

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Optimalizace mykoplazmového detekčního
systému na bázi Rekombinázové polymerázové
amplifikační reakce (RPA)**

Diplomová práce

Bc. Veronika Vaňková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2020

Vedoucí práce: prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika VAŇKOVÁ**
Osobní číslo: **R18936**
Studijní program: **N1501 Biologie**
Studijní obor: **Molekulární a buněčná biologie**
Název tématu: **Optimalizace mykoplazmového detekčního systému na bázi
Rekombinázové polymerázové amplifikační reakce (RPA)**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracováním teoretické části diplomové práce student prokáže schopnost orientovat se v tématech protinádorové biomedicíny, pracovat s odbornými cizojazyčnými texty a řádně citovat. V praktické části student prokáže schopnost samostatně naplánovat, provést a vyhodnotit laboratorní experiment. 1. Sepsat rešerši o metodách detekce mykoplazmy a o metodě RPA, o jejím principu/výhodách/nevýhodách ve srovnání s metodou PCR, o jejím použití. 2. Podílet se na vývoji a validaci typizační soupravy k detekci mykoplazmy pomocí RPA.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí diplomové práce:


prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.


Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: **12. října 2018**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. července 2020**

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

L.S.


UNIVERSITA PALACKÉHO OLOMOUČI
Fakulta lékařská
Katedra molekulární a translační medicíny
Olomouč, příspěvková organizace
IČO: 00000000
tel.: +420 585 621 111
5.11.18
prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 27. března 2017

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Bc. Veronika Vaňková
Název práce:	Optimalizace mykoplazmového detekčního systému na bázi Rekombinázové polymerázové amplifikační reakce (RPA)
Typ práce:	Diplomová práce
Pracoviště:	Katedra buněčné biologie a genetiky
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2020
Klíčová slova:	mykoplasma, buněčné kultury, kontaminace, optimalizace a RPA
Počet stran:	56
Počet příloh:	2
Jazyk:	český

Souhrn

Mykoplazmy jsou nejmenší prokaryotické buňky, které jsou schopny infikovat téměř všechny buněčné linie. Mykoplazmové infekce vedou k celé řadě změn v buněčných liniích a představují tak hlavní problém v technice buněčných kultur. K detekci rané fáze infekce, kdy je kontaminace mykoplazmy velmi nízká nebo za situace, kdy je potlačen růst mykoplazmy (ošetření buněčných kultur antibiotiky) je vyžadována vysoká citlivost detekčních metod. PCR patří mezi běžně používané molekulárně biologické metody k detekci mykoplazmové infekce buněčných kultur. Metoda PCR je poměrně nákladná a vyžaduje náročné přístrojové vybavení, a proto není vhodná pro analýzu v terénu. V poslední době dochází k rozvoji izotermálních amplifikačních technik, které mají oproti PCR řadu výhod. Jednou z těchto metod je Rekombinázová polymerázová reakce, RPA, která se díky vysoké specifitě a rychlosti používá k identifikaci nejrůznějších patogenů.

Cílem teoretické části této diplomové práce bylo za použití uvedené literatury popsat charakteristiku mykoplazmy, shrnout vybrané metody detekce mykoplazmy v buněčných kulturách, popsat princip metody RPA, její výhody/nevýhody ve srovnání s metodou PCR a její použití.

Cílem experimentální části diplomové práce byl vývoj a validace typizační soupravy TwistAmp® exo k detekci mykoplazmy pomocí RPA.

Bylo zjištěno, že detekční limit metody RPA je stejný jako v případě metody real-time PCR, tj. 60 molekul syntetického standardu *M. arginini* na 1 µl. Na základě výsledků této práce má metoda RPA vysoký potenciál k tomu, stát se alternativou metody real-time PCR k detekci

mykoplazmové infekce v buněčných liniích, i přes svoji odlišnou dynamiku. Pro získání CE-IVD značky bude potřeba provést ještě několik testů k dokončení validace této typizační soupravy.

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Bc. Veronika Vaňková
Title:	Optimization of mycoplasma detection system based on Recombinase polymerase amplification (RPA)
Type of thesis:	Master thesis
Department:	Department of cell biology and genetics
Supervisor:	prof. Mgr. Jiří Drábek, Ph.D.
The year of presentation:	2020
Keywords:	mycoplasma, cell cultures, contamination, optimization and RPA
Number of pages:	56
Number of appendices:	2
Language:	czech

Summary

Mycoplasmas are the smallest prokaryotic cells which are able to infect almost all of the cell lines. Mycoplasma infections lead to the various changes of cell lines and they represent the main issue in the cell culture techniques. For a detection of the early phase of infection when the contamination of mycoplasma is very low or in a situation when the growth of the mycoplasma is repressed (antibiotic treatment of cell cultures), the high-sensitivity detection methods are required. PCR is one of the commonly used molecular biology methods for a detection of mycoplasma infection of cell cultures. PCR method is relatively expensive and requires demanding instrument, therefore it is not suitable for a field analysis. Recently we can observe the development of the isothermal amplification technologies which have, in comparison with PCR, many benefits. One of these methods is a Recombinase polymerase reaction, RPA, which is used for an identification of various pathogens thanks to the high specificity and speed.

The aim of the theoretical part of this diploma thesis was to describe the characteristics of mycoplasma, to summarize the selected methods of mycoplasma detection in cell cultures, to describe the principle of the RPA method, its advantages and disadvantages in comparison with PCR method and its application, using the listed literature.

The aim of the experimental part of the diploma thesis was to develop and validate the typing kits TwistAmp[®] exo for a detection of mycoplasma using RPA.

It was ascertained that a detection limit of RPA method is the same as real-time PCR method, i.e. 60 molecules of *M. arginini* synthetic standard per 1 µl. Based on the results of this thesis, the RPA method has a huge potential to become an alternative to the real-time PCR method for a detection of mycoplasma infection in cell lines, despite the different dynamics.

For the acquisition of the CE-IVD certification it will be necessary to execute a few more field test to complete the validation of these typing kits.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Optimalizace mykoplazmového detekčního systému na bázi Rekombinázové polymerázové amplifikační reakce (RPA) vypracovala samostatně za použití uvedených literárních zdrojů pod odborným vedením prof. Mgr. Jiřího Drábka, Ph.D.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Nejdříve bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce, panu prof. Mgr. Jiřímu Drábkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu, trpělivost a čas, který mi věnoval při zpracování této diplomové práce. Děkuji také Anně Korytářové, která se rovněž podílela na optimalizaci mykoplazmového detekčního systému na bázi RPA, členům Laboratoře experimentální medicíny Ústavu molekulární a translační medicíny LF UP a FNOL za jejich pomoc při práci v laboratoři a příjemné prostředí – jmenovitě chci poděkovat Mgr. Heleně Štefanové, Mgr. Barboře Blumové a Veronice Holinkové, DiS. Mé poděkování patří také Bc. Renatě Buriánové za spolupráci při testování.

Dále bych ráda poděkovala své rodině, svým dvěma sourozencům a příteli, kteří mi byli po celou dobu mého studia velkou oporou. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým rodičům za to, že mi umožnili studium, a že mě vždy podporovali.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Literární přehled.....	3
3.1	Mykoplasma.....	3
3.1.1	Charakteristika mykoplazmy	3
3.1.2	Taxonomie	4
3.1.3	Morfologie buněk.....	4
3.1.4	Množení mykoplazmy.....	5
3.1.5	Významní zástupci.....	6
3.1.6	Patogeneze.....	7
3.2	Buněčné kultury	8
3.2.1	Kontaminace buněčných kultur.....	9
3.2.2	Kontaminace buněčných kultur mykoplazmou.....	10
3.3	Metody detekce	12
3.3.1	PCR	13
3.3.2	ne-PCR.....	15
3.3.3	RPA.....	18
4	Materiál a metody	23
4.1	Biologický materiál.....	23
4.2	Použité chemikálie a soupravy	23
4.3	Seznam použitých laboratorních přístrojů a pomůcek	23
4.4	Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	25
4.4.1	Návrh primerů a sondy.....	25
4.4.2	Ověření funkčnosti reagensů k detekci mykoplazmy metodou RPA	27
4.4.3	RPA diluční řada	28
4.4.4	Ověření funkčnosti reagensů při amplifikaci syntetických standardů metodou RPA	30
4.4.5	Real-time PCR diluční řada	30
4.4.6	Ověření funkčnosti RPA systému k detekci mykoplazmy v reálných vzorcích .	31
5	Výsledky	33
5.1	Návrh primerů a sondy.....	33
5.2	Optimalizace metody RPA k detekci mykoplazmy	33
6	Diskuse.....	44
7	Závěr	47
8	Literatura.....	48
9	Přílohy.....	56

Seznam zkratek

ATP	adenosintrifosfát
biotin-TEG	biotin-triethylenglykol
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
HIV	virus selhání lidské imunity (z anglického Human Immuno-deficiency Virus)
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
RT	reverzní transkripce
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>

Seznam obrázků

Obr. 1: Mykoplazmy na snímku z elektronového mikroskopu	5
Obr. 2: Rozmnožovací cyklus mykoplazmy	6
Obr. 3: Míra kontaminace buněčných kultur a její relevantní zastoupení mikrobiálních činitelů.	10
Obr. 4: Počet publikací spojených s metodou RPA od jejího uvedení na trh v roce 2006 až do roku 2019 shromážděných dle informací z „Web of Science“	19
Obr. 5: Schéma RPA	21
Obr. 6: Schéma struktury TwistAmp exo sondy a její štěpení nukleázou	27

Seznam grafů

Graf 1: Amplifikační křivka syntetického standardu mykoplazmy 1929 a negativní kontroly při RPA.	34
Graf 2: Amplifikační křivky diluční řady syntetického standardu mykoplazmy 1929 získané při RPA; 3x ředění.	34
Graf 3: Amplifikační křivky dilučních řad syntetického standardu mykoplazmy 1929 získané při RPA ve třech opakováních (A, B, C); 10x ředění.	36
Graf 4: Amplifikační křivky syntetických standardů s referenčním číslem 1929, 1930, 1931 a negativní kontroly získané při RPA.	37
Graf 5: Amplifikační křivky real-time PCR diluční řady syntetického standardu mykoplazmy 1929; 3x ředění.....	38
Graf 6: Amplifikační křivky real-time PCR diluční řady syntetického standardu mykoplazmy 1929 ve třech opakováních (A, B, C); 10x ředění.....	39
Graf 7: Amplifikační křivky vzorků buněčných linií získané při real-time PCR analýze.	41
Graf 8: Amplifikační křivky vzorků buněčných linií s čísly 2 a 3 a pozitivní kontroly získané při RPA.	42
Graf 9: Amplifikační křivky diluční řady pozitivní kontroly získané při RPA.....	43

Seznam tabulek

Tab. 1: Změny pozorovatelné v buněčných kulturách během infekce s klasickým průběhem podle druhu patogena.....	10
Tab. 2: Seznam metod používaných k detekci mykoplazmové kontaminace a jejich vlastnosti.	13
Tab. 3: Srovnání vybraných izotermických metod amplifikace nukleových kyselin.	19
Tab. 4: Seznam RPA komerčních souprav společnosti TwistDx.....	22
Tab. 5: Složení směsi primerů a sondy pro detekci syntetického standardu 1929 metodou RPA.	28
Tab. 6: Počet molekul syntetického standardu mykoplazmy 1929 v 1 μ l, který se přidává do reakce; 3x ředění.	29
Tab. 7: Počet molekul syntetického standardu mykoplazmy 1929 v 1 μ l, který se přidává do reakce; 10x ředění.	29
Tab. 8: Složení směsi primerů a sondy pro detekci syntetických standardů metodou RPA.	30
Tab. 9: Složení real-time PCR reakční směsi.....	31
Tab. 10: Teplotní a časový profil real-time PCR.	31
Tab. 11: Rozpis pipetování izolované DNA ze vzorků buněčných linií a pozitivní kontroly.....	32
Tab. 12: Rozpis pipetování diluční řady se vzorkem pozitivní kontroly (PC).....	32
Tab. 13: Koncentrace jednotlivých vzorků real-time PCR diluční řady, vypočtená PCR softwarem z kalibrační křivky pro všechna opakování (A, B, C); 10x ředění.....	40

1 Úvod

Mykoplazmy patří mezi nejmenší prokaryotní organismy, které se řadí do třídy *Mollicutes*. Mezi typické vlastnosti těchto bakterií patří neschopnost vytvářet peptidoglykan a další prvky buněčné stěny. Tyto organismy jsou schopné růstu na umělých kultivačních půdách, které jsou obohaceny o prekurzory nukleových kyselin a steroly. Mykoplazmy jsou součástí běžné mikroflóry a některé druhy jsou významnými patogeny sliznice respiračního a urogenitálního traktu.

Technika buněčných kultur nachází široké uplatnění v mikrobiologii, cytogenetice, imunologii a ve výzkumu. Hlavním problémem v technice buněčných kultur je kontaminace mykoplazmou, která vede ke vzniku celé řady změn v buněčných kulturách. Mykoplazmová kontaminace mění reakci buněk na testovaná potenciální léčiva, ale nezpůsobuje výrazné změny v buněčné morfologii, nemění vlastnosti médií a ve velmi rané fázi infekce dosahuje nízké úrovně. Z tohoto důvodu bývají mykoplazmy v buněčných liniích obtížně detekovatelné.

K detekci mykoplazmy v buněčných kulturách se ještě před nástupem metody PCR hojně používaly techniky založené na nepřímém barvení a mikrobiální kultivaci, které mají řadu nevýhod. PCR je stále běžně používanou molekulárně biologickou metodou pro amplifikaci nukleových kyselin, která vyžaduje náročné přístroje vybavení a je poměrně nákladná. V poslední době dochází k rozvoji izotermálních amplifikačních technik, které nevyžadují náročné přístrojové vybavení a lze je tedy použít pro vyšetření přímo u pacienta (POC). Jednou z takových metod je RPA, která je díky své rychlosti, specifitě a cenové dostupnosti používá k identifikaci patogenů.

2 Cíle práce

1. Vypracovat literární rešerši o metodách detekce mykoplazmy a o metodě RPA, o jejím principu/výhodách/nevýhodách ve srovnání s metodou PCR, o jejím použití.
2. Podílet se na vývoji a validaci typizační soupravy k detekci mykoplazmy v buněčných liniích pomocí RPA.

3 Literární přehled

3.1 Mykoplazma

3.1.1 Charakteristika mykoplazmy

Mykoplazmy jsou nejjednodušší a nejmenší prokaryotické buňky. Jsou běžnými kmeny sliznic dýchacího, urogenitálního či trávicího traktu zvířat a lidí s několika patogenními výjimkami. Pružná membrána na povrchu buněk jim dodává plasticitu, a proto jsou schopny procházet přes běžně používané 0,45 μ m mikrobiální filtry (Drexler *et Uphoff*, 2002).

Genom mykoplazmy je nejmenší ze všech bakterií, 580–1358 kb (Halbedel *et Stulke*, 2007). Mykoplazmy neobsahují a nejsou ani schopny vytvářet peptidoglykan a další prvky buněčné stěny. Proto jsou rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům, která inhibují syntézu buněčné stěny bakterií. Oproti tomu jsou mykoplazmy citlivé k antibiotikům ze skupiny tetracyklinů a makrolidů (Bednář *et al.*, 1996).

Ke kultivaci mykoplazmy se používají speciální média, tzv. PPLO (Pleuro Pneumonia Like Organism) agar a bujón, obohacené o prekurzory nukleových kyselin a steroly (Bednář *et al.*, 1996; Votava *et al.*, 2003). Výjimku tvoří zástupci čeledi *Acholeplasmataceae*, kteří ke svému růstu steroly nevyžadují (Greenwood *et al.*, 1999). Součástí kultivačních médií je kvasniční extrakt, pepton a zvířecí sérum, které představuje důležitý zdroj cholesterolu (Votava *et al.*, 2003). Na rozdíl od jiných bakterií je růst mykoplazmy i za optimálních podmínek velmi pomalý (Drexler *et Uphoff*, 2002): generační doba se u většiny mykoplazem pohybuje v řádu několika hodin (Votava *et al.*, 2003). Aby nedocházelo k množení běžných bakterií, bývají součástí půd antibiotika, která působí na buněčnou stěnu (ampicilin nebo penicilin), a nejsou proto vůči mykoplazmě účinná (Votava *et al.*, 2003; Vejražka 2008).

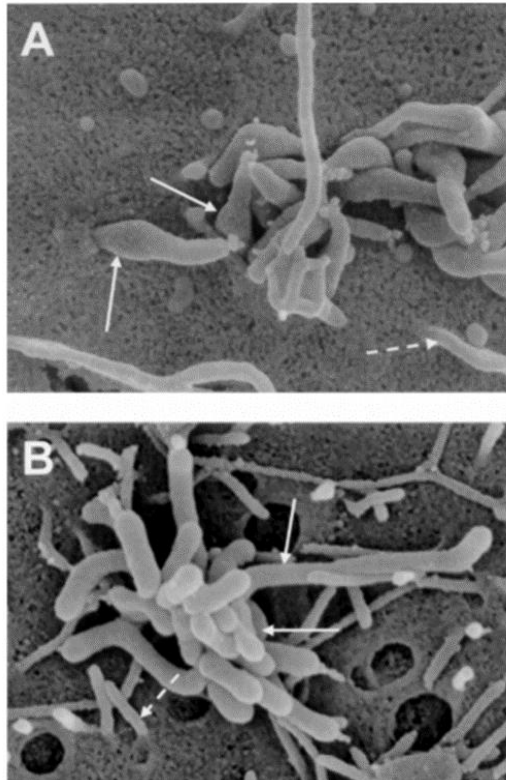
Mykoplazmy využívají jako zdroj energie buď aminokyselinu arginin, nebo sacharidy, převážně glukózu. Fermentující mykoplazmy, využívají jako zdroj energie sacharidy katabolizují glukózu (nebo jiné sacharidy) glykolytickou drahou na kyselinu mléčnou, zatímco nefermentující mykoplazmy metabolizují arginin na amoniak, ATP a CO₂ (Greenwood *et al.*, 1999). Například *M. hominis* využívá jako hlavní zdroj energie arginin a *M. pneumoniae* fermentuje glukózu (Votava *et al.*, 2003).

3.1.2 Taxonomie

Mykoplazmy patří mezi nejmenší známá prokaryota, která řadíme do třídy *Mollicutes* (Greenwood *et al.*, 1999). Řád *Mycoplasmatales* má tři čeledi *Mycoplasmataceae*, *Spiroplasmataceae* a *Acholeplasmataceae*. Čeleď *Mycoplasmataceae* obsahuje dva rody významné pro člověka *Mycoplasma* a *Ureaplasma* (Bednář *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 1999). Rod *Ureaplasma* obsahuje šest druhů (Votava *et al.*, 2003), které se převážně vyskytují v ústech, urogenitálním a respiračním traktu člověka a dalších živočichů (Sedláček, 2007). Rod *Mycoplasma* je reprezentován více než sto druhy (Young *et al.*, 2010), které se vyskytují na povrchu rostlin, u hmyzu, vyšších živočichů, ale i u člověka (Votava *et al.*, 2003). Čeleď *Acholeplasmataceae* sestává pouze z rodu *Acholeplasma*, jehož zástupci osidlují prostředí půdy a vody a nepotřebují ke svému růstu steroly (Bednář *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 1999). Pro rostliny a hmyz je patogenní rod *Spiroplasma* čeledi *Spiroplasmataceae* (Bednář *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 1999).

