

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Optimalizace PCR technik pro detekci včelích
patogenů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

| | |
|-------------------|----------------------------------|
| Autor: | Bc. Kristýna Myslínová |
| Studijní program: | N1406 Biochemie |
| Studijní obor: | Biochemie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D. |
| Rok: | 2023 |

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....

Podpis studenta

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. za jeho vstřícný přístup, cenné rady a připomínky k experimentální části. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Silvii Dostálkové, Ph.D. a Mgr. Elišce Pindřákové za veškerý věnovaný čas, především v začátcích experimentální práce. Děkuji také Mgr. Zuzaně Žvátorové za všestrannou pomoc v laboratoři a také všem dalším zaměstnancům katedry biochemie za vstřícný přístup během celého studia. V neposlední řadě bych ráda poděkovala všem včelařům, kteří se zapojili do projektu COLOSS a poskytli vzorky včel ze svých včelstev.

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Kristýna Myslínová |
| Název práce | Optimalizace PCR technik pro detekci včelích patogenů |
| Typ práce | Diplomová |
| Pracoviště | Katedra biochemie |
| Vedoucí práce | Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2023 |

Abstrakt

Včelí patogeny patří mezi faktory, které nepříznivě ovlivňují zdraví včel. Screening včelích patogenů je důležitý pro včasné rozpoznání nákazy, jejímuž šíření pak lze jednodušeji zabránit. Pro detekci včelích patogenů se nejčastěji používá PCR. Mezi její nevýhody ale patří vysoká cena vybavení, citlivost na kontaminanty a nutnost tepelného cyklování. Izolace DNA předcházející PCR je v případě použití komerčních kitů také poměrně nákladná. Levnější a časově méně náročnou alternativou izolace DNA mohou být FTA karty umožňující dlouhodobé uskladnění DNA při laboratorní teplotě. Alternativou samotné PCR pak může být metoda izotermní amplifikace zprostředkované smyčkou (LAMP), umožňující velmi rychlou amplifikaci za izotermních podmínek.

V experimentální části práce bylo optimalizováno použití FTA karet pro uchování homogenátů včel a jejich následné zpracování pro PCR aplikace. FTA karty byly spolu s DNA-izolačním kitem DNeasy Plant Mini kit použity pro detekci pěti vybraných patogenů v podzimních a jarních vzorcích včel. FTA karty byly vyhodnoceny jako levnější a rychlejší alternativa k izolačním kitům. Dále byla vypočítána prevalence patogenů, přičemž bylo pozorováno výrazné zvýšení prevalence *Nosema ceranae* ve včelstvech na jaře oproti podzimnímu období, a naopak výrazné snížení prevalence *Lotmaria passim* a *Serratia marcescens*. V podzimních odběrech ze včelstev byla také pozorována daleko větší diverzita ve výskytu patogenů. Výsledky práce poskytují nová data o prevalenci patogenů a jejich sezónním výskytu v České republice.

Dále byla optimalizována metoda LAMP v kombinaci s FTA kartami pro detekci

N. ceranae. Složení reakční směsi a množství přidávaného detekčního barviva bylo upraveno pro optimální průběh reakce a snadné určení pozitivního výsledku. Byly ale pozorovány falešně pozitivní výsledky způsobené nespecifickou amplifikací či kontaminací. Pro zavedení metody je tedy potřeba dalších optimalizačních kroků.

Klíčová slova včelí patogeny, detekce patogenů, PCR, LAMP, FTA karty, *Nosema spp.*, *Lotmaria passim*, *Serratia marcescens*, *Crithidia mellificae*

Počet stran 76

Počet příloh 0

Jazyk Český

Bibliographical identification

| | |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Bc. Kristýna Myslínová |
| Title | Optimization of PCR technique for the detection of honey bee pathogens |
| Type of thesis | Diploma |
| Department | Department of biochemistry |
| Supervisor | Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D. |
| The year of presentation | 2023 |

Abstract

Honey bee pathogens belong to a group of factors that have a negative impact on bee health. Screening of honey bee pathogens is important for early recognition of infection, the spread of which can then be easily avoided. The most used method for honey bee pathogen detection is PCR. However, its disadvantages include high cost of equipment, sensitivity to contaminants and the need for thermal cycling. Isolation of DNA prior to PCR is also rather costly when commercial DNA-isolating kits are used. A cheaper and less time-consuming alternative to DNA isolation could be FTA cards, which allow for long-term storage of DNA at room temperature. An alternative to PCR itself could be loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which is a method allowing fast DNA amplification under isothermal conditions.

In the experimental part, the use of FTA cards was optimised for the storage of honey bee homogenates and their subsequent processing for PCR applications. FTA cards were used alongside with DNA-isolating kit DNeasy Plant Mini kit for the detection of five selected pathogens in honey bee samples from autumn and spring. FTA cards were evaluated as a cheaper and faster alternative to commercial isolation kits. Next, the prevalence of pathogens was determined. A significant increase in the prevalence of *Nosema ceranae* was observed in spring samples compared to autumn samples. Conversely, a significant decrease in the prevalence of *Lotmaria passim* and *Serratia marcescens* was observed in spring samples. Much greater diversity in the occurrence of pathogens was also observed in autumn bee colonies. The results of this thesis provide

new data on the prevalence of pathogens and their seasonal occurrence in the Czech Republic.

Furthermore, the LAMP method was optimised in combination with FTA cards for the detection of *N. ceranae*. The composition of the reaction mixture and the amount of added dye for detection were adjusted for optimal reaction and easy determination of a positive result. However, false positive results caused by either contamination or nonspecific amplification were observed. Therefore, further optimisation steps are needed in order to routinely use this method.

| | |
|----------------------|---|
| Keywords | Honey bee pathogens, pathogen detection, PCR, LAMP, FTA cards, <i>Nosema spp.</i> , <i>Lotmaria passim</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Crithidia mellificae</i> |
| Number of pages | 76 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

OBSAH

| | | |
|-------|---|----|
| 1 | ÚVOD | 1 |
| 2 | SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 2 |
| 2.1 | Polymerázová řetězová reakce | 2 |
| 2.2 | Alternativní metody amplifikace DNA..... | 3 |
| 2.2.1 | NASBA | 3 |
| 2.2.2 | RCA | 4 |
| 2.2.3 | SDA | 4 |
| 2.2.4 | RPA..... | 4 |
| 2.3 | LAMP | 5 |
| 2.3.1 | <i>Bst</i> a <i>Bsm</i> polymerasa | 6 |
| 2.3.2 | Struktura používaných primerů | 7 |
| 2.3.3 | Průběh reakce | 8 |
| 2.3.4 | Způsoby detekce..... | 14 |
| 2.3.5 | Kontaminace a falešná pozitivita u LAMP a její řešení | 19 |
| 2.3.6 | Inhibitory LAMP | 20 |
| 2.3.7 | Využití LAMP pro detekci patogenů..... | 20 |
| 2.3.8 | Výhody a nevýhody LAMP | 22 |
| 2.4 | Zpracování a uchování včelích vzorků | 24 |
| 2.4.1 | Whatman FTA karty | 24 |
| | Experimentální část..... | 26 |
| 3.1 | Materiál | 26 |
| 3.1.1 | Chemikálie | 26 |
| 3.1.1 | Biologický materiál | 26 |
| 3.1.2 | Přístroje a vybavení | 26 |
| 3.1.3 | Použité roztoky..... | 27 |
| 3.1.4 | Použité kity..... | 27 |
| 3.1.5 | Reagencie pro molekulární biologii..... | 27 |
| 3.2 | Metody | 28 |
| 3.2.1 | Příprava vzorků včel..... | 28 |
| 3.2.2 | Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini kit..... | 28 |
| 3.2.3 | Izolace DNA s pomocí Whatman® FTA® karet | 29 |
| 3.2.4 | Polymerázová řetězová reakce | 29 |
| 3.2.5 | Elektroforéza na agarosovém gelu | 31 |
| 3.2.6 | Příprava vzorků DNA pro sekvenaci | 31 |
| 3.2.7 | Mikroskopie spor <i>Nosema spp.</i> | 32 |
| 3.2.8 | LAMP | 33 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.2.9 | Statistické vyhodnocení dat..... | 34 |
| 4 | Výsledky..... | 36 |
| 4.1 | Optimalizace FTA karet..... | 36 |
| 4.1.1 | Uchování homogenátů včel na FTA kartách..... | 36 |
| 4.1.2 | Zpracování vzorků z FTA karet | 37 |
| 4.1.3 | Vzájemná kontaminace vzorků při vyřezávání FTA karet | 39 |
| 4.2 | Mikroskopická detekce <i>Nosema spp.</i> | 40 |
| 4.3 | Výsledky end-point PCR z FTA karet a izolované DNA | 40 |
| 4.3.1 | Porovnání výsledných elektroferogramů | 40 |
| 4.3.2 | Shrnutí výsledků detekce ve všech testovaných vzorcích | 44 |
| 4.4 | Sekvenace PCR produktů pro potvrzení detekce cíleného patogenu | 47 |
| 4.5 | Zastoupení patogenů v podzimních a jarních vzorcích včel | 49 |
| 4.5.1 | Prevalence patogenů na podzim a na jaře | 49 |
| 4.5.2 | Koinfekce patogenů | 51 |
| 4.6 | Statistická analýza | 52 |
| 4.6.1 | Porovnání výsledků z FTA karet a kitu Qiagen | 52 |
| 4.6.2 | Porovnání výsledků u podzimních a jarních včel..... | 52 |
| 4.7 | Optimalizace LAMP | 54 |
| 4.7.1 | Optimalizace koncentrace MgSO ₄ | 55 |
| 4.7.2 | Úprava objemu reakce a koncentrace SYBR safe..... | 57 |
| 4.7.3 | Falešná pozitivita..... | 59 |
| 4.7.4 | PCR pro určení přítomnosti kontaminace..... | 60 |
| 4.7.5 | Úprava koncentrace primerů..... | 62 |
| 5 | DISKUZE | 63 |
| 5.1 | Porovnání FTA karet a izolačního kitu DNeasy Plant Mini kit | 63 |
| 5.2 | Detekce patogenů a jejich prevalence..... | 64 |
| 5.3 | LAMP | 65 |
| 6 | ZÁVĚR..... | 67 |
| 7 | LITERATURA | 69 |
| 8 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 76 |

CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše o PCR metodách používaných k diagnostice patogenů a parazitů.
- Vypracování literární rešerše o metodách odběru, zpracování a uchování vzorků.
- Zpracování přehledu diagnostiky včelích patogenů.
- Vývoj a optimalizace PCR metody pro diagnostiku včelích patogenů.
- Optimalizace LAMP techniky pro diagnostiku vybraných včelích patogenů.

1 ÚVOD

Včelí patogeny patří mezi faktory negativně ovlivňující zdraví včel. Existuje jich velké množství, a to od bakteriálních patogenů až po mnohobuněčné parazity. Pravděpodobně nejznámějšími bakteriálními patogeny jsou bakterie *Paenibacillus larvae*, způsobující mor včelího plodu, a *Melisococcus plutonius*, způsobující hnilobu včelího plodu (Fünfhaus et al., 2018). Dalším bakteriálním patogenem, který se v těle včel vyskytuje přirozeně v malém množství, je oportunní patogen *Serratia marcescens* (Raymann et al., 2018). Mezi houbové patogeny se řadí například *Nosema apis* a *Nosema ceranae*, původci průjmového onemocnění včel, a *Ascospaera apis*, která zapříčiňuje zkamenění včelího plodu (Sarwar, 2016). Dalšími zástupci eukaryotických parazitů jsou prvoci *Crithidia mellificae* a *Lotmaria passim*, jejichž vliv na zdraví včel nebyl dosud dalece prozkoumán. Z mnohobuněčných parazitů je pak vhodné zmínit roztoče *Varroa destructor*, který slouží jako vektor pro přenos řady virových onemocnění včel (Ravoet et al., 2013).

Vzhledem k tomu, že v posledních letech dochází k častějším kolapsům včelstev je screening včelích patogenů důležitý například pro včasné rozpoznání nakaženého včelstva a aplikaci vhodné léčby, popřípadě likvidaci včelstva pro zabránění šíření nákazy. Pro detekci včelích patogenů se využívá řada metod jako je mikroskopie, mikrobiální kultivace, molekulárně-biologické metody či hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu (MALDI-TOF MS), konkrétně systém MALDI Biotyper (Fries et al., 2013; Houdelet et al., 2020). Každá z metod má své přednosti, nevýhody a limitace. Například ne všechny patogeny jsou vhodné pro mikrobiální kultivaci či identifikaci s pomocí mikroskopie.

Molekulárně-biologické metody, především polymerázová řetězová reakce (PCR), jsou velmi výhodné, jelikož je lze použít pro identifikaci jakéhokoliv druhu patogenu. PCR a jí předcházející izolace nukleových kyselin jsou ale často poměrně nákladné. Tato práce bude věnována novým alternativním metodám izolace a amplifikace nukleových kyselin, které mohou snížit náklady a zrychlit diagnostiku chorob.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR je metoda umožňující rychlé namnožení vybraného úseku DNA a dnes je již standardem běžně používaným v laboratořích. Pro PCR je zapotřebí termostabilní DNA polymerasy (EC 2.7.7.7) jako je Taq polymerasa izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v teplotách vyšších než 90 °C. Pro reakci je také nutná přítomnost Mg^{2+} iontů, deoxynukleosidtrifosfátů (dNTPs) a primerů. Primery jsou pro jeden úsek DNA vždy používány 2 a to přední a zadní (forward a reverse) (Clark et al., 2019).

PCR cyklus sestává ze tří fází, které probíhají při různých teplotách, proto je pro PCR nutný termocyklér, který dokáže velmi rychle a přesně měnit teplotu reakční směsi. První fází je denaturace, která probíhá při 94-95 °C a dochází při ní k separaci dvouvláknové DNA (dsDNA). Druhá fáze je hybridizace neboli fáze nasednutí primerů, která probíhá přibližně při 60 °C, přesná teplota ale závisí na teplotě tání používaných primerů. Třetí fází je elongace, která probíhá při teplotě okolo 72 °C, tedy při teplotě optimální pro funkci Taq DNA polymerasy. Při elongaci dochází k prodloužení primerů polymerasou a tedy syntéze komplementárního vlákna od 5' konce ke 3' konci. V termocykléru dochází k cyklickému střídání těchto teplot, přičemž po každém cyklu je množství cílové DNA zdvojnásobeno. Délka každého kroku se liší podle potřeby a vybavení, nicméně průměrná doba průběhu celé PCR je 1-2 hodiny (Clark et al., 2019; Garibyan & Avashia, 2013).

Pro analýzu produktů PCR je běžně používána elektroforéza na agarosovém gelu, metoda je poté označována jako „end-point“ PCR. Na gelu pak v případě amplifikace jednoho cílového segmentu DNA vidíme jeden band. PCR je ale také možné provádět tzv. v reálném čase (real-time PCR, qPCR), kdy detekce probíhá přímo v průběhu reakce s použitím termocykléru se zabudovaným optickým systémem pro zachycení fluorescence. Pro qPCR může být použito například barvivo SYBR Green I, které emituje záření při vazbě na dsDNA, nebo mohou být použity oligonukleotidové sondy, například TaqMan sondy (Green & Sambrook, 2018; Valones et al., 2009).

PCR je používána běžně pro detekci patogenů ať už lidských, rostlinných či hmyzích a v kombinaci s reverzní transkripcí (RT-PCR) může být použita i pro detekci virové RNA. Pro detekci několika patogenů zároveň lze provádět multiplex PCR, kdy je při

reakci použito více primerů cílených na různé úseky DNA (Clark et al., 2019). U včelích patogenů se multiplex PCR používá například pro detekci vzájemně podobných patogenů jako *N. apis* a *N. ceranae* či *P. larvae* a *M. plutonius* (Gisder & Genersch, 2013; Okamoto et al., 2022).

2.2 Alternativní metody amplifikace DNA

Metody amplifikace nukleových kyselin se souhrně označují zkratkou NAAT („nucleic acid amplification techniques“). PCR je nejpoužívanější metoda amplifikace DNA, nicméně má své limity, kterými jsou především vysoká cena vybavení, možnosti kontaminace, citlivost na některé kontaminanty a inhibitory a nutnost tepelného cyklování. Kvůli těmto limitacím vznikají nové alternativní NAAT, které mají potenciální výhody oproti PCR z hlediska rychlosti, ceny či využití mimo laboratoř, přičemž většina z nich využívá izotermní amplifikace, při které není nutné použití termocykléru (Fakruddin et al., 2013). Mezi tyto alternativní metody patří například NASBA (amplifikace založená na sekvenci nukleové kyseliny; „nucleic acid sequence based amplification“), RCA (amplifikace otáčivou kružnicí; „rolling circle amplification“), SDA (amplifikace vytěšňováním řetězce; „strand displacement amplification“), LAMP (izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou; „loop mediated isothermal amplification“), RPA (rekombinasová polymerasová amplifikace; „recombinase polymerase amplification“) a mnohé další (Oliveira et al., 2021).

2.2.1 NASBA

NASBA je metoda speciálně vyvinutá pro detekci jednovláknové RNA. Jedná se o amplifikační systém zprostředkovaný transkripcí, který mimikuje RNA replikaci retrovirů. NASBA probíhá při konstantní teplotě 41 °C a využívá dvou primerů a tří enzymů - AMV reverzní transkriptasy (EC 2.7.7.49), T7 DNA-dependentní RNA polymerasy (EC 2.7.7.6) a RNasy H (EC 3.1.26.4) (Deiman et al., 2002). Na rozdíl od RT-PCR nevyžaduje syntézu cDNA, je rychlejší a méně citlivá vůči inhibitorům. Byla použita pro rychlou detekci patogenních virů s jednovláknovým RNA genomem jako je influenza A či virus Zika (Collins et al., 2003; Reed et al., 2019). Problémem je ale optimalizace reakčních podmínek kvůli třem různým enzymům pracujícím současně, a také, kvůli náchylnosti metody na falešně pozitivní výsledky, nutnost použití detekčních metod založených na specifických sondách, což vede k vyšším nákladům (Oliveira et al., 2021).

2.2.2 RCA

RCA se používá pro amplifikace jednovláknových či dvouvláknových kruhových DNA templátů. Využívá DNA polymerasy s dislokázovou aktivitou, jako je tomu například i u LAMP (viz kapitola 2.3.1), a probíhá při konstantní teplotě od 23 °C do 60 °C. V přítomnosti kruhového templátu a jednoho primeru produkuje polymerasa dlouhou DNA molekulu s tandemovými repetitivními sekvencemi (Ali et al., 2014). Tyto repetitivní sekvence mohou být navrženy na míru manipulací templátu. Vlastním designem templátu tak mohou být produkty upraveny, aby obsahovaly funkční sekvence jako DNA aptamery, DNAzomy či restrikční místa (Al-Ogaili et al., 2020; Fang et al., 2021). RCA se tak používá především pro techniky klonování, pro genotypizaci, analýzu celých genomů nebo detekci jednonukleotidových polymorfismů (Pickering et al., 2002).

2.2.3 SDA

SDA kombinuje činnost endonukleasy, DNA polymerasy bez exonukleasové aktivity a dvou sad primerů, přičemž první sada obsahuje převisy s restrikčními místy pro restrikční endonukleasu HincII (EC 3.1.21.4). SDA lze použít pro DNA i RNA templáty, není však vhodná pro amplifikaci dlouhých sekvencí. Pro SDA je také nutný prvotní denaturační krok vystavením vysoké teplotě. Během amplifikace dochází k naštipnutí nově syntetizovaného vlákna díky přítomnosti restrikčních míst na prodlužovaných primerech. Toto vlákno je poté vytěsněno a odloučeno od vlákna původního, které je znovu prodlužováno (Walker et al., 1992).

SDA probíhá za izotermních podmínek při teplotách mezi 30 až 55 °C. Takto nízké teploty ale znamenají zvýšené riziko nespecifické amplifikace, podobně jako u NASBA. Tento fakt je problémem především při použití u klinických vzorků, které běžně obsahují DNA se sekvencemi podobnými sekvenci cílové (Oliveira et al., 2021)

2.2.4 RPA

RPA využívá aktivity rekombinasy, DNA polymerasy s dislokázovou aktivitou a SSB proteinů („single-strand DNA-binding proteins“), které stabilizují ssDNA. RPA probíhá za izotermních podmínek při 37 až 42 °C (Piepenburg et al., 2006). Jedná se o jednu z nejrychlejších NAAT s časem amplifikace i kratším jak 20 minut, přičemž u ostatních zatím zmíněných metod je reakční čas delší jak 60 minut (Ereku et al., 2018; Lobato &

O'Sullivan, 2018). RPA začíná formací nukleoproteinového komplexu, který tvoří primery a rekombinasa. Tento komplex poté skenuje cílovou DNA dokud nenarazí na komplementární sekvenci. Poté rekombinasa zprostředkuje formaci primer-DNA komplexu a DNA polymerasa tak může přistoupit k replikační vidličce a prodloužit primer. RPA se využívá především pro detekci patogenů, nicméně vyžaduje striktní dodržení reakčních podmínek. Detekce patogenů s použitím surových vzorků tak může být problematická (Euler et al., 2012; Lei et al., 2014).

2.3 LAMP

Zatím popsané amplifikační metody patří mezi nejvíce rozvinuté metody, které mají velký potenciál vyrovnat se PCR ve statutu „zlatého standardu“ amplifikace DNA. Prozatím nejvíce rozvinutou a zároveň nejpoužívanější metodou izotermní amplifikace je LAMP, kterou světová zdravotnická organizace (WHO) uznala jako techniku, která splňuje všechna kritéria pro ideální NAAT pro diagnostické účely (Oliveira et al., 2021). LAMP budou tedy podrobněji věnovány následující kapitoly.

LAMP vyvinuli v roce 2000 Notomi et al. Jedná se o metodu, při které dochází k namnožení cílové DNA s vysokou specifitou, účinností a rychlostí, a to za izotermních podmínek. Na rozdíl od PCR, kde je k rozvolnění dvouvláknové struktury DNA využito vysoké teploty, je u LAMP využívána DNA polymerasa, konkrétně *Bst* či *Bsm* DNA polymerasa, mající schopnost sama účinně rozvolňovat dsDNA (Cameron et al., 2021). Při reakci je standardně využito čtyř nebo šesti různých primerů, které váží šest nebo osm různých regionů na cílovém genu, díky čemuž je reakce velmi specifická. Doba LAMP reakce je pak v závislosti na použitých primerech od 30 do 60 minut, během kterých dojde k tvorbě až 10^9 amplikonů (Notomi et al., 2000; Notomi et al., 2015).

Zároveň má LAMP širokou škálu různých aplikací jako je „point-of-care testing“ (POCT), genetické testování v rozvojových zemích (Notomi et al., 2015), a v kombinaci s dalšími molekulárními přístupy, jako je např. reverzní transkripce (RT-LAMP) může být využita pro detekci mnoha různých druhů patogenů, a to jak lidských, tak hmyzích, zvířecích či rostlinných (Wong et al., 2018). Může být také použita pro detekci geneticky modifikovaných organismů a obecně může být pro všechny zmíněné aplikace využita ve formě biosenzorů (Kaymaz & Elitas, 2021).

POCT je definován jako rychlý a jednoduchý diagnostický test, který je prováděn takzvaně v místě péče a slouží k diagnostice chorob a jejich monitoringu. POCT mohou být použity mimo laboratorní prostředí, především v prostředí bez patřičného vybavení a mohou být použity i nekvalifikovanými osobami. Tyto testy jsou tedy určeny i přímo pro pacienty. Ideální POCT systém je citlivý, specifický, rychlý, robustní a jednoduchý na použití (Vashist, 2017). LAMP má velký potenciál být úspěšně používána jako POCT. Příprava vzorku pro LAMP může být velmi rychlá díky toleranci LAMP vůči inhibitorům DNA polymerasy a amplifikace při konstantní teplotě snižuje náklady na energii (Moehling et al., 2021).

2.3.1 *Bst* a *Bsm* polymerasa

Proces LAMP spoléhá na dislokázovou aktivitu používané termostabilní DNA polymerasy, která dokáže rozvolňovat řetězce dsDNA a oddělené vlákno nahrazovat řetězcem, který sama syntetizuje. Takovou aktivitu má řada různých DNA polymeras, pro LAMP jsou ale nejvhodnější *Bst* a *Bsm* polymerasy. Oba enzymy pocházejí z termofilních bakterií a katalyzují 5'→3' syntézu DNA a postrádají 5'→3' exonukleasovou aktivitu. *Bst* polymerasa je izolována z bakterie *Bacillus stearothermophilus* a *Bsm* polymerasa pochází z bakterie *Bacillus smithii* (Woniakowski et al., 2012). Optimální teplota pro funkci těchto polymeras se pohybuje kolem 60 °C, což je i teplota optimální pro nasednutí primerů (Tomita et al., 2008).

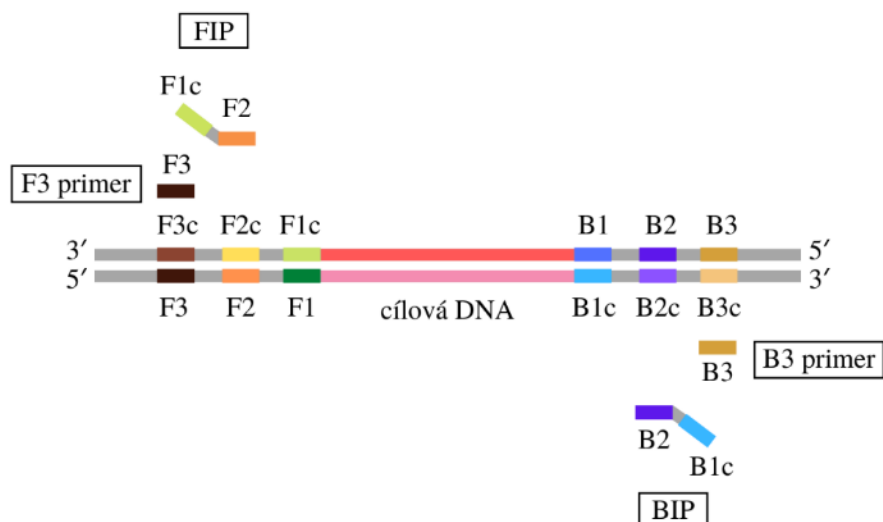
Jako první byla pro LAMP použita *Bst* polymerasa, konkrétně wild-type *Bst* DNA Polymerase, Large Fragment (New England Biolabs). Tato polymerasa je poměrně robustní a vykazuje vysokou toleranci vůči inhibitorům přítomným ve vzorcích oproti polymerasám používaným pro PCR, což ji dělá velmi vhodnou pro diagnostické aplikace. Tato polymerasa ale efektivně neinkorporuje dUTP, v důsledku čehož dochází k falešně pozitivním výsledkům při nízkých teplotách od 25 do 40 °C. Kvůli tomuto nedostatku byla in-silico navržena nová polymerasa s názvem *Bst* 2.0 DNA Polymerase (New England Biolabs), která vykazuje zlepšení v amplifikační rychlosti, výnosu, termostabilitě a toleranci vůči solím (Paik et al., 2021). Další variantou je pak *Bst* 2.0 Warmstart (New England Biolabs), která kromě zmíněných výhod navíc umožňuje připravovat reakci při pokojové teplotě díky reverzibilně vázanému aptameru, který inhibuje funkci polymerasy pod 45 °C, což zlepšuje reprodukovatelnost výsledků. Při použití výše uvedených polymeras je nutné reakční směs připravovat na ledu.

Například pro použití pro POCT je warmstart polymerasa nejvhodnější (*New England Biolabs, Inc.* <https://international.neb.com/products/m0538-bst-20-warmstart-dna-polymerase#FAQs%20&%20Troubleshooting> , 27. 3. 2023).

