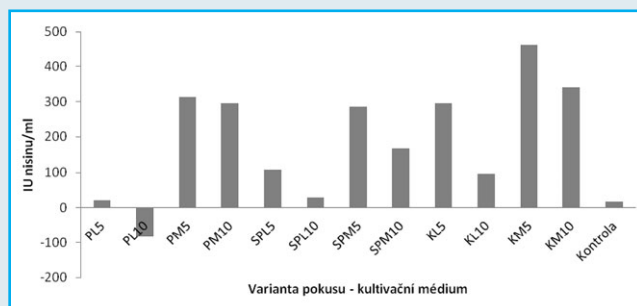


hydrolyzát 2 % a maltodextrin 10 % Nejnižší obsah nisinu u suplementovaných vzorků (940 IU/ml) byl naměřen u vzorku obsahující sojový pepton 2 % a laktóza 5 %. Také u všech variant přísad sacharidů a dusíkatých látek ve sladké syrovátce byl stanoven vyšší obsah nisinu než u kontroly (818 IU/ml) obsahující pouze sladkou syrovátku a Tween 80.

### Porovnání výsledků testování růstových médií ve sladké demineralizované syrovátce s přísadkou sacharidů a dusíkatých látek a ve sladké syrovátce s přísadkou sacharidů a dusíkatých látek



**Obr. 5** Porovnání rozdílů mezi sladkou demineralizovanou syrovátkou a sladkou syrovátkou s přísadkou sacharidů a dusíkatých látek na produkci nisinu

Při porovnání sladké demineralizované syrovátky a sladké syrovátky viz obr. 5 bylo dosaženo lepších výsledků ve sladké demineralizované syrovátce v průměru o 194 IU nisinu/ml. U vzorku obsahující pepton 2 % a laktózu 10 % byly stanoveny vyšší hodnoty ve sladké syrovátce. U všech ostatních vzorků bylo dosaženo lepších výsledků ve sladké demineralizované syrovátce.

### Závěr

V této práci byly rozšířeny dříve získané výsledky o zjištění vlivu přísad vybraných nutrientů na produkci nisinu v médiu na bázi sladké demineralizované syrovátky.

Při sledování vlivu přísad sacharidů a dusíkatých látek byly ověřeny dříve získané výsledky a u obou variant růstového média byl stanoven nejvyšší obsah nisinu u varianty kyselý kaseinový hydrolyzát 2 % a maltodextrin 10 %. Vyšší obsah nisinu v průměru o 194 IU nisinu/ml byl stanoven ve sladké demineralizované syrovátce.

Získané poznatky jsou využívány při kontinuální fermentaci v laboratorním fermentoru s následnou separací nisinu vhodnými izolačními technikami.

### Poděkování

Práce vznikla za podpory MZe, NAZV program KUS, č. projektu QJ1310254.

### Literatura:

ARAUZ L. J., JOZALA A. F., MAZZOLA P. G., VESSONI PENNA (2009): Nisin biotechnological production and application: a review, *Food Science and Technology*, s.146-154.