3.1.3 Morfologie buněk

Mezi charakteristické vlastnosti buněk mykoplazmy patří jejich rozdílná velikost a mnohotvárnost (Obr. 1) (Bednář *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 1999). Velikost nejmenších životaschopných buněk je 100 nm a buňky mykoplazmy dosahují velikostí až 1 μm . Mykoplazmy vytvářejí velmi malé kolonie (do 0,5 mm). Struktura a metabolismus buněk mykoplazmy patří k velmi jednoduchým. Povrch buněk je kryt třívrstvou cytoplazmatickou membránou, jejíž významnou složkou je cholesterol, který se podílí na osmotické stabilitě membrány. Z tohoto důvodu je pro růst mykoplazem živočichů na kultivačních půdách nutno přidat sterol do séra. (Bednář *et al.*, 1996)



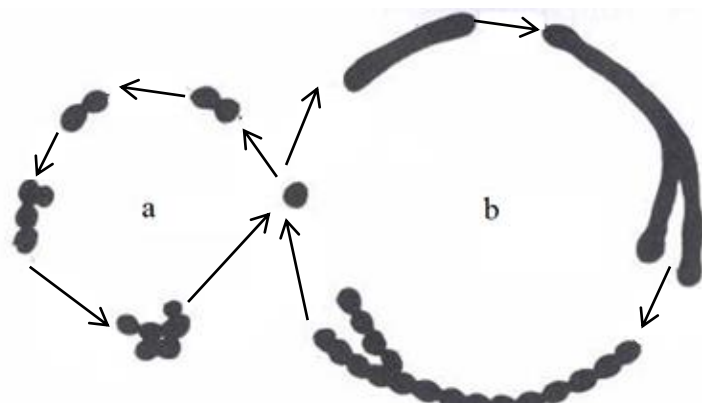
Obr. 1: Mykoplazmy na snímku z elektronového mikroskopu. Fotografie poskytl Dr. Manfred Rohde, GBF, Braunschweig, Německo (převzato z Drexler *et Uphoff*, 2002).

(A) HELA buňky infikované *M. penetrans*. Šipky značí mykoplazmu pronikající přes buněčnou membránu. Přerušovaná šipka značí mikrovilky eukaryotické buňky. Zvětšení 30000×.

(B) MDCK buněčná linie infikována *M. arginini*. Šipka značí mykoplazmu. Přerušovaná šipka značí mikrovilky. Zvětšení 30000×.

3.1.4 Množení mykoplazmy

Buňky mykoplazmy se množí binárním dělením, při němž dochází k opožděnému dělení cytoplazmy oproti replikaci jádra, což vede ke vzniku monohojaderných vláken. Zaškrcováním membrány v oblastech mezi dvěma genomy dochází k dělení cytoplazmy. To vede ke vzniku korálkovitých řetízků, které se dále rozpadají a tím vznikají jednotlivé buňky (kokovitá tělíska) (Obr. 2) (Bednář *et al.*, 1996; Greenwood *et al.*, 1999). Následně se celý cyklus opakuje. Jestliže není cytoplazma rovnoměrně rozdělena mezi dvě dceřiné buňky, může buňka začít pučet (Greenwood *et al.*, 1999).



Obr. 2: Rozmnožovací cyklus mykoplazmy (převzato z: Bednář *et al.*, 1996).

(a) binární dělení

(b) vytvoření mnohojaderných vláken a jejich rozpad v jednotlivé buňky

3.1.5 Významní zástupci

Mykoplazmy u člověka osidlují sliznici respiračního a urogenitálního traktu. Primárním patogenem respiračního traktu je druh *M. pneumoniae*. Mezi nepatogenní druhy, které jsou součástí přirozené flóry dutiny ústní, patří *M. orale*, *M. salivarium* a *M. buccale*. Sliznici lidského genitálu osidlují druhy *M. fermentans*, *M. hominis*, *M. genitalium* a *Ureaplasma urealyticum*, která vyvolává u žen zánět poševní sliznice (Bednář *et al.*, 1996; Schindler 2008).

Existuje také možná souvislost mezi mykoplazmovou infekcí a tumorigenezí. Například druhy *M. fermentans* a *M. penetrans* mohou vyvolávat maligní transformaci buněk (Tsai *et al.*, 1995) a *M. genitalium* může vést k maligní transformaci benigních lidských epiteliálních buněk (Namiki *et al.*, 2009). *M. hyorhinae* byla detekována v klinických vzorcích lidského karcinomu a podporuje invazivitu rakovinných buněk a metastázování (Huang *et al.*, 2001; Gong *et al.*, 2008).

M. pneumoniae vyvolává primární atypickou pneumonii (PAP), která je prokazatelná rentgenovým nálezem (Bednář *et al.*, 1996). I přesto, že se infekce přenáší snadno kapénkovou cestou, bronchopneumonie se objeví pouze u 3–20 % nemocných osob (Votava *et al.*, 2003). Zbylé mykoplazmové infekce probíhají asymptomaticky nebo v podobě mírného respiračního onemocnění. Mezi příznaky onemocnění patří zvýšená teplota, malátnost, pocit ucpaného nosu, bolest svalů nebo bolest v krku (Greenwood *et al.*, 1999; Votava *et al.*, 2003).

3.1.6 Patogeneze

Antigeny mykoplazmy působí na imunitní systém svého hostitele interakcí s lymfocyty. Superantigeny, látky produkované mykoplazmou, mají schopnost se vázat na povrch lymfocytů a chovat se jako mitogeny. V *in vitro* podmínkách jsou mykoplazmy také schopny aktivovat cytotoxické T-lymfocyty (Votava *et al.*, 2003).

M. pneumoniae parazituje na povrchu membrán infikovaných buněk bez pronikání do nitra buněk. V dýchacích cestách *M. pneumoniae* proniká přes mukociliární vrstvu sliznice a přilne k povrchu epitelových buněk. Hlavním adhezínem přilnavosti mykoplazmy na povrch hostitelské buňky je membránový protein označován jako P1. (Bednář *et al.*, 1996).

3.2 Buněčné kultury

Buněčné kultury jsou tvořeny izolovanými buňkami, které rostou v kontrolovaném *in vitro* prostředí (Hudu *et al.*, 2016). K založení buněčné kultury se nejčastěji používají buňky izolované z laboratorního zvířete nebo člověka, zřídka i z hmyzu nebo rostlin (Vejražka, 2008).

Buněčné kultury se používají ke kultivaci virů (buď za účelem zjištění původce nákazy, nebo k produkci očkovacích látek), cytogenetickému vyšetření chromosomů a k testování účinků toxických látek nebo potenciálně léčivých molekul (Šebek, 2018). Savčí buněčné kultury se běžně používají k produkci rekombinantních glykoproteinů, virových vakcín a protilátek (Schwarzer *et al.*, 2009). Své uplatnění nacházejí také při screeningu a prvotní charakterizaci potenciálních protinádorových léčiv (Yamaguchi *et al.*, 2013) a při testování cytotoxicity nanomateriálů a mikroplastů na buněčné úrovni (Schirinzi *et al.*, 2017). Použití kultivovaných buněk jako pokusných biologických modelů má ve srovnání s použitím laboratorních zvířat nebo izolovaného orgánu či tkáně, celou řadu výhod. Jednou z nich je krátká doba kultivace a také možnost provádět pokusy, které vedou ke zničení kultivovaných buněk (Vejražka, 2008).

Buněčné kultury mají ale i řadu nevýhod, které je omezují v jejich použití. Kultivované buňky se pěstují za nefyziologických podmínek. Buňky rostou v kultivačním médiu, které svým složením přesně neodpovídá složení vnitřního prostředí daného organismu, a v atmosféře s rozdílným tlakem kyslíku. Kultivovaným buňkám chybí také kontakt s jinými buněčnými populacemi, mezi kterými dochází v *in vivo* prostředí ke komunikaci a výměně látek (Vejražka, 2008). Dvourozměrné buněčné kultury se vyznačují velmi malou fyzickou, molekulární a fyziologickou podobností s původními tkáněmi. Proto se začaly využívat trojrozměrné systémy buněčných kultur, tzv. organoidy, které se velmi podobají *in vivo* orgánu nebo tkáni, ze které byly získány. Komplexní prostorová morfologie trojrozměrných organoidů umožňuje mezibuněčné interakce a interakce buňka-extracelulární matrix (Hynds *et al.*, 2013).

K přežití a proliferaci kultivovaných buněk je potřeba zajistit vhodné podmínky *in vitro*. Jednou z nich je složení média pro kultivaci, povrch kultivační nádoby a podmínky prostředí (složení atmosféry a teplota). Optimální teplota pro kultivaci buněk je teplota podobná tělesné teplotě daného organismu, nejčastěji tedy 37 °C. Kultivační médium obsahuje živiny, glukózu nebo jiný zdroj energie, anorganické soli, pufrý, bílkoviny, vitamíny, růstové faktory, lipidy, stopové prvky a mastné kyseliny. Spousta z výše uvedených látek bývá součástí kultivačního média typu krevní sérum, kterým dodáváme do média spoustu významných sloučenin pro růst buněk. Použití sér má i spoustu nevýhod, např. jejich složení se liší dle původce a nelze je přesně definovat (Votava *et al.*, 2003; Vejražka, 2008).

3.2.1 Kontaminace buněčných kultur

Kontaminace buněčných kultur se dělí na chemickou a mikrobiální kontaminaci, která se dále dělí na virovou, mykotickou a bakteriální kontaminaci. K nejčastějším příčinám kontaminace buněčných kultur patří v současné době nesprávná manipulace, proto je nutné dodržovat aseptický způsob práce, který brání zavlečení nejrůznějších bakterií, spór nebo plísní (Šebek, 2018). Mirjalili *et al.* (2005) ve své retrospektivní studii zjistili, že 39 % vzorků buněčných linií podlelo kontaminaci. Mezi hlavní činitele vyvolávající kontaminaci patřila mykoplazma (19 %), dále pak smíšená infekce (8 %), houby (8 %) a bakterie (4 %) rodu *Bacillus*, *Enterococcus* a *Staphylococcus* (Obr. 3).

Chemická kontaminace je v dnešní době méně častá, jelikož k vyplavování škodlivých látek z materiálů docházelo hlavně v minulosti. Mezi toxické prvky, které se uvolňovaly mezi buňky do roztoku, patřila rtuť, arsen nebo indium, které v množství 0,5–1 mmol/l vyvolává okamžitou nekrózu buněk (Šebek, 2018).

Mikrobiální kontaminace kultur může způsobit vážné problémy. U prokaryotických patogenů může být průběh infekce klasický, doprovázený změnami v morfologii kultur a fyzikálně chemickými změnami nebo latentní, bez projevů (Tab. 1) (Šebek, 2018).

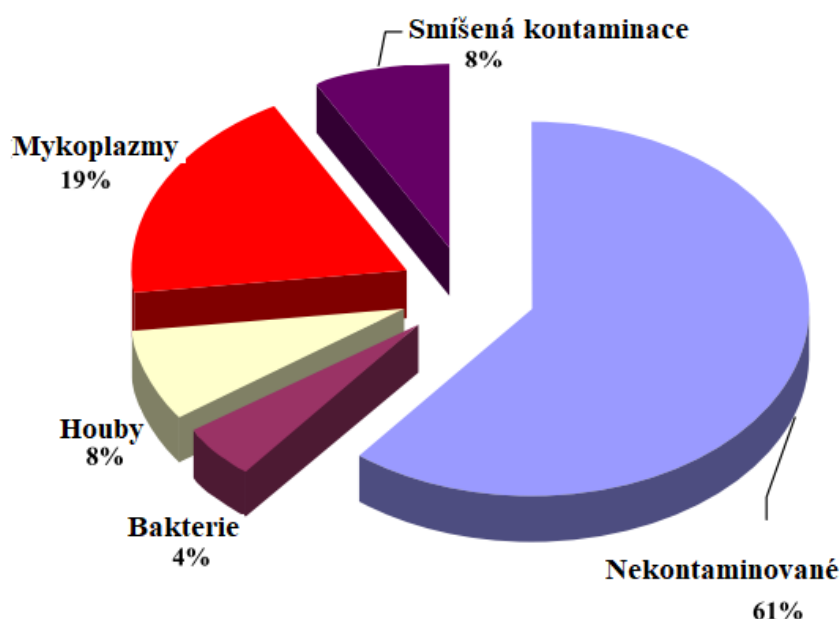
K virovým kontaminacím buněčných kultur nedochází příliš často, jelikož jsou viry schopny replikace pouze v některých buňkách. K nejčastějším patogenům způsobující kontaminaci patří respirační a herpetické viry, které jsou přenášeny personálem, méně častěji z chybně ošetřených sérových doplňků. Napadené buňky vykazují značné morfologické deformace (cytopatický efekt, CPE). Díky nim lze snadno virovou kontaminaci nepřímo odhalit během mikroskopické kontroly růstu buněk (Šebek, 2018).

Častěji se v laboratořích setkáváme s mykotickými kontaminacemi kultur, které lze na základě jejich morfologie snadno odhalit pod mikroskopem. Výskyt kvasinek nebo plísní v buněčných kulturách je spojen se zakalením média a posunem pH do alkalické oblasti (Šebek, 2018).

Bakteriální kontaminace patří k nejčastějším nákazám buněčných kultur. Dostatečné množství nutričních složek v kultivačních médiích představuje vhodné podmínky pro řadu bakterií, např. rodu *Staphylococcus*, *Streptococcus* nebo rodu *Escherichia*. Prokaryotické mikroorganismy mají krátkou generační dobu, tudíž případná infekce vede rychle ke kompletnímu znehodnocení buněčných kultur. Bakteriální kontaminaci kultur lze snadno odhalit pod mikroskopem: v médiu můžeme pozorovat tvorbu zákalu a dochází také k poklesu pH (Šebek, 2018).

Tab. 1: Změny pozorovatelné v buněčných kulturách během infekce s klasickým průběhem podle druhu patogena (převzato z: Šebek, 2018).

Typ infekce	Fyzikálně chemické změny	Mikroskopické změny
Bakteriální	pokles pH, tvorba zákalu	přítomnost bakterií
Mykoplazmová	téměř beze změn	téměř beze změn
Mykotická	nárůst pH, tvorba zákalu	přítomnost kvasinek, mykotických vláken
Virová	beze změn	někdy přítomen cytopatický efekt u buněk



Obr. 3: Míra kontaminace buněčných kultur a její relevantní zastoupení mikrobiálních činitelů (převzato z Mirjalili *et al.*, 2005).

3.2.2 Kontaminace buněčných kultur mykoplazmou

Nejkomplikovanější infekce způsobují bakterie, pro které je charakteristický intracelulární parazitizmus, např. chlamýdie, ureaplazmy a hlavně mykoplazmy (Šebek, 2018). Mykoplazmy jsou schopny infikovat téměř všechny buněčné linie a přežívají po dlouhou dobu v savčích buňkách (Yavlovich *et al.*, 2004). Až třetina buněčných linií, které se používají pro výzkumné experimenty, je infikována právě mykoplazmou (Timenetsky *et al.*, 2006). Primární buněčné kultury a časně pasážované buněčné kultury bývají méně často kontaminované mykoplazmou než vícekrát pasážované lidské nebo zvířecí buněčné linie (Drexler *et Uphoff*, 2002).

Mykoplazmy mohou kontaminovat buněčné kultury několika způsoby. Mezi nejčastější zdroje kontaminace patří původní izolovaná tkáň, kultivační roztoky (fetální bovinní sérum), laboratorní personál nebo křížová kontaminace z jiné infikované buněčné kultury (Drexler

et Uphoff, 2002). U napadených linií dochází ke zpomalení proliferační aktivity a ke změně přirozených fenotypových projevů, za což jsou odpovědné bakteriální enzymy, které přímo zasahují do syntézy proteinů, nukleových kyselin a sacharidů (Šebek, 2018). Mykoplazmová kontaminace má u eukaryotických buněk vliv na signální transdukcii, podporu buněčné transformace, indukci chromozomálních aberací (numerické a strukturální změny), indukci nebo inhibici aktivace lymfocytů, indukci nebo potlačení exprese cytokinů a další. Účinek mykoplazmy je u různých typů buněk odlišný (Drexler *et Uphoff, 2002*). Mykoplazmy nezpůsobují výrazné změny v buněčné morfologii, nemění vlastnosti médií a nevedou ani k okamžitému zániku buněčných kultur (Šebek, 2018). Jak bylo napsáno výše, mykoplazmy jsou také rezistentní k běžně používaným antibiotikům (Nikfarjam *et Farzaneh, 2012*). Buněčné linie mohou být delší dobu infikované latentně a mykoplazmy se tak s každým pasážírováním mohou snadno šířit do subkultur, což může mít negativní vliv na testování nových protinádorových léčiv (Šebek, 2018). Mezi nejčastější druhy způsobující infekci patří *M. arginini*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. orale*, *M. hyorhinae* a *Acholeplasma laidlawii* (Drexler *et Uphoff, 2002*). Primárními zdroji kontaminace *M. fermentans*, *M. orale* a *M. hominis* jsou osoby, které pracují s buněčnými kulturami a zdroji kontaminace *M. hyorhinae*, *M. arginini* a *Acholeplasma laidlawii* jsou zvířecí dárci tkání a biologické složky používané pro buněčné kultury (např. trypsin a telecí sérum) (Razin *et Tully, 1995*).

3.3 Metody detekce

Jedním z hlavních problémů v technice buněčných kultur je mykoplazmová infekce (Drexler *et Uphoff*, 2002). Koncentrace mykoplazmy může dosáhnout 10^8 buněk na ml média tkáňové kultury, aniž by došlo k zakalení nebo zjevnému vlivu na růst buněk. U mnoha buněk je kontaminace mykoplazmou velmi nízká a její detekce je možná pouze pomocí vysoce citlivých metod (Hay *et al.*, 1989). Proto je v mnoha laboratořích, které neprovádějí testy na mykoplazmu nebo používají méně citlivé metody detekce, vysoká pravděpodobnost neodhalené infekce buněčných kultur (Young *et al.*, 2010).

Je důležité, aby všechny nové buněčné kultury, které vstupují do laboratoře a všechny buněčné banky byly testovány na přítomnost mykoplazmy (Young *et al.*, 2010). Rutinním vyšetřením buněčných kultur můžeme snížit nebezpečí skrytých mykoplazmových infekcí (Nikfarjam *et Farzaneh*, 2012).