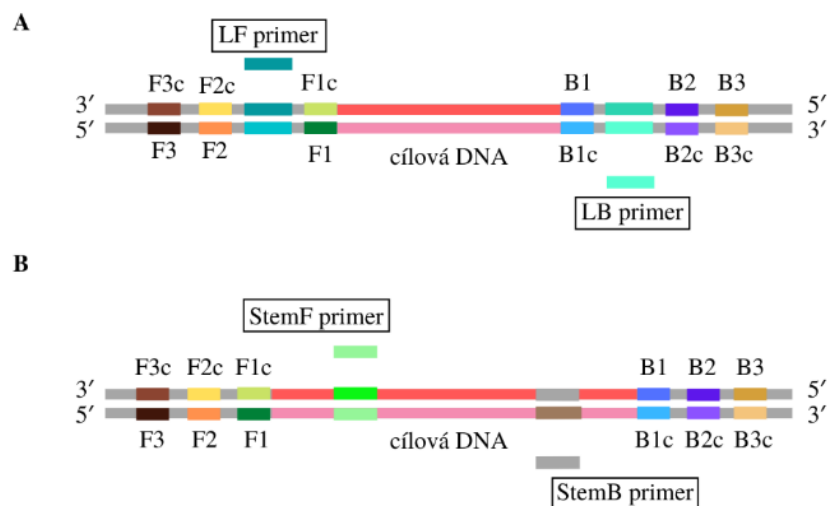
2.3.2 Struktura používaných primerů

LAMP využívá čtyř základních primerů. Mezi tyto základní nebo také hlavní primery patří dva vnější primery – vnější přední primer („forward outer primer“, F3) a vnější zadní primer („backward outer primer“, B3). Dále využívá dvou vnitřních primerů – vnitřní přední primer („forward inner primer“, FIP) a vnitřní zadní primer („backward inner primer“, BIP; viz obr. 1). Pro zrychlení reakce a zvýšení citlivosti se pak využívá ještě doplňkových primerů, kterými mohou být například smyčkové primery, konkrétně smyčkový přední primer („forward loop primer“, LF) a smyčkový zadní primer („backward loop primer“, LB). Smyčkové primery hybridizují část DNA, která během LAMP reakce tvoří smyčkovou část vlásenkové smyčky (viz obr. 2A), jak je vysvětleno dále v kapitole 2.3.3 (Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000).

Alternativně se pro stejné účely mohou místo smyčkových primerů použít tzv. „stem“ primery neboli stopkové primery. Stopkové primery jsou opět dva, a to stopkový přední primer („forward stem primer“, StemF) a stopkový zadní primer („backward stem primer“, StemB). Narozdíl od smyčkových primerů se váží na část DNA, která během reakce tvoří stopku vlásenkové smyčky (viz obr. 2B). Stopkové primery nemusejí být použity jen jako náhrada smyčkových primerů, ale mohou být s nimi použity společně (Gandelman et al., 2011; Njiru et al., 2017).



Obr. 1 Vazebná místa hlavních primerů BIP, FIP, F3 a B3 na templátové DNA. Překresleno dle Tomita et al., 2008.

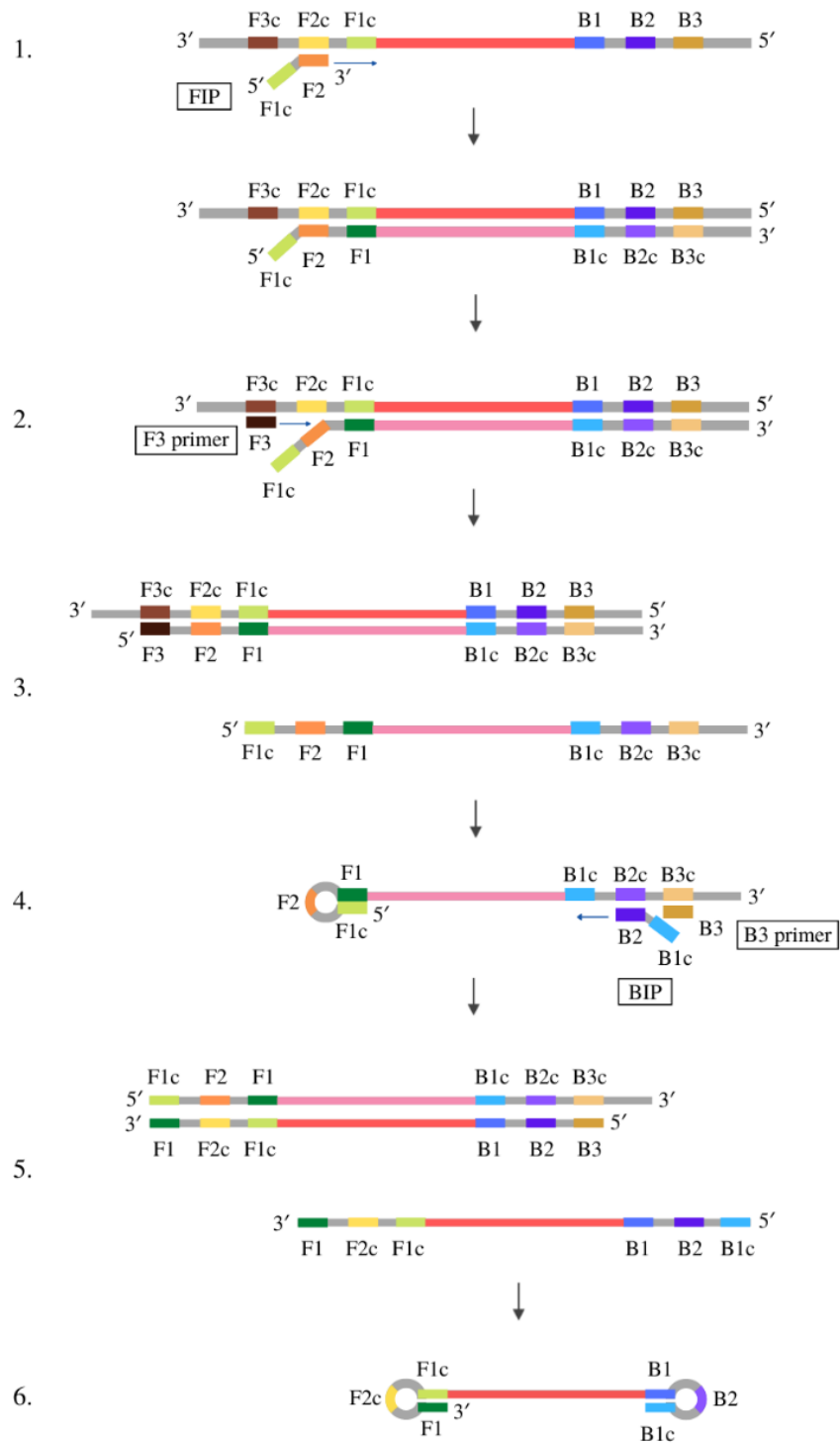


Obr. 2 Vazebná místa vedlejších primerů A) smyčkových LF a LB; B) stopkových StemF a StemB na templátové DNA. Překresleno dle Gandelman et al. (2011) a Li & Macdonald (2015).

2.3.3 Průběh reakce

Reakce má tři základní části: produkce startovní struktury, cyklická amplifikace a krok elongace a recyklace (Mori et al., 2006). Produkce startovní struktury (viz obr. 3) začíná tak, že nejprve vnitřní primer FIP, který obsahuje dvě cílové sekvence komplementární ke dvěma různým regionům na templátové DNA, hybridizuje k cílové dsDNA a startuje syntézu komplementárního řetězce pomocí DNA polymerasy (krok 1). Komplementární řetězec je syntetizován od 3' konce F2 regionu primeru FIP. Vnější primer F3 poté

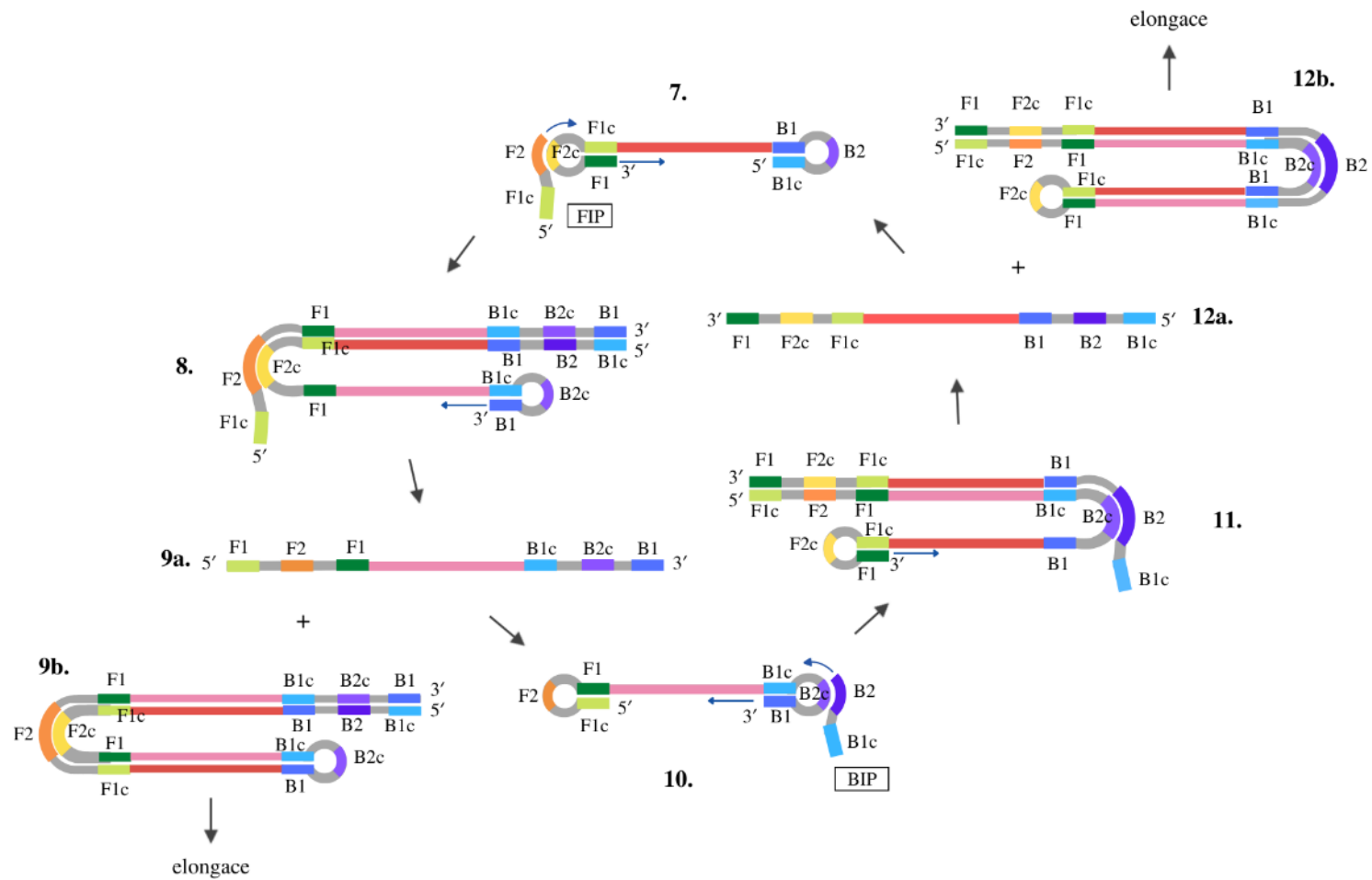
nasedá za FIP na region F3c na templátové DNA a iniciuje rozpojení vlákna a syntézu komplementárního řetězce, přičemž uvolňuje prodloužený FIP primer (krok 2). Získáváme tedy dsDNA z F3 primeru a templátové DNA a ssDNA z uvolněného prodlouženého FIP primeru (krok 3). Tato FIP-ssDNA následně tvoří na 5' konci vlásenkovou smyčku, díky komplementaritě regionů F1c a F1, a slouží jako templát pro BIP-iniciovanou syntézu DNA a následné rozpojení řetězce s pomocí primeru B3. BIP tedy nasedá na 3' konec vlákna se smyčkou na 5' konci, čímž startuje syntézu komplementárního řetězce. Během syntézy je smyčka rozvolněna zpět na lineární strukturu. Primer B3 nasedá za BIP na region B3c a skrz aktivitu DNA polymerasy začíná syntézu řetězce na 3' konci (krok 4). Prodloužený BIP primer je vytlačen a uvolněn jako ssDNA a z primeru B3 a původně prodlouženého FIP vzniká dsDNA (krok 5). Prodloužený BIP primer následně tvoří strukturu s vlásenkovou smyčkou na obou koncích vlákna, která připomíná činku (krok 6). Tato struktura slouží jako startovní struktura pro amplifikační cyklus (Fakruddin et al., 2013; Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000).



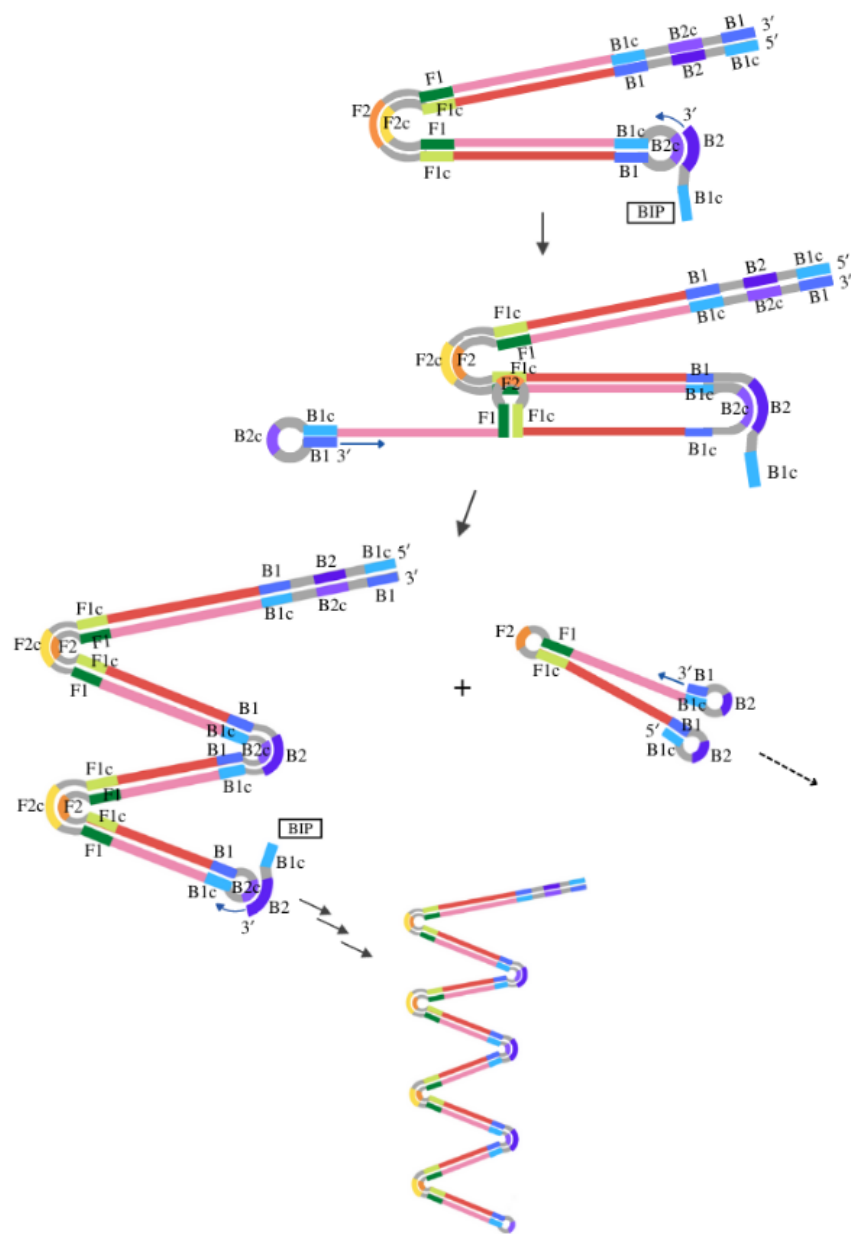
Obr. 3 Schématické znázornění kroků produkce startovní struktury u LAMP. Překresleno dle Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008.

Během cyklické amplifikace (obr. 4) startovní struktura nejprve podléhá tzv. „self-primed“ DNA syntéze, kdy DNA polymerasa prodlouží vlákno bez pomoci dalších primerů, jelikož jako primer slouží region F1 na stopkové části vlásenkové smyčky (Becherer et al., 2020). Prodloužení 3' konce zároveň rozpojí smyčku na 5' konci (B1c). Současně cyklickou amplifikaci iniciuje FIP, který se váže na F2c region na smyčkové části vlásenky (krok 7). Prodloužením FIP dojde k rozpojení dříve syntetizovaného řetězce (prodloužený region F1), přičemž na jeho konci je formována smyčka díky komplementaritě regionů B1 a B1c (krok 8). Region B1 na stopkové části vlásenkové smyčky pak slouží jako primer, jehož prodloužením dojde k rozpojení řetězce a uvolnění komplementárního vlákna, respektive prodlouženého FIP (krok 9a), a dvouvlákna se smyčkou, které poté vchází do třetí části LAMP, tedy do elongace (krok 9b). Prodloužený FIP následně tvoří na obou svých koncích vlásenkovou smyčku (krok 10), čímž vzniká struktura komplementární ke startovní struktuře v kroku 7. Další průběh je tedy totožný s kroky 7-9, pouze s rozdílem, že místo FIP se prodloužení DNA účastní BIP (krok 11). V posledním kroku po rozpojení řetězců vzniká opět startovní struktura (krok 12a), čímž se uzavírá cyklus (Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008).

V elongačním kroku poté postupným nasedáním primerů dochází ke vzniku velkého množství různě velkých struktur skládajících se ze střídavě obrácených repetitivních cílové sekvence. Vznikající amplikony jsou velmi dlouhé a tvoří tzv. kvěťákové struktury, díky přítomnosti mnoha smyček. Během elongace vznikají také kratší amplikony, mezi nimiž je i amplikon identický struktuře v kroku 6 (obr. 3), která startuje cyklickou amplifikaci. Proto se elongační krok označuje také jako krok elongace a recyklace (Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008). V případě, že jsou v reakci použity smyčkové nebo stopkové primery, vzniká ještě větší množství dalších amplikonů (Wong et al., 2018). Zjednodušené schéma elongačního kroku je znázorněno na obr. 5.



Obr. 4 Schématické znázornění kroků cyklické amplifikace u LAMP. Překresleno dle Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008.



Obr. 5 Zkrácené schéma elongačního kroku LAMP reakce. Překresleno dle Nagamine et al., 2002; Notomi et al., 2000; Tomita et al., 2008.

2.3.4 Způsoby detekce

Způsobů detekce LAMP produktů existuje celá řada, včetně technik elektrochemických, imunochemických, piezoelektrických a magnetických, sledování bioluminiscence a využití různých druhů senzorů založených například na rezonanci povrchového plazmonu (Zhang et al., 2014). V následujících podkapitolách budou popsány pouze nejběžnější způsoby.

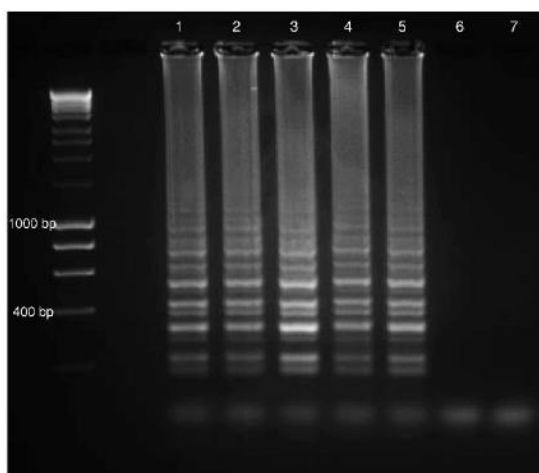
2.3.4.1 Gelová elektroforéza

Detekce produktů LAMP pomocí elektroforézy na agarosovém gelu je původním způsobem detekce. Jedná se o metodu separace makromolekul a jejich fragmentů podle jejich velikosti a náboje. Použití je v podstatě stejné jako u end-point PCR (Zhang et al., 2014). U elektroforézy LAMP produktů vidíme po vizualizaci typický „žebřík“ DNA fragmentů (viz obr. 6). Nejmenší fragment je monomer začínající na 5' konci F1c části primeru FIP a končící B1c částí primeru BIP. Multimery a polymery této monomerní struktury jsou pak produkovány ve velikostech od několika stovek párů bazí až po formaci pruhu vysokomolekulární DNA o velikosti tisíců párů bazí (Niessen et al., 2013).

Produkty reakce je možné na gelu vizualizovat několika způsoby. Dnes již méně používané je barvení ethidium bromidem, což je fluorescenční barvivo vážící dsDNA interkalací mezi jednotlivé báze. Interkalace způsobí zvýšení emise fluorescence po ozáření gelu ultrafialovým zářením (Niessen et al., 2013). Alternativou ethidium bromidu je interkalační barvivo GelRed, které je na rozdíl od něj nekarcinogenní. Popřípadě jsou používána i jiná barviva jako SYBR safe či Eva Green (Wong et al., 2018).

Výhodou gelové elektroforézy je to, že přímo rozpoznáme délku ampliconů, které se v reakci vytvořili, a tím pádem můžeme rozpoznat, zda dochází k nespecifické amplifikaci, tedy jednodušeji identifikovat případné falešně pozitivní vzorky. Zároveň je tento způsob detekce o něco citlivější než pozorování změny barvy okem či jiných okometrických způsobů detekce zmíněných dále, a to především v případě nižších koncentrací ampliconů. Slabý band je totiž na gelu lépe vidět než-li slabé zbarvení reakce ve zkumavce. Nevýhodou je větší časová náročnost oproti ostatním metodám a zároveň představuje riziko křížové kontaminace při nanášení vzorků. Gelová

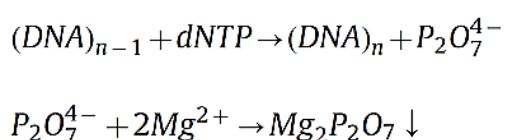
elektroforéza je rovněž nevhodná pro terénní využití LAMP metody (Wong et al., 2018; Zhang et al., 2014).



Obr. 6 Ukázka typického žebříku LAMP produktů (vzorky 1-5). Zde konkrétně detekce *Mycoplasma genitalium*. Převzato z Edwards et al., 2015.

2.3.4.2 Pozorování precipitátu

Při polymerizační reakci zprostředkované *Bst* polymerasou dochází po připojení jednotlivých dNTPs vždy k uvolnění pyrofosfátu jako vedlejšího produktu. Pokud dojde k produkci velkého množství pyrofosfátových aniontů, reagují pak s hořčnatými kationty přítomnými v reakční směsi a vzniká tak bílý precipitát (viz obr. 7; Zhang et al., 2014).

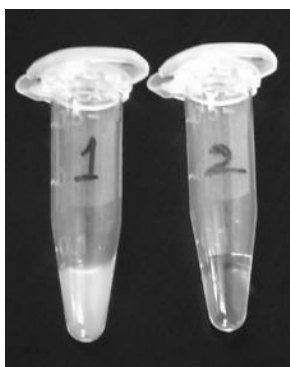


Obr. 7 Reakční schéma vzniku precipitátu při LAMP reakci. Převzato ze Zhang et al., 2014.

V případě úspěšné pozitivní LAMP reakce je produkováno dostatečné množství precipitátu, aby mohl být správně vyhodnocen výsledek pouhým okem přímo v reakční zkumavce buď bez nebo s pomocí centrifugace (obr. 8). Takto můžeme jednoduše určit zda došlo či nedošlo k amplifikaci nukleové kyseliny, a to bez dalších nákladů na detekci. Zároveň u tohoto způsobu detekce není nutné otevírat zkumavku, díky čemuž nehrozí kontaminace amplikonů (Garg et al., 2021). Určení pozitivního výsledku je ale často poměrně složité, jelikož precipitát je mnohdy špatně viditelný a je tak obtížné sledovat rozdíly mezi zkumavkami. Z tohoto důvodu je taktéž obtížné určit citlivost detekce a turbidita pozitivních vzorků je stabilní pouze krátký čas, což znamená, že

vyhodnocení musí být provedeno co nejdříve od proběhnutí reakce. Přestože je zde velké riziko nesprávného vyhodnocení výsledků v důsledku subjektivní chyby, je tato metoda dostačující pro rychlé předběžné určení výsledku LAMP reakce a vzhledem k rychlosti a nenáročnosti na vybavení je velmi vhodná pro POCT nebo jiné terénní aplikace (Garg et al., 2022; Zhang et al., 2014).

Díky tvorbě precipitátu může být LAMP sledována také v reálném čase za pomoci turbidimetru či spektrofotometru. Tento způsob je klasifikován jako nejjednodušší metoda monitoringu amplifikace genu. Nicméně má své nevýhody jako nehomogenita velikosti částic a jejich nerovnoměrné rozprostření v prostoru, opětovné rozpuštění precipitátu a problém při použití vzorků s již vysokou turbiditou před proběhnutím reakce (Mori et al., 2004).

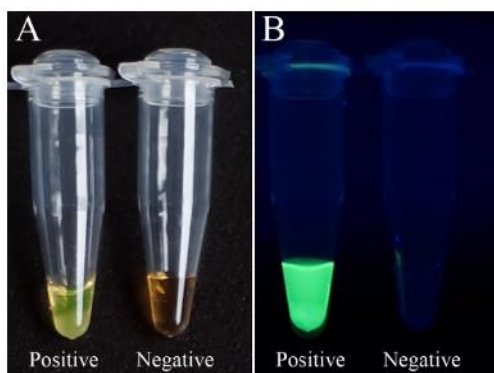


Obr. 8 vizuální detekce LAMP produktů pomocí pozorování precipitátu. Pozitivní vzorek s bílým precipitátem je vidět vlevo, negativní bez precipitátu vpravo. Převzato z Garg et al., 2021.

2.3.4.3 Použití DNA-vážících barviv

Další možností vizualizace ampliconů přímo ve zkumavce je použití DNA-vážících barviv. Tato barviva mají specifické struktury, které jim umožňují selektivně vázat dsDNA. Toto navázání a tedy formace komplexu mezi barvivem a dsDNA způsobí viditelnou barevnou změnu. Citlivost těchto barviv je pak výrazně vyšší než u pozorování precipitátu. Nevýhodou je ale vyšší cena a také zvýšené riziko kontaminace (Zhang et al., 2014). Většina interkalačních barviv inhibují LAMP reakci snížením produktivity *Bst* polymerasy. Je tedy nutné je přidávat do zkumavky až po proběhnutí reakce. Vzhledem k velkému množství ampliconů, které během LAMP vzniká, představuje otevření zkumavky riziko křížové kontaminace vzorků či kontaminace prostředí (Esmatabadi et al., 2015; Quyen et al., 2019).

Pro detekci LAMP amplikonů je možné použít několika různých barviv. Často používaným barvivem je SYBR Green I, které po navázání na dsDNA mění barvu z oranžové na zelenou. Tato barevná změna je viditelná po osvětlení zkumavky UV zářením, ale také i na přirozeném světle (obr. 9). Detekční limit se u SYBR Green I udává 1 kopie/ μ l . Možné je také použít barvivo SYBR Safe (obr. 10), u kterého nastává barevná změna z červené na žlutou (Garg et al., 2021; Zhang et al., 2014). Dalšími používanými barvivami jsou například Picogreen, GeneFinder, propidium jodid a ethidium bromid. Interkalační barviva jsou používána také pro real-time LAMP aplikace. V tomto případě je používáno barvivo SYTO-16, jelikož narušuje reakci (Biao et al., 2019; Quyen et al., 2019).



