury DNA, které mají výrazně nižší teploty tání a pravděpodobně odpovídají strukturám, které tvoří samotné „primery“. Toto zjištění ukázalo, že vizuální detekce fluorescence LAMP reakcí je vhodná pro rozlišení mezi vzorkem pozitivní a negativním na přítomnost cílového genu.

Zároveň nás v průběhu celého LAMP testování zajímal důvod falešné positivity negativní kontroly. Dle literatury může být zdrojem falešné positivity nespecifická amplifikace vlásenek a homodimerů dlouhých „primerů“ jako jsou „primery“ FIP a BIP, případně kontaminace reakční směsi produkty předchozích reakcí a svou roli hraje fluorescenční pozadí použitých „primerů“ [28]. V případě nově používané sady SAs3 jsme se pokusili „primery“ otestovat a zjistit fluorescenční pozadí použitých „primerů“ (viz. kapitola 4.14 na straně 72). Při optické vizualizaci jsme pozorovali zvýšenou intenzitu zabarvení všech inkubačních směsí, kromě směsí „primerů“ F3, B3 a jejich vzájemné kombinace, které vykazovaly nižší intenzitu zabarvení. Důvod, proč tyto „primery“ nejméně přispívaly k intenzivnímu zabarvení je pravděpodobně menší koncentrace v reakční směsi než „primerů“ FIP, BIP a BL a také kratší řetězec oligonukleotidu. Bylo zřejmé, že negativní kontrola se bude jevit jako pozitivní právě kvůli „primerům“. Abychom tomu jevu zabránili a odlišili správně pozitivní LAMP reakční produkty od případných interferencí, můžeme si pomoci tím, že fluorescenci odečítáme při zvýšené teplotě. Za těchto podmínek totiž zůstane zachována struktura jen těch klasických komplexních LAMP produktů, zatím co kratší smyčky a homodimery „primerů“ ztrácí strukturu a tím i schopnost fluorescence.

Závěrem můžeme konstatovat, že byla metoda LAMP detekce bakterie *SA* úspěšně zavedena do praxe naší laboratoře. S poměrně vysokou citlivostí a přesností,

tj. limit detekce byl stanoven na koncentraci templátové DNA *SA* 0,05 pg/ μ l, což odpovídá přibližně 20 kopiím templátové DNA bakterie *SA* v 1 μ l, a přibližně dvacetiminutovým diagnostickým oknem jsme byli schopni gen *nuc* bakterie *SA* detekovat ve dostupných vzorcích klinických pacientů a naopak vzorky, které neobsahovaly DNA *SA* byly v daném intervalu negativní.

6 Závěr

Předkládaná diplomová práce se zabývá návrhem metody LAMP pro testování vzorků pacientů na přítomnost bakterie *SA*. Stanovené cíle diplomové práce byly naplněny, konkrétně bylo dosaženo níže uvedených výsledků:

1. Byla provedena literární rešerše na téma LAMP a jeho využití v souvislosti s detekcí genu *nuc* bakterie *SA*, která tvoří úvodní část předkládané diplomové práce (str. 12–25).
2. Byla získána konsenzuální sekvence genu *nuc* bakterie *SA*.
3. Byly navrženy a testovány sady nových „primerů“ pro detekci genu *nuc* bakterie *SA* metodou LAMP.
4. Metoda byla optimalizována za účelem snížit limit detekce, rozšířit diagnostické okno a bojovat s falešnou pozitivitou negativní kontroly (resp. tento jev maximálně zpomalit).
5. Získali jsme nový, rychlý a spolehlivý protokol detekce bakterie *SA*. Během 20 minut daná metoda bezpečně odliší vzorek s koncentrací DNA *SA* až 0,5 pg/μl od vzorku negativního.
6. Ve vzorcích klinických pacientů jsme touto metodou účinně a spolehlivě detekovali přítomnost bakterie *SA* do 20 minut.
7. Produkty LAMP reakce v souvislosti s odhalením *SA* v inkubačních směsích jsme schopni vizuálně detekovat pro budoucí použití metody v místě potřeby, tedy nezávisle na složitém přístrojovém vybavení.