- BINDER M., NEHYBA A., ŠALAKOVÁ A., SEDLAŘÍK V. (2015): Vliv kulturačních podmínek na tvorbu nisinu při fermentaci syrovátky kmeny laktokoků, *Mlékařské listy*, 153, s. XIV-XIX.
- DRBOHLAV J., ŠALAKOVÁ A., SEDLAŘÍK V., NEHYBA A., CICVÁREK J. (2009): Využití kyseliny mléčné ze syrovátky pro přípravu polyaktátu a tvorbu biodegradovatelných plastů, *Mlékařské listy* 115, s. 13-18.
- FDA(2001): Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000065: August 2005. Washington, D.C.: Department of Health and Human Services. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g065.html>.
- GUERRA N. P., RUA M. L., PASTRANA L. (2001): Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey, *International Journal of Food Microbiology* 70, s. 267-281.
- CHUMCHALOVÁ J., JOSEPHEN J., PLOCKOVÁ M. (1995): Characterization of acidocin CH5, a saccharolytic sensitive bacteriocin of *Lactobacillus acidophilus* CH5. *Chemie, Mikrobiologie Technologie der Lebensmittel* 17, s. 145-150.
- KAFKOVÁ M., DRÁB V., DRBOHLAV J., HAVELKOVÁ D. (2017): Antifungální efekt a poloprovodní aplikace aktivního přípravku na bázi fermentované syrovátky v toustových chlebech, *Mlékařské listy* 163, s. 9-1.
- KUNOVÁ G., SEDLAŘÍK V., KLIMEŠOVÁ M., RAŠKOVÁ Z., HYRŠLOVÁ I., ŠALAKOVÁ A., DRÁB V. (2016): Využití syrovátky jako růstového média pro nisin produkční kmeny laktokoků, *Mlékařské listy* 146, s. I-IV.
- PAPAGIANI M., AVRADAMIS N., FILIOUSIS G. (2007): Investigating the relationship between the specific glucose uptake rate and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat cultures of *Lactococcus lactis*, *Enzyme and Microbial Technology* 40 (2007), s. 1557-1563.
- SENAN S., ABD EI-AAI H., DAVE R., HASSAN A. (2016): Production and stability of nisin in whey protein concentrate, *Food Science and Technology*, s. 125-129.
- SUKOVÁ I. (2006): Syrovátka v potravinářství, *Potravinářské informace* 2006 č. 1, s. 20.
- STOYANOVA L. G., SULTIMOVA T. D., BOTINA S. G., NETRUSOV A. I. (2006): Isolation and Identification of New Nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Milk, *Applied biochemistry and Microbiology*, s. 492-499.

**Korespondující autor:** Ing. Marie Marková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Ke Dvoru 12 A, 160 00 Praha 6-Vokovice

Markova.M@seznam.cz, markova@milcom-as.cz

Přijato do tisku: 11. 9. 2017

Lektorováno: 3. 10. 2017

## VYUŽITÍ METODY LAMP PRO RYCHLOU DETEKCI PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁŘSKÉ A KLINICKÉ PRAXI

**Eva Šviráková, Jakub Kyznar, Kateřina Loupancová**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

**The use of LAMP method for fast detection of pathogenic microorganisms in food and clinical practices**

### Abstrakt

Tato teoretická práce se zabývá problematikou charakterizace, vysvětlení základního principu a praktického využití nově vyvinuté molekulárně-biologické metody,

takzvané izotermální amplifikace zprostředkované smyčkou (metody LAMP). Tato metoda je vhodná pro detekci patogenních mikroorganismů vystupujících se jak v potravinách a způsobujících častá alimentární onemocnění, tak ve vzorcích klinických. Bylo zjištěno, že metoda LAMP je rychlou, specifickou a robustní metodou. Výsledky této literární rešerše mohou být použitelné při budoucích experimentálních aplikacích metody LAMP jak v oblasti potravinářské praxe při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti a technologické nerizikovitosti potravinářských surovin a výrobků, tak také v oblasti klinické či environmentální praxe.

**Klíčová slova:** metoda LAMP, izotermální amplifikace DNA/RNA, rychlá detekce, patogenní mikroorganismy, potravinářský průmysl, klinická praxe.

## Abstract

This theoretical work deals with the characterization, explanation of basic principle and practical use of a newly developed molecularly-biological method, called the loop-mediated isothermal amplification method (the LAMP method). This method is suitable for detection of pathogenic microorganisms occurred in foods and causing frequent alimentary diseases, as well as in clinical samples. It has been found, that the LAMP method is fast, specific and robust method. The results of this literary research can be used in the future for experimental applications of the LAMP method, not only in the field of food practice in the targeted ensuring of health safety and technological riskiness of food raw materials and products, but also in the area of clinical and environmental practices.

**Key words:** LAMP method, DNA/RNA isothermal amplification, fast detection, pathogenic microorganisms, food industry, clinical practice.

## Úvod

Metoda LAMP (z anglického slovního spojení "loop-mediated isothermal amplification"), jejíž zkratka se do jazyka českého překládá jako metoda "izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou", se řadí k nově vyvinutým molekulárně-biologickým metodám pro amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA nebo RNA), a to v souvislosti s detekcí zejména patogenních mikroorganismů. Tato metoda poskytuje vysoce spolehlivé výsledky relativně rychle, v profilu jednoduché experimentální realizovatelnosti (Notomi a kol., 2015).