Obr. 9 Použití SYBR Green I pro vizualizaci LAMP produktů. A: zkumavky v přirozeném světle. B: UV záření. Převzato z Nie et al., 2012.



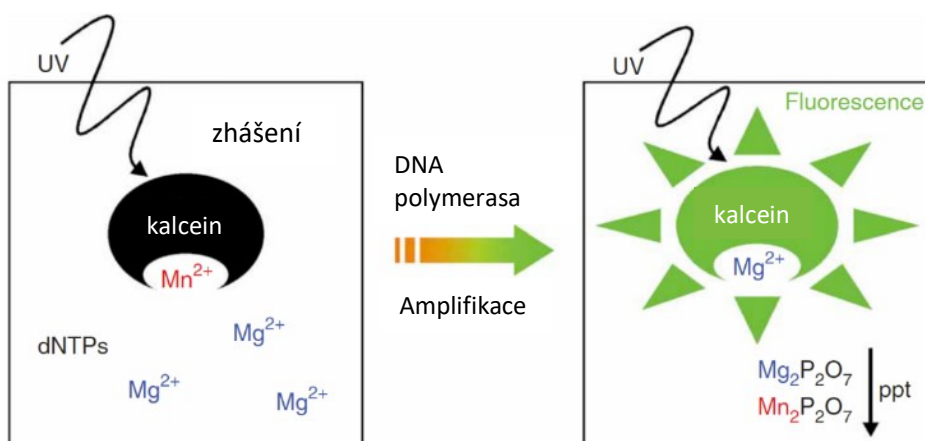
Obr. 10 Použití SYBR Safe pro vizualizaci LAMP produktů v UV transiluminátoru. C+ značí pozitivní výsledek, C- negativní. Převzato z Lannutti et al., 2020.

2.3.4.4 Použití kolorimetrických indikátorů

Pro pozorování barevné změny v případě pozitivní LAMP reakce je možné použít i kolorimetrických indikátorů. Tyto indikátory mohou být na rozdíl od interkalačních barviv přidávány přímo do reakční směsi před proběhnutím reakce. Tím pádem, podobně jako u pozorování precipitátu, není nutné otevření zkumavky po proběhnutí reakce, čímž je opět sníženo riziko kontaminace (Wastling et al., 2010).

Příkladem takového indikátoru může být kalcein. Kalcein poskytuje silnou fluorescenci tvorbou komplexů s dvojmocnými ionty kovů jako jsou vápenaté a hořečnaté kationty (obr. 11). S pomocí kalceinu je výsledek reakce určován nepřímou, jelikož se neváže na vznikající DNA. Před počátkem amplifikace tvoří komplex s manganatými kationty, které zhasí fluorescenci kalceinu a tak se reakční směs jeví jako oranžová. Jakmile dojde k amplifikaci, manganaté ionty jsou uvolněny z kalceinu, jelikož preferují vazbu se vznikajícím pyrofosfátem a dochází tak k obnovení zelené fluorescence. Navíc se na volný kalcein váží kationty hořečnaté, které zvyšují fluorescenční signál a barevná změna je pozorovatelná pouhým okem (Xie et al., 2014).

Nevýhodou použití kalceinu je, že jeho přidání spolu s chloridem manganatým do reakční směsi snižuje absolutní citlivost LAMP v porovnání s indikátory přidávanými po amplifikaci. Je možné, že kalcein a $MnCl_2$ samotné způsobují lehkou inhibici reakce, nebo také může být citlivost snížena v důsledku interakce kalceinu s dsDNA. Limit detekce je pak vyšší než u předešle zmíněných interkalačních barviv, udává se 100 kopií (Zhang et al., 2014).



Obr. 11 Princip detekce produktů LAMP reakce s použitím kalceinu. Převzato z Tomita et al., 2008.

Dalším indikátorem fungujícím na velmi podobném principu jako kalcein je hydroxynaftolová modř (HNB), která v přítomnosti hořečnatých kationtů mění barvu na fialovou. Jelikož během amplifikační reakce dochází k produkci významného množství nerozpustného magnesium pyrofosfátu, je i významně snížena koncentrace volného Mg^{2+} v roztoku, což způsobí zpětnou změnu barvy HNB na modrou. Na rozdíl od kalceinu nebyla u HNB pozorována inhibice LAMP a i limit detekce byl pozorován nižší, přesně 60 kopií (Tomita et al., 2008; Xue-jun et al., 2010).

Obecnou výhodou kolorimetrických indikátorů je tedy jejich možnost přidání do reakční směsi před počátkem amplifikace, což snižuje riziko kontaminace amplikony po otevření zkumavky jako je tomu u přidávání interkalačních barviv po proběhnutí reakce. Limity detekce jsou nižší jako u pozorování precipitátu a barevná změna je na rozdíl od precipitátu stabilní, nicméně stejně jako u ostatních metod, kdy je výsledek reakce pozorován přímo ve zkumavce, je často pro správné vyhodnocení potřeba zkušeného personálu (Wastling et al., 2010). Všechny tyto metody jsou ale na rozdíl od gelové elektroforézy poměrně rychlé a jsou tak velmi vhodné pro terénní aplikace (Esmatabadi et al., 2015).

2.3.5 Kontaminace a falešná pozitivita u LAMP a její řešení

Jak již bylo zmíněno, produkce velkého množství DNA během LAMP s sebou nese riziko křížové kontaminace vzorků aerosolizovaným produktem, a to především při použití detekčních technik vyžadujících otevření reakční zkumavky. Pro předejití tohoto problému bylo vyvinuto několik metod. Hong et al. (2012) například vyvinuli dvoukrokovou metodu, kdy ze staniolu vyrobili malý pohárek (podobně jako se skládá filtrační papír pro klasickou filtraci), pohárek vložili do zkumavky nad reakční směs a napipetovali do něj SYBR Green I. Po centrifugaci po ukončení reakce přijde barvivo do kontaktu s amplikony bez nutnosti otevření zkumavky. Jako alternativní postup pak pro zabránění kontaminace při použití SYBR green barviva, použili Karthik et al. (2014) agarové kapsle. Do zkumavky nad reakci vložili stříkačkou agarový disk, na který navrstvili barvivo a nakonec přes barvivo vložili další disk. Reakci ukončili inkubací při 95 °C, aby agar roztál a barvivo tak steklo do reakční směsi. Obdobně řešili křížovou kontaminaci i Liang et al. (2013) s použitím vosku a (Sukphattanaudomchoke et al. (2020) s použitím parafilmu.

Kromě kontaminace, může u LAMP také často docházet k nespecifickým amplifikacím, způsobeným interakcí mezi primery, především mezi FIP a BIP. Nespecifické amplifikaci je možné zamezit změnou v designu primerů či značením amplikonů modifikovanými nukleotidy, což je ale mnohdy obtížné (Warmt et al., 2022). Dalším řešením může být přidání aditiv jako je tetramethylamonium chlorid (TMAC) (Jang & Kim, 2022).

2.3.6 Inhibitory LAMP

Inhibitory LAMP mohou být přítomné buďto přímo ve vzorku, nebo mohou být zavedeny při jeho zpracování. Tyto inhibitory poté buď částečně nebo zcela inhibují reakci nebo mohou snižovat její citlivost. Například v případě klinických vzorků jsou inhibitory v krvi hemoglobin, heparin a hormony. Ve stolici pak polysacharidy, žlučové kyseliny či glykolipidy. Ve vzorcích potravy jsou to poté například tuky, glykogen, některé minerály a další (Francois et al., 2011; Schrader et al., 2012).

Pro omezení negativních vlivů inhibitorů je nutné je alespoň částečně odstranit ze vzorku. Na rozdíl od PCR ale LAMP díky vysoké toleranci vůči inhibitorům nevyžaduje pro reakci čistou DNA (Francois et al., 2011). Příprava vzorku pro LAMP je tím pádem jednodušší. Často stačí i „špinavé“ vzorky (např. stolice) pouze podrobit lýze buněk hydroxidem sodným nebo povařením vzorku (Mikita et al., 2014).

2.3.7 Využití LAMP pro detekci patogenů

LAMP je již od počátku svého vývoje jednou z nejpoužívanějších molekulárně-diagnostických metod a nyní je využívána pro detekci mnoha různých patogenů od *Escherichia coli* až po SARS-Cov-2. Za dobu své existence nabyla nesmírné popularity jako rychlá a cenově dostupná detekční metoda, a je používána pro detekci patogenů jak u lidí, tak i u zvířat, rostlin a hmyzu (Garg et al., 2022).

V případě lidských patogenů byla užitečnost a efektivita LAMP velmi dobře předvedena například u detekce tropických chorob v rozvojových zemích, které jsou často spojovány s chudobou, a tedy i limitovaným vybavením tamních laboratoří, což diagnózu těchto chorob značně ztěžuje (García-Bernalt Diego et al., 2021). LAMP byla pro tyto účely využita několika výzkumnými týmy, a to například pro rozlišení *Mycobacterium leprae* od *Mycobacterium tuberculosis*. Tyto bakterie jsou si geneticky velice blízké, ale jsou původci odlišných chorob, kdy *M. leprae* způsobuje lepru a

M. tuberculosis způsobuje tuberkulózu (Garg et al., 2021). Pro *M. tuberculosis* jsou dokonce aktivně používány diagnostické kity s UV detekcí. Například Tuberculosis test kit Loopamp™ PURE-TB-LAMP od firmy Eiken Chemical Co., Ltd. (Tokyo, Japonsko), který poskytuje výsledek za méně než 1,5 hodiny. Mezi další choroby časté v rozvojových zemích, pro které byla použita LAMP, patří např. svrab, spavá nemoc, leishmanióza, echinokokóza způsobená larvami tasemnic a další. Detekují se také viry jako je HIV, Zika, Ebola či virus hepatitidy B (Garg et al., 2022). Použití LAMP v terénu bylo například uskutečněno na Zanzibaru pro detekci asymptomatické malárie, a to za použití kitu Loopamp™ MALARIA Pan/Pf Detection Kit (Eiken Chemical Company, Japonsko), který obsahuje stripky reakčních PCR zkumavek, obsahující vakuově vysušené a teplotně stabilní reakční komponenty (Morris et al., 2015).

LAMP je ovšem používána i mimo rozvojové země. S její pomocí jsou detekovány například herpes viry, cytomegaloviry, plísněvé infekce či pneumonie způsobené různými druhy bakterií jako je *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* či *Staphylococcus aureus* (Kobayashi et al., 2014; Vergara et al., 2020). Používá se také pro nemoci způsobené kontaminovaným jídlem, a to bakteriemi jako jsou *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus* a další (Lakshmi & Kim, 2021).

V poslední době byla LAMP používána pro rychlé testování v době pandemie COVID-19. Pro SARS-Cov-2 byla vyvinuta i multiplex-LAMP, díky které bylo dosaženo opravdu velmi specifické a rychlé detekce. Multiplex LAMP totiž cílí na více genů v rámci genomu patogenu, čímž je právě zvýšena specifita a rychlost reakce. Je třeba zmínit, že na rozdíl od multiplex PCR není multiplex LAMP používána pro detekci různých patogenů, ale cílí na geny jednoho cílového patogenu (Juscamayta-López et al., 2021; Kim et al., 2019).

Co se týče zvířecích patogenů, je LAMP používána pro diagnózu slintavky a kulhavky, což jsou vysoce nakažlivá virová onemocnění sudokopytníků. Dále je pak používána pro detekci viru bovinní leukémie, diagnózu katarální horečky ovcí a skotu, klasického moru prasat a mnoha dalších onemocnění (Mansour et al., 2015). U hmyzu byla vyvinuta LAMP assay například pro detekci *Nosema bombi* u čmeláků (Kato et al., 2020) nebo *Nosema bombycis* u bource morušového (Sivaprasad et al., 2021). Ze zástupců rostlin můžeme poté zmínit využití LAMP pro detekci mnoha houbových

patogenů pšenice, které způsobují velké ztráty zemědělské produkce (Gomez-Gutierrez & Goodwin, 2022).

2.3.7.1 Detekce včelích patogenů

Nejběžněji používanou metodou pro detekci včelích patogenů je qPCR, popřípadě RT-qPCR. V posledních letech bylo ale publikováno několik studií věnovaných právě LAMP detekci patogenů, která může být v budoucnu použita v terénních podmínkách (Cameron et al., 2021).

Pro rozlišení původců nosematózy *N. ceranae* a *N. apis* navrhli Ptaszynska et al. (2014) LAMP primery cílené na 16S rRNA geny. Pro *N. ceranae* byl poté o dva roky později publikován nový LAMP test, využívající odlišných primerů, ale opět cílených na 16S rRNA (Chupia et al., 2016). V genomu *Nosema* existuje ale několik různých variant 16S rRNA genů, což zapříčiňuje nekonzistentní amplifikaci (Lannutti et al., 2020). Z tohoto důvodu Lannutti et al. (2020) navrhli LAMP primery cílené na gen kódující protein pólového vlákna (*PTP3*), který je konzervovaný a vyskytuje se pouze v jedné kopii. LAMP cílená na *PTP3* gen se ukázala jako velmi specifická a citlivá metoda. Byla díky ní správně detekována infekce v 98,6 % vzorcích, naproti tomu u PCR tomu bylo v 95,7 %. Zároveň byla pozorována 10× vyšší citlivost oproti PCR, kdy u LAMP byla stanovena na 1 pg DNA a u PCR na 10 pg DNA.

Pomocí LAMP byl detekován i hnízdní parazit včel, lesknáček úlový (*Aethina tumida*), který ničí zásoby potravy a larvy v úlu. Konkrétně byl detekován z měli, tedy odpadu na dně úlu (Ponting et al., 2021).

RT-LAMP bylo také použito pro detekci virových včelích patogenů, kdy doposud byly navrženy primery konkrétně pro virus pytlíčkovitého plodu (Jin-Long et al., 2012), korejský virus pytlíčkovitého plodu (Yoo et al., 2012) a čínský virus pytlíčkovitého plodu (Ma et al., 2011). Pro bakteriální patogeny byly publikovány primery pro *P. larvae* (Nguyen et al., 2011) a *M. plutonius* (Nguyen et al., 2012).

2.3.8 Výhody a nevýhody LAMP

Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, mezi výhody LAMP patří její jednoduchost, rychlost, robustnost a nízkonákladovost. Oproti PCR je mnohem méně citlivá vůči inhibitorům, není pro ni nutné použití termocykléru, je rychlejší, není u ní zapotřebí denaturace templátu a obecně se udává, že je citlivější. Oproti ostatním NAAT

používá pouze jeden enzym, je použitelná pro různé druhy DNA a RNA templátů, produkuje více amplikonů a umožňuje detekci pouhým okem (Oliveira et al., 2021). Co se teploty reakce týče, LAMP probíhá většinou v rozmezí teplot od 56 °C do 65 °C, přičemž některé studie udávají, že ačkoliv byla stanovena optimální teplota reakce, co se výnosu týče, pro účely detekce neměla přesná teplota na konečný výsledek LAMP vliv (Woniakowski et al., 2012). Díky tomu je LAMP vhodná pro použití v podmínkách, kde není možné zajistit zcela přesnou reakční teplotu.

Nevýhoda LAMP oproti PCR spočívá především v tom, že na rozdíl od PCR není všestranná. Je vhodná zvláště jako detekční a diagnostická metoda a nelze ji použít pro jiné molekulárně-biologické aplikace, např. klonování. Další nevýhodou je množství primerů nutných pro reakci, kdy většina NAAT používá primery 2, zatímco LAMP využívá 4 až 6 primerů. V případě multiplex LAMP pak až dvakrát tolik. Kvůli tomuto dochází u LAMP častěji k falešně pozitivním výsledkům v důsledku nespecifické amplifikace (Deng et al., 2019). Mimoto je design těchto primerů poměrně složitý a podléhá mnoha omezením. Oproti PCR je tak v rámci výběru cílové sekvence menší volnost. Pro design LAMP primerů však existují volně dostupné programy jako je PrimerExplorer a LAVA, které tento proces značně zjednodušují (Notomi et al., 2015; Torres et al., 2011).

2.4 Zpracování a uchování včelích vzorků

Vzorky včel či úlového materiálu mohou být zpracovány mnoha způsoby v závislosti na charakteru a množství vzorku. Homogenizace vzorků včel může být provedena pomocí různých typů homogenizátorů, například v kulovém mlýnku. Mohou být také použity homogenizační sáčky, popřípadě třecí miska s tloučkem. Pro následnou izolaci DNA je možné použít například fenol-chloroformovou extrakci nebo lze využít komerčních izolačních kitů, které fungují na principu vazby DNA na silikátovou membránu (Evans et al., 2013). Takto izolovanou DNA je pak nutné skladovat v mrazáku. Zjednodušení celého procesu a možnost uchování DNA při laboratorní teplotě nabízejí izolační karty, které budou popsány dále.

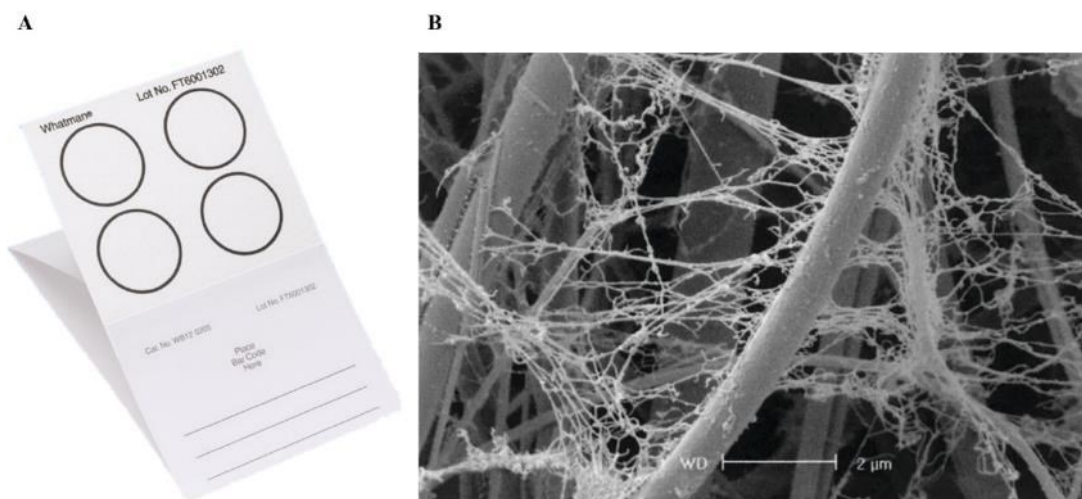
2.4.1 Whatman FTA karty

Flinders Technology Associates (FTA) karty (viz obr. 12a) jsou karty původně používané pro uchovávání krevních vzorků pro forenzní testy, pro sběr materiálu pro genotypovou analýzu mikroorganismů a rostlin, ale také pro epidemiologické studie (da Cunha Santos, 2018). Jsou vyrobené ze specializované formy filtračního papíru, obsahujícího patentovanou směs chemikálií, schopnou lyzovat buňky a denarovat proteiny. Papír zároveň váže nukleové kyseliny tak, že jsou chráněny před degradací způsobenou oxidací či UV zářením (Smith & Burgoyne, 2004; Stringer et al., 2021). Nukleové kyseliny jsou po aplikaci na FTA kartu zachyceny v matrix karty (viz obr. 12b). Karty mohou být skladovány při laboratorní teplotě a nukleové kyseliny na nich zachycené jsou stabilní až po dobu 16 let (Rahikainen et al., 2016). V případě izolace RNA jsou někdy karty skladovány zmražené (da Cunha Santos, 2018).

Komerčně dostupné FTA karty se liší v barvě filtračního papíru, velikosti a v přítomných chemikáliích, které poté ovlivňují postup extrakce nukleových kyselin. Pro bezbarvé vzorky je vhodné používat barevné FTA karty, kdy se po nanesení vzorku na kartu mění barva z růžové na bílou v místě aplikace. Jelikož jsou karty velmi lehké a malé, nezabírají velké množství prostoru a jsou tedy velmi vhodné pro zasílání poštou (da Cunha Santos, 2018; Dobbs et al., 2002).

Nukleové kyseliny mohou být pro použití k PCR buďto ponechány navázané na FTA kartě, nebo eluovány. V prvním případě je z FTA karty vyříznuta malá část požadované velikosti, která je v PCR zkumavce promyta FTA promývacím pufrem a následně TE pufrem. Na takto promytou část FTA karty jsou poté přímo přidány reagenty pro PCR

(Cardona-Ospina et al., 2019). V případě, že je potřeba nukleové kyseliny z karty eluovat, je možné použít DNA-izolační protokoly využívající například pryskyřici Chelex[®]100 (Ahmed et al., 2011). FTA karty lze použít i v kombinaci s LAMP. Například Yan et al. (2014) tuto kombinaci použili pro detekci *Nosema bombycis*, patogenu bource morušového.



Obr. 12 A) FTA karta. B) Elektronový mikrograf DNA zachycené v matrixu FTA karty, zvětšení 10000x. Převzato z (Merck, https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/whawb120205?lang=en®ion=US&gclid=CjwKCAjw0ZiiBhBKEiwA4PT9zh0HB99EI166uwfE60V_dZ6x9uEguIPjY_bBtiM3719S1Cbmt-8DBoCoPQQA vD_BwE&gclid=aw.ds, 23. 11. 2022).

Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Agarosa (SERVA, Německo)

Ethylendiamintetraoctová kyselina (Fluka, Česká republika)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, Německo)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, Německo)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.1 Biologický materiál

V rámci experimentální části práce bylo pracováno se vzorky včel poskytnutými včelaři, zapojenými do projektu COLOSS. Použity byly vzorky včel z různých částí České republiky, odebraných ze stejných včelstev na podzim roku 2020 a na jaře roku 2021. Tyto včely byly zmrazeny a uchovány při -20 °C. Pro optimalizaci metod byly použity noseatické vzorky včel po uhynulých včelstvech.

3.1.2 Přístroje a vybavení

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Děrovací kleště (průměr 1,6 mm)

Digitální pH metr (InoLab, Německo)

DNA/RNA UV-dekontaminační box UVC/T-M-AR (Biosan, Lotyšsko)

Elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)

Gel Doc EZ systém (BioRad, Německo)

Homogenizační sáčky (Bioreba, Švýcarsko)

Homogenizátor MiniMix[®]CC (Interscience, Francie)

Chlazená centrifuga 5424 R (Eppendorf, Německo)

Mikroskop Olympus BX50 (Olympus, Japonsko)

Předvážky (KERN, Německo)

SmartView Simple Imager System, MUV-IMG-CA (Major Science, Taiwan)

Termocyklér Biometra Tone (Analytik Jena, Německo)

Transiluminátor DR46 (Clare Chemical Research, USA)

Vortex V-1plus (Biosan, Lotyšsko)

CH-100 Heating/Cooling Dry Block (Biosan, Lotyšsko)

Zdroj pro elektroforézu PowerPac™ Basic Power Supply (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Použité roztoky

1× TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (40 mmol·l⁻¹ Tris-Cl; 20 mmol·l⁻¹ kyselina octová; 0,4 mmol·l⁻¹ EDTA)

TENT pufr (10 mmol·l⁻¹ Tris-Cl; 1 mmol·l⁻¹ EDTA; 12 mmol·l⁻¹ NaCl; 2,5% Triton X-100; pH 8)

TE pufr (10 mmol·l⁻¹ Tris-Cl; 0,1 mmol·l⁻¹ EDTA; pH 8)

3.1.4 Použité kity

DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nizozemsko)

Monarch[®] PCR a DNA Cleanup Kit (New England Biolabs, UK)

3.1.5 Reagencie pro molekulární biologii

10 mM Ultrapure dNTPs mix (EURx, Polsko)

Bst 2.0 DNA Polymerase (New England Biolabs) – balení obsahuje také

100 mmol·l⁻¹ MgSO₄ a izotermální amplifikační pufr (IA, 10x)

Bst 2.0 Warmstart DNA Polymerase (New England Biolabs, UK)

MIDORI Green Advance (Elisabeth Pharmacon, Česká republika)

Gel Loading Dye, Purple 6× (New England Biolabs, UK)

GeneRuler 50 bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

Generuler 100 bp DNA ladder (Thermo Scientific, USA)

GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, USA)

Nuclease-free voda (Promega, USA)

Primery pro PCR a LAMP (Elisabeth Pharmacon, Česká republika)

SYBR[™] safe (ThermoFisher Scientific, Česká republika)

Whatman[®] FTA[®] Cards (Sigma-Aldrich, USA)

3.2 Metody

3.2.1 Příprava vzorků včel

Pro homogenizaci vzorků včel byly použity homogenizační sáčky Bioreba, které byly rozděleny na dvě poloviny (zalamínovány). Z každého vyšetřovaného včelstva bylo odebráno vždy 20 včel, které byly vloženy do homogenizačního sáčku. Následně byly k těmto včelám přidány 3 ml sterilní deionizované vody. Sáček byl uzavřen zatavením. Včely byly nejprve krátce roztlučeny tloučkem a následně byl sáček vložen do homogenizačního přístroje Minimix[®]CC na 1 min při rychlosti 4. Poté byly včely znovu roztlučeny tloučkem a opět vloženy do homogenizátoru. Po rozstřížení sáčku bylo z každého vzorku odebráno vždy 90 µl pro izolaci DNA a 20 µl bylo kápnuto na FTA kartu. Zbylý homogenát (cca 1,5 ml) byl zamražen pro budoucí mikroskopickou analýzu.

3.2.2 Izolace DNA pomocí DNeasy Plant Mini kit

Pro izolaci DNA pomocí DNeasy Plant Mini kitu by mělo být použito maximálně 100 mg vzorku v případě nevysušeného materiálu a 20 mg v případě materiálu suchého. Pro izolaci DNA bylo tedy použito vždy 90 µl homogenátu včel. Izolace probíhala následovně dle mírně upraveného protokolu výrobce:

1. Do koncentrovaných pufrů AW1 a AW2 byl přidán ethanol podle instrukcí na zásobní láhvi.
2. Ke včelímu homogenátu bylo přidáno 400 µl pufru AP1. RNasa A nebyla přidána kvůli možné kontaminaci laboratoře. Vzorek byl zvortexován a inkubován 10 min při 65 °C, přičemž mikrozkušavka byla během inkubace 2-3× obrácena. V tomto kroku probíhá lýze buněk.
3. Bylo přidáno 130 µl pufru P3, lyzát byl promíchán a inkubován na ledu po dobu 5 min.
4. Lyzát byl centrifugován 5 min při 20 000 g.
5. Supernatant byl odpipetován do QIAshredder spin kolonky vložené do 2 ml sběrné zkumavky a následně centrifugován 2 min při 20 000 g.
6. Přečištěný lyzát byl přemístěn do nové mikrozkušavky, bylo k němu přidáno 1,5 objemu pufru AW1 a promíchán byl okamžitě pipetováním.

7. 650 μl směsi bylo napipetováno na DNeasy Mini spin kolonku ve 2 ml sběrné zkumavce. Následně byl vzorek centrifugován 1 min při 6000 g. Průtoková frakce byla vylita do odpadu a krok byl opakován se zbytkem vzorku.
8. Kolonka byla přemístěna do nové 2ml sběrné zkumavky. Bylo přidáno 500 μl pufru AW2 a vzorek byl centrifugován 1 min při 6000 g. Průtoková frakce byla odstraněna.
9. Bylo přidáno dalších 500 μl pufru AW2 a vzorek byl centrifugován 2 min při 20 000 g. Centrifugace byla zopakována ještě jednou s tím, že zkumavka byla v centrifuze otočena o 90 stupňů (pro lepší vysušení kolonky).
10. Kolonka byla přemístěna do 1,5 ml mikrozkušavky.
11. Bylo přidáno 100 μl elučního pufru AE. Vzorek byl inkubován 5 min při laboratorní teplotě a následně centrifugován 1 min při 6000 g. Tento krok byl zopakován.