V současné době existuje několik metod, které se používají k detekci mykoplazmové infekce (Tab. 2). Tyto metody lze rozdělit do několika skupin (Drexler *et Uphoff*, 2002; Uphoff *et Drexler*, 2009; Ligasová *et al.*, 2019):

- histologické barvení
- elektronová mikroskopie (transmisní a skenovací elektronová mikroskopie)
- DNA fluorochromové barvení (např. DAPI, Hoechst 33258)
- mikrobiologický přístup (kultivace na agaru/bujónu)
- biochemické metody (např. testy založené na měření enzymatické aktivity, gradientová/elektroforetická separace značené RNA)
- imunologické metody (ELISA, autoradiografie, fluorescenční/enzymatické barvení s protilátkami, imunofluorescence) (Razin *et Tully*, 1996)
- RNA hybridizace (např. hybridizace v kapalném roztoku nebo na filtru)
- polymerázová řetězová reakce (PCR) a real-time PCR

Pro spolehlivou detekci mykoplazmy v buněčných kulturách je doporučeno použít právě dvě z těchto technik: metody založené na PCR, nepřímé barvení a kultivace na bujónu nebo agaru (Young *et al.*, 2010). Testy mohou být provedeny buď přímo na vzorku odebraném z buněčné kultury anebo nepřímo pomocí tzv. indikátorové buněčné kultury, při níž je vzorek naočkovan do jiné buněčné kultury, která neobsahuje mykoplazmu (např. buněčné linie Vero). Použití indikátorových buněčných linií vede k lepší standardizaci a umožňuje zahrnout do každého testu vhodnou pozitivní a negativní kontrolu (Drexler *et Uphoff*, 2002).

Optimální metody detekce by měly splňovat následující kritéria: vysoká specifita, efektivita, rychlost, jednoduchost a nízké náklady. Vyhodnocení testů zahrnuje komponenty

validity vztahující se k analytickým parametrům jako je senzitivita, specificita, přesnost a prediktivní hodnota. K dalším parametrům hodnocení testu patří opakovatelnost a reprodukovatelnost. Velké množství metod je závislých na interpretaci a subjektivním čtení výsledků, které vyžadují zkušenosti (Uphoff *et al.*, 1992b).

Tab. 2: Seznam metod používaných k detekci mykoplazmové kontaminace a jejich vlastnosti (Převzato z Young *et al.*, 2010).

Název metody	Citlivost	Výhody	Nevýhody
PCR	vysoká	rychlost	optimalizace
Nested PCR	vysoká	rychlost	falešné pozitivita
Přímé barvení DNA	nízká	rychlost a cenová dostupnost	obtížná interpretace
Nepřímé barvení DNA	vysoká	snadná interpretace	časově náročné
Kultivace na agaru a bujónu	vysoká	citlivost	pomalé a může vyžadovat odbornou interpretaci
ELISA	mírná	rychlost	omezený rozsah detekce druhů
Autoradiografie	mírná	rychlost	obtížná interpretace, je-li kontaminace na nízké úrovni
Imunobarvení	mírná	rychlost	obtížná interpretace, je-li kontaminace na nízké úrovni

3.3.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) je rozšířená v laboratořích po celém světě (de Paz *et al.*, 2014). Jedná se o cyklický proces, při kterém dochází k exponenciální amplifikaci každé jednotlivé molekuly nukleové kyseliny na miliardy kopií *in vitro*. PCR reakce je složena ze tří důležitých kroků: denaturace, hybridizace (annealing) a elongace, řízených změnami teplot. Tímto se PCR řadí mezi neizotermální metody. PCR reakce začíná při teplotě 95 °C, kdy dochází k denuraci dvouřetězcové DNA; poté se teplota sníží na 50–65 °C, což umožní nasednutí primerů (annealing) (Mullis *et Faloona*, 1987) a poté dojde opět ke zvýšení teploty na 70–74 °C, což umožní DNA polymeráze syntetizovat druhý řetězec DNA (Saiki *et al.*, 1988).

PCR

Metoda PCR se používá k detekci kontaminace buněčných kultur a k identifikaci mykoplazem. Jedná se o rychlou a citlivou metodu. Primery byly navrženy z konzervované oblasti genu 16S ribozomální RNA (rRNA) a slouží k identifikaci nejběžnějších druhů mykoplazem kontaminující buněčné kultury (Rawadi *et Dussurget*, 1995). Byly popsány téměř všechny mykoplazmové 16S rRNA sekvence, jenž tvoří základ pro systematickou fylogenetickou analýzu třídy *Mollicutes* (Drexler *et Uphoff*, 2002). Metoda PCR zahrnuje použití rodově-specifických primerů, popřípadě druhově-specifických primerů pro každý organismus nebo primerů založených na 16S–23S rRNA oblastí rodu *Mycoplasma* (Harasawa *et al.*, 1993, Harasawa 1996).

PCR může být provedena s lyofilizovaným nebo zmrazeným vzorkem, což umožňuje provádět i retrospektivní analýzu. Další výhodou těchto vzorků je jejich snadná přeprava, skladování a odběr (Drexler *et Uphoff*, 2002).

Při rutinní diagnostice není vyžadována vysoká úroveň citlivosti, jelikož akutní a hlavně chronické mykoplazmové infekce buněčných kultur obsahují velký počet organismů (obvykle 10^6 nebo vyšší). Vysoká úroveň citlivosti je výhodná ve velmi rané fázi infekce nebo za situace, kdy je potlačen růst mykoplazmy, což může být například během testování buněčných kultur po ošetření antibiotiky za účelem odstranění kontaminace. Metoda PCR není omezena schopností mykoplazem růst v kultuře, a proto by mohla nahradit metodu kultivace v umělém médiu. Pomocí PCR lze detekovat jedinou buňku mykoplazmy a to z ní činí jednu z nejcitlivějších detekčních metod (Drexler *et Uphoff*, 2002).

Real-time PCR

Real-time PCR neboli PCR s detekcí v reálném čase s možností kvantifikace představuje modifikaci klasické PCR, pomocí které lze sledovat nárůst DNA během každého cyklu. Množství DNA je v průběhu každého cyklu kontinuálně zaznamenáváno pomocí speciálního přístroje tzv. real-time PCR termocykléru, což představuje rozdíl oproti klasické PCR, kdy je zaznamenán až výsledný produkt pomocí elektroforézy (McPherson *et Møller*, 2000; Logan *et al.*, 2009). Real-time PCR využívá k detekci fluorescenci, jejíž emitování je přímo úměrné množství amplikonu (Higuchi *et al.*, 1993). K vizualizaci nárůstu počtu amplikonů se používají interkalační činidla (např. SYBR Green a ethidium bromid) a specifické sondy (např. TaqMan a FRET sondy), které se váží na amplifikovanou DNA. Interkalační barviva se vmezeřují mezi páry na jakémkoliv místě v dsDNA (Arya *et al.*, 2005). Nevýhodou interkalačních činidel je, že detekují veškerou dsDNA, tedy i nespecifické produkty PCR (Kaltenboeck *et Wang*, 2005). Oproti tomu specifické sondy jsou představovány oligonukleotidy a hybridizují s vytvořeným amplikonem (Valentová, 2018). Například TaqMan sondy mají na svém 5' konci reportér (fluorescenční značku) a na 3' konci zhášeč. Taq DNA polymeráza syntetizuje nový řetězec a díky své exonukleázové

aktivitě štěpí specifickou sondou, což vede k oddělení zhášeče od fluoroforu a dochází k emisi fluorescence (Didenko, 2006).

Metoda real-time PCR není schopna rozlišit mezi mykoplasma-specifickým a nespecifickým PCR produktem. Identifikace mykoplasma-specifického produktu vyžaduje stanovení bodu tání PCR produktu nebo může být provedena reakce s třetím fluorescenčně značeným oligonukleotidem se zhášečem, který specificky hybridizuje na amplifikovaný produkt mykoplazmové DNA (Uphoff *et* Drexler, 2009).

Množství cílové DNA lze kvantifikovat pomocí paralelních reakcí s kalibrační řadou standardů, což ale není pro detekci kontaminace mykoplazmou nutné (Uphoff *et* Drexler, 2009).

Nested PCR

Amplifikace může být provedena jako jednokroková PCR nebo dvoukroková PCR tzv. Nested PCR. Nested PCR zvyšuje specifitu a citlivost reakce, ale také zvyšuje riziko kontaminace přenosem DNA (Drexler *et* Uphoff, 2002). Reakce využívá dvou párů primerů: vnější a vnitřní. Nejprve je provedena amplifikace s vnějšími páry primerů a vzniklý produkt slouží jako templát pro amplifikaci s vnitřními primery. Použitím dvou párů primerů dojde ke zvýšení pravděpodobnosti amplifikace specifické sekvence (Labguide).

3.3.2 ne-PCR

Před příchodem PCR a RNA hybridizace bylo za tzv. „zlaté standardy“ považováno fluorochromové barvení DNA (Hoechst a DAPI barvení) a mikrobiální kultivace (McGarity *et al.*, 1985; Barile *et* Rottem, 1993). K detekci mykoplazmové kontaminace lze také použít komerčně dostupné diagnostické soupravy, které jsou založené na imunologické a biochemické detekci. Avšak pomocí jediného testu nelze detekovat všechny druhy mykoplazem, které kontaminují buněčné kultury (Uphoff *et al.*, 1992a).

Mikrobiologická kultivace

K přímému průkazu mikroorganismů se používá jejich kultivace. Ke kultivaci se používají sterilní živné půdy (médiá), která splňují požadavky jednotlivých mikroorganismů na výživu, osmotický tlak a pH (Kopecká *et* Rotková, 2017). Živné půdy se podle své konzistence dělí na tekuté (bujón) a pevné (bujónový základ ztužen agarem) (Kurková, 2009). Jednou z nejdůležitějších složek kultivačních médií je krevní sérum, které se skládá ze směsi albuminů, růstových faktorů a růstových inhibitorů (Lane *et* Miller, 1976). Sérum slouží jako zdroj aminokyselin, proteinů, vitamínů (především se jedná o vitamíny rozpustné v tucích), lipidů, hormonů, uhlohydrátů, minerálů, růstových faktorů a stopových prvků. Telecí fetální séra se používají k podpoře růstu buněk v kultuře (von Seefried *et* Macmorine, 1976).

Vzorky buněčných kultur jsou naočkovány nejprve do bujónu určeného pro mykoplazmu a následně na agar. Součástí bujónu i agaru je octan thallný, který inhibuje růst běžných bakterií, ale na růst mykoplazem nemá žádný vliv. Je doporučováno provádět kultivaci za anaerobních podmínek, jelikož aerobní kultivace vede k nižší rychlosti detekce. Po 4 až 7 dnech inkubace se bujóny se vzorky přenesou na agarové plotny. Většina mykoplazem vytváří malé kolonie (průměr 100–400 µm) připomínající „smažené vejce“, které rostou pod povrchem agaru (McGarity *et al.*, 1985; Barile *et Rottem*, 1993)

K výhodám této metody patří jednoduchá manipulace a vizuální rozpoznávání kolonií. Mykoplazmové kolonie izolované z různých buněčných kultur se navzájem liší ve své morfologii, velikosti a rychlosti růstu. Kolonie lze detekovat po 3–6 dnech, ale i později. Mezi „nekultivovatelné“ mykoplazmy patří druh *M. hyorhinae*, který roste špatně anebo vůbec na bujónech nebo agarových médiích (Uphoff *et Drexler*, 2009). Pro průkaz *M. hominis* se používají tekutá média obsahující arginin, zatímco k izolaci *M. pneumoniae* slouží pevné agarové půdy obsahující glukózu. Tekuté médium s obsahem urey slouží zase k zachycení *Ureaplasma urealyticum*. Mykoplazmy během svého růstu nekálí bujón, a proto se k detekci jejich množení přidává do půdy indikátor pH (Votava *et al.*, 2003).

Metoda mikrobiologické kultivace je vysoce citlivá a levná referenční metoda, která se vyznačuje také vysokou mírou detekce. K jejím nevýhodám patří dlouhá inkubační doba, nutnost zkušenosti s interpretací výsledků, neschopnost kultivovat všechny druhy mykoplazem a potřeba společně kultivovat pozitivní kontroly, s čímž souvisí určité riziko kontaminace (Uphoff *et Drexler*, 2009).

DNA fluorochromové barvení

Fluorescenční barviva, vázající se na DNA byla poprvé použita k detekci mykoplazmové infekce v sedmdesátých letech. Mezi nejpoužívanější barviva patří DAPI a Hoechst 33258. Fluorescenční barviva se selektivně a rychle vážou na eukaryotickou a prokaryotickou DNA, se kterou vytvářejí silné fluorescenční komplexy DNA-barvivo s vysokou specificitou. Pod fluorescenčním mikroskopem dochází u nekontaminované buněčné kultury k jaderné fluorescenci na tmavém pozadí. Mitochondriální DNA má také schopnost vázat fluorochrom, avšak na zanedbatelné úrovni pro rutinní mikroskopii (Uphoff *et Drexler*, 2009). Metody DNA fluorochromového barvení se dělí na přímé a nepřímé.

Přímé barvení buněčných kultur se nedoporučuje, jelikož přináší často nejasné výsledky a spolehlivě detekuje pouze silně kontaminované kultury. Interpretace výsledků je obtížná při nízkém počtu mykoplazem, při kontaminaci jinou bakterií nebo při přítomnosti degradované buněčné DNA, která může vyvolat vznik malých teček fluorescence, jenž se podobají mykoplazmě (Freshney, 2005). Přímé barvení buněčných linií DNA barvivy přináší výsledky do 24 hodin, avšak s nízkou citlivostí.

Vyšší citlivosti lze dosáhnout společnou kultivací testované buněčné linie v přítomnosti indikátorové buněčné linie (např. Vero buněčná linie, MDCK a A549 buněčné linie), poté se tato metoda označuje jako nepřímé barvení DNA (Freshney, 2005; SigmaAldrich). Mykoplazmovou DNA lze pozorovat jako malé tečky nebo skvrny fluorescence, které se nacházejí na povrchu buněk, v okolním médiu a na kultivační misce, zatímco buněčná jádra se jeví jako velké fluorescentní oválné oblasti (Young *et al.*, 2010).

Pomocí DNA fluorochromového barvení můžeme detekovat titry 10^5 organismů na ml anebo vyšší. Falešně pozitivní výsledky mohou být způsobeny barvením artefaktů nebo buněčným detritem. Především apoptické buňky mohou napodobovat infikované buněčné kultury. Stav buněčné kultury je proto rozhodující pro kvalitu testu. Tato metoda je závislá na intenzitě infekce, jelikož pomocí ní můžeme identifikovat pouze masivně kontaminované kultury, což může snadno vést ke vzniku falešných negativit. Většina falešně negativních a falešně pozitivních hodnot je způsobena nejednoznačným barvením, které vyvolává potíže při interpretaci výsledků. Použití indikátorové buněčné linie výrazně zvýšilo citlivost, přesnost a specifickou této metody (Uphoff *et al.*, 1992b).

Mezi nevýhody fluorochromových testů patří nutnost trvale udržovat adherentní buněčnou linii a prodloužená inkubační doba. Buněčná kultura může být kontaminovaná také jinými druhy bakterií, které produkují extracelulární fluorescenční signály, čímž způsobují problémy s interpretací výsledků (Vankuppeveld *et al.*, 1994). K výhodám těchto testů patří jednoduchost, nízká cena a lze je použít k pravidelnému screeningu (Uphoff *et al.*, 2009).

Imunofluorescence:

Metoda imunofluorescence vizualizuje reakci antigen-protilátka pomocí fluorescence (Bartůňková *et al.*, 2005). Tato metoda je založena na fluorochromovém značení antigenů nebo protilátek, které se specificky vážou ke stanovované látce. Imunofluorescenci dělíme na přímou, též označovanou jako jednostupňovou a nepřímou neboli dvoustupňovou. U přímé imunofluorescence se protilátka značená fluorochromem váže přímo na antigen, čímž jej vizualizuje. Přímá metoda se využívá k průkazu antigenů v tkáňových nebo buněčných kulturách. U nepřímé imunofluorescence se detekce specifických protilátek provádí přidáním vhodných antigenních substrátů. Pokud jsou ve vzorku přítomny protilátky, dojde k jejich navázání na antigenní substráty a vznikne imunokomplex, který je detekován pomocí sekundární protilátky s fluorescenčním barvivem. Nepřímá metoda se využívá k průkazu protilátek, nejčastěji autoprotilátek (Litzman *et al.*, 2007). Přítomnost nebo nepřítomnost fluorescence je vyhodnocena pomocí fluorescenčního mikroskopu. Hlavní nevýhodou metody je subjektivní hodnocení výsledků (Bartůňková *et al.*, 2005).

Ligasová *et al.* (2019) vyvinuli nový imunofluorescenční test k detekci mykoplazmy v buněčných kulturách, který je založený na enzymatickém značení DNA mykoplazmy pomocí

DNA polymerázy I a modifikovaných nukleotidů, s následnou detekcí využívající specifické protilátky. Po začlenění modifikovaných nukleotidů do DNA mykoplazmy následuje vizualizace pomocí imunofluorescenční mikroskopie. Jedná se o rychlou metodu, pomocí které můžeme detekovat nekultivovatelné mykoplazmy a nedochází při ní k intenzivnímu barvení jaderné DNA a bakterií s buněčnou stěnou. Ve srovnání s metodou, která je založena na přímém značení pomocí barviv DAPI nebo Hoechst má tento přístup vyšší citlivost. K nevýhodám této metody patří souběžné barvení mitochondriální DNA, a proto je vhodné pro zvýšení citlivosti použít mitochondriální markery (např. MTCO2).

3.3.3 RPA

In vitro amplifikace nukleových kyselin se využívá v klinické diagnostice, forenzní vědě, epidemiologii, ve výzkumu a v mnoha dalších oborech (Moore, 2005). PCR je neizotermální metoda, vyžadující změny teplot v průběhu své reakce, ke kterým využívá programovatelný termoblok – termocyklér. Z tohoto důvodu ji nelze použít pro vyšetření přímo u pacienta (tzv. point-of-care, POC) (Li *et Macdonald*, 2015).

V poslední době došlo k velkému rozvoji izotermálních amplifikačních technik (Tab. 3), které mají oproti PCR dvě zásadní výhody. Zaprvé, metody založené na izotermální amplifikaci replikují nukleové kyseliny při jediné teplotě, bez použití termocykléru, což vede k použití této metody při POC diagnostice (Li *et Macdonald*, 2015). Zadruhé, výhodou těchto metod je dobrá tolerance k PCR inhibitorům, které se běžně nacházejí v klinických vzorcích (de Paz *et al.*, 2014).