Princip metody byl poprvé zveřejněn v roce 2000 (Notomi a kol., 2000) a v téměř roce se řada světových vědecko-výzkumných týmů začala rozvojem této metody a jejího praktického využití v různých oblastech lidských činností intenzivně zabývat (Mori a kol., 2013). Na základě detailního studia a experimentálního výzkumu základních principů metody LAMP byla vyvinuta řada aplikačních testů LAMP vycházejících z jejího základního postupu, začínajících extrakcí nukleových kyselin až po koncovou

detekci zjišťovaného patogenního mikroorganismu (Notomi a kol., 2015).

V průběhu vlastní reakce LAMP jsou specifické sekvence nukleových kyselin amplifikovány při fixní teplotě, a to při opakování dvou typů elongačních reakcí, během kterých dochází k prodloužení templátového vlákna v oblastech takzvané kmenové "smyčky" (Notomi a kol., 2015). K reakci jsou využívány dvojce vnitřních a vnějších primerů, přičemž každý z vnitřních primerů obsahuje genovou sekvenci, která je komplementární k jednomu řetězci amplifikační oblasti na 3'-konci. Tato sekvence je identická s vnitřní oblastí stejného řetězce na 5'-konci templátového vlákna. Existuje několik aspektů metody LAMP, které se liší od ostatních amplifikačních metod. Za prvé, amplifikace je být uskutečňována za podmínek konstantní teploty. Především na základě charakteristik vnitřního primeru dochází k amplifikaci s daleko vyšší specifitou, než jaká je typická pro jiné detekční metody. Proces amplifikace je obvykle dokončen do 1 h. Návrh specifických loop-primerů může zkrátit dobu amplifikace buď až na polovinu nebo alespoň o jednu třetinu oproti původní metodě LAMP (Nagamine a kol., 2002). Navíc, tato metoda může být použita pro amplifikaci cílové sekvence RNA. V tomto případě může být jednodušší amplifikace, podobně jako amplifikace DNA, provedena za současného přidávání enzymu reverzní transkriptasy, která také vykazuje vysokou aktivitu při prodloužování řetězce. Z důvodů vysoké specifčnosti metody LAMP a vzniku dlouhých amplifikačních produktů mohou být k detekci produktů DNA použity i jiné detekční metody, například turbidimetrická metoda (Mori a kol., 2001, 2004) nebo fluorescenční metoda (Tomita a kol., 2008). Obě metody umožňují detekci produktů DNA v reálném čase a jejich vizuální kontrolu. Kromě toho, detekce produktů LAMP s využitím běžných sond DNA je také vhodná. Dalším prvkem, který přispívá k jednoduchosti metody LAMP, je dostupnost softwaru sloužícího pro usnadnění návrhu vhodných primerů pro reakci LAMP. Tento software může být provozován v režimu online a automaticky může navrhnout vhodné sety primerů specifické pro vstupní cílovou sekvenci (Anonymous, 2015).

Ve srovnání s klasickou metodou polymerasové řetězové reakce (Polymerase Chain Reaction, PCR) se metoda LAMP jeví jako vhodnější, a to zejména z důvodu jednoduchosti, rychlosti a snazší praktické aplikovatelnosti v terénní praxi. Probíhající reakce u metody LAMP nejsou tak snadno inhibované nejrůznějšími kontaminanty z prostředí, jako je tomu u metody PCR (Bektaş a Chapela, 2014). Obecně lze uvést, že se dá metoda LAMP flexibilně použít v širokém spektru praktických aplikací, a to například od detekce patogenních mikroorganismů na konkrétně zvoleném místě počínaje, přes genetické screeningové analýzy patogenů uskutečňované v zemích s nižší analyticko-přístrojovou vybaveností (například v rozvojových zemích), až po situace nutného rychlého testování patogeny kontaminovaných vzorků potravin, klinických vzorků či environmentálních vzorků (Notomi a kol., 2015).

Cílem této práce bylo vytvoření teoretické rešerše, zabývající se představením základních principů molekulárně-biologické metody LAMP a jejího využití pro rychlou a spolehlivou detekci patogenních mikroorganismů zejména v potravinářské a klinické praxi.