Seznam použité literatury

- [1] Walker, G. T.; Fraiser, M. S.; Schram, J. L.; Little, M. C.; Nadeau, J. G.; Malinowski, D. P.: Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*. **20**, 1691–1696 (1992).
- [2] Kwoh, D. Y.; Davis, G. R.; Whitfield, K. M.; Chappelle, H. L.; DiMichelle, L. J.; Gingeras, T. R.: Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**, 1173–1177 (1989).
- [3] Compton, J.: Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. **350**, 91–92 (1991).
- [4] Vincent, M.; Xu, Y.; Kong, H.: Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Reports*. **5**, 795 (2004).
- [5] Notomi, T.; Okayama, H.; Masubuchi, H.; Yonekawa, T.; Watanabe, K.; Amino, N.; Hase, T.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. **28**, (2000).
- [6] Murray, C. J.; Ikuta, K. S.; Sharara, F.; Swetschinski, L. a kol.: Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*. **399**, 629–655 (2022).
- [7] Antimicrobial Resistance. *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*, 2021 [online] [cit. 30. 09. 2022]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>
- [8] Antimicrobial resistance. *World Health Organization (WHO)*, 2021 [online]. [cit. 30. 9. 2022]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [9] World Health Organisation (WHO): Global action plan on antimicrobial resistance. 2015.
- [10] Nagamine, K.; Hase, T.; Notomi, T.: Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*. **16**, 223–229 (2002).
- [11] Notomi, T.; Mori, Y.; Tomita, N.; Kanda, H.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*. **53**, 1–5 (2015).
- [12] Wong, Y. P.; Othman, S.; Lau, Y. L.; Radu, S.; Chee, H. Y.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*. **124**, 626–643 (2018).
- [13] Mori, Y.; Nagamine, K.; Tomita, N.; Notomi, T.: Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **289**, 150–154 (2001).
- [14] Shirato, K.: Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiology and Immunology*. **63**, 407 (2019).
- [15] Tanner, N. A.; Zhang, Y.; Evans, T. C.: Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*. **58**, 59–68 (2015).
- [16] Panno, S.; Matic, S.; Tiberini, A.; Caruso, A. G.; Bella, P.; Torta, L.; Stassi, R.; Davino, S.: Loop mediated isothermal amplification: Principles and applications in plant virology.

Plants. **9**, (2020).

- [17] Le, D. T.; Vu, N. T.: Progress of loop-mediated isothermal amplification technique in molecular diagnosis of plant diseases. *Applied Biological Chemistry*. **60**, 169–180 (2017).
- [18] Kiefer, J. R.; Mao, C.; Hansen, C. J.; Basehore, S. L.; Hogrefe, H. H.; Braman, J. C.; Beese, L. S.: Crystal structure of a thermostable *Bacillus* DNA polymerase I large fragment at 2.1 Å resolution. *Structure*. **5**, 95–108 (1997).
- [19] Ignatov, K. B.; Barsova, E. V.; Fradkov, A. F.; Blagodatskikh, K. A.; Kramarova, T. V.; Kramarov, V. M.: A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *BioTechniques*. **57**, 81–87 (2014).
- [20] Shi, C.; Shen, X.; Niu, S.; Ma, C.: Innate reverse transcriptase activity of DNA polymerase for isothermal RNA direct detection. *Journal of the American Chemical Society*. **137**, 13804–13806 (2015).
- [21] Parida, M.; Posadas, G.; Inoue, S.; Hasebe, F.; Morita, K.: Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 257 (2004).
- [22] Paik, I.; Ngo, P. H. T.; Shroff, R.; Diaz, D. J.; Maranhao, A. C.; Walker, D. J. F.; Bhadra, S.; Ellington, A. D.: Improved Bst DNA polymerase variants derived via a machine learning approach. *Biochemistry*. **62**, 410–418 (2023).
- [23] Ma, Y.; Zhang, B.; Wang, M.; Ou, Y.; Wang, J.; Li, S.: Enhancement of polymerase activity of the large fragment in DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* by site-directed mutagenesis at the active site. *BioMed research international* (2016).
- [24] Jia, B.; Li, X.; Liu, W.; Lu, C.; Lu, X.; Ma, L.; Li, Y. Y.; Wei, C.: GLAPD: Whole genome based LAMP primer design for a set of target genomes. *Frontiers in Microbiology*. **10**, 1–9 (2019).
- [25] PrimerExplorer V5, dostupné na <http://primerexplorer.jp> [online] [cit. 14. 12. 2022].
- [26] NEW ENGLAND BioLabs: NEB LAMP Primer Design Tool, dostupné na <https://lamp.neb.com> [online] [cit. 14. 12. 2022].
- [27] Parida, M. M.; Sannarangaiah, S.; Dash, P. K.; Rao, P. V. L.; Morita, K.: Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*. **18**, 407–421 (2008).
- [28] Rolando, J. C.; Jue, E.; Barlow, J. T.; Ismagilov, R. F.: Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic Acids Research*. **48**, e42–e42 (2020).
- [29] Tomita, N.; Mori, Y.; Kanda, H.; Notomi, T.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. **3**, 877–882 (2008).
- [30] Dukes, J. P.; King, D. P.; Alexandersen, S.: Novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Archives of Virology*. **151**, 1093–1106 (2006).