Izolovaná DNA byla následně proměřena na spektrofotometrickém readeru pro stanovení koncentrace. Jako blank byl použit pufr AE. Koncentrace izolované DNA se pohybovaly průměrně kolem $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$. Vzorky DNA byly poté použity jako templáty pro PCR.

3.2.3 Izolace DNA s pomocí Whatman® FTA® karet

Po kápnutí homogenátu na FTA kartu byla karta vysušena při laboratorní teplotě. Po vysušení byl z FTA karty skalpelem vyříznut čtverec o hraně 1 mm. Čtverec byl vložen do PCR zkumavky a promyt $3 \times 100 \mu\text{l}$ TENT pufru a $2 \times 100 \mu\text{l}$ TE pufru, dle (Thompson & Hrabak, 2018). Následně byl vzorek vysušen při laboratorní teplotě v digestoři po dobu 90 minut nebo v termobloku při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 20 minut. Vysušený promytý vzorek byl použit jako templát pro PCR.

3.2.4 Polymerázová řetězová reakce

Ve vzorcích včel bylo detekováno celkem 5 různých patogenů. Použité primery pro PCR jsou uvedeny v tabulce 1, komponenty reakce jsou uvedeny v tabulce 2, parametry průběhu reakce poté v tabulce 3. Detekce patogenů byla provedena na 50 vzorcích včelstev z podzimu roku 2020 a na 35 vzorcích včelstev z jara roku 2021. Detekce byla provedena jak s DNA izolovanou komerčním kitem, tak s DNA uchovanou na FTA kartách pro porovnání metod.

Tab. 1 Sekvence oligonukleotidů používaných pro identifikaci vybraných včelích patogenů.

| gen/ patogen | Název primeru | Zdroj | Primer 5'→3' | | Velikost amplikonu (bp) |
|----------------------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|--|-------------------------------|
| | | | Forward | Reverse | |
| <i>EF-1 alpha</i> | | (Lourenço et al., 2008) | GGAGATGCT GCCATCGTTA T | CAGCAGCGTCTT TGAAAGTT | 153 |
| <i>S. marcescens</i> | | (Bussalleu a Althouse, 2018) | GGTGAGCTTA ATACGTTTCAT CAA | AATTCCGATTAA CGCTTGCAC | 107 |
| <i>N. apis</i> | 321APIS | (Martín-Hernández et al., 2007) | GGGGGCATG TCTTTGACGT ACTATGTA | GGGGGGCGTTTA AAATGTGAAAC AACTATG | 321 |
| <i>N. ceranae</i> | 218MITOC | (Martín-Hernández et al., 2007) | CGGCGACGA TGTGATATGA AAATATTAA | CCCGGTCATTCT CAAACAAAAAA CCG | 218–219 |
| <i>N. apis</i> | NosaRNAPol | (Gisder & Genersch, 2013) | AGCAAGAGA CGTTTCTGGT ACCTCA | CCTTCACGACCA CCCATGGCA | 297 |
| <i>N. ceranae</i> | NoscRNAPol (duplex PCR) | | TGGGTTCCCT AAACCTGGTG GTTT | TCACATGACCTG GTGCTCCTTCT | 662 |
| <i>C. melliferae</i> | CmCytb | (Stevanovic et al., 2016) | AGTTTGAGCT GTTGGATTTG TT | AACCTATTACAG GCACAGTTGC | 140 |
| <i>L. passim</i> | LpCytb | (Stevanovic et al., 2016) | CGAAGTGCA CATATATGCT TTAC | GCCAAACACCA ATAACTGGTACT | 247 |

Tab. 2 Složení reakční směsi pro end-point PCR.

| Reagencie | objem [μl] na 1 reakci |
|----------------------------------|------------------------|
| 10 μmol·l ⁻¹ primer F | 0,5 |
| 10 μmol·l ⁻¹ primer R | 0,5 |
| PCR voda | 4,75 |
| GoTaq Polymerase premix | 6,25 |
| Celkový objem | 12,5 |
| + gDNA | 0,5 |

Tab. 3 Parametry průběhu PCR.

| Krok | Čas | Teplota | Počet cyklů |
|--------------------|-------|---------|-------------|
| Prvotní denaturace | 2 min | 95 °C | 1 |
| Denaturace | 40 s | 95 °C | |
| Hybridizace | 30 s | 60 °C | 34 |
| Elongace | 1 min | 72 °C | |
| Finální elongace | 5 min | 72 °C | 1 |
| Ochlazení | ∞ | 4 °C | 1 |

3.2.5 Elektroforéza na agarosovém gelu

Pro vyhodnocení PCR byl připraven 2,5% agarosový gel tak, že 1,25 g agarosy bylo rozpuštěno v 50 ml 1× TAE pufru a rozvařeno v mikrovlnné troubě. Po ochlazení na cca 60 °C byly přidány 2 µl Midori Green a promíchány. Takto připravený agarosový gel byl nalit do elektroforetické formy na přípravu gelu. Po odstranění bublin byl do gelu vložen hřeben a gel byl ponechán ztuhnout. Po ztuhnutí byl hřeben a postranní gumičky odstraněny a gel byl i s formou vložen do elektroforetické vany tak, aby loadovací jamky byly u záporně nabitě katody. Elektroforetická vana byla naplněna 1× TAE pufrem. Do loadovacích jamek bylo napipetováno vždy 10 µl vzorku, markeru pak 3 µl. V případě nanášení produktů PCR, u kterých byla použita GoTaq DNA polymerasa, byly tyto vzorky nanášeny přímo. V případě produktů LAMP reakce bylo 8 µl produktů smícháno s 2 µl 6× Purple Loading Dye před nanesením na gel. Elektroforetická vana byla připojena ke zdroji a nastavena na napětí 80 V a čas 60 min. Po proběhnutí elektroforézy byl zdroj odpojen, gel byl vyjmut a položen na podložku UV Tray, vložen do přístroje Gel DocTM EZ Imager a vyfocen pomocí programu Image Lab.

3.2.6 Příprava vzorků DNA pro sekvenaci

V případě, že byl nalezen vzorek pozitivní na jeden z detekovaných patogenů, byl daný vzorek použit znovu jako templát pro PCR, nicméně ve větším objemu (70 µl). Po proběhnutí reakce byla reakční směs přečištěna s použitím Monarch[®] PCR a DNA Cleanup Kit. Postup přečištění byl následovný (všechny centrifugační kroky probíhaly při laboratorní teplotě při 16 000 g):

1. K 60 µl PCR produktů bylo přidáno 300 µl pufru DNA Cleanup Binding Buffer a směs byla promíchána pipetováním.

2. Vzorek byl napipetován na kolonku umístěnou ve sběrné mikrozkušavce a centrifugován 1 min. Průtoková frakce byla vylita do odpadu.
3. Na kolonku bylo napipetováno 200 μl promývacího pufru. Po 2 min inkubace byl vzorek centrifugován 1 min. Průtoková frakce byla vylita do odpadu.
4. Byl zopakován promývací krok 3.
5. Vzorek byl centrifugován 2 min s otevřeným víčkem.
6. Kolonka byla umístěna do nové čisté sběrné zkumavky a znovu centrifugována s otevřeným víčkem 2 min.
7. Vzorek byl pak následně ponechán inkubovat 2 min s otevřeným víčkem při laboratorní teplotě.
8. Na střed matrix kolonky bylo napipetováno 15 μl RNase-free vody. Po inkubaci 1 min byl vzorek centrifugován 1 min pro eluci DNA.
9. Průtoková frakce byla odebrána a znovu napipetována na kolonku. Krok 8 byl zopakován.

Následně byla změřena koncentrace purifikované DNA. DNA byla poté přidána k 2,5 μl 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ primeru tak, aby po doplnění PCR vodou na objem 10 μl bylo ve směsi 50 ng DNA. Takto připravená směs byla poté odeslána do firmy SEQme s.r.o. pro provedení Sangerova sekvenování StandardSeq. Výsledky sekvenování byly otevřeny v programu FinchTV, sekvence nukleotidů byla poté vložena do webového programu BLAST

(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_SPEC=GeoBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch) za účelem zjištění shody sekvence s hledaným patogenem.

3.2.7 Mikroskopie spor *Nosema spp.*

N. ceranae a *N. apis* jsou jedinými z patogenů, detekovaných v této práci, jejichž detekce je možná provést pomocí světelného mikroskopu. Odlišení těchto druhů od sebe není velmi spolehlivé. Pro účely práce byla ale mikroskopie spor *Nosema spp.* použita jako pozitivní kontrola pro porovnání s PCR, tedy pro identifikaci případně falešně negativních výsledků.

Pro pozorování spor *Nosema spp.* byl připraven nefixovaný preparát ze včelího homogenátu a to tak, že 10 μl homogenátu bylo kápnuto na podložní sklíčko a

přeloženo sklíčkem krycím. Preparát byl poté vložen pod světelný mikroskop a spory byly pozorovány při zvětšení 400×.

3.2.8 LAMP

Postup pro detekci patogenů technikou LAMP byl přejat z Lannutti et al. (2020) s tím rozdílem, že místo genomické DNA *N. ceranae* byl jako DNA templát použit vzorek včelího homogenátu uchovaný na FTA kartě, který byl dle mikroskopie a PCR vyhodnocen jako pozitivní na *N. ceranae*. Vzorek z FTA karty byl zpracován stejným způsobem jako pro PCR. Primery použité pro reakci jsou uvedeny v tabulce 4, koncentrace jednotlivých reagensů v reakční směsi v tabulce 5. Reakce probíhala v termocykléru 30 min při 62 °C a ukončena byla inkubací 5 min při 80 °C. Pro detekci byl po ukončení reakce přidán 1 µl barviva SYBR safe. Výsledky byly vizualizovány pomocí transiluminátoru, popřípadě byly amplikony podrobeny agarosové elektroforóze. Pro optimalizaci metody byly vyzkoušeny různé koncentrace Mg²⁺ a primerů, různé finální objemy reakce a různá koncentrace SYBR safe pro detekci.

Tab. 4 Sekvence primerů cílených na gen *PTP3*, používaných pro LAMP detekci *N. ceranae* dle Lannutti et al. (2020).

| Primer | Sekvence (5'→3') |
|-------------|---|
| F3-NC PTP3 | GAGAGGTA CTCTCAAAGAACA |
| B3-NC PTP3 | CTCCACTGTTAAGTGATCTCAT |
| FIP-NC PTP3 | GATTGCGCTGCTTTAATTCCTGTGGCTACAGAAGAAAGACTTG |
| BIP-NC PTP3 | GGAGGAACAATAGAAGAAGCAAGATGCGCTTCTCTACTCTCA |
| LF-NC PTP3 | CCTCACTAATCTTCCTGGCTCTA |
| LB-NC PTP3 | CAGCTAAGGCGGCAGCTGAAA |

Tab. 5 Složení reakční směsi pro LAMP dle (Lannutti et al., 2020).

| Reagencie | Koncentrace zásobního roztoku | Koncentrace v reakční směsi | Objem [μl] na 10 μl reakční směsi |
|---|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| IA pufr (obsahuje 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgSO_4) | 10x | 1x | 1 |
| MgSO_4 | 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,8 |
| dNTPs mix | 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 1,4 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 1,4 |
| primer BIP/FIP | 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 1,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 1,6 |
| primer F3/B3 | 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,2 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,2 |
| primer LF/LB* | 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,4 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 0,4 |
| <i>Bst</i> polymerasa | 8000 U | 3,2 U | 0,4 |
| H_2O | - | - | 1 |
| DNA templát | variabilní | > 10 kopií † | 1 |

*Je možné předpřipravit primer mix ze všech primerů na určité množství reakcí.

† Udávané výrobcem polymerasy.

3.2.9 Statistické vyhodnocení dat

Veškeré statistické vyhodnocení dat bylo provedeno v programu Microsoft Excel a s pomocí webových nástrojů uvedených dále. Byly porovnávány výsledky z detekce pěti vybraných patogenů získané z PCR s použitím FTA karet a DNA izolované kitem Qiagen. Pro stanovení míry shody výsledků bylo pro každý detekovaný patogen vypočteno Cohenovo kappa (κ), které v tomto případě posuzuje shodu dvou metod, tedy FTA a Qiagen, které rozdělují testované vzorky do dvou skupin – nakažené a nenakažené. Pro výpočet κ byla použita online kalkulačka dostupná na webu Idostatistics (<https://idostatistics.com/cohen-kappa-free-calculator/#resultati>). Interpretace hodnoty κ byla následovná: 0,01-0,20 značí nepatrnou shodu; 0,21-0,40 ucházející shodu; 0,41-0,60 mírnou shodu; 0,61-0,80 značnou shodu a 0,81-1,00 téměř dokonalou shodu. Pokud je $\kappa=0$ pak pravděpodobnost shody je stejná jako pravděpodobnost náhodné shody. Pokud nabývá κ záporných hodnot, pak je pravděpodobnost shody nižší než pravděpodobnost náhodné shody. Detekce patogenů byla provedena na vzorcích včel odebraných ze včelstev na podzim roku 2020 a na jaře roku 2021. Pro výpočet κ při porovnávání metod byly použity výsledky detekce ze všech testovaných vzorků, tedy z 50 podzimních a 35 jarních.

Jelikož *Nosema spp.* lze detekovat i mikroskopicky, byly výsledky takové detekce brány jako kontroly. Výsledky z mikroskopie byly tedy porovnány s výsledky z PCR s použitím FTA karet či kitu Qiagen pro zhodnocení správnosti detekce. K porovnání byl opět použit výpočet κ .

Jako poslední byl výpočet κ použit pro vyhodnocení, zda se daný patogen vyskytoval ve stejném včelstvu jak na podzim, tak i na jaře. Pro srovnání rizika výskytu detekovaných patogenů (náchylnosti včelstev k nákaze) v daných ročních obdobích byl poté vypočten poměr šancí („odds ratio“; OR) pro každý z patogenů. V případě, že $OR=1$, pak neexistuje souvislost mezi výskytem nákazy a ročním obdobím. $OR<1$ značí snížený výskyt nákazy a $OR>1$ značí zvýšený výskyt nákazy. OR byly vypočteny s pomocí online kalkulačky dostupné na webu Social Science Statistics (<https://www.socscistatistics.com/biostatistics/default2.aspx>). Při porovnávání jarních a podzimních vzorků byly vždy použity výsledky detekce pouze ze včelstev, u kterých byly k dispozici vzorky jak z podzimních, tak z jarních odběrů (35 včelstev).

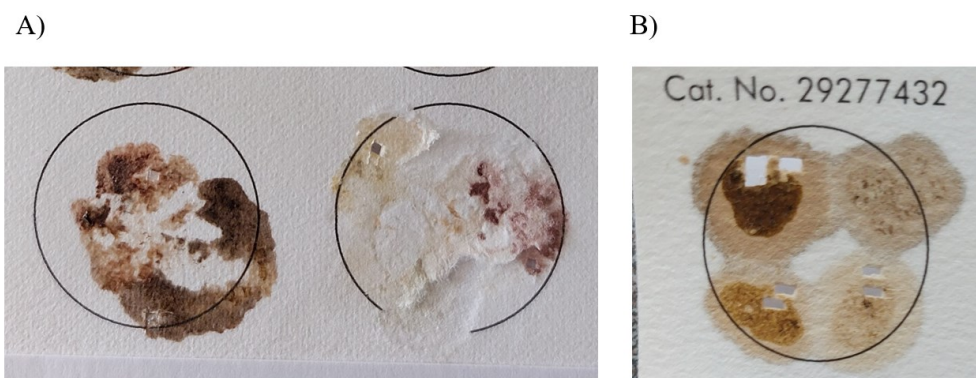
4 Výsledky

4.1 Optimalizace FTA karet

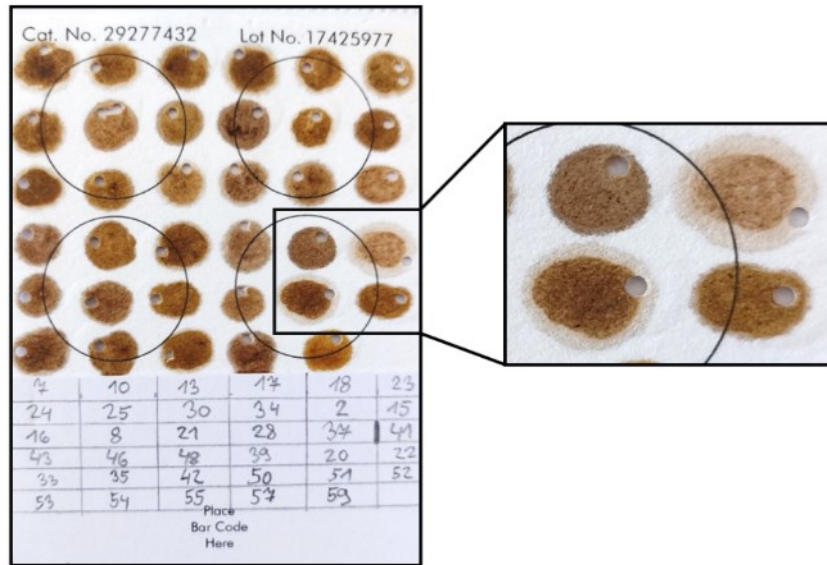
4.1.1 Uchování homogenátů včel na FTA kartách

Pro použití s rostlinným materiálem se FTA karty používají tak, že list rostliny je obtisknut na kartu (Thompson & Hrabak, 2018). Tento způsob byl vyzkoušen i se vzorky včel, kdy včely byly přimáčknuty k povrchu karty. Tento způsob ale narušoval povrch karty, zabíral příliš velké místo na kartě a nebylo možné získat homogenní vzorek (obr.13A). Proto byly využity homogenizační sáčky a homogenát byl aplikován na kartu v objemu 20 μ l. Bylo ale pozorováno nerovnoměrné rozprostření a prosakování jednotlivých vzorků do sebe (obr. 13B).

Na FTA kartách jsou předem natištěné 4 kružnice, které značí místa nanášení vzorků. Pro vazbu DNA je ale použitelná celá plocha karty. Kvůli velkému množství testovaných vzorků byly karty pomyslně rozděleny do šesti řádků a sloupců. Vzorky včelích homogenátů byly nanášeny na karty tak, aby se na jednu FTA kartu vešlo 36 vzorků (viz obr. 14). Zároveň byl upraven způsob aplikace homogenátů následovně: Pomocí 1000 μ l pipety bylo nabráno 100 μ l homogenátu. Ze špičky byla vytlačena malá kapka, která byla přiložena na FTA kartu (pipeta byla stále držena v 1. poloze) a pomalu rovnoměrně rozprostřena tak, aby vytvořila kruh o průměru cca 0,5 cm. Zbylý homogenát byl vtažen zpět do špičky. Tímto způsobem byla karta nasycena homogenátem pouze na požadované ploše. Bylo tak zabráněno migraci vzorku do oblasti jiného vzorku, prosáknutí skrz kartu k jejímu papírovému obalu či nahromadění hustého homogenátu na povrchu karty.



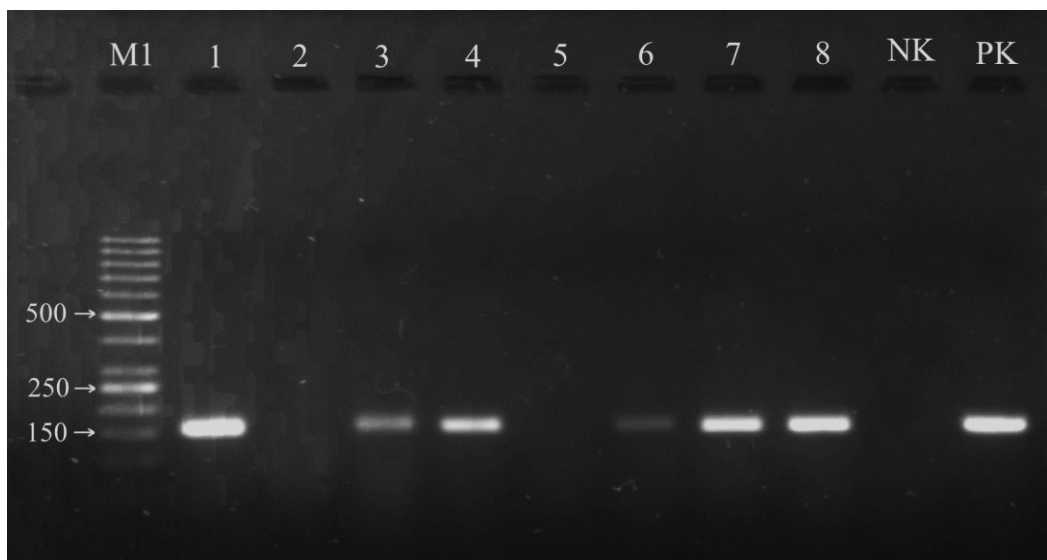
Obr. 13 Prvotní zkouška nanášení vzorků včel na FTA kartu. A) Obtisknuté celé včely. B) Aplikované homogenáty včel.



Obr. 14 Finální optimalizované nanesení vzorků na FTA kartě.

4.1.2 Zpracování vzorků z FTA karet

Pro optimalizaci PCR z FTA karet bylo použito 8 vzorků včel, přičemž sledovaný gen byl housekeeping gen *EF-1 alpha*. Jak je vidět na obr. 15, výsledky PCR byly poněkud nekonzistentní. Všechny testované vzorky měly být pozitivní, nicméně u některých vzorků došlo k falešné negativitě.

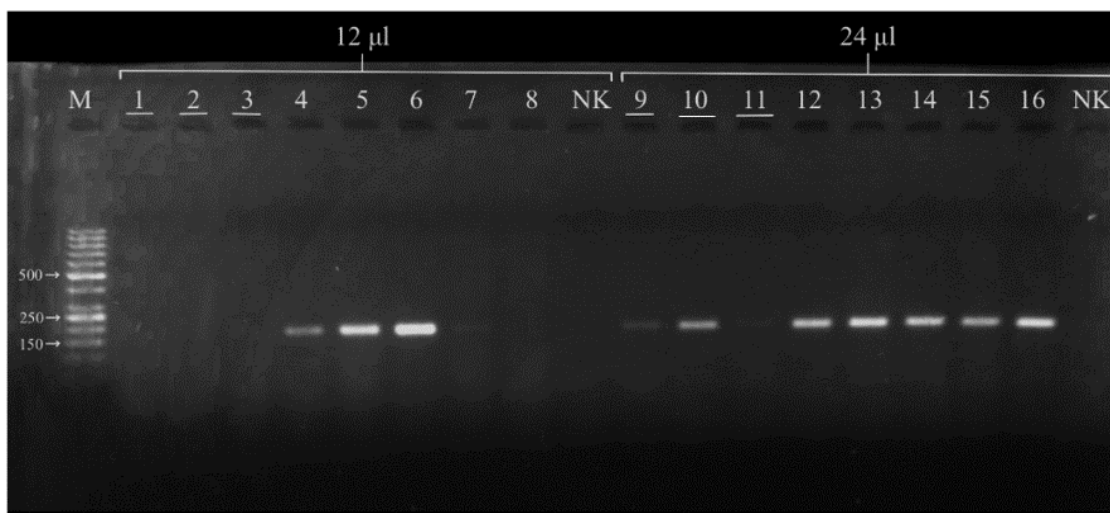


Obr. 15 Výsledky PCR z FTA karet cílené na gen *EF1-alpha* (153 bp). M1: marker GeneRuler 50 bp; 1-8: vzorky včel; NK: negativní kontrola; PK: pozitivní kontrola (izolovaná včelí gDNA).

Jako možné problémy PCR z FTA karet byly určeny příliš velká velikost vzorku, nedostatečné promytí vzorku (po promytí musí být vzorek čistě bílý jako původní karta) a nedostatečný objem PCR reakční směsi (na vystřiženém čtverci je příliš mnoho DNA). Místo čtverce vyříznutého skalpelem bylo z FTA karet vystřiženo kolečko děrovacími kleštěmi o průměru 1,6 mm (obr. 16). Kolečko bylo následně skalpelem rozříznuto na čtvrtiny. Byly tedy získány vždy 4 vyříznuté vzorky karet, jejichž plocha byla menší než 1 mm. V případě, že byl vzorek homogenátu aplikovaného na kartu příliš hustý a po zaschnutí se na povrchu karty vytvořila krusta, byla tato krusta po vystřižení vzorku jemně seškrábnuta skalpelem, což značně zrychluje následný proces promývání. Pro dokonalé promytí vzorku byl postup promývání upraven a to tak, že vzorek v PCR zkumavce byl nejprve inkubován 5 min ve 100 μ l TENT pufru a následně krátce protřepán v ruce. Vzorek byl poté promyt ještě $2 \times 100 \mu$ l TENT pufru a $2 \times 100 \mu$ l TE pufru. Kvůli možnosti příliš velkého množství DNA ve vzorku na používaný objem reakce, byla pro porovnání vyzkoušena reakce dvojnásobná se stejnými vzorky. Výsledný elektroferogram je zobrazen na obr. 17. Je vidět, že při zvýšeném objemu reakce a dokonalém promytí karty, probíhala amplifikace konzistentně ve všech vzorcích.



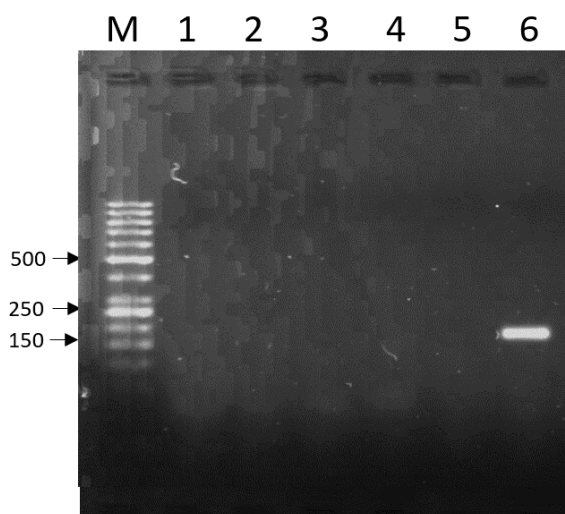
Obr. 16 Děrovací kleště používané pro vyřezávání vzorků z FTA karet.



Obr. 17 Zkouška různých postupů zpracování FTA karet pro PCR. M: marker Generuler 50 bp; 1-8: vzorky použité pro PCR o objemu 12 µl; 9-16 stejné vzorky použité pro PCR o objemu 24 µl; NK: negativní kontrola. Podtržené vzorky byly záměrně ponechány lehce zabarvené (nedokonale promyté).