## VYUŽITÍ METODY LAMP V POTRAVINÁŘSKÉ PRAXI

### Charakterizace, výskyt a detekce potravinových patogenních mikroorganismů

Za patogenní mikroorganismy se považují takové mikroorganismy, které jsou schopny vyvolat infekční onemocnění. Jsou rozšířeny po celém světě a představují příčinu mnoha onemocnění a, bohužel, i úmrtí. Aby patogen způsobil alimentární onemocnění, musí být schopen v potravině přežít a následně po její konzumaci v těle člověka produkovat své faktory virulence (Bhunia, 2008). Patogenní mikroorganismy vyskytující se v potravinách jsou příčinou velkého počtu alimentárních onemocnění obecně po celém světě, nejvíce pak v rozvojových zemích. Důležitou roli zde hraje jejich včasná detekce, která může zabránit propuknutí alimentárních onemocnění, včetně toxikóz (Priyanka a kol., 2016).

Konvenční metody používané pro detekci potravinových patogenů jsou náročné na čas i experimentální práci, a proto dochází k neustálému vývoji nových rychlých metod usnadňujících a hlavně urychlujících detekci patogenních mikroorganismů. Podle principu, na kterém jsou tyto metody založeny, mohou být rozděleny na metody imunologické (např. metoda ELISA), molekulárně-biologické (např. metody PCR, LAMP aj.) a metody využívající biosensory. Všechny tyto nově vyvinuté metody mají jeden společný cíl, a to poskytnout rychlou, citlivou a specifickou metodu pro detekci patogenů, která je nenáročná na čas, práci a vynaložené finanční prostředky (Law a kol., 2015). Právě s příslibem těchto vlastností byla na začátku 21. století vyvinuta skupinou pod vedením Tsugunoriho Notomi metoda LAMP, která se v posledních letech začala prakticky uplatňovat už i na poli potravinářského průmyslu (Kokkinos a kol., 2014; Law a kol., 2015; Priyanka a kol., 2016).

### Alimentární onemocnění spojovaná s potravinovými patogenními mikroorganismy

Různé mikroorganismy, převážně bakterie, jsou přirozeně přítomny v lidském zažívacím traktu či na povrchu pokožky či u jiných savců, kde tvoří přirozenou mikroflóru. Nicméně existuje mnoho druhů mikroorganismů (bakterií, kvasinek a plísní), a také virů, které jsou pro člověka patogenní. Lidský zaživací trakt je jednou z možných cest, prostřednictvím které se patogenní mikroorganismy dostávají do těla, čímž dojde ke vzniku alimentárního onemocnění. Patogenní mikroorganismy jsou často přítomny ve

**Tab. 1** Vybrané lidské patogenní mikroorganismy, viry a prvoci vyskytující se v mléce a mlékárenských výrobcích, jako původci alimentárních onemocnění (Hayes a Boor, 2001; upraveno)

Původce alimentárního onemocnění	Alimentární onemocnění	
Bakterie čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i> včetně sérotypu O157:H7	Gastroenteritida, hemolytická urémie
	<i>Salmonella</i>	Gastroenteritida, břišní tyfus
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Gastroenteritida
Ostatní gramnegativní bakterie	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenteritida
	<i>Brucella</i> spp.	Brucelóza
	<i>Campylobacter jejuni</i>	Gastroenteritida
Grampozitivní sporující bakterie	<i>Bacillus cereus</i>	Gastroenteritida
	<i>Bacillus anthracis</i>	Antrax
	<i>Clostridium perfringens</i>	Gastroenteritida
	<i>Clostridium botulinum</i>	Botulismus
Grampozitivní koky	<i>Staphylococcus aureus</i>	Emetické intoxikace
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	Bolest v krku
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spála / bolest v krku
	<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	Faryngitida / zánět ledvin
Ostatní grampozitivní bakterie	<i>Corynebacterium</i> spp.	Záškrt
	<i>Listeria monocytogenes</i>	Listerióza
	<i>Mycobacterium bovis</i>	Tuberkulóza
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberkulóza
Rickettsie	<i>Coxiella burnetii</i>	Horečka Q
Viry	Enteroviry, polioviry, rotaviry, virus FMD	Střevní infekce
Plísně	Plísně	Mykotoxikóza
Prvoci	<i>Entamoeba histolytica</i>	Améboza
	<i>Giardia lamblia</i>	Giardióza (lamblióza)
	<i>Toxoplasma gondii</i>	Toxoplazmóza

vodě či v potravinářských surovinách a výrobcích, které nebyly například tepelně ošetřeny. Z tohoto důvodu je včasná detekce patogenů velmi důležitá, zejména kvůli prevenci vzniku alimentárních onemocnění (Priyanka a kol., 2016). Mezi mikroorganismy nejčastěji způsobující alimentární onemocnění se řadí následující: *Acinetobacter* spp., *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* a *Yersinia pestis* (Priyanka a kol., 2016).