- [31] Esmatabadi, M. J. D.; Bozorgmehr, A.; Zadeh, H. M.; Bodaghabadi, N.; Farhangi, B.; Babashah, S.; Sadeghizadeh, M.: Techniques for evaluation of LAMP amplicons and their applications in molecular biology. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* . **16**, 7409–7414 (2015).
- [32] Mori, Y.; Kitao, M.; Tomita, N.; Notomi, T.: Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. **59**, 145–157 (2004).
- [33] Zhou, D.; Guo, J.; Xu, L.; Gao, S.; Lin, Q.; Wu, Q.; Wu, L.; Que, Y.: Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detection of cry1Ac transgenic sugarcane. *Scientific Reports*. **4**, (2014).
- [34] Cao, D.; Hu, L.; Lin, M.; Li, M.; Ye, Z.; Sun, H.; Huang, J.; Yang, H.; Tian, J.: Real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and reliable diagnosis of pulmonary tuberculosis. *Journal of Microbiological Methods*. **109**, 74–78 (2015).
- [35] Lucchi, N.W.; Demas, A.; Narayanan, J.; Sumari, D.; Kabanywany, A.; Patrick Kachur, S.; Barnwell, J. W.; Udhayakumar, V.: Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLOS ONE*. **5**, (2010).
- [36] Ostorbin, I. P.; Belousova, E. A.; Zakabunin, A. I.; Boyarskikh, U. A.; Filipenko, M. L.: Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *BioTechniques*. **61**, 20–25 (2016).
- [37] Huang, W. E.; Lim, B.; Hsu, C. C.; Xiong, D.; Wu, W.; Yu, Y.; Jia, H.; Wang, Y.; Zeng, Y.; Ji, M.; Chang, H.; Zhang, X.; Wang, H.; Cui, Z.: RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology*. **13**, 950–961 (2020).
- [38] Dong, Y.; Wu, X.; Li, S.; Lu, R.; Li, Y.; Wan, Z.; Qin, J.; Yu, G.; Jin, X.; Zhang, C.: Comparative evaluation of 19 reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for detection of SARS-CoV-2. *Scientific Reports* 2021. **11**, 1–11 (2021).
- [39] Park, G. S.; Ku, K.; Baek, S. H.; Kim, S. J.; Kim, S. II; Kim, B.T.; Maeng, J.S.: Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Journal of Molecular Diagnostics*. **22**, 729–735 (2020).
- [40] Thai, H. T. C.; Le, M. Q.; Vuong, C. D.; Parida, M.; Minekawa, H.; Notomi, T.; Hasebe, F.; Morita, K.: Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. **42**, 1956–1961 (2004).
- [41] Kashir, J.; Yaqinuddin, A.: Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Medical Hypotheses*. **141** (2020).
- [42] Augustine, R.; Hasan, A.; Das, S.; Ahmed, R.; Mori, Y.; Notomi, T.; Kevadiya, B. D.; Thakor, A. S.: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 Pandemic. *Biology* 2020. **9**, 182 (2020).