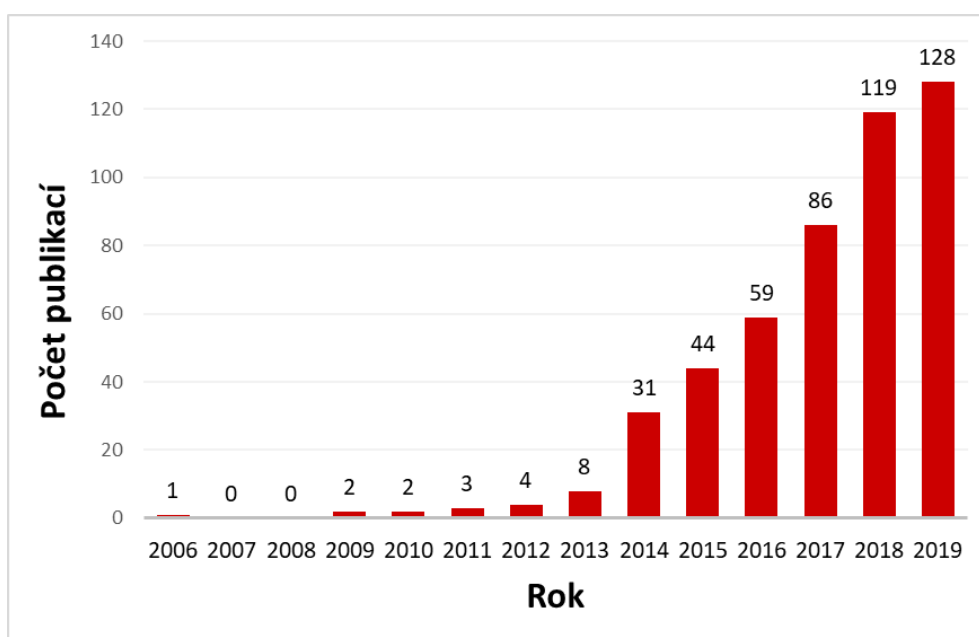
Mezi metody izotermické amplifikace nukleových kyselin založené na RNA transkripci patří např. NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification), která je založena na amplifikaci molekul RNA a využívá se k diagnostice RNA virů a metoda SMART (Signal-Mediated Amplification of RNA Technology), která slouží k detekci molekul RNA i DNA (Li *et Macdonald*, 2015). K metodám založených na replikaci DNA, které využívají enzymy k rozpletení řetězce nukleových kyselin, patří: Amplifikace závislá na helikáze HDA (Helicase Dependent Amplification), která napodobuje mechanismus replikační vidličky během replikace DNA *in vivo* (Vincent *et al.*, 2004) a Rekombinázová polymerázová amplifikace (Recombinase Polymerase Amplification, RPA), která k rozplétání dvoušroubovice DNA využívá rekombinázu. Metoda amplifikace otáčivou kružnicí (Rolling Circle Amplification, RCA) a izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) využívají DNA polymerázy, které mají schopnost vytěsnit řetězec z lineární/kruhové nukleové kyseliny (Li *et Macdonald*, 2015). Metoda SDA (Strand Displacement Amplification) kombinuje působení restriční endonukleázy a vlákno vytěšňující DNA polymerázy k amplifikaci molekul DNA, jedná se o tzv. amplifikaci s vytěšňováním řetězce (Walker *et al.*, 1992; Li *et Macdonald*, 2015).

Tab. 3: Srovnání vybraných izotermických metod amplifikace nukleových kyselin (převzato a upraveno z de Paz *et al.*, 2014).

Metoda	Teplota [°C]	Čas detekce [min]	Počet enzymů	Analytická citlivost [kopie]	První publikace
RPA	37–42	10–20	3	1–10	2006
LAMP	60–65	15–60	1	1–10	2000
NASBA	37–42	60	2–3	1–10	1991
SDA	37	120	2	>10	1992
RCA	30–60	10–40	1	>10	1996
HDA	60–65	60–120	2	100	2004

3.3.3.1 Popis a princip metody RPA

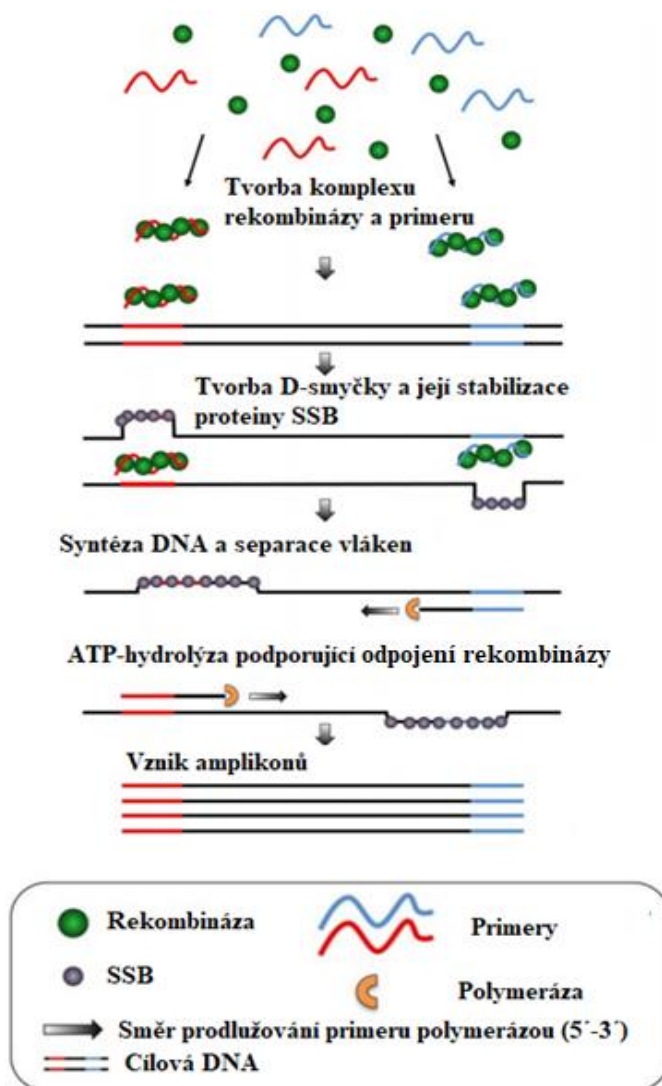
Rekombinázová polymerázová amplifikační reakce patří mezi izotermické amplifikační metody (de Paz *et al.*, 2014). Metoda RPA byla představena v roce 2006 (Piepenburg *et al.*, 2006), prochází rychlým vývojem a její podíl na trhu stále vzrůstá (Obr. 4) (Li *et al.*, 2019). V závislosti na počátečním množství templátu a velikosti ampliconu trvá RPA reakce 5–20 minut a provádí se obvykle při teplotě 37 °C (Hill-Cawthorne *et al.*, 2014). Pro RPA je charakteristické rychlé reakční schéma, izotermální profil (bez jakéhokoliv kolísání teploty), jednoduché přístrojové vybavení a vysoká specifita a účinnost (Piepenburg *et al.*, 2006).



Obr. 4: Počet publikací spojených s metodou RPA od jejího uvedení na trh v roce 2006 až do roku 2019 shromážděných dle informací z „Web of Science“ (převzato z Li *et al.*, 2019 a obnoveno).

Metoda RPA původně sloužila k amplifikaci DNA (Piepenburg *et al.*, 2006). Později se ukázalo, že templátem může být i RNA po přidání reverzní transkriptázy k RPA reagenčním (Euler *et al.*, 2012). Podle publikovaných dokumentů by délka amplikonů pro rychlou a účinnou amplifikaci měla být mezi 100 a 250 nukleotidy (Li *et al.*, 2019). RPA primery bývají delší než primery pro PCR. Minimální doporučená délka RPA primerů je 30 nukleotidů, avšak jejich nejčastější velikost je mezi 32 a 35 nukleotidy. Pro RPA reakci lze také použít kratší PCR primery, které mají délku mezi 18 a 25 nukleotidy, čímž může dojít ke snížení citlivosti a reakční rychlosti (TwistDx). Metoda RPA využívá tři proteiny, které nahrazují PCR tepelnou denaturaci: rekombinázový protein, DNA polymeráza s aktivitou vytěšňující vlákno a protein vázající jednovláknovou DNA (Single Strand Binding proteins, SSB). Tyto proteiny umožňují exponenciální DNA amplifikaci bez potřeby termálního cyklování nebo počáteční denaturace (Piepenburg *et al.*, 2006).

Principem metody RPA je nejprve vznik nukleoproteinového vlákna, které je tvořeno rekombinázou a primery (komplex rekombináza-primery). Tento komplex skenuje dsDNA s cílem najít homologní sekvenci. Poté, co vlákno nalezne homologii, nasedne na dsDNA a vytvoří strukturu D-smyčky (D-loop), která představuje lokální separaci vláken DNA stabilizovanou jednořetězcovým vazebným proteinem SSB. Hydrolyza ATP vyvolá odpojení rekombinázy z nukleoproteinového vlákna, což umožní nasednutí primerů a syntézu nového DNA vlákna prostřednictvím polymerázy. Vzniklé dva duplexy jsou použity v dalším kole RPA cyklu. Exponenciální amplifikace je tedy dosaženo opakováním RPA cyklu, který je samoudržující (Obr. 5) (Piepenburg *et al.*, 2014).



Obr. 5: Schéma RPA (převzato z Daher, 2015).

RPA se využívá pro rychlou, specifickou a cenově dostupnou identifikaci patogenů. Díky minimálním požadavkům na přípravu vzorku, nízké provozní teplotě a komerční dostupnosti lyofilizovaných činidel je tato metoda využívána mimo prostředí laboratoře, ve vzdálených oblastech (Daher *et al.*, 2016). RPA je vhodná pro analýzu v terénu, v místě péče o pacienta, v prostředí s minimálními zdroji a ve statimovém režimu – v situaci, kdy je potřebná rychlá analýza (TwistDx).

Metodou RPA lze detekovat méně než 10 kopií DNA proviru HIV-1 do 20 minut (Boyle *et al.*, 2013). K rychlé detekci viru eboly během epidemie v západní Africe v roce 2014 byl vyvinut test EBOV-RPA, který je založen na rekombinázové polymerázové amplifikaci. Tento test vykazoval 97% citlivost a 97% specifitu pro všechny testované vzorky a mohl být dokončen do 20 minut (Yang *et al.*, 2016). Real-time RPA s reverzní transkripcí slouží k detekci viru slintavky a kulhavky do 10 minut (Abd El Wahed *et al.*, 2013) nebo bovinního koronaviru (Amer *et al.*, 2013) a pro detekci dalších virů a bakterií (Euler *et al.*, 2013).

3.3.3.2 Komerční soupravy

Metodu RPA zkomercionalizovala pouze pro výzkumné účely společnost TwistDx, která nabízí celou řadu souprav k amplifikaci DNA nebo RNA (Tab. 4). Souprava RPA obsahuje: reakční pufr, roztok octanu hořečnatého (280 mmol/l), zkumavky s peletami obsahující lyofilizovaná RPA činidla a kontroly (pozitivní templátová kontrola a pozitivní kontrola primerů, nebo primerů a sondy) (TwistDx).

Smícháním RPA primerů, nebo primerů a sondy s reakčním pufrem a cílovou nukleovou kyselinou získáme reakční roztok. Tento roztok se poté přidá do zkumavky s peletou, následuje krátké promíchání a centrifugace. Samotná reakce je zahájena až po přidání hořčíku. Inkubace probíhá při jedné teplotě v rozmezí mezi 37–42 °C v závislosti na použité soupravě, viz Tab. 4. Po inkubaci následuje detekce RPA produktů, kterou lze provést v reálném čase nebo až po ukončení reakce. Amplifikované produkty mohou být vizualizovány pomocí elektroforézy v agarózovém gelu, real-time fluorescenční sondy a laterálního toku na proužku (tzv. lateral-flow, LF). Při detekci v reálném čase jsou výsledky získány během inkubační doby, do 10 minut. Pro post-RPA detekci musí být RPA amplikony nejprve purifikovány a až poté mohou být separovány na agarózovém gelu. Při detekci pomocí laterálního toku mohou být použity nepurifikované RPA amplikony a výsledky jsou získány do 5 minut po RPA reakci (Daher *et al.*, 2016).

Na trh jsou dodávány také druhově specifické soupravy, např. k detekci *Salmonelly* (TwistGlow® *Salmonella*), *Listerie monocytogenes* (TwistAmp® *exo+ ListeriaM*) nebo *Campylobakterie* (TwistAmp® *exo+ Campylobacter*) (TwistDx).

Tab. 4: Seznam RPA komerčních souprav společnosti TwistDx (převzato a upraveno z Daher *et al.*, 2016).

Název soupravy ⁽¹⁾ (TwistAmp®)	Cílová molekula	Inkubace [°C]	Postamplifikační purifikace	Detekční systém ⁽²⁾
Basic	DNA	37–39	ano	AG
Basic RT	RNA	40–42	ano	AG
exo	DNA	37–39	ne	rt
exo RT	RNA	40–42	ne	rt
fpg	DNA	37–39	ano, pouze pro AG detekci	rt/ AG
nfo	DNA	37–39	ano, pouze pro AG detekci	LT/rt/AG

(1): RT: reverzní transkripce; exo: Exonukleáza III; fpg: Fpg nukleáza; nfo: Nfo nukleáza

(2): AG: elektroforéza v agarózovém gelu, rt: real-time, LT: laterální tok

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Pro optimalizaci mykoplazmového detekčního systému na bázi RPA byly použita DNA izolovaná z buněčných linií napadených mykoplazmou a syntetické standardy GeneArt Strings: DNA fragment *Mycoplasma arginini* s lokálním referenčním číslem 1929 (Invitrogen, kat. č. 2233049), DNA fragment *Mycoplasma fermentans* s lokálním referenčním číslem 1930 (Invitrogen, kat. č. 2233050), DNA fragment *Acholeplasma laidlawii* s lokálním referenčním číslem 1931 (Invitrogen, kat. č. 2233051).

→ Sekvence použitých syntetických standardů je uvedena v přílohách, viz Příloha 1.

Izolaci DNA provedly laborantky z Laboratoře experimentální medicíny, ÚMTM.

4.2 Použité chemikálie a soupravy

- depcH₂O
- Primer 1562 (Generi Biotech, kat. č. 1348U3)
- Primer 1563 (Generi Biotech, kat. č. 1348U4)
- Sonda 1565, FAM (Eurogentec, kat. č. 6686818)
- Sonda 2198, BHQ-FAM (Generi Biotech, kat. č. 17530C7)
- Souprava TwistAmp® exo kit Improved Formulation (TwistDx, kat. č. TAEXO02KIT)
- GoTaq® qPCR Master Mix 2x (Promega, kat. č. 0000201701)

→ Sekvence použitých primerů a sond je uvedena v přílohách, viz Příloha 2.

4.3 Seznam použitých laboratorních přístrojů a pomůcek

- Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Centrifuga/vortex Combi-Spin (Biosan)
- Laminární box Mars Safety Classe 2 (LaboGene)
- Mrazák a chladnička (Gorenje)
- Rotilabo®-mini-centrifuga "Uni-fuge" (Carl Roth)

- Termocyklér: LightCycler® 480 Real-Time PCR systém (Roche), CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)
- Vortex mixér VX-200 (Labnet)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Návrh primerů a sondy

Návrh primerů a sondy k detekci mykoplazmy metodou RPA za použití soupravy TwistAmp® exo s následným screeningem a výběrem preferovaného páru primerů a sondy byl proveden Annou Korytářovou.

Návrh primerů a sondy vychází z dostupných informací zveřejněných společností TwistDx na jejich webových stránkách: <https://www.twistdx.co.uk/>:

Primery, které jsou navrženy pro metodu PCR, mohou fungovat i v RPA, ale nemusí být optimální pro TwistAmp reakce. Oproti PCR není teplota tání primeru kritickým faktorem pro jeho výkon. S velikostí oligonukleotidu klesá schopnost rekombinázových proteinů stimulovat a dokončit rekombinaci. Oligonukleotidy kratší než 30 nukleotidů mohou být funkční, ale jejich amplifikační kinetika je pomalejší ve srovnání s primery, jejichž velikost je 30 nukleotidů nebo více. Primery s délkou větší než 45 nukleotidů mohou být také použity v TwistAmp reakcích, ale může dojít ke zvýšení pravděpodobnosti vzniku sekundárních struktur, které mohou způsobit vznik primerového šumu. Proto se nedoporučuje navrhovat velmi dlouhé primery. PCR primery fungují v TwistAmp reakcích odlišně a nelze zatím dostatečně předvídat, jak dobře bude konkrétní primer fungovat na základě nukleotidového složení, přestože byl navržen software pro design primerů a sond; PrimedRPA (Higgins *et al.*, 2019).

Při navrhování primerů je doporučováno vyhnout se sériím jednoho konkrétního nukleotidu nebo velkému počtu krátkých repetitivních sekvencí uvnitř primeru. Pravděpodobně nevhodný může být i nepřiměřeně vysoký (>70%) nebo nízký (<30%) obsah GC. Párování bází uvnitř a mezi primery může vést ke vzniku artefaktů (dimery primerů). Je doporučeno se vyhnout také primerům, které mohou tvořit sekundární struktury (vlásky). Doporučená délka amplikonu by měla být 100–200 bp, výjimečně až 500 bp.

Design primerů se skládá z několika kroků:

1. Výběr cílové oblasti

Vybraná oblast uvnitř templátu by měla mít „průměrné“ složení nukleotidové sekvence:

- repetitivní sekvence
- malé množství přímých/obrácených repetitivních sekvencí, palindromů atd.
- obsah GC mezi 40 % a 60 %

2. Kandidáti primerů

Po stanovení cílové oblasti, jsou vybrány dvě skupiny oligonukleotidů (forward, dopředný a reverse, zpětný), které představují kandidátní primery. Každý primer ze skupiny forward může být párován s každým primerem ze skupiny reverse. Pro testy, které jsou prováděny pod časovým tlakem a kde není zásadní optimální návrh primerů (např. testovaný cíl se nachází ve vzorcích ve vysoké koncentraci), jsou navrženy následující hodnoty nastavení v softwaru pro PCR (např. Primer 3, Primer-BLAST):

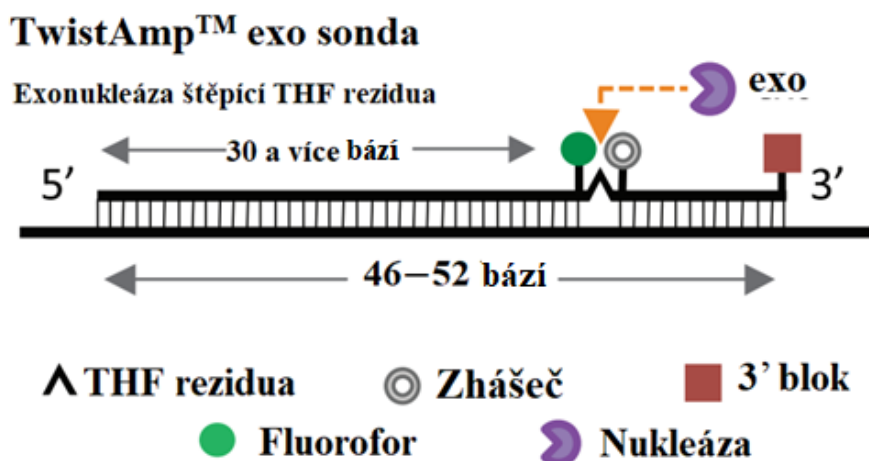
- velikosti primeru je minimálně 30 a maximálně 36
- maximální délka jednonukleotidového opakování je stanovena na 5
- GC% hodnota primeru je minimálně 20 a maximálně 70
- hodnota T_m (teplota tání) primeru je minimálně 50 a maximálně 100

3. Screening kandidátních primerů

Jakmile jsou stanoveny páry kandidátních primerů, je posouzen a porovnán jejich relativní výkon. Mezi klíčové parametry výkonu patří čas nástupu exponenciální amplifikace, citlivost a síla fluorescenčního signálu.