Vzhledem k tomu, že mléko představuje vhodné prostředí pro růst patogenních mikroorganismů, snadno se tak stává prostředkem pro šíření alimentárních onemocnění. Nejčastějšími patogeny vyskytujícími se v mléce a mlékárenských výrobcích jsou *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., koagulasa-negativní stafylokoky; vyskytují se zde často také kvasinky a plísně. Výskyt dalších patogenů jakými jsou *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. a *Listeria monocytogenes* byl zaznamenán spíše v menší míře (Karpíšková a kol., 2011; Hyžáková, 2013). V Tab. 1 je uveden přehled vybraných lidských patogenů, které jsou spojovány s jejich výskytem v mléce a mlékárenských výrobcích (Hayes a Boor, 2001).

### Detekce potravinových patogenních mikroorganismů s využitím metody LAMP

Pro detekci potravinových patogenů byla metoda LAMP poprvé experimentálně použita v roce 2003; konkrétně byla provedena detekce genu *stxA2* u kmene *Escherichia coli* O157:H7 (Maruyama a kol., 2003). K výhodám detekce potravinových patogenů s využitím metody LAMP se řadí vyšší specifita a citlivost metody v porovnání s metodou PCR (Hara-Kudo a kol., 2005; Wang a kol., 2008; Yamazaki a kol., 2008). Jako příklad lze uvést detekci bakteriálního poddruhu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* v přirozeně kontaminovaných čerstvých vejcích. Literární studie uvádí, že k detekci této bakterie byly využity klasická kultivační metoda, metoda PCR a metoda LAMP. Zatímco pomocí kultivační metody a metody LAMP byla spolehlivě identifikována přítomnost *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ve všech vzorcích, metoda PCR selhala při identifikaci u 10 % vzorků z celkového počtu 110 testovaných vzorků. Metoda LAMP se ukázala být tedy rychlejší a zároveň stejně citlivou v porovnání s klasickou kultivační metodou (Ohtsuka a kol., 2005).

V současnosti jsou na trhu k dispozici komerční soupravy designované pro metodu LAMP, které jsou vhodné pro detekci patogenních mikroorganismů, jakými jsou zejména bakterie *r. Listeria*, *r. Salmonella*, *r. Campylobacter*, *r. Shigella*, *r. Legionella* či *Escherichia coli*, které proces detekce významně zjednodušují a zrychlují. Například, komerčně dostupná souprava reagensů "Loopamp detection kit" (Eiken Chemical Co., Tokyo, JPN) je vhodná pro detekci patogenů vyskytujících se v potravinářských

surovinách a výrobcích, jakými jsou často *Salmonella enteritica* subsp. *enterica*, bakterie *r. Shigella*, kmene *Escherichia coli* O157 a O26 produkující verotoxin či bakterie *r. Campylobacter*. Tato souprava obsahuje veškeré reagensie potřebné pro uskutečnění amplifikace, která probíhá v jedné zkumavce za podmínky, že celkový čas od přípravy vzorku až po dokončení amplifikace nepřesáhne 1 h. Před vlastní amplifikací DNA je nutno testovaný vzorek potravinu upravit; veškeré roztoky a činidla potřebné pro reakci LAMP jsou součástí soupravy. Připravený potravinový vzorek je následně podroben amplifikací DNA, která probíhá při konstantní teplotě, obvykle však v rozmezí teplot 59–65 °C. Přítomnost patogenu je potvrzena tím, že došlo k amplifikaci specifického genu. Vznik precipitátu je možné pozorovat pouhým okem či za pomoci turbidimetru, prostřednictvím kterého je měřen zákal v reálném čase; jedná se tedy o takzvanou metodu "Real-Time LAMP" (Law a kol., 2015).