- [43] Park, J. W.: Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests. *Biosensors*. **12**, (2022).
- [44] World Health Organization (WHO): The use of loop-mediated isothermal amplification (TB-LAMP) for the diagnosis of pulmonary tuberculosis, *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*. 1–52 (2016).
- [45] Nancy, K.; Lillian, W.; Wilkinson, M.; Claire, M.; Luna, K.; Dorcas, W.; Rosemary, G.; Japheth, L.; Christine, I.; Emily, W.; Jim, K.: Optimization of a loop-mediated isothermal amplification assay as a point-of-care tool for the detection of *Wuchereria bancrofti* in human blood in Tana River Delta, Kenya. *Journal of Parasitology Research* (2021).
- [46] Avelar, D. M. De; Carvalho, D. M.; Rabello, A.: Development and clinical evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the diagnosis of human Visceral Leishmaniasis in Brazil. *BioMed Research International* (2019).
- [47] Wang, X. R.; Wu, L. F.; Wang, Y.; Ma, Y. Y.; Chen, F. H.; Ou, H. L.: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **175**, 882–891 (2015).
- [48] Yu, G.; Chen, L.; Lin, C. W.; Li, B.; Cui, H.; Chen, S.; Miao, J.; Bian, H.; Chen, D.; Deng, Y.: Loop-mediated isothermal amplification assays for screening of bacterial integrons. *Biological Research*. **47**, 1–10 (2014).
- [49] Nixon, G.; Garson, J. A.; Grant, P.; Nastouli, E.; Foy, C. A.; Huggett, J. F.: Comparative study of sensitivity, linearity, and resistance to inhibition of digital and nondigital polymerase chain reaction and loop mediated isothermal amplification assays for quantification of human cytomegalovirus. *Analytical Chemistry*. **86**, 4387–4394 (2014).
- [50] Sherrill-Mix, S.; Hwang, Y.; Roche, A. M.; Glascock, A.; Weiss, S. R.; Li, Y.; Haddad, L.; Deraska, P.; Monahan, C.; Kromer, A.; Graham-Wooten, J.; Taylor, L. J.; Abella, B. S.; Ganguly, A.; Collman, R. G.; Van Duyne, G. D.; Bushman, F. D.: Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons. *Genome Biology*. **22**, 1–17 (2021).
- [51] Soroka, M.; Wasowicz, B.; Rymaszewska, A.: Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): The better sibling of PCR?. *Cells* **2021**. **10**, 1931 (2021).
- [52] Isothermal DNA Amplification & LAMP: Isothermal Reaction and Trouble Shouting Guide. *Jena Bioscience* [online]. [cit. 25. 10. 2022]. Dostupné z: <https://www.jenabioscience.com/molecular-biology/isothermal-amplification-lamp>
- [53] Tanner, N.: Optimized integration of New England Biolabs® loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reagents with Axxin ISO instruments. *New England Biolabs* (2019).
- [54] Alhamid, G.; Tombuloglu, H.; Al-Suhaimi, E.: Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays using five primers reduces the false-positive rate in COVID-19 diagnosis, *Scientific Reports* **2023**. **13**, 1–13 (2023).
- [55] Shirshikov, F. V.; Bespyatykh, J. A.: Loop-mediated isothermal amplification: From theory to practice. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **2022**. **48**, 1159–1174 (2022).
- [56] Li, Y.; Fan, P.; Zhou, S.; Zhang, L.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. *Microbial Pathogenesis*. **107**, 54–61 (2017).

- [57] Yeh, H. Y.; Shoemaker, C. A.; Klesius, P. H.: Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *Ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Microbiological Methods*. **63**, 36–44 (2005).
- [58] Wang, D. G.; Brewster, J. D.; Paul, M.; Tomasula, P. M.: Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules*. **20**, 6048 (2015).
- [59] Hsieh, K.; Mage, P. L.; Csordas, A. T.; Eisenstein, M.; Soh, H. T.: Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical Communications*. **50**, 3747–3749 (2014).
- [60] Foo, P. C.; Nurul Najian, A. B.; Muhamad, N. A.; Ahamad, M.; Mohamed, M.; Yean Yean, C.; Lim, B. H.: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable PCR substitute for diagnostic applications: A comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC Biotechnology*. **20**, 1–15 (2020).
- [61] Zharkov, D. O.; Mechetin, G. V.; Nevinsky, G. A.: Uracil-DNA glycosylase: Structural, thermodynamic and kinetic aspects of lesion search and recognition. *Mutation Research*. **685**, 11-20 (2010).
- [62] Krokan, H. E.; Drabløs, F.; Slupphaug, G.: Uracil in DNA – occurrence, consequences and repair. *Oncogene 2002 21:58*. **21**, 8935–8948 (2002).
- [63] Aryee, A.; Edgeworth, J. D.: Carriage, clinical microbiology and transmission of *Staphylococcus aureus*. in: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, Springer Verlag, : pp. 1–19.
- [64] Schindler, J.: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha, Grada Publishing, 2014, str. 66.
- [65] Barber, M.; Rozwadowska-Dowzenko, M.: Infection by penicillin-resistant *Staphylococci*. *The Lancet*. **252**, 641–644 (1948).
- [66] Fuda, C. C. S.; Fisher, J. F.; Mobashery, S.: β -Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: The adaptive resistance of a plastic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **62**, 2617–2633 (2005).
- [67] Jevons, M. P.: “Celbenin” - resistant *Staphylococci*, *British Medical Journal*. **1**, 124 (1961).
- [68] Monaco, M.; Pimentel de Araujo, F.; Cruciani, M.; Coccia, E. M.; Pantosti, A.: Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **409**, 21–56 (2017).
- [69] Fishovitz, J.; Hermoso, J. A.; Chang, M.; Mobashery, S.: Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*. **66**, 572 (2014).
- [70] Tong, S. Y. C.; Davis, J. S.; Eichenberger, E.; Holland, T. L.; Fowler, V. G.: *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*. **28**, 603 (2015).