4.1.3 Vzájemná kontaminace vzorků při vyřezávání FTA karet

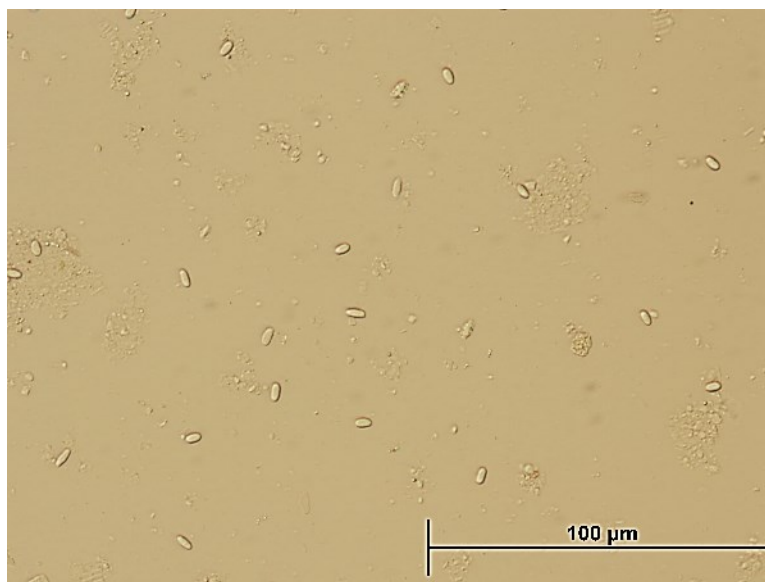
Pro stanovení, zda při vyřezávání vzorků z karty pomocí děrovacích kleští nedochází ke vzájemné kontaminaci vzorků, bylo vyříznuto 5 kontrol z čistých částí karty. Tyto kontroly byly vyřezávány tak, že po vyříznutí vzorku homogenátu byla stejnými kleštěmi ihned vyřezána čistá část karty. Tento postup byl opakován s dalšími čtyřmi vzorky. Všech pět kontrol bylo čistých (viz obr. 18), při vyřezávání karet tedy nedochází ke vzájemné kontaminaci vzorků.



Obr. 18 Zkouška cross-kontaminace FTA karet při vyřezávání vzorků. M: marker GeneRuler 50 bp; 1-5: vyřezané čisté části karty; 6: část karty se vzorkem homogenátu (pozitivní kontrola).

4.2 Mikroskopická detekce *Nosema spp.*

Všechny vzorky homogenátů včel z projektu COLOSS byly mikroskopovány pro určení přítomnosti spor *Nosema spp.* Na obrázku 19 je vidět mikroskopický snímek vybraného pozitivního vzorku. Výsledky z mikroskopie všech vyšetřovaných včelstev jsou uvedeny dále v tab. 6 a 7 spolu s výsledky z PCR.

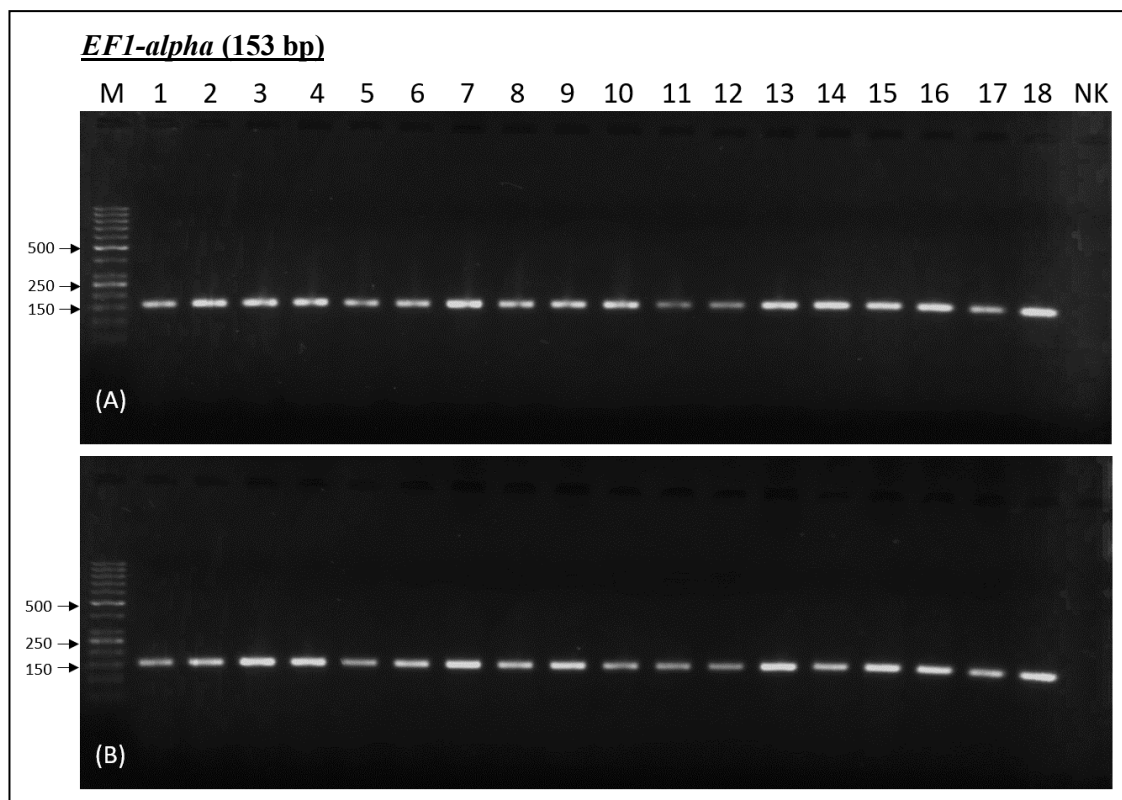


Obr. 19 Ukázka vzorku pozitivního na *Nosema spp.*

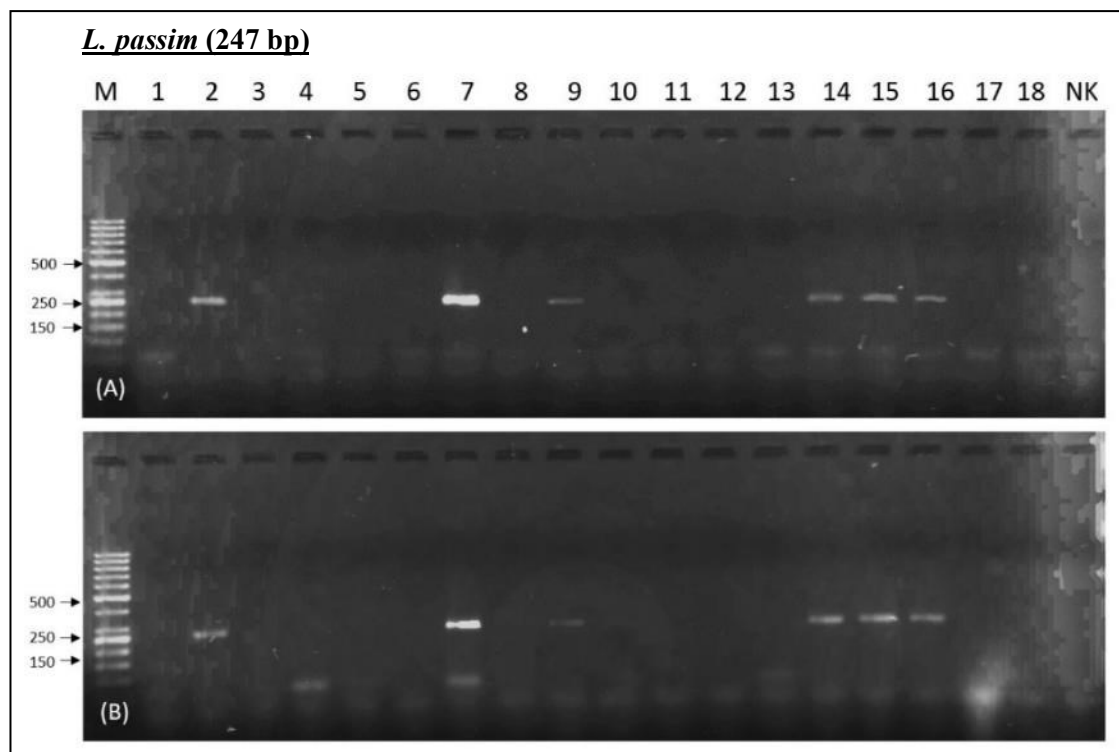
4.3 Výsledky end-point PCR z FTA karet a izolované DNA

4.3.1 Porovnání výsledných elektroferogramů

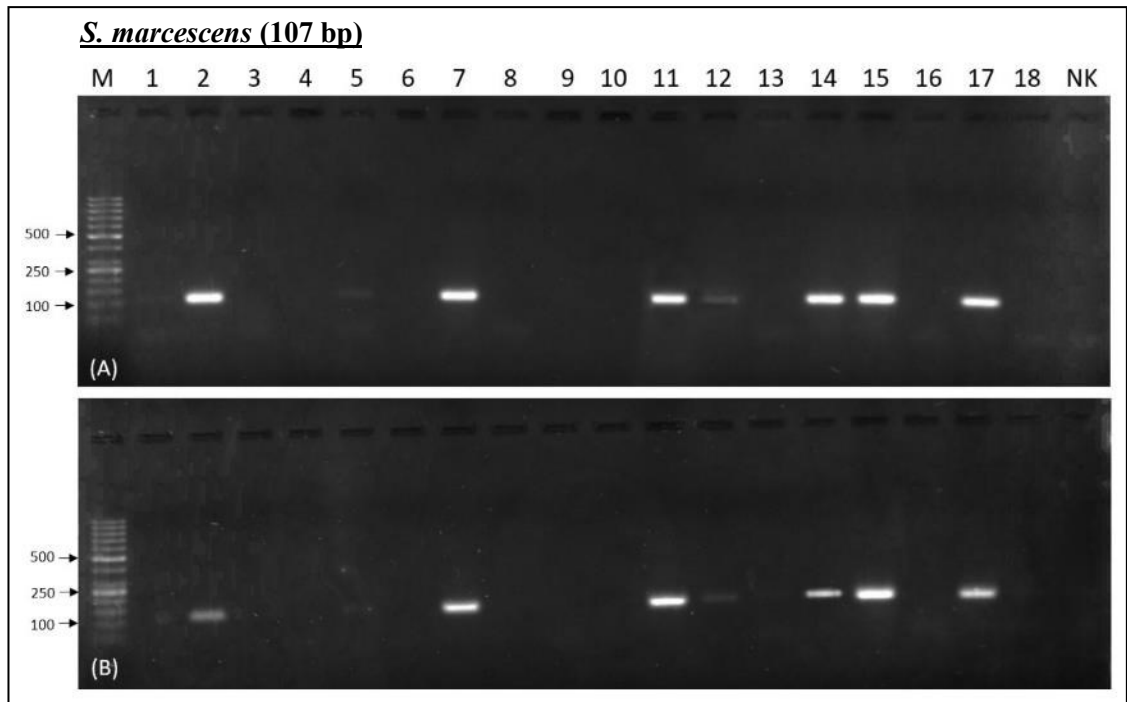
End-point PCR bylo provedeno se všemi podzimními a jarními vzorky včel, a to jak z izolované DNA kitem Qiagen, tak z DNA na FTA kartách. Na obrázcích 20-24 jsou vidět porovnání elektroferogramů produktů PCR z kitu Qiagen a FTA karet osmnácti vybraných podzimních či jarních vzorků včel, vyšetřovaných na vybrané patogeny. V případě PCR cílené na *EFl-alpha*, *L. passim* a *S. marcescens* se výsledky z kitu Qiagen a FTA karet shodovaly a byly pozorovány pouze mírné rozdíly v intenzitě bandů (např. vzorek 2 na obr. 21). *C. mellificae* nebyla detekována v žádném včelstvu. U *N. ceranae* byly pozorovány výrazné rozdíly, kdy u kitu Qiagen byly na elektroferogramu vidět pouze velmi slabé (viz podzimní vzorek 14 na obr. 24) či žádné bandy u vzorků, které na FTA kartách vycházely jako pozitivní. *N. apis* byla detekována pouze v jednom jarním včelstvu, a to pouze na FTA kartách.



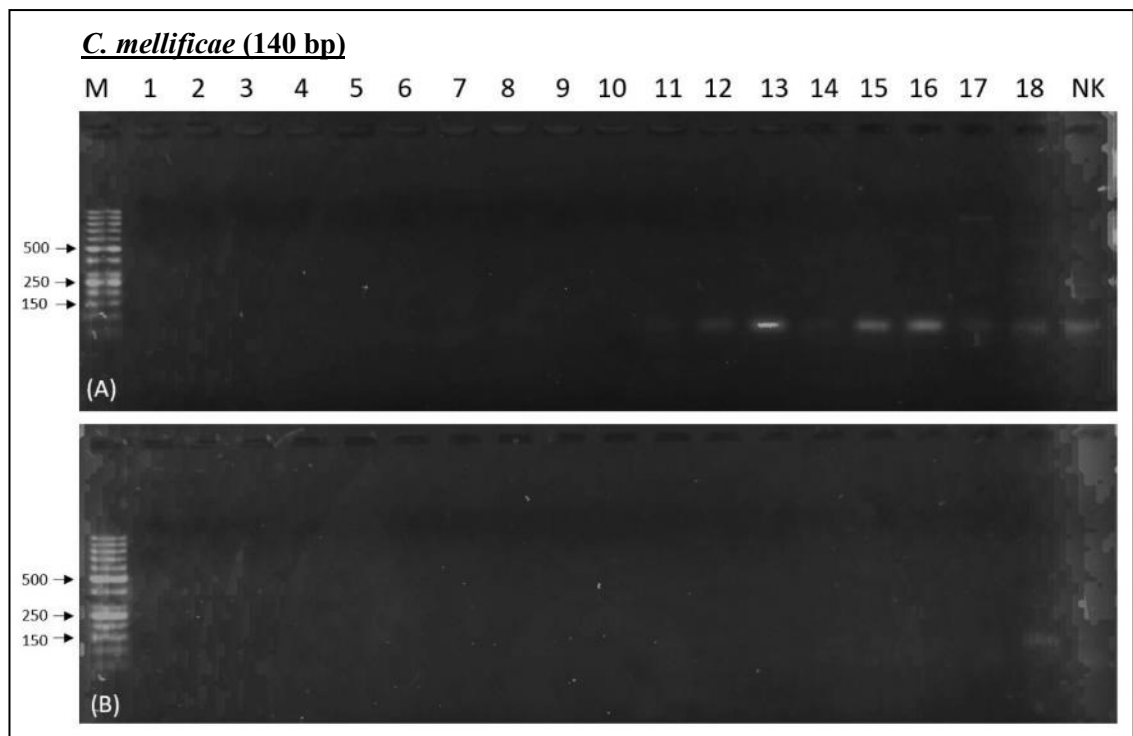
Obr. 20 Porovnání elektroferogramů produktů PCR cílené na gen *EF1-alpha*. (A) výsledky z DNA-izolačního kitu Qiagen. (B) výsledky z FTA karet. M: marker GeneRuler 50 bp; 1-18: vybrané podzimní vzorky včel; NK: negativní kontrola.



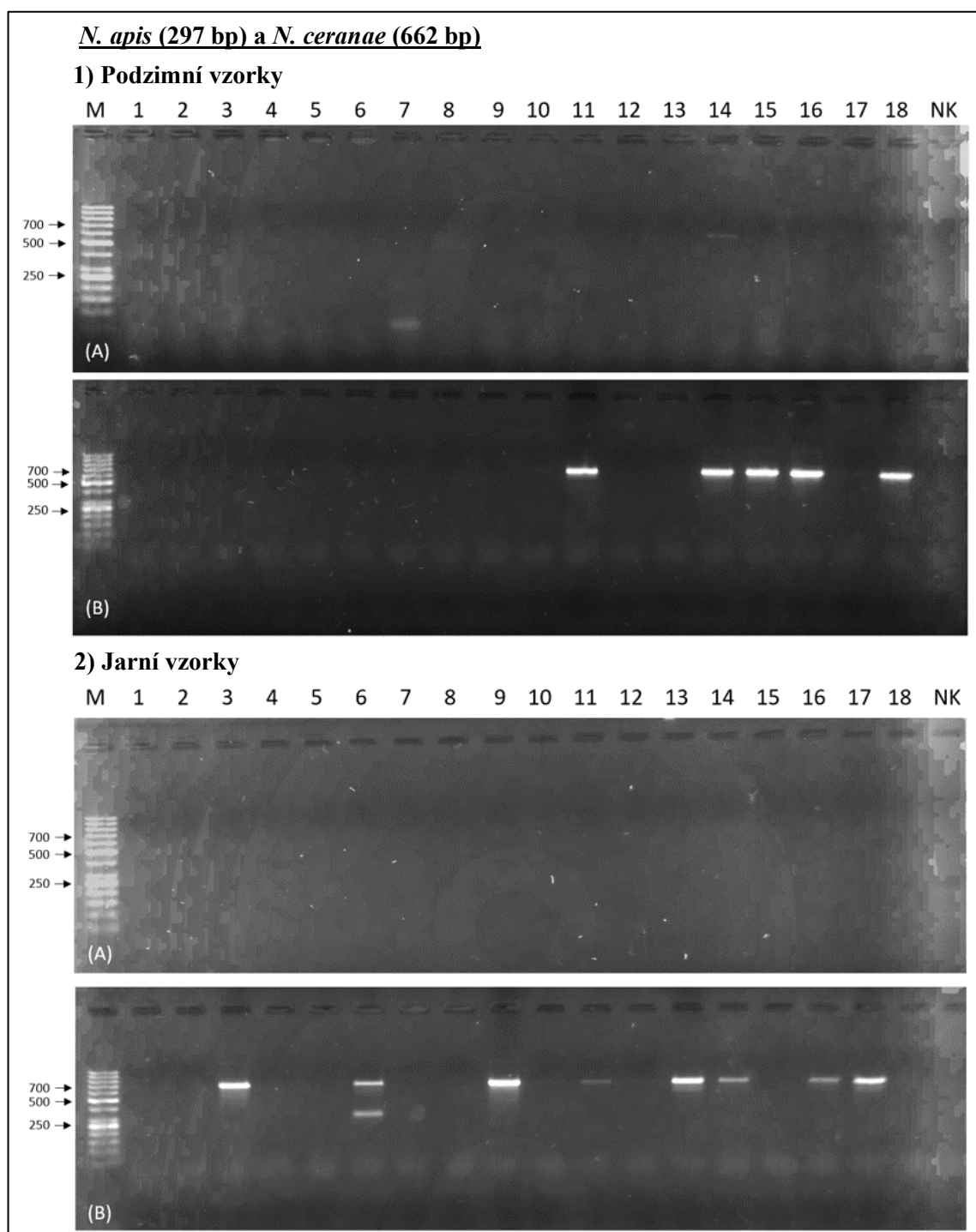
Obr. 21 Porovnání elektroferogramů produktů PCR pro detekci *L. passim*. (A) výsledky z DNA izolačního kitu Qiagen. (B) výsledky z FTA karet. M: marker GeneRuler 50 bp; 1-18: vybrané podzimní vzorky včel; NK: negativní kontrola.



Obr. 22 Porovnání elektroferogramů produktů PCR *S. marcescens*. (A) výsledky z DNA izolačního kitu Qiagen. (B) výsledky z FTA karet. M: marker GeneRuler 50 bp; 1-18: vybrané podzimní vzorky včel; NK: negativní kontrola.



Obr. 23 Porovnání elektroferogramů produktů PCR pro detekci *C. melliferae*. (A) výsledky z DNA izolačního kitu Qiagen. (B) výsledky z FTA karet. M: marker GeneRuler 50 bp; 1-18: vybrané podzimní vzorky včel; NK: negativní kontrola.



Obr. 24 Porovnání elektroferogramů produktů duplex PCR pro detekci *N. apis* a *N. ceranae*. (A) výsledky z DNA izolačního kitu Qiagen. (B) výsledky z FTA karet. M: marker GeneRuler 50 bp; 1-18: vybrané jarní/podzimní vzorky včel; NK: negativní kontrola.

4.3.2 Shrnutí výsledků detekce ve všech testovaných vzorcích

Shrnutí výsledků zastoupení patogenů získaných z end-point PCR (kit Qiagen vs. FTA) ve všech podzimních vzorcích je uvedeno v tabulce 6 a vzorcích jarních v tabulce 7. Zároveň jsou v tabulkách uvedeny výsledky mikroskopické detekce, která sloužila jako kontrola správnosti určení pozitivní infekce pro *Nosema spp.* Z celkových 36 vzorků označených jako *Nosema*-pozitivní byl pouze 1 vzorek na FTA kartě vyhodnocen jako falešně negativní, zatímco u kitu Qiagen bylo falešně negativních vzorků celkem 32. V případě detekce *L. passim* a *C. mellificae* byly výsledky shodné ve všech testovaných včelstvech. U *S. marcescens* se výsledky lišily ve 2 včelstvech.

Tab. 6 Porovnání výsledků mikroskopické detekce *Nosema spp.* a PCR detekce patogenů provedené na DNA izolované kitem Qiagen nebo FTA kartami z podzimních vzorků včel. Vysvětlivky: (+) = pozitivní nález; (-) = negativní.

| Podzim 2020 | <i>L. passim</i> | | <i>C. mellifcae</i> | | <i>S. marcescens</i> | | <i>N. apis</i> | | <i>N. ceranae</i> | | Mikroskopie <i>Nosema spp.</i> |
|----------------|------------------|-----|---------------------|-----|----------------------|-----|----------------|-----|-------------------|-----|-----------------------------------|
| | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 7 | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 13 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 14 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| 16 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 19 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | + | + | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 28 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 29 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 32 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 34 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 35 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 36 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| 37 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 38 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 39 | - | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 40 | - | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 41 | + | + | - | - | + | + | - | - | + | + | + |
| 42 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| 43 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| 44 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 45 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 46 | + | + | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| 48 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 50 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 51 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 52 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 53 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 54 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 55 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 56 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 57 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 58 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 59 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tab. 7 Porovnání výsledků mikroskopické detekce *Nosema spp.* a PCR detekce patogenů provedené na DNA izolované kitem Qiagen nebo FTA kartami z jarních vzorků včel. Vysvětlivky: (+) = pozitivní; (-) = negativní.

| Jaro 2021 | <i>L. passim</i> | | <i>C. mellifica</i> | | <i>S. marcescens</i> | | <i>N. apis</i> | | <i>N. ceranae</i> | | Mikroskopie <i>Nosema spp.</i> |
|--------------|------------------|-----|---------------------|-----|----------------------|-----|----------------|-----|-------------------|-----|-----------------------------------|
| | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | Qiagen | FTA | |
| 2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 7 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 28 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 30 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 33 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 34 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 35 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 37 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 39 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 41 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + | + |
| 42 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 43 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| 46 | + | + | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 48 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 50 | - | - | - | - | + | + | - | - | - | + | + |
| 51 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 52 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 53 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 54 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 55 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 57 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| 59 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

4.4 Sekvence PCR produktů pro potvrzení detekce cíleného patogenu

Vzorky, u kterých byla detekována *N. ceranae*, *N. apis*, *L. passim* a *S. marcescens*, byly poslány na sekvenaci (provedla firma SeqMe jako zakázkovou sekvenaci) pro potvrzení, že se opravdu jedná o dané mikroorganismy. *C. mellificae* nebyla ve vzorcích detekována. Získané sekvence byly vloženy do webového nástroje nucleotide BLAST. U všech vzorků byla nalezena shoda s daným mikroorganismem (viz obr. 25-28). Pouze u vzorku *S. marcescens* byla také nalezena shoda s jinými enterobakteriemi, například z rodu *Legionella* a *Salmonella*.

Nosema apis strain AP1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [JQ639297.1](#) Length: 322 Number of Matches: 1

Range 1: 38 to 320 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|-----------|-----------|
| 503 bits(272) | 8e-138 | 279/283(99%) | 2/283(0%) | Plus/Plus |
| Query 11 | ACTGCT-MGT-ATACTCACTTTATTTGATGTACATTATACATAACTACGTTAAAGTGTAG | 68 | | |
| Sbjct 38 | ACTGCTCAGTAATACTCACTTTATTTGATGTACATTATACATAACTACGTTAAAGTGTAG | 97 | | |
| Query 69 | CTAACATATGTACAGTAAGAGTGAGACCTATCAGCTAGTTGTTAAGGTAATGGCTTAACA | 128 | | |
| Sbjct 98 | CTAACATATGTACAGTAAGAGTGAGACCTATCAGCTAGTTGTTAAGGTAATGGCTTAACA | 157 | | |
| Query 129 | AGGCAATAACGGGTAAACGGTATTACTTTGTAATATTCGGGAGAAGGAGCCTGAGAGACGG | 188 | | |
| Sbjct 158 | AGGCAATAACGGGTAAACGGTATTACTTTGTAATATTCGGGAGAAGGAGCCTGAGAGACGG | 217 | | |
| Query 189 | CTACTAAGTCTAAGGATTGACAGGGGGCAAACCTTGACCTATGGATATTATCTGAGGCA | 248 | | |
| Sbjct 218 | CTACTAAGTCTAAGGATTGACAGGGGGCAAACCTTGACCTATGGATATTATCTGAGGCA | 277 | | |
| Query 249 | GTTATGGGAAGTAACATAGTTGTTTCACATTTTAAACGCCCCC | 291 | | |
| Sbjct 278 | GTTATGGGAAGTAACATAGTTGTTTCACATTTTAAACGCCCCC | 320 | | |

Obr. 25 Porovnání sekvence nukleotidů PCR produktu se sekvencí genomu *N. apis* z databáze s pomocí nástroje nucleotide BLAST. Query = osekvenovaný produkt; sbjct = referenční sekvence z databáze.

Nosema ceranae strain BJ3 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
 Sequence ID: [MF099639.1](#) Length: 187 Number of Matches: 1

Range 1: 4 to 187 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|--------------|-----------|-----------|
| 337 bits(182) | 5e-88 | 183/184(99%) | 0/184(0%) | Plus/Plus |
| Query 3 | GATTACTATAGAATTTGAGTTTTTTGGCTCTGGGGATAGTATGATCGCAAGATTGAAAAT | 62 | | |
| Sbjct 4 | GATTACTATAGAATTTGAGTTTTTTGGCTCTGGGGATAGTATGATCGCAAGATTGAAAAT | 63 | | |
| Query 63 | TAAAGAAATTGACGGAAGAATACCACAAGGAGTGGATTGTGCGGCTTAATTTGACTCAAC | 122 | | |
| Sbjct 64 | TAAAGAAATTGACGGAAGAATACCACAAGGAGTGGATTGTGCGGCTTAATTTGACTCAAC | 123 | | |
| Query 123 | GCGAGGTAACCTACCAATATTTATATTTTGGAGRACGGTTTTTTGTTTGAGAATGAC | 182 | | |
| Sbjct 124 | GCGAGGTAACCTACCAATATTTATATTTTGGAGAACGGTTTTTTGTTTGAGAATGAC | 183 | | |
| Query 183 | CGGG 186 | | | |
| Sbjct 184 | CGGG 187 | | | |

Obr. 26 Porovnání sekvence nukleotidů PCR produktu se sekvencí *N. ceranae* z databáze s pomocí nástroje nucleotide BLAST. Query = osekvenovaný produkt; sbjct = referenční sekvence z databáze.

Lotmaria passim isolate 2365A cytochrome b (cytb) gene, partial cds; kinetoplast

Sequence ID: [MG494247.1](#) Length: 425 Number of Matches: 1

[See 1 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins\(IPG\)](#)

Range 1: 162 to 377 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|--|---------------|-----------|------------|
| 399 bits(216) | 7e-107 | 216/216(100%) | 0/216(0%) | Plus/Minus |
| Query 5 | TATTCCTTTTACTGTATGTTTCATATATTTAAAGCGATCGTTTTAATAATTTTATTGATA | 64 | | |
| Sbjct 377 | TATTCCTTTTACTGTATGTTTCATATATTTAAAGCGATCGTTTTAATAATTTTATTGATA | 318 | | |
| Query 65 | CTCatattttagtatgagcagtaggttttattatatatatattcatagtagttataggtt | 124 | | |
| Sbjct 317 | CTCATATTTTAGTATGAGCAGTAGGTTTTATTATATATATATTCATAGTAGTTATAGGTT | 258 | | |
| Query 125 | ttattGGATATGTATTACCATGTACAATGATGCTTATTGAGGTCTAACTGTTTTAGCA | 184 | | |
| Sbjct 257 | TTATTGGATATGTATTACCATGTACAATGATGCTTATTGAGGTCTAACTGTTTTAGCA | 198 | | |
| Query 185 | ATATTTTAGCAACAGTACCAGTTATTGGTGTGGC | 220 | | |
| Sbjct 197 | ATATTTTAGCAACAGTACCAGTTATTGGTGTGGC | 162 | | |

Obr. 27 Porovnání sekvenční nukleotidů PCR produktu se sekvencí *L. passim* z databáze s pomocí nástroje nucleotide BLAST. Query = osekvenovaný produkt; sbjct = referenční sekvenční z databáze.