### Srovnání vybraných molekulárně-biologických metod vhodných pro detekci potravinových patogenních mikroorganismů

V Tab. 2 jsou uvedeny vybrané molekulárně-biologické metody (konkrétně klasická metoda PCR, modifikovaná metoda PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase a metoda LAMP), které jsou vhodné pro detekci patogenních mikroorganismů pocházejících z různých kontaminovaných potravinářských surovin a výrobků, z důvodu možnosti vzájemného detailního porovnání výhod i nevýhod (Parida a kol., 2004).

**Tab. 2** Srovnání vybraných molekulárně-biologických metod vhodných pro detekci patogenních mikroorganismů (Parida a kol., 2004; upraveno)

	Detekční metoda		
	Konvenční metoda PCR	Modifikovaná metoda PCR s fluorescenční detekcí v reálném čase	Metoda LAMP
Výhody metody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Metoda "zlatého" standardu po izolaci DNA/RNA bez přítomnosti "živého agens"</li> <li>Včasná potvrzující diagnóza patogenu</li> <li>Často užívaná molekulárně-biologická metoda</li> <li>Možnost sériových analýz</li> <li>Možnost multiplexních analýz</li> <li>Jednoduše standardizovatelná metoda mezi laboratořemi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Simultánní amplifikace a detekce DNA/RNA během exponenciální části amplifikace</li> <li>Monitorování amplifikace DNA/RNA v reálném čase</li> <li>Kvalitativní i kvantitativní metoda</li> <li>Nižší riziko křížové kontaminace díky operacím prováděným v uzavřené zkumavce</li> <li>Zvýšená citlivost metody díky využití fluorescence</li> <li>Vyšší výkonost analýzy díky softwarové řízení detekci</li> <li>Jednoduše standardizovatelná metoda mezi laboratořemi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Izotermální amplifikace nevyžadující termocykler</li> <li>Detekce možná v reálném čase i po proběhnutí reakce</li> <li>Kvalitativní i kvantitativní metoda</li> <li>Sledování průběhu amplifikace (změna barvy, tvorba zákalu) pouhým okem</li> <li>Robustní metoda</li> <li>Metoda jednoduše standardizovatelná mezi laboratořemi</li> </ul>
Nevýhody metody	<ul style="list-style-type: none"> <li>Post-operační kroky u této metody mohou vést ke křížové kontaminaci</li> <li>Časově náročná metoda (trvání analýzy 1–3 h s delší dobou přípravy vzorku)</li> <li>Metoda vyžadující termocykler</li> <li>Metoda náchylná k inhibitorům, nespecifické DNA, změnám fyzikálně-chemických parametrů, vystavení reagensů okolním teplotám</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drahý spotřební materiál a vybavení pro detekci</li> <li>Metoda s dlouhotrvajícími přípravami</li> <li>Metoda náchylná k inhibitorům, nespecifické DNA, změnám fyzikálně-chemických parametrů, vystavení reagensů okolním teplotám</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Komplikované navrhování primerů (metoda vyžaduje 6 primerů)</li> <li>Metoda vyžaduje dva dlouhé primery v kvalitě pro HPLC</li> <li>Omezená dostupnost reagensů a laboratorního vybavení v některých zemích</li> <li>Metoda s dlouhotrvajícími přípravami</li> <li>Metoda náchylná k inhibitorům, nespecifické DNA, změnám fyzikálně-chemických parametrů, vystavení reagensů okolním teplotám</li> </ul>

### Detekce patogenních mikroorganismů v různých potravinářských surovinách a výrobcích s využitím metody LAMP

Potraviny jako jsou vejce, maso a zelenina bývají často kontaminovány různými sérotypy nejrozšířenějšího potravinového patogenu, a to *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Pro rychlou detekci tohoto patogenu byla vyvinuta metoda LAMP v různých potravinových matricích, jakými byly mléko a mléčné výrobky, vepřové maso, kuřecí maso, kachní maso, masné výrobky, vejce a výrobky z vajec (Kokkinos a kol., 2014). Pro specifickou detekci bakterií rodu *Salmonella* v potravinách byly navrženy speciální primery cílené na gen *phoP*, který reguluje expresi genu virulence (Li a kol., 2009). Před samotnou amplifikací a následnou detekcí hledané genové sekvence pomocí metody LAMP je nutno potravinové vzorky připravit k analýze dle schématu uvedeného ve zjednodušené podobě na Obr. 1 (Li a kol., 2009).