TwistAmp exo sonda se skládá z oligonukleotidové páteře, která obsahuje abazický nukleotidový analog (zbytek tetrahydrofuranu, THF), který obklopuje dT-fluorofor (obvykle fluorescein), odpovídající dT-zhášeč a na svém 3' konci obsahuje modifikační skupinu (např. fosfát, C3-spacer, biotin-TEG nebo amin), aby nedocházelo k prodlužování sondy polymerázou (Obr. 6). Jakýkoliv fluorescenční signál vydávaný fluoroforem je potlačen zhášečem. THF rezidua představují substrát pro Exonukleázu III, která je přítomna v kitu TwistAmp exo. Exonukleáza III štěpí sondu v místě THF, čímž dochází k oddělení fluoroforu a zhášeče a vzniká fluorescenční signál. Tento krok je účinný pouze tehdy, pokud sonda nasedla na cílovou sekvenci v amplifikačním produktu.

Délka sondy by měla být 46–52 nukleotidů, přičemž nejméně 30 nukleotidů je umístěno ve směru k 5' konci od THF místa a nejméně dalších 15 nukleotidů je umístěno směrem k 3' konci od THF. Neexistuje žádné pravidlo, které by popisovalo nejvhodnější polohu sondy vzhledem k primerům. Je důležité, aby artefakty primerů nebyly detekovány sondou, k čemuž by mohlo dojít, pokud by sonda překrývala primery. Neměly by se také překrývat primery proti směru sondy, aby nedošlo ke vzniku dimerů primer-sonda. Primery, které mají stejný směr jako sonda, mohou překrývat pouze její 5' konec, ale součástí tohoto překryvu nesmí být abazické místo a část sondy k 3' konci.



Obr. 6: Schéma struktury TwistAmp exo sondy a její štěpení nukleázou (převzato z TwistDx).

K detekci mykoplazmy pomocí metody RPA za použití soupravy TwistAmp® exo byla vybrána dvojice primerů 1562, 1563 a sonda 1565, jejichž sekvence jsou uvedeny v Příloze 2.

Ke kontrole navržených primerů a sondy pro testovanou sekvenci mykoplazmy byl prof. Mgr. Jiřím Drábkem, Ph.D. použit software PrimedRPA (Higgins *et al.*, 2019), který v době návrhu nebyl ještě k dispozici. Bohužel, software PrimedRPA při zadání vstupní sekvence mykoplazmy žádné primery a sondy pro RPA nenavrhnul a neobsahuje funkci ohodnocení primerů, navržených mimo tento software.

4.4.2 Ověření funkčnosti reagensů k detekci mykoplazmy metodou RPA

K ověření funkčnosti primerů 1562, 1563 a sondy 1565 při amplifikaci syntetického standardu mykoplazmy s lokálním referenčním číslem 1929 (*M. arginini*) metodou RPA byla použita souprava TwistAmp exo (TwistDx).

Byla připravena směs primerů se sondou, viz Tabulka č. 5. Připravená směs byla pipetována do dvou PCR zkumavek po 8 μ l. Ke zkumavkám bylo přidáno 29,5 μ l pufru Primer free Rehydration Buffer. Směs byla důkladně zvortexována a krátce stočena. Následně byla směs přenesena do dvou zkumavek s reakční peletou a promíchána pipetováním. Poté byla směs pipetována do dvou PCR zkumavek po 16 μ l. Do první zkumavky bylo přidáno 4,3 μ l syntetického standardu mykoplazmy 1929 o $6 \cdot 10^7$ počtu molekul v 1 μ l a do druhé zkumavky 4,3 μ l de pH_2O . Do každé zkumavky bylo přidáno 1,2 μ l 280mmol/l MgOAc. Připravená směs

byla zvortexována a krátce stočena. Následně byla změřena fluorescence v termocykléru CFX96 Touch (Bio-Rad) při teplotě 39 °C po dobu 16 minut ve fluorescenčním kanále FAM. Po 4 minutách byl průběh měření fluorescence pozastaven a zkumavky byly promíchány na vortexu a krátce stočeny. Následně byly zkumavky umístěny ve stejné pozici zpět do bloku termocykléru a fluorescence byla měřena zbylých 12 minut.

Tab. 5: Složení směsi primerů a sondy pro detekci syntetického standardu 1929 metodou RPA.

Složka	Objem [μl]
Primer 1562 (10 μmol/l)	2
Primer 1563 (10 μmol/l)	2
Sonda 1565, FAM (10 μmol/l)	0,6
depcH ₂ O	5,4

4.4.3 RPA diluční řada

Byly připraveny dvě diluční řady se syntetickým standardem mykoplazmy 1929 (*M. arginini*) ke stanovení limitu detekce metody RPA za použití soupravy TwistAmp® exo kit (TwistDx).

Ze syntetického standardu mykoplazmy 1929 o $6 \cdot 10^7$ počtu molekul v 1 μl byly připraveny dvě diluční řady v depcH₂O o 3x a 10x ředěních. V první diluční řadě byl každý následující vzorek syntetického standardu 3x ředěnější než předchozí (Tab. 6) a v druhé diluční řadě byl každý následující vzorek syntetického standardu 10x ředěnější než předchozí (Tab. 7).

Do třech lyofilizovaných zkumavek s reakční peletou bylo přidáno 29,5 μl pufru Primer free Rehydration Buffer. Reakční pelety byly rozpuštěny pipetováním. Obsah všech tří zkumavek byl smíchán pipetováním do jedné PCR zkumavky. Následně bylo do zkumavky přidáno 0,4 μl sondy 1565 (koncentrace 100 μmol/l) a 1,2 μl primeru 1562 a 1563 (koncentrace 100 μmol/l). Připravená směs byla pipetována po 7,6 μl do devíti PCR zkumavek. Do zkumavek byla pipetována po 2,5 μl přichystaná diluční řada. Poté byl připraven roztok MgOAc, smícháním 5 μl 280mmol/l MgOAc a 20 μl depcH₂O. Následně bylo do PCR zkumavek přidáno po 2,4 μl naředěného roztoku MgOAc. Vzorky byly zvortexovány a krátce stočeny. Fluorescence byla měřena za stejných podmínek jako u předchozího pokusu, viz Kapitola 4.4.2. Pokus s diluční řadou syntetického standardu o 10x ředěních byl proveden ve třech opakování.

Tab. 6: Počet molekul syntetického standardu mykoplazmy 1929 v 1 μ l, který se přidává do reakce; 3x ředění.

Ředění	Počet molekul v 1 μl
1	60 220 000
1/3	20 073 333
1/9	6 691 111
1/27	2 230 370
1/81	743 457
1/243	247 819
1/729	82 606
1/2187	27 535
NC	–

NC: negativní kontrola

Tab. 7: Počet molekul syntetického standardu mykoplazmy 1929 v 1 μ l, který se přidává do reakce; 10x ředění.

Ředění	Počet molekul v 1 μl
1	60 220 000
10^{-1}	6 022 000
10^{-2}	602 200
10^{-3}	60 220
10^{-4}	6 022
10^{-5}	602
10^{-6}	60
10^{-7}	6
NC	–

NC: negativní kontrola

4.4.4 Ověření funkčnosti reagensů při amplifikaci syntetických standardů metodou RPA

K ověření funkčnosti primerů 1562, 1563 a sondy 1565 při amplifikaci syntetických standardů 1930 (*M. fermentans*) a 1931 (*Acholeplasma laidlawii*) metodou RPA byl použit stejný postup jako pro syntetický standard 1929 (*M. arginini*) (viz Kapitola 4.4.2) s využitím soupravy TwistAmp® exo kit (TwistDx).

Byla připravena směs primerů se sondou, viz Tabulka č. 8. Směs byla pipetována po 8 µl do dvou PCR zkumavek. Ke zkumavkám bylo přidáno 29,5 µl pufru Primer free Rehydration Buffer. Směs byla důkladně zvortexována a krátce stočena. Následně byla směs z každé zkumavky přenesena do jedné zkumavky s reakční peletou a promíchána pipetováním. Poté byla směs pipetována do čtyř PCR zkumavek po 16 µl. Následně bylo do tří zkumavek postupně přidáno po 4,3 µl syntetického standardu DNA a do jedné zkumavky byla přidána depcH₂O. Zkumavky byly zvortexovány a následně stočeny. Do každé zkumavky bylo přidáno 1,2 µl 280mmol/l MgOAc. Připravená směs byla zvortexována a krátce stočena. Fluorescence byla měřena za stejných podmínek jako v kapitole 4.4.2.

Tab. 8: Složení směsi primerů a sondy pro detekci syntetických standardů metodou RPA.

Složka	Objem [µl]
Primer 1562 (10 µmol/l)	4
Primer 1563 (10 µmol/l)	4
Sonda 1565, FAM (10 µmol/l)	1,2
depcH ₂ O	10,8

4.4.5 Real-time PCR diluční řada

Byly připraveny dvě diluční řady se syntetickým standardem mykoplazmy 1929 (*M. arginini*) ke stanovení limitu detekce metody real-time PCR.

Stejně jako u RPA ze syntetického standardu mykoplazmy 1929 o $6 \cdot 10^7$ počtu molekul v 1 µl byly připraveny dvě diluční řady v depcH₂O o 3x a 10x ředěních. V první diluční řadě byl každý následující vzorek syntetického standardu 3x ředěnější než předchozí (Tab. 6) a v druhé diluční řadě byl každý následující vzorek syntetického standardu 10x ředěnější než předchozí (Tab. 7).

Byla připravena PCR reakční směs dle Tabulky č. 9. Připravená reakční směs byla pipetována po 9 µl do 9 PCR zkumavek. Následně bylo do zkumavek pipetováno po 1 µl diluční řady syntetického standardu (Tab. 6 a 7). Vzorky byly zvortexovány, krátce stočeny a vloženy do termocyklu LightCycler® 480 (Roche). Časový a teplotní průběh real-time PCR je uveden

v Tabulce č. 10. Pokus s diluční řadou syntetického standardu o 10x ředěních byl proveden ve třech opakování.

Tab. 9: Složení real-time PCR reakční směsi.

Reagencie	Objem pro 9 reakcí [μl]	Koncentrace zásobního roztoku	Ředící faktor	Finální koncentrace
Promega pufr FastTaq	52,7	2x	2	1x
Sonda 2198, BHQ-FAM	0,2	100 μmol/l	500	0,2 μmol/l
Primer 1562	0,85	100 μmol/l	125	0,8 μmol/l
Primer 1563	0,85	100 μmol/l	125	0,8 μmol/l
DEPC H ₂ O	40,2	-	-	-
Celkový objem	94,8			

Tab. 10: Teplotní a časový profil real-time PCR.

Krok PCR reakce	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Denaturace	95	15 min	1x
Hybridizace primerů	95	45 s	40x
Finální syntéza	55	100 s	1x
Konec reakce	37	1 s	

4.4.6 Ověření funkčnosti RPA systému k detekci mykoplazmy v reálných vzorcích

Ověření funkčnosti primerů 1562, 1563 a sondy 1565 při amplifikaci DNA izolované z buněčných linií k detekci mykoplazmy bylo provedeno pomocí metody RPA za použití soupravy TwistAmp exo (TwistDx).

Do třech lyofilizovaných zkumavek s reakční peletou bylo přidáno 29,5 μl pufru Primer free Rehydration Buffer. Reakční pelety byly rozpuštěny pipetováním. Obsah všech tří zkumavek byl smíchán pipetováním do jedné PCR zkumavky. Následně bylo do zkumavky přidáno 0,4 μl sondy 1565 (koncentrace 100 μmol/l) a 1,2 μl primeru 1562 a 1563 (koncentrace 100 μmol/l). Připravená směs byla pipetována po 7,6 μl do devíti PCR zkumavek. Do jednotlivých zkumavek byla pipetována po 2,5 μl izolovaná DNA ze vzorků buněčných linií (vzorek č. 2 a 3) a pozitivní kontra (vzorek izolovaný z buněčné linie obsahující mykoplazmu) dle rozpisu v Tab. 11. Zkumavky byly zvortexovány a následně stočeny. Poté byl připraven roztok MgOAc, smícháním 5 μl 280mmol/l MgOAc a 20 μl depcH₂O. Následně bylo do PCR zkumavek přidáno po 2,4 μl naředěného roztoku MgOAc. Vzorky byly zvortexovány a krátce stočeny. Fluorescence byla měřena za stejných podmínek jako v kapitole 4.4.2.

Tab. 11: Rozpis pipetování izolované DNA ze vzorků buněčných linií a pozitivní kontroly.

Vzorek	Ředění
2	–
2	10^{-1}
3	–
3	10^{-1}
3	10^{-2}
PC	10^{-2}
PC	10^{-2}
PC	10^{-3}
PC	10^{-3}

PC: pozitivní kontrola

vzorek č. 2 a 3: DNA izolovaná z buněčných linií

Následně byla připravena diluční řada se vzorkem pozitivní kontroly z předchozího experimentu dle rozpisu v Tab. 12. ke stanovení limitu detekce metody RPA pro vzorky z buněčných linií.

Experiment byl proveden dle stejného postupu jako v kapitole 4.4.6. s rozpisem pro pipetování diluční řady vzorku pozitivní kontroly uvedeným v Tab. 12.

Tab. 12: Rozpis pipetování diluční řady se vzorkem pozitivní kontroly (PC).

Zkumavka č.	Ředění
1	10^{-1}
2	10^{-1}
3	10^{-2}
4	10^{-2}
5	10^{-3}
6	10^{-3}
7	10^{-4}
8	10^{-4}
9	10^{-5}

5 Výsledky

5.1 Návrh primerů a sondy

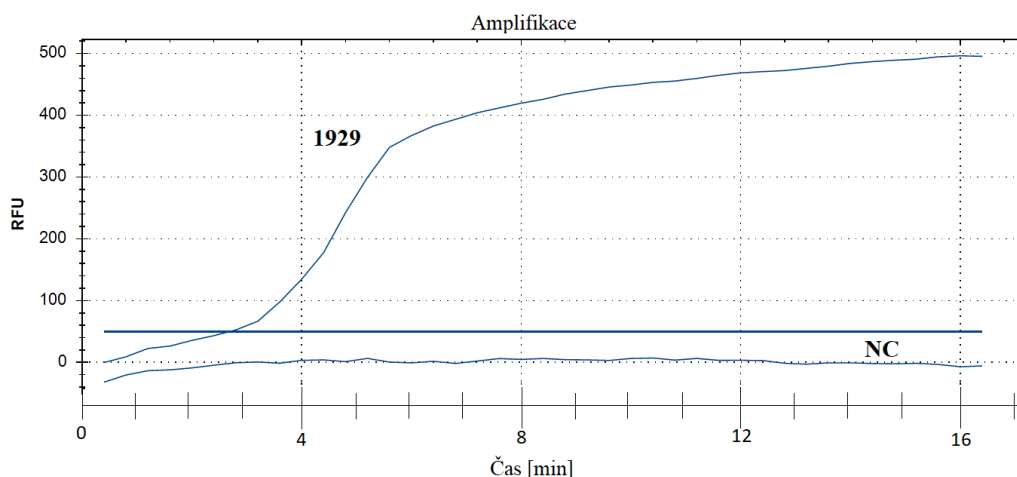
Primery a sonda k detekci mykoplazmy pomocí metody RPA za použití soupravy TwistAmp exo byly navrženy Annou Korytářovou podle postupu zveřejněného společností TwistDx na svých webových stránkách: <https://www.twistdx.co.uk/>.

V této době nebyl ještě k dispozici software PrimedRPA (Higgins *et al.*, 2019), který slouží k návrhu primerů a sond pro testy využívající rekombinázovou polymerázovou amplifikační reakci. Proto byl tento software použit až po svém zveřejnění se snahou zkontrolovat teoretickou funkčnost navržených primerů a sondy. Podle softwaru PrimedRPA nejsou navržené primery a sonda optimální pro použití v testech založených na metodě RPA. Software PrimedRPA nebyl schopen navrhnout žádné primery a sondy pro testovanou sekvenci mykoplazmy.

5.2 Optimalizace metody RPA k detekci mykoplazmy

Na základě provedeného screeningu několika navržených primerů a sond Annou Korytářovou byla vybrána dvojice primerů; 1562 (forward), 1563 (reverse) a sonda 1565 k optimalizaci metody RPA pro detekci mykoplazmy.

Následně bylo nutné ověřit funkčnost těchto reagensů při amplifikaci syntetického standardu *M. arginini* s referenčním číslem 1929. K tomuto testu byla použita souprava TwistAmp® exo od firmy TwistDx, která detekuje amplifikované produkty v reálném čase, pomocí fluorescenční sondy. Na Grafu č. 1 vidíme, že amplifikační křivka syntetického standardu mykoplazmy 1929 stoupá velmi brzy (ve 3. minutě) a má sigmoidní tvar, zatímco u vzorku negativní kontroly (beztemplátová kontrola, označena jako NC) nedošlo k amplifikaci. Na základě tohoto výsledku byla potvrzena účinnost navržených primerů 1562, 1563 a sondy 1565 v RPA reakci. Kombinace těchto primerů a sondy byla následně použita pro další testy, které vedly k optimalizaci mykoplazmového detekčního systému na bázi RPA.



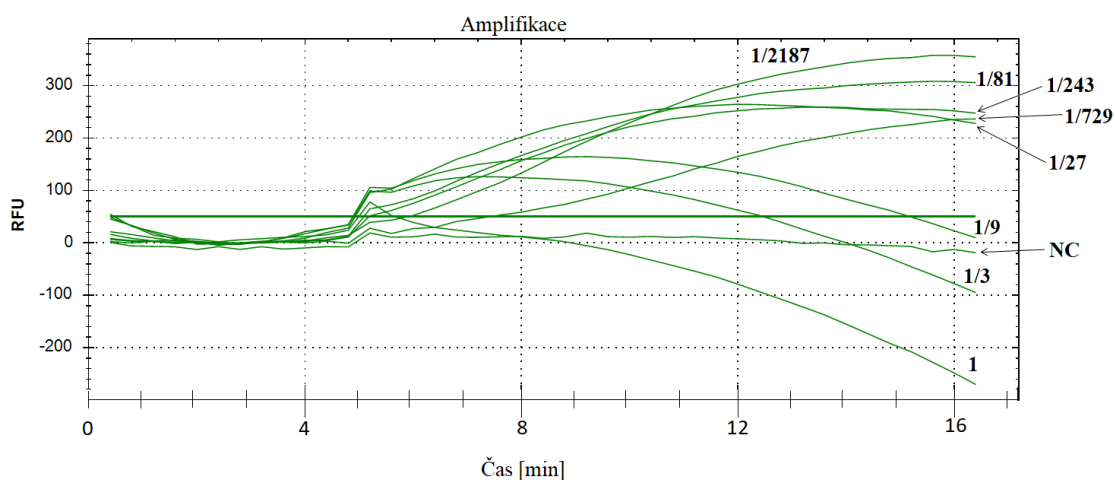
Graf 1: Amplifikační křivka syntetického standardu mykoplazmy 1929 a negativní kontroly při RPA.