- [71] McAdow, M.; Kim, H. K.; DeDent, A. C.; Hendrickx, A. P. A.; Schneewind, O.; Missiakas, D. M.: Preventing *Staphylococcus aureus* sepsis through the inhibition of its agglutination in blood. *PLoS Pathogens*. **7**, 1002307 (2011).
- [72] Weidenmaier, C.; Lee, J. C.: Structure and function of surface polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **409**, 57–93 (2017).
- [73] Berube, B. J.; Wardenburg, J. B.: Staphylococcus aureus α -toxin: Nearly a century of intrigue. *Toxins*. **5**, 1140 (2013).
- [74] Löffler, B.; Hussain, M.; Grundmeier, M.; Brück, M.; Holzinger, D.; Varga, G.; Roth, J.; Kahl, B. C.; Proctor, R. A.; Peters, G.: Staphylococcus aureus Pantan-Valentine leukocidin is a very potent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathogens*. **6**, (2010).
- [75] Acland, K. M.; Darvay, A.; Griffin, C.; Aali, S. A.; Russell-Jones, R.: Staphylococcal scalded skin syndrome in an adult associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Dermatology*. **140**, 518–520 (1999).
- [76] Silversides, J. A.; Lappin, E.; Ferguson, A. J.: Staphylococcal toxic shock syndrome: Mechanisms and management. *Current Infectious Disease Reports*. **12**, 392–400 (2010).
- [77] Fisher, E. L.; Otto, M.; Cheung, G. Y. C.: Basis of virulence in enterotoxin-mediated staphylococcal food poisoning. *Frontiers in Microbiology*. **9**, 436 (2018).
- [78] Sanchini, A.: Recent developments in phenotypic and molecular diagnostic methods for antimicrobial resistance detection in *Staphylococcus aureus*: A narrative review. *Diagnostics*. **12**, (2022).
- [79] Long, L. J.; Lin, M.; Chen, Y. R.; Meng, X.; Cui, T. T.; Li, Y. P.; Guo, X. G.: Evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for *Staphylococcus aureus* detection: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. **21**, 1–9 (2022).
- [80] Koide, Y.; Maeda, H.; Yamabe, K.; Naruishi, K.; Yamamoto, T.; Kokeguchi, S.; Takashiba, S.: Rapid detection of *mecA* and *spa* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Letters in Applied Microbiology*. **50**, 386–392 (2010).
- [81] Xu, Z.; Li, L.; Chu, J.; Peters, B. M.; Harris, M. L.; Li, B.; Shi, L.; Shirtliff, M. E.: Development and application of loop-mediated isothermal amplification assays on rapid detection of various types of staphylococci strains. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*. **47**, 166 (2012).
- [82] Su, J.; Liu, X.; Cui, H.; Li, Y.; Chen, D.; Li, Y.; Yu, G.: Rapid and simple detection of methicillin-resistance staphylococcus aureus by *orfX* loop-mediated isothermal amplification assay. *BMC Biotechnology*. **14**, 8 (2014).
- [83] UniProt Consortium. “UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021.” *Nucleic acids research*. **49**, D480-D489 (2021).
- [84] ENA Browser. [online] [cit. 14. 2. 2023]. Dostupné z: <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/M13812>

- [85] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W.; Lipman, D. J.: Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*. **215**(3), 403–410 (1990).
- [86] Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G.: Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*. **7**, 539 (2011).
- [87] Waterhouse, A. M.; Procter, J. B.; Martin, D. M. A.; Clamp, M.; Barton, G. J.: Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. **25**, 1189–1191 (2009).
- [88] Smrčka, T.: Porovnání různých molekulárně-biologických přístupů pro detekci přítomnosti DNA patogenní bakterie *Haemophilus influenzae*. Praha, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Martínková, Markéta.
- [89] Zrnová, A.: Studium využití uracil-DNA glykosylasy s cílem zamezit kontaminací testovaných vzorků produkty předchozích DNA amplifikačních reakcí. Praha, 2021. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Martínková, Markéta.
- [90] Lamas, A.; Azinheiro, S.; Roumani, F.; Prado, M.; Garrido-Maestu, A.: Evaluation of the effect of outer primer structure, and inner primer linker sequences, in the performance of Loop-mediated isothermal amplification. *Talanta*. **260**, 124642 (2023).
- [91] Dle ústního sdělení Mgr. Petra Jeřábka, PhD. (Karlova univerzita v Praze) dne 10. 1. 2023.
- [92] Friček, M.: Optimalizace metody izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou pro testování infekce způsobené bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Praha, 2022. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra biochemie. Vedoucí práce Jeřábek, Petr.