Serratia marcescens strain Tc-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [MW425449.1](#) Length: 1292 Number of Matches: 1

Range 1: 435 to 497 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|--------------|--|-------------|----------|-----------|
| 117 bits(63) | 2e-22 | 63/63(100%) | 0/63(0%) | Plus/Plus |
| Query 14 | AGCACCGGCTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA | 73 | | |
| Sbjct 435 | AGCACCGGCTACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGA | 494 | | |
| Query 74 | ATT 76 | | | |
| Sbjct 495 | ATT 497 | | | |

Obr. 28 Porovnání sekvenční nukleotidů PCR produktu se sekvencí *S. marcescens* z databáze s pomocí nástroje nucleotide BLAST. Query = osekvenovaný produkt; sbjct = referenční sekvenční z databáze.

4.5 Zastoupení patogenů v podzimních a jarních vzorcích včel

4.5.1 Prevalence patogenů na podzim a na jaře

Prevalence patogenů byla vypočítána jako procento pozitivních vzorků ze všech testovaných vzorků. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8. V tabulce 9 je pak uvedeno porovnání výskytu patogenů ve stejných včelstvech na podzim 2020 a na jaře 2021.

Tab. 8 Porovnání prevalence patogenů ve vzorcích včel z podzimu 2020 a jara 2021. Pro výpočet prevalencí byly použity pouze výsledky z PCR provedené na FTA kartách.

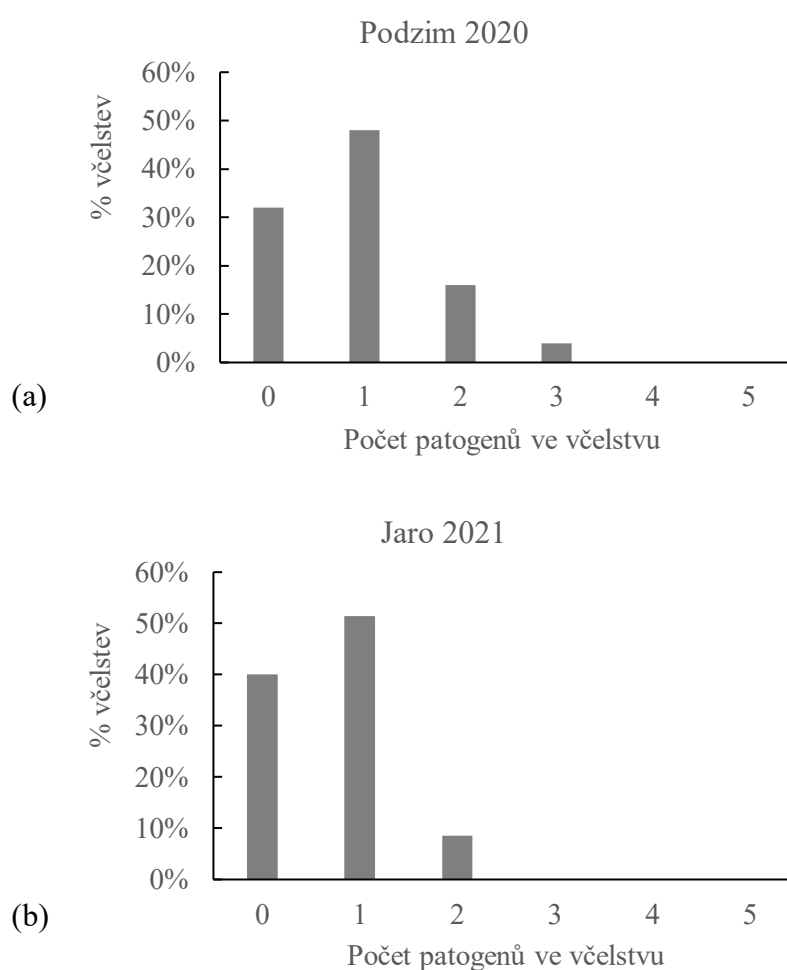
| patogen | Podzim 2020 | | | Jaro 2021 | | |
|----------------------|--------------|--------------------------|------------|--------------|--------------------------|------------|
| | počet vzorků | počet pozitivních vzorků | prevalence | počet vzorků | počet pozitivních vzorků | prevalence |
| <i>L. passim</i> | | 9 | 18 % | | 1 | 2,8 % |
| <i>C. mellificae</i> | | 0 | 0 % | | 0 | 0 % |
| <i>S. marcescens</i> | 50 | 23 | 46 % | 35 | 1 | 2,8 % |
| <i>N. apis</i> | | 0 | 0 % | | 1 | 2,8 % |
| <i>N. ceranae</i> | | 14 | 28 % | | 21 | 60 % |

Tab. 9 Porovnání zastoupení patogenů ve stejných včelstvech na podzim 2020 a poté na jaře 2021.

| Číslo včelstva | Podzim 2020 | | | | | Číslo včelstva | Jaro 2021 | | | | |
|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------|-------------------|----------------|------------------|----------------------|----------------------|----------------|-------------------|
| | <i>L. passim</i> | <i>C. melliferae</i> | <i>S. marcescens</i> | <i>N. apis</i> | <i>N. ceranae</i> | | <i>L. passim</i> | <i>C. melliferae</i> | <i>S. marcescens</i> | <i>N. apis</i> | <i>N. ceranae</i> |
| 2 | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | + |
| 7 | + | - | + | - | - | 7 | - | - | - | - | - |
| 8 | - | - | - | - | + | 8 | - | - | - | - | + |
| 10 | - | - | - | - | + | 10 | - | - | - | - | + |
| 13 | - | - | + | - | - | 13 | - | - | - | - | - |
| 15 | - | - | + | - | + | 15 | - | - | - | - | + |
| 16 | - | - | + | - | + | 16 | - | - | - | - | - |
| 17 | - | - | - | - | - | 17 | - | - | - | - | + |
| 18 | - | - | - | - | - | 18 | - | - | - | - | - |
| 20 | - | - | - | - | - | 20 | - | - | - | - | - |
| 21 | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | - |
| 22 | - | - | + | - | - | 22 | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | - | - | + | 23 | - | - | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | - | 24 | - | - | - | - | + |
| 25 | + | - | + | - | - | 25 | - | - | - | - | + |
| 28 | - | - | + | - | - | 28 | - | - | - | - | + |
| 30 | - | - | - | - | - | 30 | - | - | - | - | + |
| 33 | - | - | + | - | - | 33 | - | - | - | - | + |
| 34 | - | - | - | - | - | 34 | - | - | - | - | + |
| 35 | - | - | - | - | - | 35 | - | - | - | - | - |
| 37 | - | - | + | - | - | 37 | - | - | - | - | + |
| 39 | - | - | + | - | + | 39 | - | - | - | - | - |
| 41 | + | - | + | - | + | 41 | - | - | - | + | + |
| 42 | - | - | - | - | + | 42 | - | - | - | - | - |
| 43 | - | - | + | - | + | 43 | - | - | - | - | - |
| 46 | + | - | + | - | + | 46 | + | - | - | - | + |
| 48 | + | - | - | - | + | 48 | - | - | - | - | + |
| 50 | - | - | + | - | - | 50 | - | - | + | - | + |
| 51 | - | - | - | - | - | 51 | - | - | - | - | + |
| 52 | - | - | - | - | - | 52 | - | - | - | - | + |
| 53 | - | - | + | - | - | 53 | - | - | - | - | + |
| 54 | - | - | + | - | - | 54 | - | - | - | - | - |
| 55 | - | - | - | - | + | 55 | - | - | - | - | + |
| 57 | - | - | + | - | - | 57 | - | - | - | - | + |
| 59 | + | - | - | - | - | 59 | - | - | - | - | - |

4.5.2 Koinfekce patogenů

V podzimních vzorcích včel bylo celkem 32 % včelstev neinfikovaných žádným z detekovaných patogenů, zatímco v jarních vzorcích tomu bylo u 40 % včelstev. 48 % podzimních vzorků ze včelstev bylo infikované jedním patogenem, 16 % dvěma různými patogeny a zbylá 4 % byla infikována třemi různými patogeny. Žádné ze včelstev nebylo na podzim infikováno více jak třemi patogeny. Na jaře byl ve více jak polovině včelstev (51,43 %) detekován jeden druh patogenu. Zbylá jarní včelstva (8,57 %) byla infikována dvěma druhy (viz obr. 29).



Obr. 29 Koinfekce patogenů v testovaných včelstvech. (a) Procentuální zastoupení včelstev infikovaných vícero patogeny na podzim 2020. (b) Procentuální zastoupení včelstev infikovaných vícero patogeny na jaře 2021.

4.6 Statistická analýza

4.6.1 Porovnání výsledků z FTA karet a kitu Qiagen

Cohenovo kappa bylo vypočteno pro vyhodnocení shody výsledků detekce patogenů získaných z PCR s použitím FTA karet a kitu Qiagen, a také pro vyhodnocení shody mezi výsledky mikroskopické detekce a PCR detekce *Nosema spp.* s použitím FTA karet a kitu Qiagen. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10. Patogeny, u nichž je uvedena pomlčka nebyly v dané sadě vzorků detekovány, nemohlo tak pro ně být vypočteno κ , popřípadě nemohly být detekovány mikroskopicky. Shoda výsledků v případě detekce *L. passim* a *S. marcescens* byla vyhodnocena jako téměř dokonalá, a to jak u podzimních, tak jarních vzorků. U *N. apis* a *N. ceranae* nebyla v jarních vzorcích nalezena žádná shoda. V podzimních vzorcích byla shoda výsledků pro detekci *N. ceranae* vyhodnocena jako ucházející. Při porovnání výsledků z kitu Qiagen s mikroskopickou detekcí *Nosema spp.*, kterou považujeme jako pozitivní kontrolu, byly pozorovány stejné hodnoty κ jako u porovnání s FTA kartami. Naopak při porovnání FTA karet s mikroskopickou detekcí byla pozorována téměř dokonalá shoda. Kit Qiagen tedy při detekci *Nosema spp.* neposkytuje správné výsledky, zatímco FTA karty ano.

Tab. 10 Hodnoty Cohena kappu pro určení míry shody mezi výsledky získanými použitím rozdílných metod

| patogen | Cohenovo kappa | | | | | |
|----------------------|----------------|-------|------------------------|-------|---------------------|-------|
| | Qiagen vs. FTA | | Qiagen vs. mikroskopie | | FTA vs. mikroskopie | |
| | podzim | jaro | podzim | jaro | podzim | jaro |
| <i>L. passim</i> | 1,000 | 1,000 | - | - | - | - |
| <i>C. mellificae</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. marcescens</i> | 0,920 | 1,000 | - | - | - | - |
| <i>N. apis</i> | - | 0,000 | - | - | - | - |
| <i>N. ceranae</i> | 0,365 | 0,000 | - | - | - | - |
| <i>Nosema spp.</i> | | | 0,365 | 0,000 | 1,000 | 0,940 |

4.6.2 Porovnání výsledků u podzimních a jarních včel

Pro určení, zda existuje shoda mezi výskytem stejných patogenů ve stejných včelstvech na podzim a na jaře, bylo vypočítáno κ (viz tab. 11). Pro výpočet byly použity pouze výsledky z FTA karet. U *S. marcescens* byla pozorována nepatrná shoda, u *L. passim* pak shoda ucházející. U *N. apis* a *N. ceranae* nebyla pozorována žádná shoda. Pro

vyhodnocení náchylnosti včelstev k nákaze na jaře oproti podzimu či naopak, byly vypočítány hodnoty OR. Pro porovnání výsledků vzorků podzimních vůči jarním bylo použito označení OR1 a pro porovnání výsledků jarních vůči podzimním označení OR2 (viz tab. 12). Z výsledných hodnot OR je patrné, že včelstva byla na podzim náchylnější na infekci *L. passim* oproti jaru. Podobně tak tomu je i u *S. marcescens*, kdy jsou šance jejího výskytu na podzim výrazně vyšší. Naproti tomu u *N. ceranae* byla pozorována přibližně trojnásobně vyšší šance výskytu na jaře oproti podzimu.

Tab. 11 Vyhodnocení shody výskytu vybraných patogenů ve stejných včelstvech na podzim a na jaře.

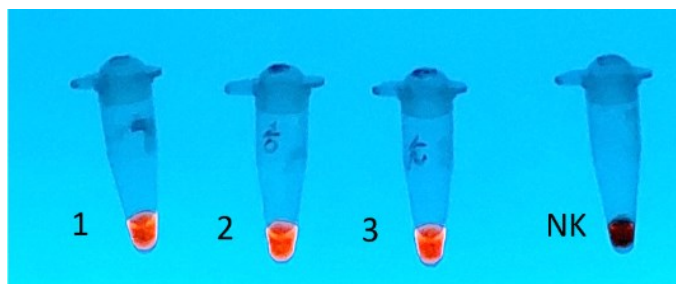
| patogen | podzim vs. jaro |
|----------------------|-----------------|
| | Cohenovo kappa |
| <i>L. passim</i> | 0,250 |
| <i>C. mellifcae</i> | - |
| <i>S. marcescens</i> | 0,060 |
| <i>N. apis</i> | 0,000 |
| <i>N. ceranae</i> | -0,022 |

Tab. 12 Srovnání náchylnosti včelstev vůči nákaze na podzim a na jaře, vyjádřené pomocí OR.

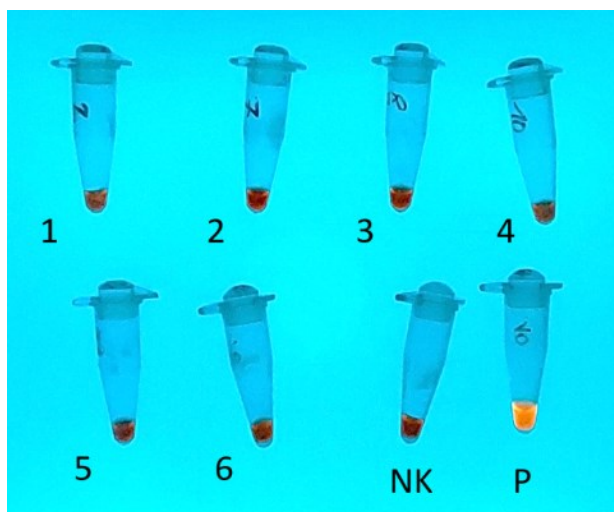
| patogen | podzim/jaro | jaro/podzim |
|----------------------|-------------|-------------|
| | OR1 | OR2 |
| <i>L. passim</i> | 7,03 | 0,14 |
| <i>C. mellifcae</i> | - | - |
| <i>S. marcescens</i> | 32,11 | 0,03 |
| <i>N. apis</i> | - | - |
| <i>N. ceranae</i> | 0,35 | 2,88 |

4.7 Optimalizace LAMP

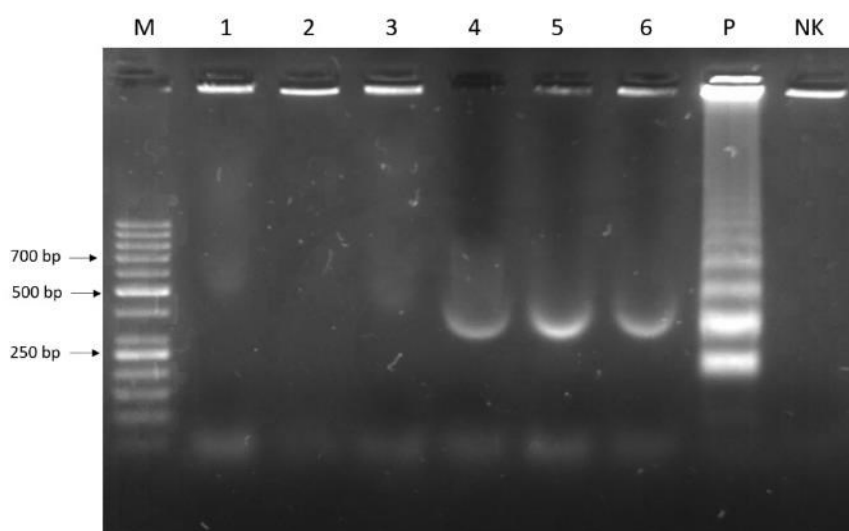
LAMP reakce byla nejprve vyzkoušena dle Lannutti et al. (2020) s rozdílem v templátu. Reakce tedy probíhala v objemu 10 μ l a pro detekci byl přidán 1 μ l barviva SYBR safe. Pro reakci byly použity 3 vybrané vzorky, pozitivní na *N. ceranae*. Výsledky reakce jsou vidět na obr. 30. U tří testovaných vzorků bylo pozorováno oranžové, u negativní kontroly poté temně červené až černé zbarvení. Je patrné, že všechny tři použité vzorky jsou pozitivní, nicméně nebylo pozorováno čistě žluté zbarvení, jaké uvádějí v článku (viz obr. 10 v kapitole 2.3.4.3). Stejný postup byl vyzkoušen ještě jednou, tentokrát s použitím šesti vybraných COLOSS vzorků pozitivních na *N. ceranae*. Všechny reakce však byly negativní (obr. 31). LAMP produkty těchto šesti neúspěšných reakcí spolu s jednou z předešlých úspěšných reakcí byly také podrobeny agarosové elektroforóze pro potvrzení, zda došlo či nedošlo k amplifikaci. Na výsledném elektroferogramu je vidět, že k amplifikaci opravdu nedošlo (viz obr. 32).



Obr. 30 Výsledky LAMP reakce provedené v objemu 10 μ l s detekcí 1 μ l SYBR safe. 1-3: vybrané vzorky předešle identifikované jako *Nosema*-pozitivní. NK: negativní kontrola.



Obr. 31 Výsledky LAMP reakce provedené v objemu 10 μl s detekcí 1 μl SYBR safe. 1-6: Vybrané COLOSS vzorky. NK: Negativní kontrola. P: pozitivní reakce (zkumavka z předešlé úspěšné amplifikace přiložena pro vizuální porovnání).

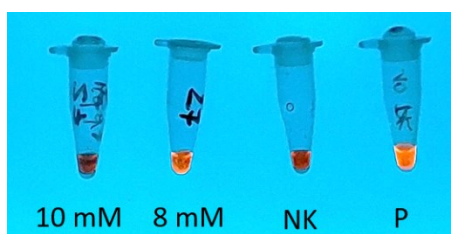


Obr. 32 Elektroferogram výsledků LAMP reakce šesti vybraných COLOSS vzorků (1-6), které při vizuální detekci byly vyhodnoceny jako negativní. M: marker Generuler 50 bp. P: pozitivní reakce z předešlé úspěšné amplifikace. NK: negativní kontrola.

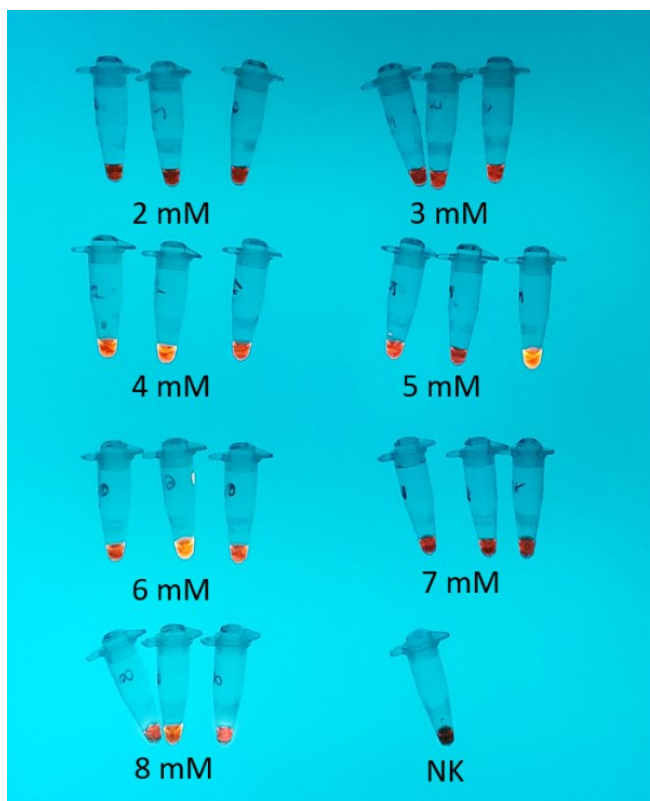
4.7.1 Optimalizace koncentrace MgSO_4

Jelikož v návodu pro *Bst* polymerasu výrobce uvádí optimální celkovou koncentraci Mg^{2+} v reakci 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, bylo vyzkoušeno snížení koncentrace z 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ na 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Po snížení koncentrace byla pozorována amplifikace (viz obr. 33). Pro vyzkoušení, zda by při ještě nižších koncentracích Mg^{2+} neprobíhala reakce lépe, byly vyzkoušeny LAMP reakce s celkovou koncentrací Mg^{2+} od 2 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ do 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (obr. 34). Každá reakce byla provedena v triplicátu a pro všechny byl použit stejný

vzorek. Amplifikace byla pozorována u koncentrací 4; 5; 6 a 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Zároveň byly pozorovány nekonzistentní výsledky v rámci triplikátů, zbarvení se neshodovala. Nejvíce žluté zbarvení bylo pozorováno u koncentrací 5 a 6 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ovšem pouze v jednom ze tří replikátů. Naproti tomu nejvíce konzistentní amplifikace v rámci replikátů byla pozorována u koncentrace 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, nicméně zbarvení bylo světle oranžové, amplifikace tudíž nebyla vysoká. Nebyla tedy určena přesná ideální koncentrace MgSO_4 , avšak vzhledem k předešlým neúspěšným amplifikacím s použitím koncentrace 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla pro další optimalizační kroky používána koncentrace 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



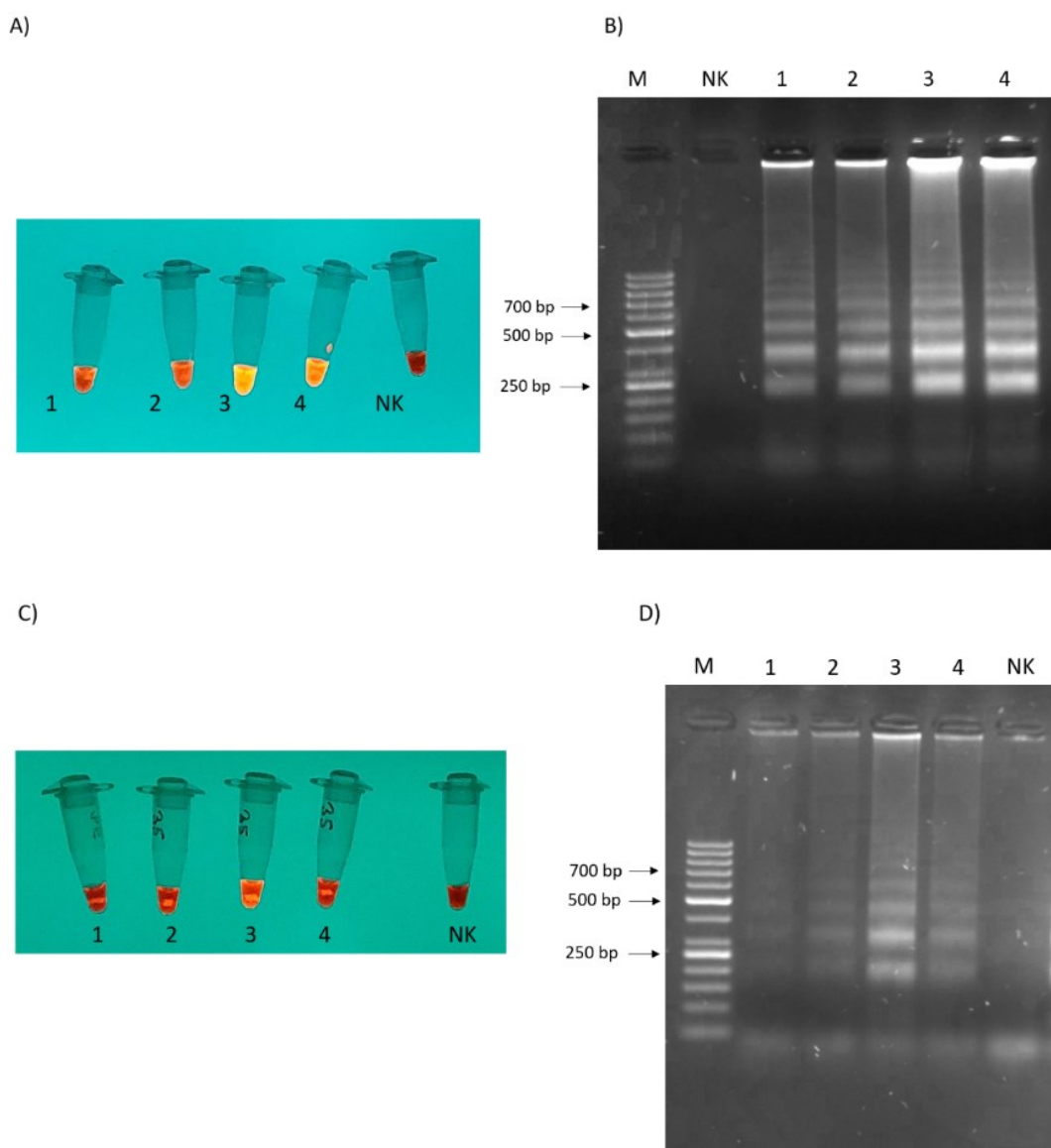
Obr. 33 Porovnání LAMP reakce provedené při koncentraci Mg^{2+} 10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. NK: negativní kontrola. P: pozitivní reakce (zkumavka z předešlé úspěšné amplifikace přiložena pro vizuální porovnání).