NC: negativní kontrola

1929: syntetický standard *M. arginini* s referenčním číslem 1929

Ke stanovení detekčního limitu metody RPA byly připraveny dvě diluční řady se syntetickým standardem mykoplazmy 1929 (*M. arginini*) o počtu molekul $6 \cdot 10^7$ v $1 \mu\text{l}$ de $\text{p}^{\text{c}}\text{H}_2\text{O}$ o 3x a 10x ředěních, za použití soupravy TwistAmp® exo kit (TwistDx).

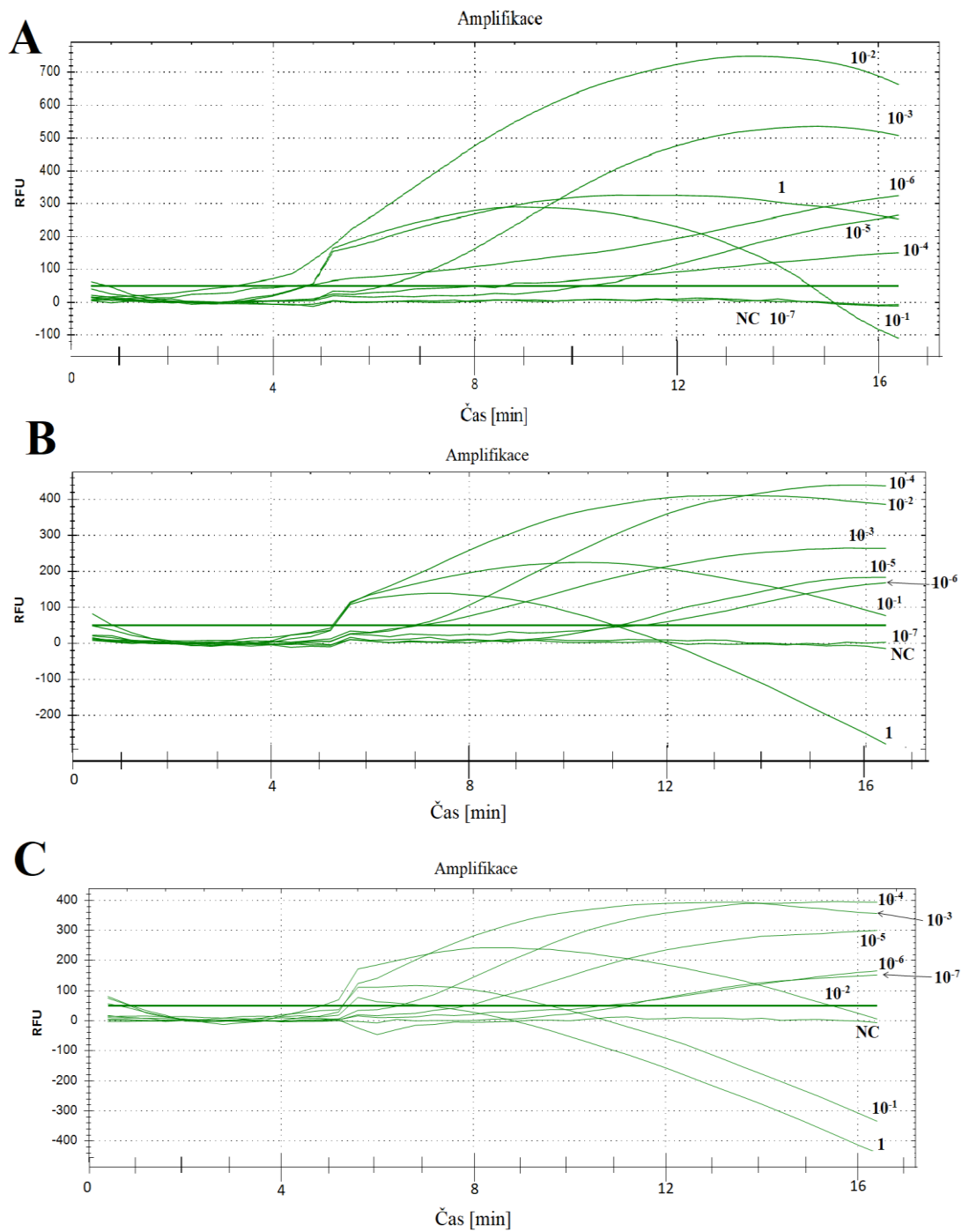
Na Grafu č. 2 lze pozorovat amplifikační křivky syntetického standardu mykoplazmy 1929 z diluční řady o 3x ředěních, které nevykazují standardní průběh, který bychom očekávali na základě zkušeností s PCR. U vzorků s ředěním 1, 1/3 a 1/9 dochází v 5. minutě ke strmému zvednutí křivky, po kterém následuje pokles až pod linku prahové hodnoty. Linka prahové hodnoty byla nastavena na základě předchozích pokusů s negativními kontrolami, které se po celou dobu nezvedly nad fluorescenční hodnotu 50. Negativní kontrola nebyla amplifikována.



Graf 2: Amplifikační křivky diluční řady syntetického standardu mykoplazmy 1929 získané při RPA; 3x ředění.

NC: negativní kontrola

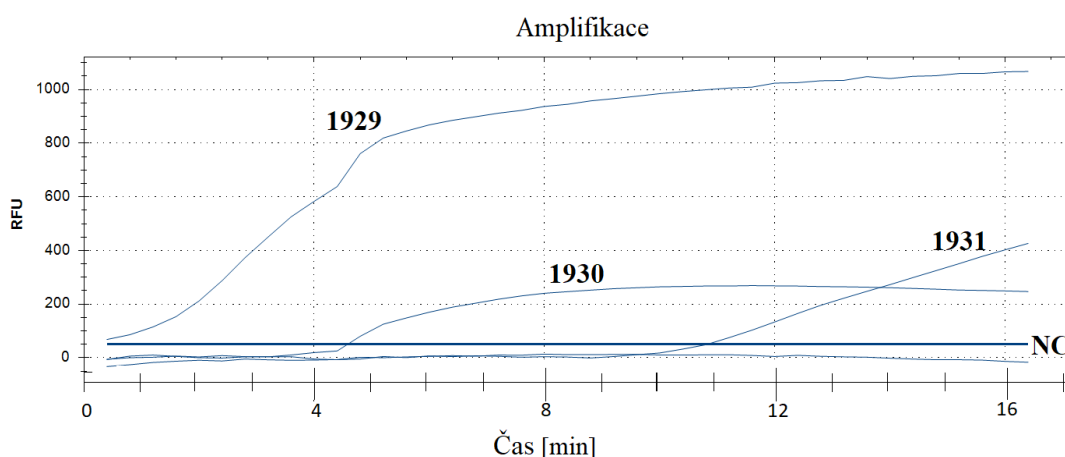
Dále byla provedena diluční řada se syntetickým standardem mykoplazmy 1929 v depeH₂O o 10x ředěních, ve třech opakování (A, B, C), viz Graf č. 3. Stejně jako v diluční řadě o 3x ředěních (Graf 2) vykazují i amplifikační křivky diluční řady o 10x ředěních nestandardní průběh. V grafech A a B lze pozorovat, že u vzorku s ředěním 10⁻⁷ nedošlo k amplifikaci, což neplatí u grafu C, kde k amplifikaci tohoto vzorku došlo. Lze tedy říci, že v některých případech může docházet k amplifikaci vzorků až po ředění 10⁻⁷, ale spolehlivěji k ní dochází jen po ředění 10⁻⁶. Detekční limit metody RPA je při ředění zásobního standardu 10⁻⁶ (ředěno milionkrát), což odpovídá 60 molekulám syntetického standardu mykoplazmy na 1 μl. U vzorků s ředěním 1 (neředěno) nebo 10⁻¹ a v případě grafu C i vzorku 10⁻² byl po 5. minutě pozorován nárůst amplifikace nad linku prahové hodnoty, avšak v některých případech následně došlo k výraznému poklesu amplifikačních křivek. Ve všech třech opakováních této diluční řady nedošlo k amplifikaci vzorků negativní kontroly (NC).



Graf 3: Amplifikační křivky dilučních řad syntetického standardu mykoplazmy 1929 získané při RPA ve třech opakováních (A, B, C); 10x ředění.

NC: negativní kontrola

Dalším krokem k optimalizaci mykoplazmového detekčního systému na bázi RPA bylo ověření funkčnosti primerů 1562, 1563 a sondy 1565 při amplifikaci dalších syntetických standardů; 1930 (*M. fermentans*) a 1931 (*Acholeplasma laidlawii*) podle designu pro syntetický standard 1929 (*M. arginini*) (viz Kapitola 4.4.2.), za použití soupravy TwistAmp® exo kit (TwistDx). Na Grafu č. 4 lze pozorovat, že u všech vzorků syntetických standardů došlo k amplifikaci. Nejdříve byl pozorován nárůst amplifikace u syntetického standardu 1929 (přibližně 2. minuta), dále následoval syntetický standard 1930 (přibližně 5. minuta) a poslední byl syntetický standard *Acholeplasma laidlawii* s referenčním číslem 1931 (11. minuta). Pouze amplifikační křivky syntetických standardů 1929 a 1930 mají tvar připomínající standardní sigmoidní PCR křivku. U vzorku negativní kontroly nedošlo k amplifikaci. Na základě výsledků je zřejmé, že metodou RPA lze detekovat více druhů třídy *Mollicutes* způsobujících kontaminaci buněčných kultur. Tato zkřížená reaktivita není na škodu.



Graf 4: Amplifikační křivky syntetických standardů s referenčním číslem 1929, 1930, 1931 a negativní kontroly získané při RPA.

NC: negativní kontrola

1929: syntetický standard *M. arginini* s referenčním číslem 1929

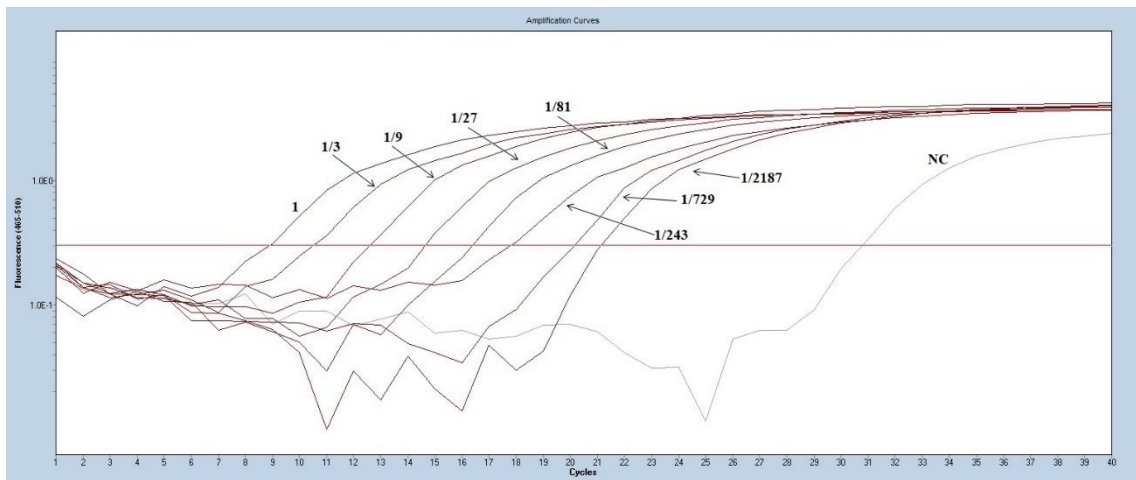
1930: syntetický standard *M. fermentans* s referenčním číslem 1930

1931: syntetický standard *Acholeplasma laidlawii* s referenčním číslem 1931

Pro porovnání detekčního limitu metody RPA s real-time PCR byly připraveny dvě real-time PCR diluční řady se syntetickým standardem mykoplazmy 1929 (*M. arginini*) o počtu molekul $6 \cdot 10^7$ v 1 μ l depcH₂O o 3x a 10x ředěních.

Na Grafu č. 5 lze pozorovat PCR amplifikační křivky syntetického standardu mykoplazmy 1929 z diluční řady o 3x ředěních, které oproti amplifikačním křivkám z RPA diluční řady o 3x ředěních vykazují standardní průběh. Jednotlivé vzorky se postupně amplifikují

v závislosti na ředění (na počtu molekul templátu) a mají typický sigmoidní tvar. U vzorku negativní kontroly byl pozorován zdvih amplifikační křivky, který byl pravděpodobně způsoben tvorbou primerových dimerů. K rozlišení amplifikace specifických produktů od tvorby primerových dimerů slouží analýza teploty tání (melting temperature, T_m). Zdvih amplifikační křivky negativní kontroly byl pozorován se značným zpožděním oproti vzorkům syntetického standardu mykoplazmy 1929. Lze tedy říci, že vzorky, které se amplifikují až po 30. cyklu můžeme považovat za negativní.

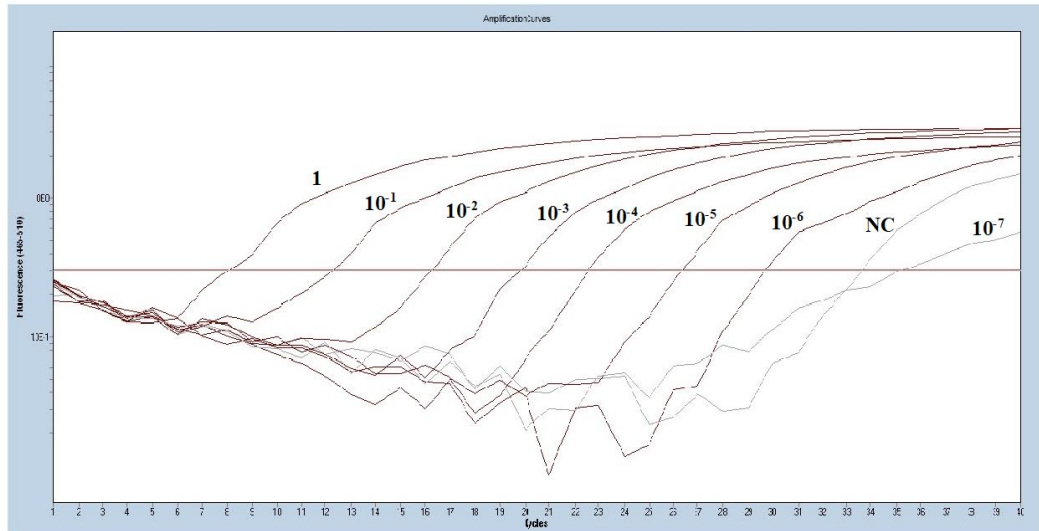
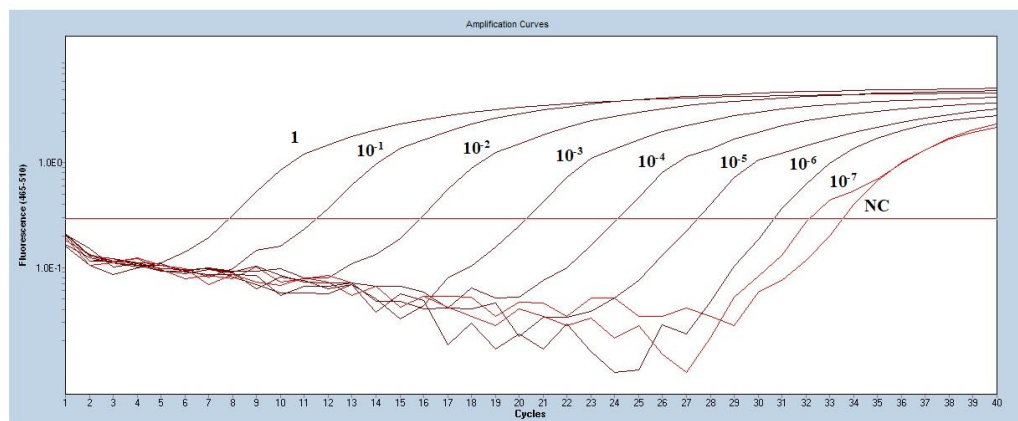
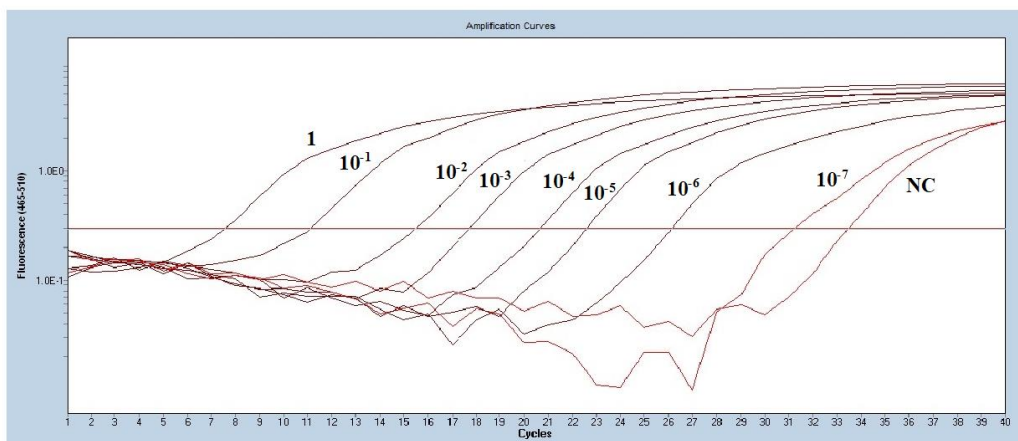


Graf 5: Amplifikační křivky real-time PCR diluční řady syntetického standardu mykoplazmy 1929; 3x ředění.

NC: negativní kontrola

Následně byla provedena diluční řada se syntetickým standardem mykoplazmy 1929 (*M. arginini*) v depcH_2O o 10x ředěních, ve třech opakováních (A, B, C), viz Graf 6. Amplifikační křivky jednotlivých vzorků syntetického standardu mykoplazmy 1929 vykazují standardní průběh, ve srovnání s amplifikačními křivkami z RPA diluční řady o 10x ředěních. Ve všech třech opakováních došlo k amplifikaci vzorku s ředěním 10^{-7} až po 30. cyklu, lze tedy tento vzorek považovat za negativní. Dále pak u grafu B byl po 30. cyklu amplifikován ještě vzorek s ředěním 10^{-6} . Na základě výsledků lze říci, že v některých případech dochází k amplifikaci vzorků po ředění 10^{-5} , ale spolehlivěji k ní dochází až po ředění 10^{-6} . Detekční limit metody real-time PCR je při ředění 10^{-6} , čemuž odpovídá 60 molekul syntetického standardu mykoplazmy na 1 μl . Ve všech třech opakováních této diluční řady došlo k amplifikaci vzorků negativní kontroly (NC) až po 30. cyklu, tudíž je můžeme považovat za negativní.