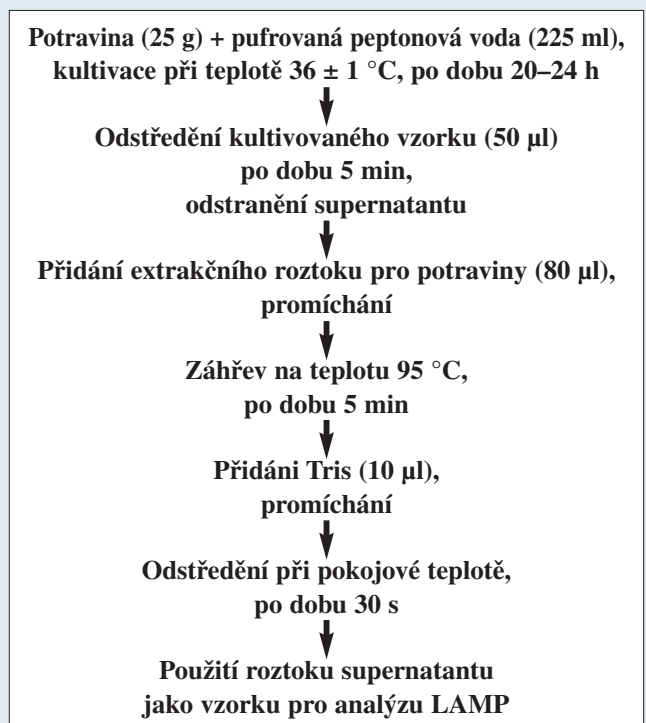
**Mléko a mlékárenské výrobky.** Detekce patogenních mikroorganismů z mléka a mlékárenských výrobků s využitím metody LAMP, v časovém horizontu poskytnutí výsledků přibližně do 24 h, je výrazně rychlejší v porovnání s tradičními kultivačními metodami, které mohou poskytnout výsledky za 5 až 7 dní. Pokud jsou před zahájením analýzy tyto potravinové vzorky před-inkubovány (při teplotě 37 °C po dobu 20 h), je možné pomocí metody LAMP detekovat přítomné patogeny v množství 3,5·10<sup>1</sup> KTJ v objemu 250 ml testovaného vzorku (Li et al., 2009).

Další výhodou použití metody LAMP, v modifikaci takzvané multiplexní metody LAMP (mLAMP), je možnost paralelního stanovení *Salmonella* spp. současně s *Shigella* spp. ve vzorcích mléka. Pro simultánní stanovení je zapotřebí dvou sad speciálně navržených primerů cílených na gen *invA* u *Salmonella* spp. a gen *ipaH* u *Shigella* spp. Při izotermních podmínkách (při teplotě 63 °C) dojde k amplifikaci DNA během 60 min. Finálními produkty LAMP jsou opakující se vlásenky se smyčkou různých délek. Po gelové elektroforéze se na elektroforeogramu objeví tzv. "žebřík", složený z několika bandů. Tato žebříková struktura je LAMP amplifikací LAMP charakteristická. Celkový čas analýzy LAMP trvá přibližně 20 h, včetně úprav vzorků (nabohacení), což výrazně zkracuje dobu detekce. Citlivost metody mLAMP je 100 fg DNA/zkumavku v porovnání s citlivostí metody mPCR, která je charakterizována hodnotou 1 pg DNA/zkumavku. Ve vzorcích mléka lze tedy touto metodou detekovat kontaminaci bakteriemi r. *Salmonella* v množství 5 KTJ/10 ml vzorku (Shao a kol., 2011).