Obr. 34 Optimalizace koncentrace MgSO_4 v LAMP reakci v koncentracích od 2 do 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.7.2 Úprava objemu reakce a koncentrace SYBR safe

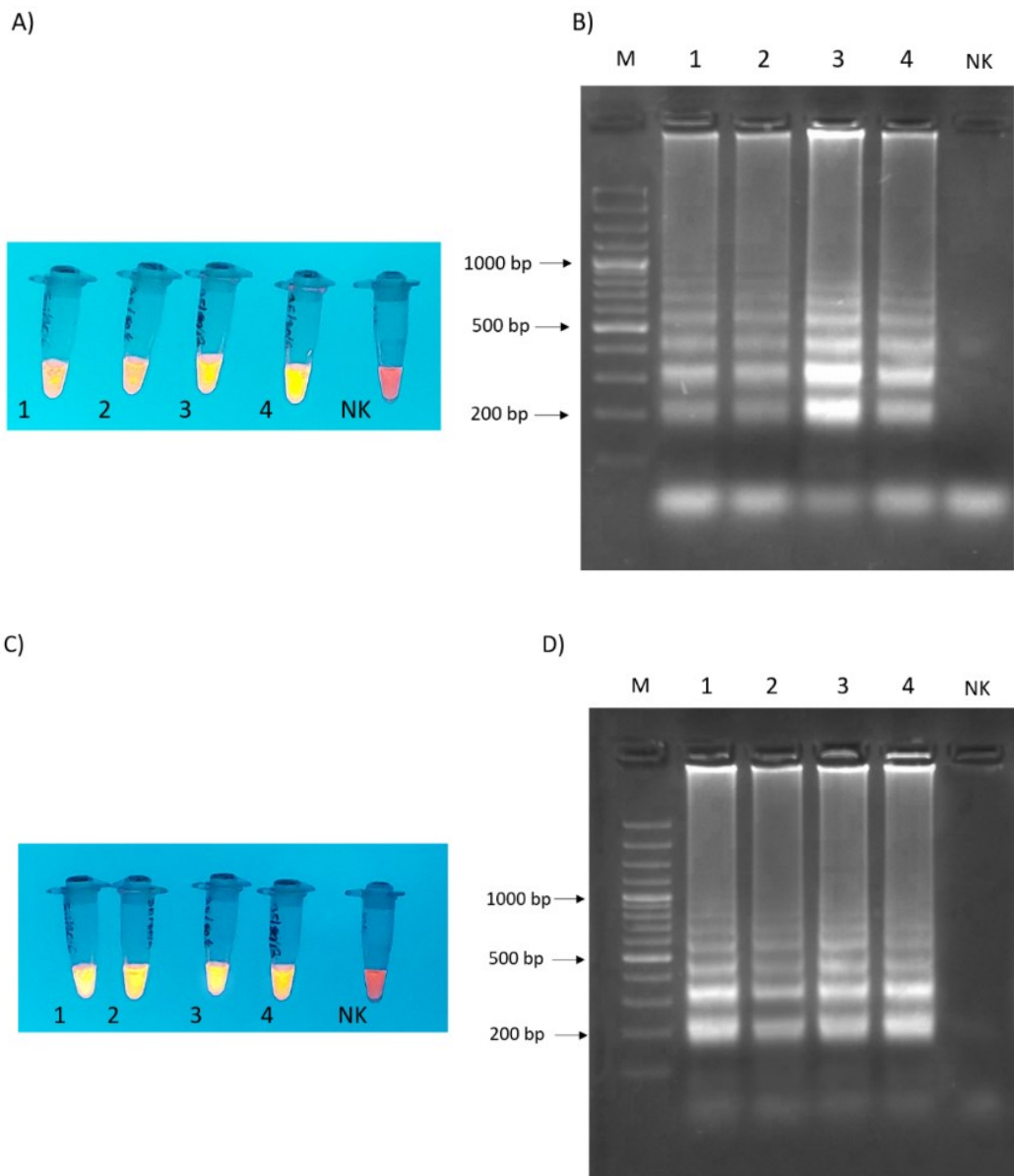
Jelikož při optimalizaci FTA karet pro PCR byly ze začátku pozorovány podobně nekonzistentní výsledky a problém byl vyřešen zvýšením objemu reakce, byl objem LAMP reakce zvýšen dvojnásobně, tedy na 20 μl . Byly provedeny 4 reakce se stejným vzorkem a amplikony byly detekovány jak přímo, tak pomocí gelové elektroforézy (obr. 35A a 35B). Reakce byla následně se stejnými parametry a stejnými vzorky provedena znovu následující den (obr. 35C a 35D).



Obr. 35 LAMP reakce provedené ve 20 μl s 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mg^{2+} . A) Přímá detekce použitím 1 μl SYBR safe. B) Elektroferogram vzorků z části A. C) Opakování reakce následující den; detekce 1 μl SYBR Safe. D) Elektroferogram vzorků z části C. 1-4: replikáty stejného *Nosema*-pozitivního vzorku. M: marker Gener Ruler 100 bp. NK: negativní kontrola.

U reakce v objemu 20 μl byla opět pozorována nekonzistentní amplifikace a výsledky nebyly reprodukovatelné, proto byl objem reakce v dalším pokusu zvýšen o dalších 10 μl . Zároveň bylo pozorováno, že u některých vzorků, u kterých zabarvení při přímé vizuální detekci naznačovalo negativní reakci (např. vzorek 4 na obr. 35C), byla na agarosovém gelu pozorována pozitivní amplifikace. Pravděpodobně tedy šlo o přebytečné nenavázané barvivo SYBR safe, které v případě nižší koncentrace amplikonů „přebíjelo“ vzniklé žluté zabarvení. Pro přímou detekci bylo tedy použito 10 \times zředěné barvivo SYBR safe v objemu 1 μl .

Reakce v objemu 30 μl s detekcí 10 \times naředěným barvivem byla taktéž provedena ve dvou po sobě následujících dnech (obr. 36). Byla pozorována výrazná změna ve zbarvení reakce, kdy reakční směs pozitivní reakce měla velmi sytě žluté zbarvení a negativní reakce byla červená. V obou dnech byly pozorovány amplifikace ve všech replikátech a amplifikace byla relativně konzistentní, pouze první den ve třetím replikátu (obr. 36B) byla pozorována vyšší intenzita bandů oproti ostatním replikátům.



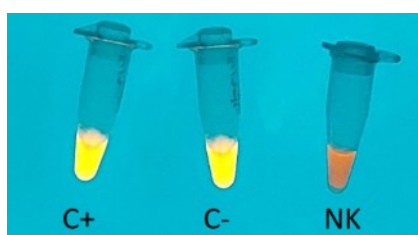
Obr. 36 LAMP reakce provedené ve 30 μl s 8 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Mg^{2+} . A) Přímá detekce použitím 1 μl 10 \times naředěného SYBR safe. B) Elektroferogram vzorků z části A. C) Opakování reakce následující den; detekce 1 μl 10 \times naředěného SYBR Safe. D) Elektroferogram vzorků z části C. 1-4: replikáty stejného *Nosema*-pozitivního vzorku. M: marker Gener Ruler 100 bp. NK: negativní kontrola.

4.7.3 Falešná pozitivita

Po optimalizaci reakce byly připraveny zbylé vzorky pro detekci, avšak po proběhnutí reakce byly všechny vzorky včetně negativní kontroly pozitivní. Kvůli podezření na možnou kontaminaci, byly vyměněny všechny používané roztoky, nicméně problém stále přetrvával. Byly objednány nové roztoky a byla použita *Bst* 2.0 Warmstart

polymerasa, která by měla omezovat vznik případné nescifické amplifikace. Byly připraveny alikvoty roztoků v objemech pro různé počty reakcí tak, aby každý alikvot byl použit pouze jednou. Pro zamezení kontaminace laboratoře aerosolizovanými amplikony byly zkumavky před přidáním detekčního barviva otevírány v jiné místnosti.

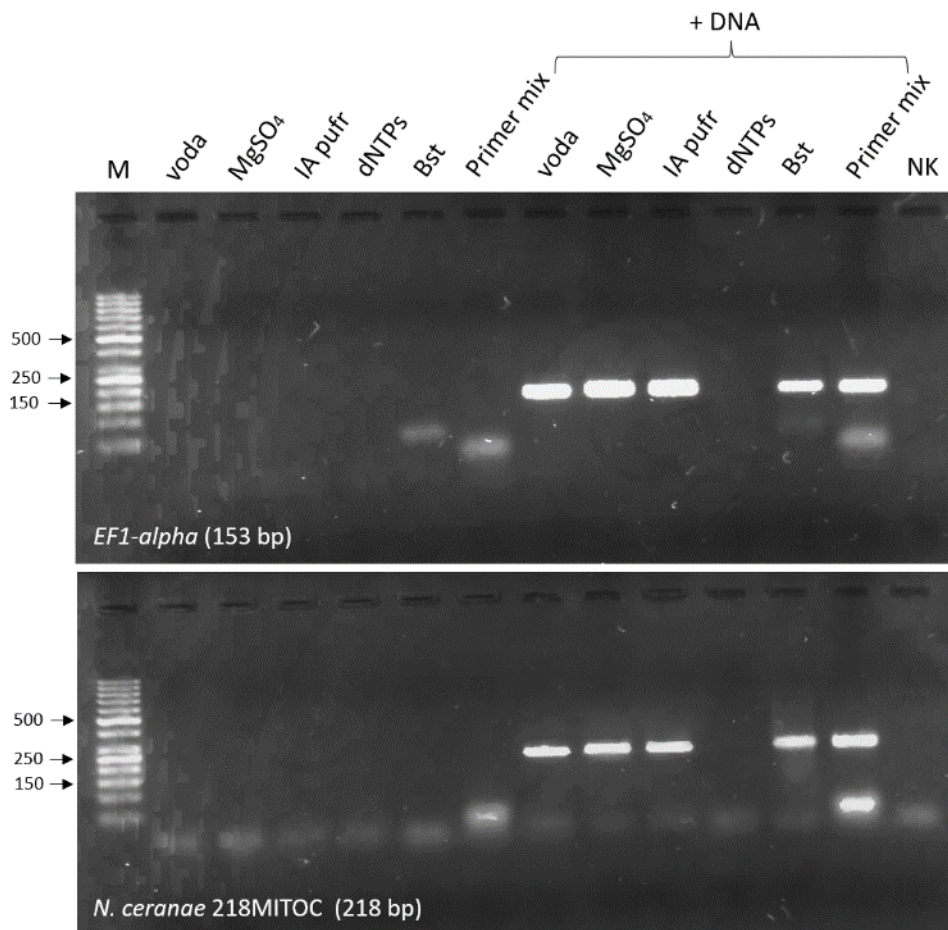
LAMP reakce s novými roztoky byla provedena na dvou vzorcích, jednom *Nosema*-pozitivním a jednom *Nosema*-negativním. Negativní kontrola byla negativní, avšak oba vzorky byly vyhodnoceny jako pozitivní (obr. 37).



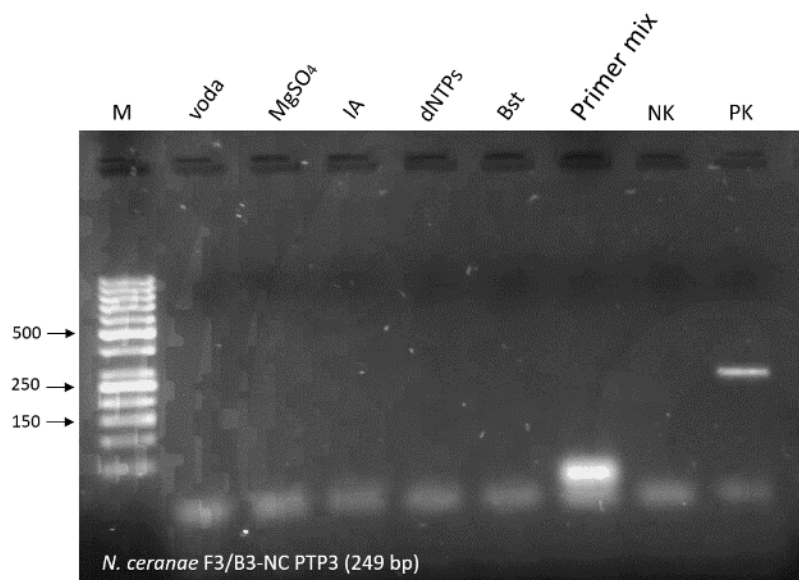
Obr. 37 LAMP reakce provedená s novými reagensy. C+: *Nosema*-pozitivní vzorek. C-: *Nosema*-negativní vzorek. NK: negativní kontrola.

4.7.4 PCR pro určení přítomnosti kontaminace

Pro určení přítomnosti kontaminace byla provedena PCR reakce, kdy jako templát byly použity všechny roztoky používané pro LAMP v objemu 1 μ l. Pro ujištění, že žádný z testovaných roztoků neinhibuje PCR, byla provedena také reakce obsahující jak LAMP reagentie, tak přidanou včelí gDNA. Roztoky byly testovány na přítomnost včelí DNA (*EF1*-alpha) a na přítomnost *N. ceranae* s použitím primerů 218MITOC cílených na 16SrRNA (obr. 38). Pro případ, že by kontaminace byla způsobena pouze amplikony LAMP, byla PCR také provedena s primery F3 a B3 používanými v LAMP cílenými na gen *PTP3* (obr. 39). Předpokládaná délka amplikonu dle Primer-BLAST při použití primerů B3 a F3 pro end-point PCR je 249 bp.



Obr. 38 Stanovení přítomnosti kontaminace včelí DNA či DNA *N. ceranae* v roztocích používaných pro LAMP. M: marker Generuler 50 bp. NK: negativní kontrola.

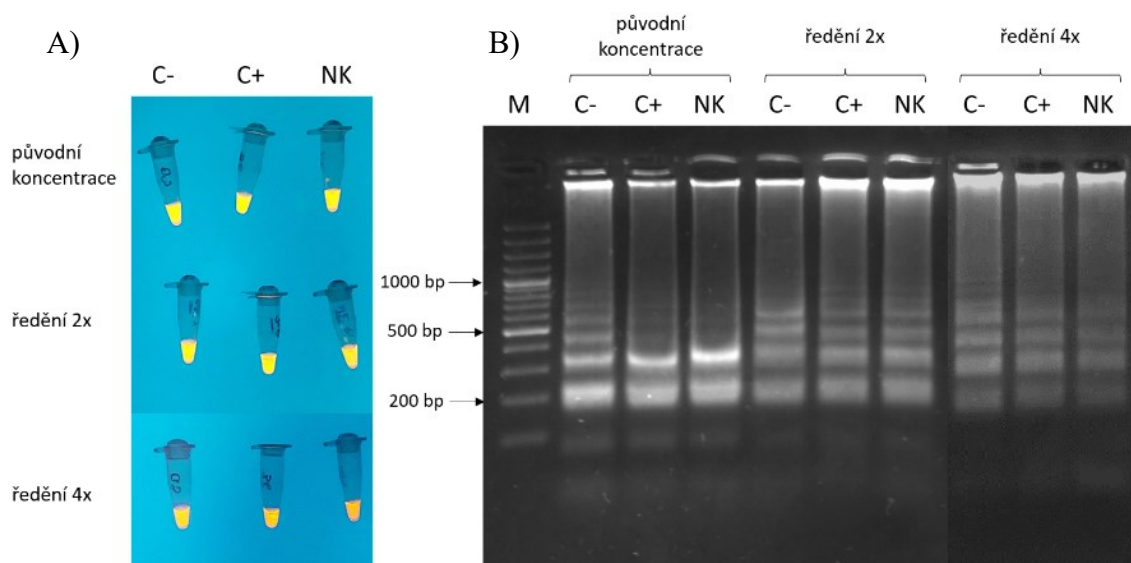


Obr. 39 Stanovení přítomnosti kontaminace způsobené amplifikací LAMP reakce v roztocích používaných pro LAMP. M: marker Generuler 50 bp. NK: negativní kontrola. PK: pozitivní kontrola.

V žádném z používaných roztoků nebyla nalezena kontaminace včelí DNA nebo DNA *N. ceranae*. Pouze u roztoku dNTPs nebylo možné správně zhodnotit přítomnost kontaminace, jelikož přidané dNTPs inhibovaly PCR reakci. V případě směsi primerů byl pozorován vznik ampliconů o velikosti cca 40 bp, což značí přítomnost dimerů primerů.

4.7.5 Úprava koncentrace primerů

Vzhledem k přítomnosti velkého množství dimerů primerů v PCR byly vyzkoušeny LAMP reakce se sníženou koncentrací všech primerů pro případ, že by jejich vysoká koncentrace způsobovala falešnou pozitivitu. Používaný primer mix ($1,6 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BIP/FIP; $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ F3/B3; $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ LF/LB) byl do LAMP reakce naředěn 2× a 4×. Ve výsledcích nebyl ale pozorován rozdíl mimo intenzitu bandů (obr. 40), všechny reakce byly pozitivní.



Obr. 40 LAMP provedená se sníženými koncentracemi primerů. C-: *Nosema*-negativní vzorek. C+: *Nosema*-pozitivní vzorek. NK: negativní kontrola.

5 DISKUZE

5.1 Porovnání FTA karet a izolačního kitu DNeasy Plant Mini kit

FTA karty jsou používány pro mnoho různých aplikací v různých odvětvích. Používají se rutinně v klinických laboratořích pro uchování vzorků krve nebo mohou být použity pro uchování a transport virové RNA z míst, kde je obtížné zajistit optimální podmínky pro klasické metody (Cardona-Ospina et al., 2019). Pro včelí vzorky však FTA karty nebyly dosud použity.

Při použití vzorků jako jsou listy rostlin je možné vzorky aplikovat na kartu pouhým obtisknutím (Thompson & Hrabak, 2018). Tento postup však není možné aplikovat u včel, jelikož obtisknutí včely na kartu způsobuje narušení povrchu karty. Také nedosáhneme homogenního rozmístění, což je pro detekci patogenů zásadní. Zároveň je takový způsob aplikace neekonomický z hlediska využití místa na kartě. Proto byly použity včelí homogenáty získané homogenizací v homogenizačních sáčcích, které umožňovaly jednoduchou a rychlou homogenizaci co největšího počtu včel. Po optimalizaci nanášení bylo možné aplikovat na 1 FTA kartu 36 homogenátů včel. Při vyřezávání vzorků pro PCR pak z každého vzorku mohlo být získáno více jak 20 výřezků, což bylo pro potřeby této práce více než dostačující.

Pro použití k PCR byly stanoveny zásadní faktory ovlivňující úspěšnost amplifikace, kterými byly správná velikost karty, dostatečné promytí karty a správný objem reakce. Po optimalizaci těchto bodů byly FTA karty úspěšně použity jako templát pro PCR.

Jedna FTA karta vyjde přibližně na 170 korun, což je tedy cena izolace 36 vzorků včel, bez započtení nákladů na další potřebné laboratorní vybavení. Tato cena je výrazně nižší v porovnání s izolačním kitem DNeasy Plant Mini kit, u kterého izolace 36 vzorků vyjde přibližně na 4 000 korun. Rozdíl je také v časové náročnosti. U FTA karet je nutné vyčkat na vyschnutí homogenátu na kartě a následně vyřezat a promýt vzorek. Pro 18 vzorků tento proces zabere 1,5 až 2 hodiny. Vyřezané vzorky ale mohou být předchystány do PCR zkumavek. Samotný promyvací proces se sušením pak zabere cca 45 min. Izolace 18 vzorků kitem trvá zhruba 2,5 hodiny. Výhodou izolačního kitu je to, že izolace je provedena pouze jednou a následně je nutné pouze rozmrazit uschovanou DNA. U FTA karet je vždy před PCR nutné věnovat čas přípravě vzorku. Na druhou stranu doba přípravy reakční směsi pro PCR je u FTA karet kratší, jelikož je

PCR premix aplikován přímo na kartu ve zkumavce a není potřeba pipetování templátu. Tím se také může minimalizovat možnost křížové kontaminace vzorků, jelikož na FTA kartě je DNA imobilizována, zatímco u izolované DNA může dojít ke kontaminaci aerosolizovanou DNA. Samotný postup izolace DNA s pomocí FTA karet je jednodušší než s pomocí kitu. Časová náročnost obou metod je ale srovnatelná, jelikož každá představuje časové výhody a nevýhody, pouze v odlišných krocích.

Výsledky detekce patogenů s použitím FTA karet a kitu Qiagen se shodovaly u 3 z 5 detekovaných patogenů. Při použití FTA karet pro detekci *Nosema spp.* se FTA karty ukázaly být výrazně lepší než kit Qiagen. Z 36 *Nosema*-pozitivních vzorků (pozitivita stanovena na základě mikroskopie) bylo s FTA kartami správně identifikováno 35 infikovaných včelstev, zatímco s kitem Qiagen pouze 4. Je pravděpodobné, že spory *Nosema spp.* jsou příliš odolné a lyzační krok v postupu u kitu Qiagen nebyl dostačující pro izolaci DNA *Nosema spp.* Pro úspěšnou izolaci DNA *Nosema spp.* tímto kitem by musela být provedena optimalizace lyzačního kroku, popřípadě i kroků následných. Vzhledem k ceně izolace DNA a úspěšnosti identifikace *Nosema* infekce pomocí FTA karet ale nebyla optimalizace provedena. FTA karty tak byly vyhodnoceny jako vhodná alternativa DNA izolačních kitů, která poskytuje skvělé výsledky při použití pro detekci patogenů v homogenátech včel. Lze také říci, že právě v případě *Nosema spp.* jsou FTA karty časově méně náročné, jelikož případné optimalizační kroky nutné pro izolaci DNA těchto mikrosporidií kitem Qiagen by navýšily dobu přípravy vzorku.

5.2 Detekce patogenů a jejich prevalence

U jarních včelstev byla pozorována výrazně nižší diverzita patogenů oproti včelstvům podzimním. Bylo pozorováno výrazné zvýšení prevalence *N. ceranae* na jaře oproti podzimu a snížení prevalence *S. marcescens* a *L. passim*. Zároveň se na jaře snížila diverzita patogenů, kdy všechny patogeny mimo *N. ceranae* byly detekovány pouze v jednom či v žádném včelstvu.

Tyto výsledky se shodují s výsledky dříve publikovaných studií v různých zemích. Například Emsen et al. (2020) udávají, že v Severní Americe byly nejvyšší míry infekce *N. ceranae*, její prevalence a zároveň také životnosti spor, zaznamenány na jaře a v létě. Nejnižší byly pozorovány na podzim. V Německu Gisder et al. (2017) také zaznamenali nárůst prevalence *N. ceranae* během léta, kterou přisuzují vyššímu proliferačnímu

potenciálu *N. ceranae* v teplejších měsících. *N. apis* byla detekována pouze v jednom z vyšetřovaných včelstev, což potvrzuje již zdokumentované vytěšňování *N. apis* druhem *N. ceranae*, který je více virulentní. Zároveň byla *N. apis* detekována ve vzorku, který byl pozitivní i na *N. ceranae*. Tato koinfekce není velmi častá.

S. marcescens je oportunním patogenem, který se může běžně vyskytovat v trávicím traktu včel jako součást mikrobiomu. V této práci byla výhradně detekována v podzimních včelstvech, a to v poměrně velké části z nich (46 %). Tento rozdíl může být způsoben rozdíly ve výživě jarních a podzimních včelstev, který ovlivňuje diverzitu mikrobiomu. Kešnerová et al. (2019) například uvádějí, že včely mohou disponovat mechanismy, které zvyšují rezistenci vůči oportunním patogenům v zimních měsících.

C. mellifica nebyla detekována v žádném včelstvu, což může potvrzovat hypotézu, že dříve často detekovaná *C. mellifica* byla ve skutečnosti její příbuzná *L. passim* (Schwarz et al., 2015), která v této práci byla detekována téměř ve čtvrtině podzimních včelstev. Tyto výsledky se shodují například s výsledky v Japonsku v letech 2018 a 2019, kdy prevalence *C. mellifica* byla 0 % a u *L. passim* se v různých regionech pohybovala přibližně od 16 do 70 % (Yamamoto et al., 2023). U *L. passim* se také uvádí, že se hojněji vyskytuje v chladnějších měsících (Vargas et al., 2017). V České republice ale v roce 2021, zařadili Mráz et al. *C. mellifica* mezi nejvíce zastoupené patogeny spolu s *N. ceranae* a *L. passim*. Naproti tomu *N. apis* nedetekovali vůbec.

Mezi výskytem patogenů v jarních a v podzimních vzorcích včel nebyla pozorována statisticky významná souvislost. Včelstva infikovaná danými patogeny na podzim nebyla infikována stejnými patogeny i na jaře. Výsledky práce poskytují nová data o prevalenci patogenů a jejich sezónním výskytu v rámci celé České republiky.

5.3 LAMP

Metoda LAMP má potenciál být levnější a rychlejší alternativou k PCR detekci včelích patogenů. Protokol publikovaný Lannutti et al. (2020), který byl v této práci použit pro LAMP detekci *N. ceranae* využívá izolované DNA z purifikovaných spor. Tento purifikační krok je časově a technicky náročný, proto byl v této práci jako templát použit vzorek homogenátu včel uchovaného na FTA kartě. Tato kombinace může představovat velmi rychlou detekční metodu použitelnou pro terénní aplikace. Zároveň tato kombinace může více urychlit zpracování vzorků z FTA karet, jelikož je LAMP

méně citlivá na kontaminanty a je tedy možné, že vzorek FTA karty pro LAMP není nutné dokonale promývat jako je tomu u PCR.

Postup LAMP dle autorů původní publikace, s rozdílem v templátu, neposkytoval kýžené výsledky. Výsledky nebyly reprodukovatelné. Po vyzkoušení několika úprav byl jako hlavní problém určen nedostatečný objem reakce. Stejný problém byl pozorován při použití FTA karet s PCR. Po trojnásobném zvýšení objemu reakce byly získány reprodukovatelné výsledky a byla pozorována konzistentní amplifikace v rámci replikátů stejného *Nosema*-pozitivního vzorku. Jelikož množství přidávaného detekčního barviva SYBR safe, které autoři uvádějí, bylo příliš velké a ztěžovalo správné a rychlé určení pozitivní reakce, bylo barvivo naředěno 10× a používáno v objemu 1 µl na 30 µl reakční směsi. S touto úpravou byly pozitivní výsledky pozorovány jako intenzivně žluté reakce a negativní výsledky červené. Nebyly již pozorovány oranžové reakce, obtížně rozlišitelné od negativní kontroly.

Po této optimalizaci se LAMP jevila jako velmi rychlá, jednoduchá a přesná metoda pro detekci *N. ceranae*. Při pokusech o aplikaci metody na zbylé testované vzorky byla ale pozorována amplifikace jak v pozitivních vzorcích, tak ve vzorcích negativních a i v negativní kontrole. Používané roztoky byly testovány pomocí PCR na přítomnost kontaminace, nicméně žádná nebyla nalezena. Použití *Bst* 2.0 Warmstart polymerasy a snížení koncentrace primerů pro zamezení nespecifické amplifikace rovněž nevyřešilo přítomný problém. Metoda tedy vyžaduje další optimalizační kroky, aby mohla být úspěšně používána pro diagnostiku včelích patogenů.

Problémy v reakci mohou být způsobeny designem primerů, kdy primery buď nejsou dostatečně specifické nebo jejich sekvence způsobuje vysokou šanci formace dimerů. Kromě koncentrace primerů může být také pro zamezení nespecifické amplifikace vyzkoušena úprava koncentrace *Bst* polymerasy a MgSO₄, popřípadě může být upravena teplota reakce. Jako poslední může být vyzkoušeno přidání TMAC. Nicméně vzhledem k tomu, že při optimalizaci metody nebyl pozorován problém a negativní kontroly byly čisté, je možné, že problém mohl být způsoben dosud neidentifikovanou příčinou, např. kontaminací.

6 ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla věnována detekci včelích patogenů pomocí PCR a jí podobných metod. Byla vypracována literární rešerše o metodách amplifikace nukleových kyselin, používaných pro diagnostiku patogenů a parazitů. Hlavní pozornost byla dána rešerši o metodě LAMP a jejím využití. Dále byla vypracována literární rešerše o FTA kartách používaných pro uchování a izolaci DNA. V experimentální části byla řešena detekce vybraných včelích patogenů v podzimních a jarních odběrech ze včelstev, s použitím různých metod izolace DNA a její následné detekce. V rámci experimentu bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Bylo optimalizováno použití FTA karet pro uchování DNA z homogenátů včel a jejich následné zpracování pro PCR aplikace. FTA karty byly vyhodnoceny jako vhodná alternativa komerčních kitů pro izolaci DNA. Jejich výhodou je především jednoduché zpracování, cena a možnost uchování při laboratorní teplotě.
2. Pomocí end-point PCR bylo detekováno 5 vybraných patogenů: *N. ceranae*, *N. apis*, *C. melliferae*, *L. passim* a *S. marcescens*. Byly porovnány výsledky získané s použitím FTA karet a DNA-izolačního kitu Qiagen, kdy se ukázalo, že pro detekci *Nosema spp.* jsou vhodnější FTA karty, jelikož bylo s jejich pomocí správně detekováno výrazně vyšší procento *Nosema*-pozitivních vzorků oproti kitu Qiagen (97,2 % vs. 11,1 %). Výsledky detekce zbylých patogenů se shodovaly.
3. Patogeny byly detekovány v 50 včelstvech z podzimu 2020 a ve 35 včelstvech z jara 2021. Byla vypočítána prevalence patogenů v obou ročních obdobích a bylo pozorováno výrazné zvýšení prevalence *N. ceranae* v jarních vzorcích oproti podzimním. Naproti tomu došlo ke snížení výskytu *S. marcescens* a *L. passim*. *C. melliferae* nebyla detekována v žádném včelstvu, *N. apis* pouze v jediném.
4. Byla vyzkoušena LAMP metoda pro detekci *N. ceranae* s použitím FTA karet. Byl upraven objem reakce, koncentrace $MgSO_4$ a množství přidávaného detekčního barviva SYBR safe pro optimální průběh reakce a správné určení pozitivního výsledku.
5. U LAMP reakcí byly pozorovány falešně pozitivní výsledky způsobené kontaminací či nespecifickou amplifikací.