V Tabulce č. 13 jsou uvedeny koncentrace vzorků z real-time PCR diluční řady o 10x ředěních pro všechna opakování. Koncentrace vzorků byla spočítána na základě analýzy Abs Quant/Fit Points, která je součástí termocykléru LightCycler® 480 (Roche).

A**B****C**

Graf 6: Amplifikační křivky real-time PCR diluční řady syntetického standardu mykoplazmy 1929 ve třech opakováních (A, B, C); 10x ředění.

NC: negativní kontrola

Tab. 13: Koncentrace jednotlivých vzorků real-time PCR diluční řady, vypočtená PCR softwarem z kalibrační křivky pro všechna opakování (A, B, C); 10x ředění.

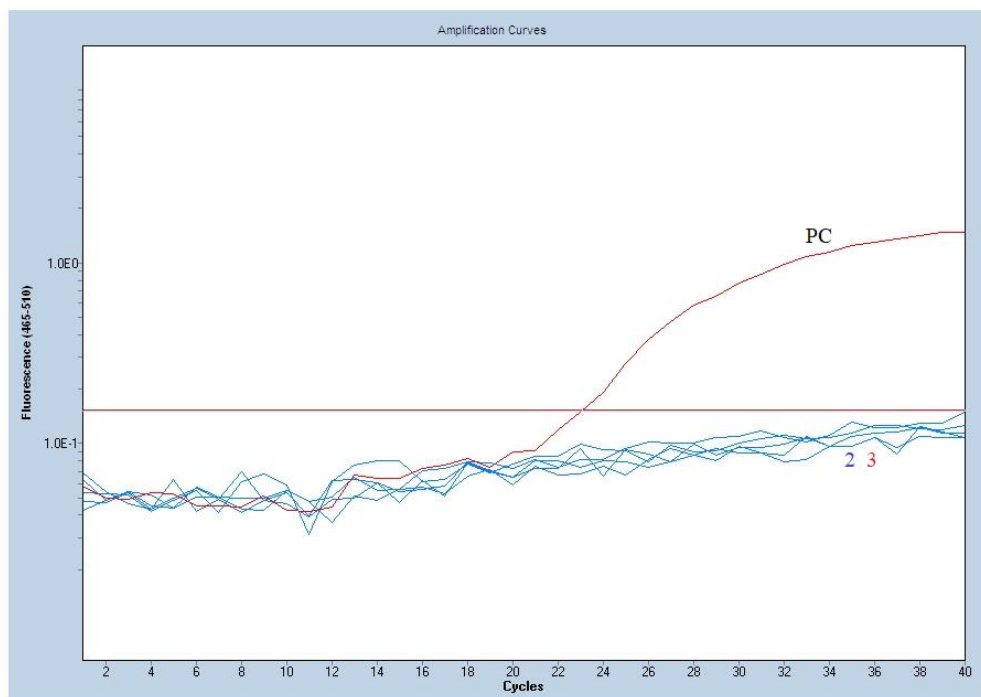
Ředění vzorku	Koncentrace (A) [počet molekul v 1 μ l]	Koncentrace (B) [počet molekul v 1 μ l]	Koncentrace (C) [počet molekul v 1 μ l]
1	$1,22 \cdot 10^7$	$2,16 \cdot 10^7$	$1,67 \cdot 10^7$
10^{-1}	$9,93 \cdot 10^5$	$1,75 \cdot 10^6$	$1,39 \cdot 10^6$
10^{-2}	$8,74 \cdot 10^4$	$8,76 \cdot 10^4$	$4,14 \cdot 10^4$
10^{-3}	$6,98 \cdot 10^3$	$4,64 \cdot 10^3$	$7,37 \cdot 10^3$
10^{-4}	$1,29 \cdot 10^3$	364	685
10^{-5}	97	37,10	161
10^{-6}	10,80	–	12,80
10^{-7}	–	–	–
NC	–	–	–

NC: negativní kontrola

Na ÚMTM probíhá rutinní testování buněčných linií na přítomnost mykoplazmy pomocí metody real-time PCR. Proto bylo provedeno srovnání RPA se standardní PCR metodou v ostrém režimu, s reálnými vzorky buněčných linií, u kterých před provedením testu nebyl znám mykoplazmový status.

Testování oběma metodami byly podrobeny 2 vzorky buněčných linií a jedna pozitivní kontrola (vzorek izolovaný z buněčné linie obsahující mykoplazmu). Na Grafu č. 7 lze pozorovat, že došlo k PCR amplifikaci pouze pozitivní kontroly (PC), zatímco u zbylých vzorků buněčných linií k amplifikaci nedošlo. Z toho vyplývá, že všechny testované buněčné linie nebyly kontaminovány mykoplazmou.

Tento pokus byl proveden Bc. Renatou Buriánovou

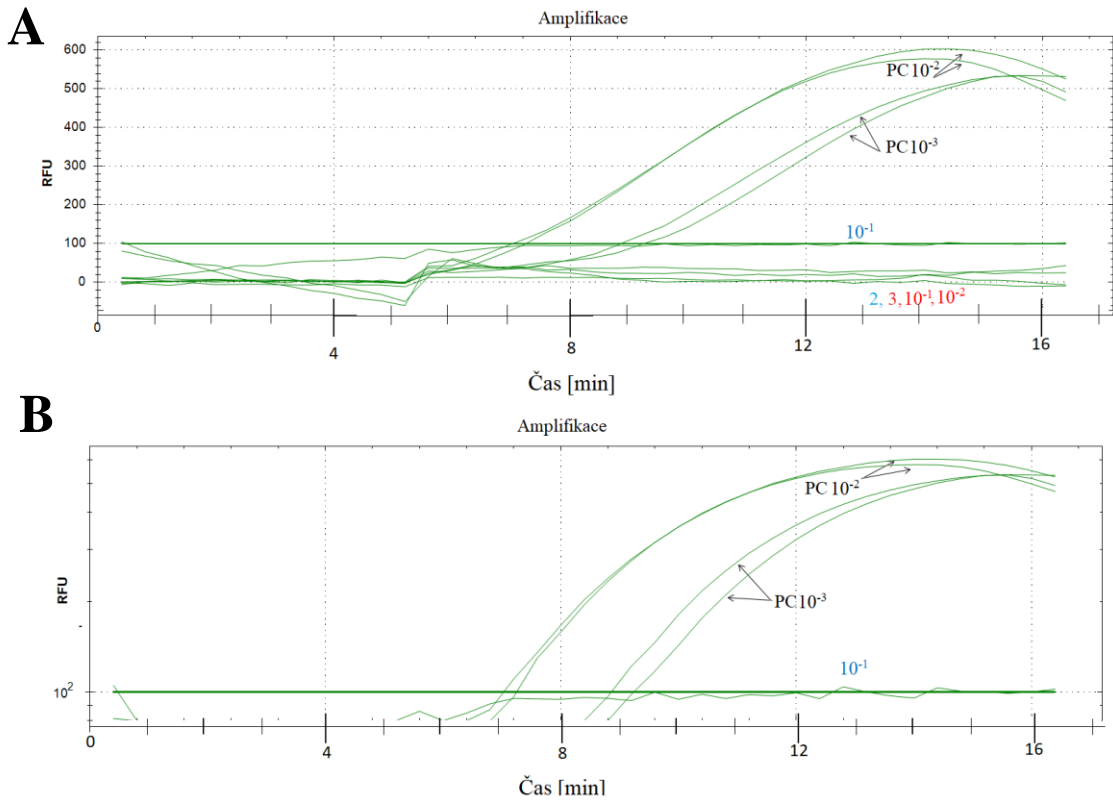


Graf 7: Amplifikační křivky vzorků buněčných linií získané při real-time PCR analýze.

PC: pozitivní kontrola

2,3: vzorky buněčných linií

K ověření funkčnosti RPA systému k detekci mykoplazmy v reálných vzorcích byly na základě předchozího pokusu vybrány vzorky buněčných linií s čísly 2 a 3 a pozitivní kontrola. Na Grafu č. 8A lze pozorovat amplifikační křivky vzorků pozitivní kontroly ředěných 10^{-2} a 10^{-3} , které mají téměř standardní sigmoidní tvar. U vzorků buněčných linií označených č. 2 a 3 nedošlo k amplifikaci. Pro detailnější náhled amplifikačních křivek je na Grafu č. 8B zobrazena logaritmická stupnice. Lze říci, že výsledek metody real-time PCR koreluje s výsledky získanými při metodě RPA. Vzorky buněčných linií s čísly 2 a 3 nebyly infikovány mykoplazmou a nedošlo v jejich zkumavkách k amplifikaci. Zatímco vzorek pozitivní kontroly byl amplifikován.



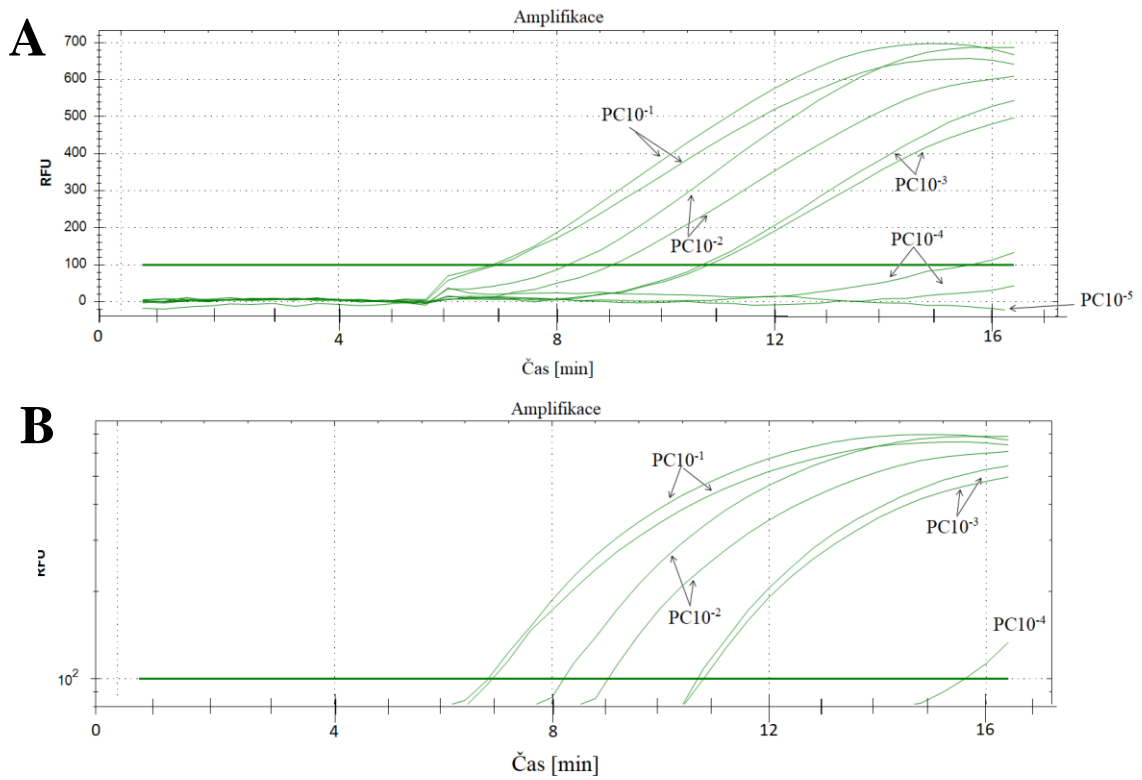
Graf 8: Amplifikační křivky vzorků buněčných linií s čísly 2 a 3 a pozitivní kontroly získané při RPA.

PC: pozitivní kontrola

modrou barvou je označen vzorek buněčné linie č. 2 a jeho příslušná ředění

červenou barvou je označen vzorek buněčné linie č. 3 a jeho příslušná ředění

Následně byla se vzorkem pozitivní kontroly vytvořena diluční řada dle rozpisu v Tabulce č. 12 ke zjištění detekčního limitu metody RPA při použití reálných vzorků. Každé ředění pozitivní kontroly bylo vytvořeno v duplikátu (kromě ředění 10^{-5}). Na Grafu č. 9A lze pozorovat amplifikační křivky pozitivní kontroly s ředěním 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} , které vykazují téměř sigmoidní tvar. U pozitivního vzorku s ředěním 10^{-4} lze v jednom případě pozorovat mírnou amplifikaci, která přesahuje linku prahové hodnoty těsně před ukončením analýzy. Vzorek s ředěním 10^{-5} nebyl amplifikován. Pro detailnější náhled amplifikačních křivek je na Grafu č. 9B zobrazena logaritmická stupnice. Na základě výsledků lze říci, že detekční limit metody RPA pro reálné vzorky je při ředění 10^{-3} (tisícinásobné ředění).



Graf 9: Amplifikační křivky diluční řady pozitivní kontroly získané při RPA.

PC: pozitivní kontrola

6 Diskuse

Mykoplazmy jsou prokaryotické organismy, které způsobují infekce buněčných kultur (Greenwood *et al.*, 1999; Šebek, 2018). Kontaminace buněčných linií mykoplazmou představuje hlavní problém techniky buněčných kultur (Drexler *et Uphoff*, 2002). K detekci velmi rané fáze infekce nebo v případech, kdy je potlačen růst mykoplazmy (např. během ošetření buněčných kultur antibiotiky za účelem odstranění kontaminace) je vyžadována vysoká citlivost detekčních metod (Drexler *et Uphoff*, 2002). Metoda PCR se běžně používá k citlivé a rychlé detekci kontaminace buněčných kultur a identifikaci mykoplazem (Rawadi *et Dussurget*, 1995). PCR patří mezi neizotermální metody, které vyžadují náročné přístrojové vybavení, a proto je nelze použít pro testování v terénu. Před několika lety došlo k rozvoji izotermálních amplifikačních technik, které nevyžadují náročné přístrojové vybavení a lze je použít pro POC diagnostiku (Li *et Macdonald*, 2015). Mezi izotermální techniky patří např. metoda RPA, která se používá k identifikaci celé řady patogenů (Daher *et al.*, 2016).

Cílem diplomové práce byl vývoj a validace typizační soupravy TwistAmp® exo k detekci mykoplazmy v buněčných kulturách pomocí metody RPA.

Byla ověřena funkčnost navržených primerů a sondy při amplifikaci syntetických standardů *M. arginini*, *M. fermentans* a *Acholeplasma laidlawii* metodou RPA za použití soupravy TwistAmp® exo (Graf 4). Zkřížená reaktivita není v tomto testování na škodu a lze pomocí ní detekovat více druhů třídy *Mollicutes* způsobujících kontaminaci buněčných kultur. V RPA dilučních řadách o 3x a 10x ředěních syntetického standardu *M. arginini* (Graf 2 a 3) byl u vzorků s vysokým počtem molekul pozorován na začátku detekce nárůst amplifikace, po kterém následoval výrazný pokles amplifikace pod linku prahové hodnoty. Na základě výsledků hypotetizovat, že pravděpodobně dochází u vzorků s vysokým počtem molekul ke zhášení fluorescence. Rohrman *et Richards-Kortum* (2015) ve své studii zjistili, že vysoká celková koncentrace vstupní DNA má negativní vliv na citlivost metody RPA (zabraňuje amplifikaci cílové DNA). Vysoce koncentrované vzorky představují problém v případě, kdybychom použili metodu s detekcí amplikonů až na konci testu. V takovém případě bychom nepozorovali žádný signál a mykoplazma by nebyla vůbec detekována. Proto je vhodné použít k detekci mykoplazmy metodu s detekcí v reálném čase, což s sebou nese nevýhodu pro případnou POC aplikaci – je nutné využít přístroj ke snímání fluorescence (termocyklér nebo dedikovaný přístroj vyráběný TwistDx). Amplifikační křivky RPA dilučních řad syntetického standardu *M. arginini* o 3x a 10x ředěních (Graf 2 a 3) nevykazují standardní průběh, který je naopak pozorován v real-time PCR dilučních řadách syntetického standardu *M. arginini* o 3x a 10x ředěních (Graf 5 a 6). Změna nastává v případě RPA amplifikačních křivek reálných vzorků (Graf 8 a 9), které svým tvarem připomínají téměř sigmoidní PCR křivku. Na základě

výsledků lze říci, že RPA amplifikační křivky se liší svým tvarem na základě vzorku použitého k amplifikaci.

Ke stanovení detekčního limitu metody RPA byla připravena diluční řada syntetického standardu *M. arginini* o 10x ředěních. Detekční limit metody exo-RPA byl 60 molekul syntetického standardu mykoplazmy *M. arginini* na 1 μ l (Graf 3). Pro porovnání detekčního limitu metody RPA s real-time PCR byla připravena real-time PCR diluční řada se syntetickým standardem *M. arginini* o 10x ředěních (Graf 6). Detekční limit real-time PCR byl stejný jako u metody RPA, 60 molekul syntetického standardu *M. arginini* na 1 μ l. Na základě výsledků lze říci, že exo-RPA je stejně citlivá jako standardní metoda real-time PCR. Stejných výsledků dosáhli i Wang *et al.* (2017), kteří porovnávali detekční limit metody exo-RPA s real-time PCR (10^2 kopií/reakce) k detekci kočičího herpesviru typu 1 (FHV-1). Také Geng *et al.* (2017) ve své studii zjistili, že detekční limit metody exo-RPA k detekci psího parvoviru typu 2 (CPV2) byl stejný jako v případě metody real-time PCR (10^1 kopií/reakce).

Ke stanovení detekčního limitu metody RPA pro reálné vzorky, byla připravena diluční řada (Tab 12) se vzorkem, který byl pozitivně testován na přítomnost mykoplazmy metodou real-time PCR (Graf 7). Detekční limit metody exo-RPA pro reálné vzorky buněčných linií je při ředění 10^{-3} (Graf 9). V budoucnu by měla být provedena real-time PCR diluční řada stejného vzorku pro porovnání detekčního limitu těchto metod.

Výhodou testů založených na metodě RPA je rychlost, specifita a cenová dostupnost (Daher *et al.*, 2016). Metodou Real-time PCR trvala detekce syntetického standardu *M. arginini* přibližně 3 hodiny, zatímco za použití metody exo-RPA byla tato detekce zkrácena na 16 minut. Stejných výsledků dosáhli i Geng *et al.* (2017), kteří ve své studii porovnávali dobu běhu testu exo-RPA k detekci CPV-2, která trvala 4–12 minut, zatímco v případě real-time PCR byla tato doba 32–54 minut. Daher (2015) ve své disertační práci porovnal cenu jednoho real-time PCR testu pro průkaz streptokoků skupiny B neboli *Streptococcus agalactiae* (GBS), která byla 35 USD, zatímco cena jednoho testu za použití metody RPA by mohla být přibližně 10 USD.