6. Metoda LAMP má potenciál být v kombinaci s FTA kartami levnou a rychlou metodou detekce včelích patogenů. Pro rutinní zavedení metody v laboratoři je ale nutné provést další optimalizační kroky.

7 LITERATURA

- Ahmed, H. A., MacLeod, E. T., Hide, G., Welburn, S. C., & Picozzi, K. (2011). The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasites & Vectors*, 4(1), 68. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-68>
- Ali, M. M., Li, F., Zhang, Z., Zhang, K., Kang, D.-K., Ankrum, J. A., Le, X. C., & Zhao, W. (2014). Rolling circle amplification: a versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chemical Society Reviews*, 43(10), 3324. <https://doi.org/10.1039/c3cs60439j>
- Al-Ogaili, A. S., Liyanage, R., Lay, J. O., Jiang, T., Vuong, C. N., Agrawal, S., Kumar, T. K. S., Berghman, L. R., Hargis, B. M., & Kwon, Y. M. (2020). DNA aptamer-based rolling circle amplification product as a novel immunological adjuvant. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79420-w>
- Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerle, R., & von Stetten, F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods*, 12(6), 717–746. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
- Bussalleu, E., & Althouse, G. C. (2018). A PCR detection method for discerning *Serratia marcescens* in extended boar semen. *Journal of Microbiological Methods*, 151, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.012>
- Cameron, T. C., Wiles, D., & Beddoe, T. (2021). Current Status of Loop-Mediated Isothermal Amplification Technologies for the Detection of Honey Bee Pathogens. *Frontiers in veterinary science*, 8. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2021.659683>
- Cardona-Ospina, J. A., Villalba-Miranda, M. F., Palechor-Ocampo, L. A., Mancilla, L. I., & Sepúlveda-Arias, J. C. (2019). A systematic review of FTA cards® as a tool for viral RNA preservation in fieldwork: Are they safe and effective? *Preventive Veterinary Medicine*, 172, 104772. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104772>
- Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 6 - Polymerase Chain Reaction. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee, *Molecular Biology* (třetí vyd.; s. 168–198). Academic Cell. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00006-9>
- Collins, R. A., Ko, L. S., Fung, K. Y., Chan, K. Y., Xing, J., Lau, L. T., & Yu, A. C. H. (2003). Rapid and sensitive detection of avian influenza virus subtype H7 using NASBA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(2), 507–515. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02896-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02896-6)
- da Cunha Santos, G. (2018). FTA Cards for Preservation of Nucleic Acids for Molecular Assays: A Review on the Use of Cytologic/Tissue Samples. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 142(3), 308–312. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0303-RA>
- Deiman, B., Van Aarle, P., & Sillekens, P. (2002). Characteristics and applications of Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 20(2), 163–179. <https://doi.org/10.1385/MB:20:2:163/METRICS>
- Deng, M.-H., Zhong, L.-Y., Kamolnetr, O., Limpanont, Y., & Lv, Z.-Y. (2019). Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. *Infectious Diseases of Poverty*, 8(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0530-z>
- Dobbs, L. J., Madigan, M. N., Carter, A. B., & Lori, ; (2002). Use of FTA Gene Guard Filter Paper for the Storage and Transportation of Tumor Cells for Molecular Testing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 126(1), 56-63. <https://doi.org/10.5858/2002-126-0056-UOFGGF>
- Edwards, T., Burke, P., Smalley, H. B., Gillies, L., Longhurst, D., Vipond, B., & Hobbs, G. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid detection of *Mycoplasma genitalium*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 83(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/J.DIAGMICROBIO.2015.05.010>
- Emsen, B., De la Mora, A., Lacey, B., Eccles, L., Kelly, P. G., Medina-Flores, C. A., Petukhova, T., Morfin, N., & Guzman-Novoa, E. (2020). Seasonality of *Nosema ceranae* Infections and

- Their Relationship with Honey Bee Populations, Food Stores, and Survivorship in a North American Region. *Veterinary Sciences*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/VETSCI7030131>
- Esmatabadi, M. javad D., Bozorgmehr, A., zadeh, H. M., Bodaghabadi, N., Farhangi, B., Babashah, S., & Sadeghizadeh, M. (2015). Techniques for Evaluation of LAMP Amplicons and their Applications in Molecular Biology. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(17), 7409–7414. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.17.7409>
- Euler, M., Wang, Y., Otto, P., Tomaso, H., Escudero, R., Anda, P., Hufert, F. T., & Weidmann, M. (2012). Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(7), 2234–2238. <https://doi.org/10.1128/JCM.06504-11>
- Evans, J. D., Schwarz, R. S., Chen, Y. P., Budge, G., Cornman, R. S., de La Rúa, P., de Miranda, J. R., Foret, S., Foster, L., Gauthier, L., et al. (2013). Standard methods for molecular research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52 (4), 1–54. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.11>
- Fakruddin, M., Mannan, K. bin, Hossain, M., Islam, S., Mazumdar, R., Chowdhury, A., & Chowdhury, M. (2013). Nucleic acid amplification: Alternative methods of polymerase chain reaction. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(4), 245. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.120066>
- Fang, C., Ouyang, P., Yang, Y., Qing, Y., Han, J., Shang, W., Chen, Y., & Du, J. (2021). MiRNA detection using a rolling circle amplification and rna-cutting allosteric deoxyribozyme dual signal amplification strategy. *Biosensors*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/bios11070222>
- Francois, P., Tangomo, M., Hibbs, J., Bonetti, E.-J., Boehme, C. C., Notomi, T., Perkins, M. D., & Schrenzel, J. (2011). Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 62(1), 41–48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>
- Fries, I., Chauzat, M. P., Chen, Y. P., Doublet, V., Genersch, E., Gisder, S., Higes, M., McMahon, D. P., Martín-Hernández, R., Natsopoulou, M., et al. (2013). Standard methods for *Nosema* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.14>
- Fünfhaus, A., Ebeling, J., & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.008>
- Gandelman, O., Jackson, R., Kiddle, G., & Tisi, L. (2011). Loop-Mediated Amplification Accelerated by Stem Primers. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(12), 9108–9124. <https://doi.org/10.3390/IJMS12129108>
- García-Bernalt Diego, J., Fernández-Soto, P., & Muro, A. (2021). LAMP in Neglected Tropical Diseases: A Focus on Parasites. *Diagnostics*, 11(3), 521. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11030521>
- Garg, N., Ahmad, F. J., & Kar, S. (2022). Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Current Research in Microbial Sciences*, 100120. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100120>
- Garg, N., Sahu, U., Kar, S., & Ahmad, F. J. (2021). Development of a Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique for specific and early detection of *Mycobacterium leprae* in clinical samples. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89304-2>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gisder, S., & Genersch, E. (2013). Molecular differentiation of *Nosema apis* and *Nosema ceranae* based on species-specific sequence differences in a protein coding gene. *Journal of invertebrate pathology*, 113(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2013.01.004>
- Gisder, S., Schüler, V., Horchler, L. L., Groth, D., & Genersch, E. (2017). Long-term temporal trends of *Nosema* spp. infection prevalence in Northeast Germany: Continuous spread of *Nosema ceranae*, an emerging pathogen of honey bees (*Apis mellifera*), but no general replacement of *Nosema apis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, 301. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2017.00301/BIBTEX>
- Gomez-Gutierrez, S. v., & Goodwin, S. B. (2022). Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of Plant Pathogens in Wheat (*Triticum aestivum*). *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.857673>

- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). The basic polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(5), 338–345. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095117>
- Hong, M., Zha, L., Fu, W., Zou, M., Li, W., & Xu, D. (2012). A modified visual loop-mediated isothermal amplification method for diagnosis and differentiation of main pathogens from *Mycobacterium tuberculosis* complex. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 523–531. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0843-y>
- Houdelet, C., Bocquet, M., & Bulet, P. (2020). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry biotyping, an approach for deciphering and assessing the identity of the honeybee pathogen *Nosema*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 35(3), 0–2. <https://doi.org/10.1002/rcm.8980>
- Chupia, V., Patchanee, P., Krutmuang, P., & Pikulkaew, S. (2016). Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of *Nosema ceranae* in honeybee. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(12), 952–956. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(16\)61163-5](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(16)61163-5)
- Jang, M. J., & Kim, S. (2022). Inhibition of Non-specific Amplification in Loop-Mediated Isothermal Amplification via Tetramethylammonium Chloride. *Biochip journal*, 16(3), 326–333. <https://doi.org/10.1007/S13206-022-00070-3>
- Jin-Long, Y., Rui, Y., Ke-Fei, S., Xiang-Wei, P., Tao, X., & Zuo-Hua, L. (2012). Rapid detection of sacbrood virus (SBV) by one-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Virology Journal*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-47>
- Juscamayta-López, E., Valdivia, F., Horna, H., Tarazona, D., Linares, L., Rojas, N., & Huaranga, M. (2021). A Multiplex and Colorimetric Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Sensitive and Rapid Detection of Novel SARS-CoV-2. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.653616>
- Karthik, K., Rathore, R., Thomas, P., Arun, T. R., Viswas, K. N., Dhama, K., & Agarwal, R. K. (2014). New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*, 1, 137–143. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.009>
- Kato, Y., Yanagisawa, T., Nakai, M., Komatsu, K., & Inoue, M. N. (2020). Direct and sensitive detection of a microsporidian parasite of bumblebees using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Scientific Reports*, 10(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57909-8>
- Kaymaz, S. V., & Elitas, M. (2021). Optimization of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) reaction mixture for biosensor applications. *MethodsX*, 8, 101282. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2021.101282>
- Kešnerová, L., Emery, O., Troilo, M., Liberti, J., Erkosar, B., & Engel, P. (2019). Gut microbiota structure differs between honeybees in winter and summer. *The ISME Journal*, 14(3), 801–814. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0568-8>
- Kim, J. H., Kang, M., Park, E., Chung, D. R., Kim, J., & Hwang, E. S. (2019). A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *BioChip Journal*, 13(4), 341–351. <https://doi.org/10.1007/s13206-019-3404-3>
- Kobayashi, T., Yagami, A., Suzuki, K., Yoshikawa, T., & Matsunaga, K. (2014). Concurrent Reactivation of Herpes Simplex and Varicella Zoster Viruses Confirmed by the Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay. *Case Reports in Dermatology*, 6(1), 5–9. <https://doi.org/10.1159/000358005>
- Lakshmi, B. A., & Kim, S. (2021). Recent trends in the utilization of LAMP for the diagnosis of viruses, bacteria, and allergens in food. *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, 291–297. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821406-0.00027-8>
- Lannutti, L., Mira, A., Basualdo, M., Rodriguez, G., Erler, S., Silva, V., Gisder, S., Genersch, E., Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2020). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and a direct LAMP for the specific detection of *Nosema ceranae*, a parasite of honey bees. *Parasitology Research*, 119(12), 3947–3956. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06915-w>
- Lei, Y., Zhou, J., Zheng, Y., Gamson, A. S., Roembke, B. T., Nakayama, S., & Sintim, H. O. (2014). Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Molecular BioSystems*, 10(5), 970. <https://doi.org/10.1039/c3mb70304e>

- Li, J., & Macdonald, J. (2015). Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics*, 64, 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.08.069>
- Liang, C., Cheng, S., Chu, Y., Wu, H., Zou, B., Huang, H., Xi, T., & Zhou, G. (2013). A Closed-Tube Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Products Using a Wax-Sealed Fluorescent Intercalator. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(6), 3999–4005. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.6497>
- Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
- Lourenço, A. P., Mackert, A., Cristino, A. D. S., & Simões, Z. L. P. (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, 39(3), 372–385. <https://doi.org/10.1051/apido:2008015>
- Biao, M., Yu, H., Fang, J., Sun, C., & Zhang, M. (2019). Employing DNA binding dye to improve detection of *Enterocytozoon hepatopenaei* in real-time LAMP. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52459-0>
- Ma, M., Ma, C., Li, M., Wang, S., Yang, S., & Wang, S. (2011). Loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of Chinese sacbrood virus. *Journal of Virological Methods*, 176(1–2), 115–119. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.028>
- Xue-jun, M., Shu, Y., Nie, K., Qin, M., Wang, D., Gao, R., Wang, M., Wen, L., Han, F., Zhou, S., et al. (2010). Visual detection of pandemic influenza A H1N1 Virus 2009 by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Journal of Virological Methods*, 167(2), 214–217. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.03.027>
- Mansour, S. M. G., Ali, H., Chase, C. C. L., & Cepica, A. (2015). Loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of 18 World Organization for Animal Health (OIE) notifiable viral diseases of ruminants, swine and poultry. *Animal Health Research Reviews*, 16(2), 89–106. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000018>
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailón, E., & Higes, M. (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6331–6338. <https://doi.org/10.1128/AEM.00270-07>
- Merck*.
https://www.sigmaaldrich.com/CZ/en/product/sigma/whawb120205?lang=en®ion=US&gclid=CjwKCAjw0ZiiBhBKEiwA4PT9zh0HB99EI166uwfE60V_dZ6x9uEguIPjY_bBtiM3719S1Cbmt-8DBoCoPQQAvD_BwE&gclsrc=aw.ds (23. 11. 2022)
- Mikita, K., Maeda, T., Yoshikawa, S., Ono, T., Miyahira, Y., & Kawana, A. (2014). The Direct Boil-LAMP method: A simple and rapid diagnostic method for cutaneous leishmaniasis. *Parasitology International*, 63(6), 785–789. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.007>
- Moehling, T. J., Choi, G., Dugan, L. C., Salit, M., & Meagher, R. J. (2021). LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community. *Expert review of molecular diagnostics*, 21(1), 43–61. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1873769>
- Mori, Y., Hirano, T., & Notomi, T. (2006). Sequence specific visual detection of LAMP reactions by addition of cationic polymers. *BMC Biotechnology*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-3>
- Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., & Notomi, T. (2004). Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>
- Morris, U., Khamis, M., Aydin-Schmidt, B., Abass, A. K., Msellem, M. I., Nassor, M. H., González, I. J., Mårtensson, A., Ali, A. S., Björkman, A., & Cook, J. (2015). Field deployment of loop-mediated isothermal amplification for centralized mass-screening of asymptomatic malaria in Zanzibar: A pre-elimination setting. *Malaria Journal*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12936-015-0731-2/TABLES/1>
- Mráz, P., Hýbl, M., Kopecký, M., Bohatá, A., Hošťicková, I., Šipoš, J., Vočadlova, K., & Čurn, V. (2021). Screening of Honey Bee Pathogens in the Czech Republic and Their Prevalence in Various Habitats. *Insects*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/INSECTS12121051>

- Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3), 223–229. <https://doi.org/10.1006/MCPR.2002.0415>
- New England Biolabs, Inc. <https://international.neb.com/products/m0538-bst-20-warmstart-dna-polymerase#FAQs%20&%20Troubleshooting> (27. 3. 2023)
- Nguyen, P. van, Han, S.-H., & Yoon, B.-S. (2011). Development of a Metalloproteinase Gene Based Loop Mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Paenibacillus* larvae. <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01721502>
- Nguyen, P. van, Lee, B., Yoo, M.-S., & Yoon, B.-S. (2012). Development and Clinical Validation of a DNA Gyrase Subunit B Gene Based Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detection of *Melissococcus plutonius*. *Journal of Apiculture*, 27(1), 51–58. <http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01845632>
- Nie, K., Qi, S. xiang, Zhang, Y., Luo, L., Xie, Y., Yang, M. jie, Zhang, Y., Li, J., Shen, H., Li, Q., & Ma, X. jun. (2012). Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA Extraction for the Detection of Human Enterovirus 71 Subgenotype C4 in Nasopharyngeal Swab Specimens. *PLOS ONE*, 7(12), e52486. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0052486>
- Niessen, L., Luo, J., Denschlag, C., & Vogel, R. F. (2013). The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants. *Food Microbiology*, 36(2), 191–206. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2013.04.017>
- Njiru, Z. K., Mbae, C. K., & Mburugu, G. N. (2017). Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for *Trypanosoma gambiense* Group 1 with Stem Primers: A Molecular Xenomonitoring Test for Sleeping Sickness. *Journal of Tropical Medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8630708>
- Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., & Kanda, H. (2015). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53(1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12), e63–e63. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.12.E63>
- Okamoto, M., Furuya, H., Sugimoto, I., Kusumoto, M., & Takamatsu, D. (2022). A novel multiplex PCR assay to detect and distinguish between different types of *Paenibacillus* larvae and *Melissococcus plutonius*, and a survey of foulbrood pathogen contamination in Japanese honey. *The Journal of veterinary medical science*, 84(3), 390–399. <https://doi.org/10.1292/JVMS.21-0629>
- Oliveira, B. B., Veigas, B., & Baptista, P. V. (2021). Isothermal Amplification of Nucleic Acids: The Race for the Next “Gold Standard”. *Frontiers in Sensors*, 2. <https://doi.org/10.3389/fsens.2021.752600>
- Paik, I., Ngo, P. H. T., Shroff, R., Diaz, D. J., Maranhao, A. C., Walker, D. J. F., Bhadra, S., & Ellington, A. D. (2021). Improved Bst DNA Polymerase Variants Derived via a Machine Learning Approach. *Biochemistry*, acs.biochem.1c00451. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.1c00451>
- Pickering, J., Bamford, A., Godbole, V., Briggs, J., Scozzafava, G., Roe, P., Wheeler, C., Ghouze, F., & Cuss, S. (2002). Integration of DNA ligation and rolling circle amplification for the homogeneous, end-point detection of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*, 30(12), 60e-60. <https://doi.org/10.1093/nar/gnf060>
- Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLOS Biology*, 4(7), e204. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0040204>
- Ponting, S., Tomkies, V., & Stainton, K. (2021). Rapid identification of the invasive Small hive beetle (*Aethina tumida*) using LAMP. *Pest Management Science*, 77(3), 1476–1481. <https://doi.org/10.1002/PS.6168>
- Ptaszyńska, A. A., Borsuk, G., Woźniakowski, G., Gnat, S., & Małek, W. (2014). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for rapid detection and differentiation of *Nosema apis*

- and *N. ceranae* in honeybees. *FEMS Microbiology Letters*, 357(1), 40–48. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12521>
- Quyen, T. L., Ngo, T. A., Bang, D. D., Madsen, M., & Wolff, A. (2019). Classification of Multiple DNA Dyes Based on Inhibition Effects on Real-Time Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): Prospect for Point of Care Setting. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02234>
- Rahikainen, A. L., Palo, J. U., de Leeuw, W., Budowle, B., & Sajantila, A. (2016). DNA quality and quantity from up to 16 years old post-mortem blood stored on FTA cards. *Forensic Science International*, 261, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2016.02.014>
- Ravoet, J., Maharramov, J., Meeus, I., de Smet, L., Wenseleers, T., Smagghe, G., & de Graaf, D. C. (2013). Comprehensive Bee Pathogen Screening in Belgium Reveals *Crithidia mellificae* as a New Contributory Factor to Winter Mortality. *PLoS ONE*, 8(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072443>
- Raymann, K., Coon, K. L., Shaffer, Z., Salisbury, S., & Moran, N. A. (2018). Pathogenicity of *serratia marcescens* strains in honey bees. *mBio*, 9(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01649-18>
- Reed, A. J., Connelly, R. P., Williams, A., Tran, M., Shim, B. S., Choe, H., & Gerasimova, Y. V. (2019). Label-free pathogen detection by a deoxyribozyme cascade with visual signal readout. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 282, 945–951. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.11.147>
- Sarwar, M. (2016). Fungal diseases of honey bees (Hymenoptera : Apidae) that induce considerable losses to colonies and protocol for treatment. *International Journal of Zoology Studies*, 1(1), 8–13.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schwarz, R. S., Bauchan, G. R., Murphy, C. A., Ravoet, J., De Graaf, D. C., & Evans, J. D. (2015). Characterization of two species of trypanosomatidae from the Honey Bee *Apis mellifera*: *Crithidia mellificae* Langridge and McGhee, and *Lotmaria passim* n. gen., n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 567–583. <https://doi.org/10.1111/jeu.12209>
- Sivaprasad, V., Satish, L., Mallikarjuna, G., Chandrakanth, N., Mary Josepha, A., & Moorthy, S. (2021). A Field-Friendly Loop-Mediated Isothermal Amplification (FF-LAMP) method for rapid detection of *Nosema bombycis* in silkworm, *Bombyx mori*. *ISJ*, 18(1).
- Smith, L. M., & Burgoyne, L. A. (2004). Collecting, archiving and processing DNA from wildlife samples using FTA® databasing paper. *BMC Ecol*, 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-4-4>
- Stevanovic, J., Schwarz, R. S., Vejnovic, B., Evans, J. D., Irwin, R. E., Glavinic, U., & Stanimirovic, Z. (2016). Species-specific diagnostics of *Apis mellifera* trypanosomatids: A nine-year survey (2007–2015) for trypanosomatids and microsporidians in Serbian honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 139, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.07.001>
- Stringer, O. W., Bossé, J. T., Lacouture, S., Gottschalk, M., Fodor, L., Angen, Ø., Velazquez, E., Penny, P., Lei, L., Langford, P. R., & Li, Y. (2021). Rapid Detection and Typing of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serovars Directly From Clinical Samples: Combining FTA® Card Technology With Multiplex PCR. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.728660>
- Sukphattanaudomchoke, C., Siripattanapipong, S., Thita, T., Leelayoova, S., Piyaraj, P., Mungthin, M., & Ruang-areerate, T. (2020). Simplified closed tube loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for visual diagnosis of *Leishmania* infection. *Acta Tropica*, 212, 105651. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105651>
- Thompson, M., & Hrabak, E. (2018). Capture and storage of plant genomic DNA on a readily available cellulose matrix. *BioTechniques*, 65(5), 285–287. <https://doi.org/10.2144/btn-2018-0109>
- Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., & Notomi, T. (2008). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5), 877–882. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Torres, C., Vitalis, E. A., Baker, B. R., Gardner, S. N., Torres, M. W., & Dzenitis, J. M. (2011). LAVA: An Open-Source Approach To Designing LAMP (Loop-Mediated Isothermal

- Amplification) DNA Signatures. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 240. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-240>
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., & Crovela, S. (2009). Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A review. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 1–11. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000100001>
- Vargas, M., Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Bruna, A., Vidal, M., Rodríguez, M., & Gerding, M. (2017). Viral and intestinal diseases detected in *apis mellifera* in central and southern Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(3), 243–249. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>
- Vashist, S. (2017). Point-of-Care Diagnostics: Recent Advances and Trends. *Biosensors*, 7(4), 62. <https://doi.org/10.3390/bios7040062>
- Vergara, A., Boutal, H., Ceccato, A., López, M., Cruells, A., Bueno-Freire, L., Moreno-Morales, J., Puig de la Bellacasa, J., Castro, P., Torres, A., et al. (2020). Assessment of a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for the Rapid Detection of Pathogenic Bacteria from Respiratory Samples in Patients with Hospital-Acquired Pneumonia. *Microorganisms*, 8(1), 103. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010103>
- Walker, G. T., Fraiser, M. S., Schram, J. L., Little, M. C., Nadeau, J. G., & Malinowski, D. P. (1992). Strand displacement amplification-an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Research*, 20 (7), 1691–1696. <https://doi.org/10.1093/nar/20.7.1691>
- Warmt, C., Yaslanmaz, C., & Henkel, J. (2022). Investigation and validation of labelling loop mediated isothermal amplification (LAMP) products with different nucleotide modifications for various downstream analysis. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-022-11320-7>
- Wastling, S. L., Picozzi, K., Kakembo, A. S. L., & Welburn, S. C. (2010). LAMP for Human African Trypanosomiasis: A Comparative Study of Detection Formats. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(11), e865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000865>
- Wong, Y.-P., Othman, S., Lau, Y.-L., Radu, S., & Chee, H.-Y. (2018). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*, 124(3), 626–643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Woniakowski, G., Kozdrun, W., & Samorek-Salamonowicz, E. (2012). Loop-mediated isothermal amplification for the detection of goose circovirus. *Virology Journal*, 9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-110>
- Xie, L., Xie, Z., Zhao, G., Liu, J., Pang, Y., Deng, X., Xie, Z., Fan, Q., & Luo, S. (2014). A loop-mediated isothermal amplification assay for the visual detection of duck circovirus. *Virology Journal*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-76>
- Yamamoto, S., Nakamura, S., Nakayama, K., Kusakisako, K., Watanabe, K., Ikadai, H., & Tanabe, T. (2023). Molecular detection of *Lotmaria passim* in honeybees in Japan. *Parasitology International*, 93, 102711. <https://doi.org/10.1016/J.PARINT.2022.102711>
- Yan, W., Shen, Z., Tang, X., Xu, L., Li, Q., Yue, Y., Xiao, S., & Fu, X. (2014). Detection of *Nosema bombycis* by FTA Cards and Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). *Current Microbiology*, 69(4), 532–540. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0619-3>
- Yoo, M.-S., Noh, J.-H., Yoon, B.-S., Reddy, K. E., Kweon, C.-H., Jung, S.-C., & Kang, S.-W. (2012). Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for sensitive and rapid detection of Korean sacbrood virus. *Journal of Virological Methods*, 186(1–2), 147–151. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.009>
- Zhang, X., Lowe, S. B., & Gooding, J. J. (2014). Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosensors and Bioelectronics*, 61, 491–499. <https://doi.org/10.1016/J.BIOS.2014.05.039>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|--------------|--|
| B3 | vnější zadní primer |
| BIP | vnitřní zadní primer |
| dNTPs | deoxyribonukleosidtrifosfáty |
| dsDNA | dvouvláknová DNA |
| F3 | vnější přední primer |
| FIP | vnitřní přední primer |
| HNB | hydroxynaftolová modř |
| κ | Cohenovo kappa |
| LAMP | izotermní amplifikace zprostředkovaná smyčkou |
| LB | smyčkový zadní primer |
| LF | smyčkový přední primer |
| MALDI-TOF MS | hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s analyzátozem doby letu |
| NAAT | techniky amplifikace nukleových kyselin |
| NASBA | amplifikace založená na sekvenci nukleové kyseliny |
| OR | „Odds ratio“ (poměr šancí) |
| PCR | polymerázová řetězová reakce |
| POCT | „point-of-care testing“ |
| qPCR | PCR v reálném čase (kvantitativní PCR) |
| RCA | amplifikace otáčivou kružnicí |
| RPA | rekombinasová polymerasová amplifikace |
| RT-LAMP | LAMP s reverzní transkripcí |
| RT-PCR | PCR s reverzní transkripcí |
| SDA | amplifikace vytěsňováním řetězce |
| SSB | „single-strand DNA-binding protein“ |
| ssDNA | jednovláknová DNA |
| StemB | stopkový zadní primer |
| StemF | stopkový přední primer |
| WHO | Světová zdravotnická orgnizace |