Ishikaw *et al.* (2006) vyvinuli rychlou a jednoduchou metodu k detekci mykoplazmy v buněčných kulturách za použití metody real-time PCR s detekcí amplikonů pomocí interkalakčního činidla SYBR green. Detekční limit tohoto testu je 100 fg genomické DNA *M. hyorhinae*. Podobný detekční limit má i genomická DNA izolovaná z *M. orale* nebo *M. salivarium*. Nevýhodou metod založených na PCR je jejich omezené použití v situacích, kdy je kontaminace způsobena mykoplazmou pocházející z neznámého druhu, jehož sekvence je značně odlišná od běžných druhů mykoplazem. V takovém případě je vhodné použít metody založené na DNA fluorochromovém barvení (např. nespecifické Hoechstovo barvení). Avšak fluorescenční barvení může vést k nejasným nebo falešně pozitivním výsledkům v přítomnosti jaderných zbytků po buněčné smrti. Proto je vhodné ke zvýšení spolehlivosti detekce

mykoplazmové kontaminace použít metody, které se liší principem detekce např. metody založené na PCR a fluorescenční barvení DNA.

Pro validaci soupravy exo-RPA k detekci mykoplazmy v buněčných kulturách bude potřeba provést test na specifitu s jinými bakteriemi způsobujícími kontaminaci buněčných kultur, např. rody *Staphylococcus*, *Streptococcus* nebo *Escherichia* (Šebek, 2018) a test na senzitivitu s větším počtem reálných pozitivních a negativních vzorků z buněčných linií.

7 Závěr

Cílem diplomové práce byl vývoj a validace typizační soupravy TwistAmp® exo k detekci mykoplazmy pomocí RPA.

Primery a sonda k detekci mykoplazmy pomocí metody exo-RPA byly navrženy Annou Korytářovou za využití volně přístupných internetových softwarů a informací zveřejněných společností TwistDx. Následně byla ověřena funkčnost těchto reagensů při amplifikaci syntetických standardů *M. arginini*, *M. fermentans* a *Acholeplasma laidlawii*. Výsledky potvrdily, že pomocí metody exo-RPA lze detekovat více druhů třídy *Mollicutes* způsobujících kontaminaci buněčných kultur. Ke stanovení detekčního limitu metody RPA byla připravena diluční řada syntetického standardu *M. arginini* o 10x ředěních, která byla porovnána s diluční řadou získanou během metody real-time PCR. Detekční limit obou metod byl stejný, 60 molekul syntetického standardu *M. arginini* na 1 µl. Lze tedy říci, že citlivost metody exo-RPA je srovnatelná s real-time PCR. V reálném nakaženém (pozitivním) vzorku buněčné linie byla přítomnost mykoplazmy spolehlivě prokázána i při tisícinásobném ředění. Metoda RPA má ve srovnání s real-time PCR výhodu v jednoduchosti, rychlosti a finanční dostupnosti.

Mykoplazmový detekční systém na bázi rekombinázové polymerázové amplifikační reakce ještě není zvalidovaný tak, aby mu bylo možno udělit certifikační značka CE-IVD, popřípadě aby se metoda dala zakreditovat dle normy ISO15189. V budoucnu bude nutné stanovit specifitu a senzitivitu na větším počtu pozitivních a negativních vzorků buněčných linií. Na základě dosavadních výsledků této práce má RPA vysoký potenciál k tomu stát se alternativou metody real-time PCR k detekci mykoplazmové infekce v buněčných kulturách, i přes svoji odlišnou dynamiku.

8 Literatura

Abd El Wahed A., El-Deeb A., El-Tholoth M., Abd El Kader H., Ahmed A., Hassan S., Hoffmann B., Haas B., Shalaby M. A., Hufert F. T., Weidmann M. (2013): A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *Plos One* 8: e71642.

Amer H. M., Abd El Wahed A., Shalaby M. A., Almajhdi F. N., Hufert F. T., Weidmann M. (2013): A new approach for diagnosis of bovine coronavirus using a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay. *Journal of Virological Methods* 193: 337–340.

Arya M., Shergill I. S., Williamson M., Gommersall L., Arya N., Patel H. R. (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5: 209–219.

Barile M. F., Rottem S. (1993): *Mycoplasmas in Cell Culture*. In: Kahane I., Adoni A. (eds.): *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas*, pp. 155–193, Plenum Press, New York.

Bartůňková J., Paulík M. a kolektiv (2011): *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada, Praha.

Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996): *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*, Marvil, Praha.

Boyle D. S., Lehman D. A., Lillis L., Peterson D., Singhal M., Armes N., Parker M., Piepenburg O., Overbaugh J. (2013): Rapid detection of HIV-1 proviral DNA for early infant diagnosis using recombinase polymerase amplification. *MBio* 4: e00135–13.

Daher R. (2015): *Recombinase polymerase amplification technology: Assessment for nucleic acidbased point-of-care diagnostics*. Disertační práce. Université Laval, Québec, Canada.

Daher R. K., Stewart G., Boissinot M., Bergeron M. G. (2016): Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications. *Clinical Chemistry* 62: 947–958.

de Paz H. D., Brotons P., Munoz-Almagro C. (2014): Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 14: 827–843.

Didenko, V. V. (2006): *Fluorescent energy transfer nucleic acid probes: designs and protocols*. Vol. 335, Humana Press. *Methods in molecular biology*, Totowa, N.J.

- Drexler H. G., Uphoff C. C. (2002): Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39: 75–90.
- Euler M., Wang Y., Heidenreich D., Patel P., Strohmeier O., Hakenberg S., Niedrig M., Hufert F. T., Weidmann M. (2013): Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents. *Journal of Clinical Microbiology* 51: 1110–1117.
- Euler M., Wang Y., Nentwich O., Piepenburg O., Hufert F. T., Weidmann M. (2012): Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus. *Journal of Clinical Virology* 54: 308–312.
- Freshney R. I. (2005): *Culture of Animal Cells*. Vyd. 5, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Geng Y., Wang J., Liu L., Lu Y., Tan K., Chang Y. Z. (2017): Development of real-time recombinase polymerase amplification assay for rapid and sensitive detection of canine parvovirus 2. *BMC Veterinary Research* 13: 311.
- Gong M., Meng L., Jiang B., Zhang J., Yang H., Wu J., Shou C. (2008): p37 from *Mycoplasma hyorhinis* promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 530–537.
- Greenwood D., Slack R. C. B., Peutherer J. F. a kolektiv (1999): *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. Grada, Praha.
- Halbedel S., Stulke J. (2007): Tools for the genetic analysis of Mycoplasma. *International Journal of Medical Microbiology* 297: 37–44.
- Harasawa R., Mizusawa H., Nozama T., Asada K., Ito I. (1993): Detection and tentative identification of dominant mycoplasma species in cell cultures by restriction analysis of the 16S–23S rRNA intergenic spacer regions. *Research in Microbiology* 144: 489–493.
- Harasawa, R. (1996): PCR: Application of nested PCR to detection of mycoplasmas. *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* 2: 75–79.
- Hay R. J., Macy M. L., Chen T. R. (1989): Mycoplasma infection of cultured cells. *Nature* 339: 487–488.

- Haycock J. W. (2011): 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. *Methods in Molecular Biology* 695: 1–15.
- Higgins M., Ravenhall M., Ward D., Phelan J., Ibrahim A., Forrest M. S., Clark T. G., Campino, S. (2019): PrimedRPA: primer design for recombinase polymerase amplification assays. *Bioinformatics* 35: 682–684.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson, R. (1993): Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* 11: 1026–1030.
- Hill-Cawthorne G. A., Hudson L. O., El Ghany M. F. A., Piepenburg O., Nair M., Dodgson A., Forrest M. S., Clark T. G., Pain, A. (2014): Recombinations in *Staphylococcal Cassette* chromosome mec elements compromise the molecular detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* 9: e101419.
- Huang, S., Li, J.Y., Wu, J., Meng, L. and Shou, C. C. (2001): Mycoplasma infections and different human carcinomas. *World Journal of Gastroenterology* 7: 266–269.
- Hudu S. A., Alshrari A. S., Syahida A., Sekawi Z. (2016): Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *Journal of clinical and diagnostic research* 10: DE01–DE05.
- Hynds R. E., Giangreco A. (2013): The relevance of human stem cell-derived organoid models for epithelial translational medicine. *Stem Cells* 31: 417–422.
- Chen T. R. (1977): In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Experimental Cell Research* 104: 255–262.
- Ishikawa Y., Kozakai T., Morita H., Saida K., Oka S., Masuo Y. (2006): Rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures using sybr green-based real-time polymerase chain reaction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 42: 63–69.
- Kaltenboeck B., Wang C. (2005): Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Advances in Clinical Chemistry*. 40: 219–59.
- Kopecká, J., Rotková G. (2017): Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií. Masarykova univerzita, Brno. [online] [navštíveno 18.3.2020] Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/kultivace_mikroorganizmu.html

Kurková L. (2009): Testování kvality kultivačních médií. Diplomová práce. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice.

Labguide. [online] [navštíveno 19.3.2020] Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/pcr/modifikace-pcr/>

Lane B. P., Miller S. L. (1976): Preparation of large numbers of uniform tracheal organ cultures for long term studies. I. Effects of serum on establishment in culture. *In vitro* 12: 147–154.

Li J., Macdonald J. (2015): Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors and Bioelectronics* 64: 196–211.

Li J., Macdonald J., von Stetten F. (2019): Review: a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification. *The Analyst* 144: 31–67.

Ligasová A., Vydržalová M., Buriánová R., Brůčková L., Večeřová R., Janošťáková A., Koberna K. (2019): A new sensitive method for the detection of mycoplasmas using fluorescence microscopy. *Cells* 8: 1510.

Litzman J. Chovancová Z., Thon V., Vlková M., Král V., Freiburger T. (2007): *Základy vyšetření v klinické imunologii*. Vyd. 1, Masarykova univerzita, Brno.

Logan J., Edwards K., Saunders N. (2009): *Real-time PCR. Current technology and application*. Caister Academic Press. Norfolk, UK.

Masters J. R., Stacey G. N. (2007): Changing medium and passaging cell lines. *Nature Protocols* 2: 2276–2284.

McGarrity G. J., Vanaman V., Sarama J. (1985): Cell culture techniques. *American society for Microbiology News* 51: 170–183.

McPherson M. J., Møller S. G. (2000): *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.

Mirjalili A., Parmoor E., Moradi Bidhendi S., Sarkari B. (2005): Microbial contamination of cell cultures: a 2 year study. *Biologicals* 33: 81–85.

Moore P. (2005): Replicating success. *Nature* 435: 235–235.

Mullis K. B., Faloona F. A. (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–350.

Namiki K., Goodison S., Porvasnik S., Allan R. W., Iczkowski K. A., Urbanek C., Reyes L., Sakamoto N., Rosser C. J. (2009): Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells. *PLoS ONE* 4: e6872.

Nikfarjam, L., Farzaneh, P. (2012): Prevention and detection of Mycoplasma contamination in cell culture. *Cell Journal* 13: 203–212.

Piepenburg O., Williams C. H., Stemple D. L., Armes N.A. (2006): DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology* 4: e204.

Piepenburg, O., Williams C. H., Armes N. A. (2014): Methods for multiplexing Recombinase Polymerase Amplification. [online] [navštíveno 1.4.2020] Dostupné z: <https://patents.google.com/patent/US20140295436>

Rawadi G., Dussurget O., (1995): Advances in PCR-based detection of mycoplasmas contaminating cell cultures. *PCR. Methods Applications* 4: 199–208.

Razin S., Tully J. G. (1995): *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Vol. 1. Academic Press, San Diego.

Razin S., Tully J. G. (1996): *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology*. Vol. 2. Academic Press, San Diego.

Rohrman B., Richards-Kortum R. (2015): Inhibition of Recombinase Polymerase Amplification by Background DNA: A Lateral Flow-Based Method for Enriching Target DNA. *Analytical Chemistry*, 87: 1963–1967.

Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.

Sedláček I. (2007): *Taxonomie prokaryot*. Masarykova univerzita, Brno.

Schindler J. (2008): *Ze života bakterií*. Academia, Průhledy, Praha.

Schirinzi G. F., Pérez-Pomeda I., Sanchís J., Rossini C., Farré M., Barceló D. (2017): Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environmental Research* 159: 579–587.

Schwarzer J., Rapp E., Hennig R., Genzel Y., Jordan I., Sandig V., Reichl U. (2009): Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: Influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* 27: 4325–4336.

Sigmaaldrich. [online] [navštíveno 19.3.2020] Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/testing-for-mycoplasma0.html>

Šebek J. (2018): *Buněčné kultury v medicíně*. Galén, Praha.

Timenetsky J., Santos L. M., Buzinhani M., Mettifogo E. (2006): Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 39: 907–914

Tsai S., Wear D. J., Shih J. W., Lo, S. C. (1995): Mycoplasmas and oncogenesis: persistent infection and multistage malignant transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 10197–10201.

TwistDx. [online] [navštíveno 20.3.2020] Dostupné z: <https://www.twistdx.co.uk/en/support/manuals/twistamp-manuals>

Uphoff C. C., Brauer S., Grunicke D., Gignac S. M., MacLeod R. A. F., Quentmeier H., Steube K., Tümmler M., Voges M., Wagner B., Drexler H. G. (1992b): Sensitivity and specificity of five different mycoplasma detection assays. *Leukemia* 6: 335–341.

Uphoff C. C., Drexler H. G. (2002): Comparative PCR analysis for detection of mycoplasma infections in continuous cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 38: 79e85.

Uphoff C.C., Drexler H.G. (2009): Mycoplasma Contamination of Cell Cultures. In: Flickinger M.C. (ed.): *The encyclopedia of industrial biotechnology, bioprocess, bioseparation and cell technology*. Vol 5, pp. 3611–3630, John Wiley & Sons, New York.

Uphoff C.C., Gignac S. M., Drexler H. G. (1992a) Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines. I. Comparison of various detection methods. *Journal of Immunol Methods* 149: 43–53.

Valentová Š. (2018): *Studium exprese genů v živočišných tkáních metodou real-time PCR*. Bakalářská práce. Agronomická fakulta, Mendelova univerzita, Brno.

Vankuppeveld F. J. M., Johansson K. E., Galama J. M. D., Kissing, J., Bolske, G., Vanderlogt J. T. M., Melchers W. J. G. (1994): Detection of Mycoplasma Contamination in Cell-Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 149–152.

Vejražka M. (2008): Buněčné kultury. Bioprojekty. Ústav lékařské biochemie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha. [online] [navštíveno 18.3.2020] Dostupné z: <http://bioprojekty.lf1.cuni.cz/3381/sylaby-prednasek/textova-verze-prednasek/bunecne-kultury-vejrazka.pdf>

Vincent M., Xu Y., Kong H. (2004): Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO reports* 5: 795–800.

von Seefried A, MacMorine H. G. (1976): The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. *Developments in biological standardization* 37: 83–99.

Votava M., Černohorská L., Heroldová M., Holá V. Ondrovčík P., Růžička F., Woznicová V., Zahradníček O., Mejzlíková L. Dvořáčková M. (2003): *Lékařská mikrobiologie speciální*. Neptun, Brno.

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: 1691–1696.

Wang J., Liu L., Wang J., Sun X., Yuan W. (2017): Recombinase polymerase amplification assay – a simple, fast and cost-effective alternative to real time pcr for specific detection of feline herpesvirus-1. *PLoS One* 12: e0166903.

Yamaguchi Y., Deng D., Sato Y., Hou Y. T., Watanabe R., Sasaki K., Kawabe M., Hirano E., Morinaga T. (2013): Silicate fiber-based 3D cell culture system for anticancer drug screening. *Anticancer Research* 33: 5301–5309.

Yang M., Ke Y., Wang X., Ren H., Liu W., Lu H., Zhang W., Liu S., Chang G., Tian S., Wang L., Huang L., Liu Ch. Yang R., Chen Z. (2016): Development and evaluation of a rapid and sensitive EBOV-RPA test for rapid diagnosis of ebola virus disease. *Scientific Reports* 6 (1).

Yavlovich A., Tarshis M., Rottem S. (2004): Internalization and intracellular survival of *Mycoplasma pneumoniae* by non-phagocytic cells. *FEMS Microbiology Letters* 233: 241–246.

Young L., Sung J., Stacey G., Masters J. R. (2010): Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature Protocols* 5: 929–934.

9 Přílohy

Příloha 1: Nukleotidové sekvence použitých syntetických standardů.

Příloha 2: Nukleotidové sekvence použitých primerů a sond.

Příloha 1: Nukleotidové sekvence použitých syntetických standardů.

Označení	Směr	Sekvence (5'-3')
Syntetický standard 1929	F	GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATCATTAGTCGGTGGAGAGTTCACTGACGCAGCTAACGCAT TAAATGATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTTGAAGAT ACGCGGAGAACCTTACCCACTCTTGACATCCTTCGCAATGCTATAGAGATATAGCGGAGGTTAACGGAGTGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTCAGCT CGTGTCGTGAGATGTTTGGTCAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTACTAACGAGTCATGTCGAGGACTCTAGAGATACTGCCTGGGT AACTGGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGAGTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAAGAGAAGCAATATGG CGACATGGAGCAAATCTCAAAAAGCCGATCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCTA CGCTGCGGT
Syntetický standard 1930	F	TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGATCATTAGCTGATGGGGAACTCATCGGGCAGCTAACGCATTAATGA TCCGCCTGAGTAGTACGTTTCGCAAGAATAAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTTGAAGATACGCGTA GAACCTTACCCACTCTTGACATCTTCTGCAAAGCTATGGAGACATAGTGGAGGTTAACAGAATGACAGATGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCG TGAGATGTTTGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTAGTTACTACCATTTAGTTGAGGACTCTAAGGAGACTGCCCCAGTAATCGGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGAGTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAAGAGAAGCGAAGTGGTGACATGGA GCAAACCTCAAAAACCGGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGT GAATACGTTTC
Syntetický standard 1931	F	AACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGAACTAAGTGTTGGGCAAAAGGTCAGTGCTGCAGTTAACGCATTAAGTTCTCCGCC TGAGTAGTACGTACGCAAGTATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGGATCATGTTGTTTAAATTCGAAGATACAACGAAAAAC CTTACCAGGTCTTTGACATACTCTGCAAAAAGGCTTAGAAAATAAGTCCGGAGGCTTACAGATGTACAGGTGGTGCACGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGT GAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCCTTATTGCTAGTTACCATCATTAAAGTTGGGGACTCTAGCGAGACTGCCAGTGATAAATTGGAG GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCCTTATGAACCTGGGCTACCAAACGTGATAACAATGGCTGGAACAAAAGAGAAGCGATAGGGTGACCTG GAGCGAAACTCACAAAACAGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCCCAAATCAGCATGTTGCGG TGAATACGTTTC

F: forward

Příloha 2: Nukleotidové sekvence použitých primerů a sond.

Označení	Směr	Sekvence (5'-3')
Primer 1562	F	ATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTG
Primer 1563	F	CATTGTAGCACGTGTGTTGCCCACT
Sonda 1565	F	AACGGAGTGACAGATGGTGCATGGTTGTCG1CAZC2CGTGTCGTGAGATGTT
Sonda 2198	F	ATCCGCACAAGCGGTGGAGC

F: forward, R: reverse