**Maso a masné výrobky.** Metoda LAMP byla testována a validována pro detekci přítomnosti *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* ser. Typhymurium ve vzorcích vepřového masa a vepřových párků tak, aby bylo možné během přibližně jednoho dne obdržet kompletní vyhodnocené výsledky (Techathuvanan a kol., 2010). Tato metoda byla později rovněž testována a validována pro detekci *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* ser. Typhymurium, ovšem ve vzorcích kuřecího masa (celkem bylo testováno 225 vzor-

ků) s tím, že její účinnost byla srovnávána s metodou PCR a kultivační metodou (Kumar a kol., 2014). Analýza LAMP byla provedena s bakteriální DNA izolovanou do 8 h od doby, kdy byly vzorky připraveny k reakci; u metody PCR šlo o delší dobu 18 h. Ze studie vyplynulo, že metoda LAMP poskytla, spolu s metodou PCR i kultivační metodou, 100 % úspěšnost při průkazu přítomnosti tohoto bakteriálního sérotypu v kontaminovaných vzorcích. Zároveň bylo zjištěno, že výsledky získané metodou LAMP, které byly kvalitou srovnatelné s výsledky získanými metodou PCR, byly poskytnuty do 26 h bez použití sofistikovaného laboratorního vybavení. Naproti tomu výsledky získané metodou PCR byly poskytnuty až do 48 h a výsledky získané kultivační metodou až do 6 dnů. Metoda LAMP použitá v této studii dokázala jednak detekovat, jednak odlišit, sérotyp *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* ser. Typhymurium od jiných sérotypů *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* (Kumar a kol., 2014).

**Vejce a výrobky z vajec.** Konzumace vajec kontaminovaných bakteriemi rodu *Salmonella* vede k infekci lidské populace. V průběhu posledních 30 let byly v mnoha zemích světa zaznamenávány zvláště případy výskytu *Salmonella enterica* subsp. *enteritidis* (Ohtsuka a kol., 2005). Bylo prokázáno, že metoda LAMP je pro detekci přítomnosti *Salmonella* spp. vhodnější hlavně proto, že je rychlejší, specifičtější a citlivější, než metoda PCR. Metoda LAMP byla tedy úspěšně použita pro detekci salmonel u čerstvých vajec, s přípravným nabohacovacím krokem při kultivaci vzorků/mikroorganismů v pufované peptonové vodě při teplotě 37 °C po dobu 20 h (Ohtsuka a kol., 2005).



**Obr. 1** Příklad postupu přípravy potravinového vzorku pro detekci *Salmonella* spp. s využitím metody LAMP, konkrétně s použitím detekční soupravy "Loopamp detection kit" (Eiken Chemical Co., Tokyo, JPN) (Li a kol., 2009).

## VYUŽITÍ METODY LAMP V KLINICKÉ PRAXI

### Definice základních pojmů v souvislosti s klinickými zkouškami

**Klinickým hodnocením** používaného zdravotnického prostředku se rozumí proces, jehož účelem je kritické vyhodnocení klinických údajů a prokázání bezpečnosti a účinnosti hodnoceného zdravotnického prostředku při dodržování zvoleného účelu stanoveného výrobcem v běžných podmínkách jeho použití (Anonymous, 2017).

**Klinickými údaji** se rozumí informace o bezpečnosti nebo účinnosti zdravotnického prostředku, které vyplývají z jeho použití (Anonymous, 2017).

Klinické údaje se získávají prostřednictvím:

- jedné nebo více klinických zkoušek hodnoceného zdravotnického prostředku,
- jedné nebo více klinických zkoušek nebo jiných studií uváděných v odborné literatuře, které se týkají zdravotnického prostředku, u něhož je prokázána rovnocennost s hodnoceným zdravotnickým prostředkem, nebo
- publikovaných nebo nepublikovaných odborných zpráv nebo závěrů o používání hodnoceného zdravotnického prostředku v klinické praxi nebo zdravotnického prostředku řádně opatřeného označením CE, u kterého je prokázána rovnocennost s hodnoceným zdravotnickým prostředkem (Anonymous, 2017).

**Klinickou zkouškou** se rozumí používání zdravotnického prostředku na subjektech hodnocení v procesu systematického zkoušení u poskytovatele zdravotních služeb s cílem:

- prokázat, zda zkoušený zdravotnický prostředek je vhodný pro použití v souladu s určeným účelem, zejména z hlediska bezpečnosti a účinnosti,
- zjistit vliv zkoušeného zdravotnického prostředku na subjekt hodnocení,
- specifikovat vedlejší účinky zkoušeného zdravotnického prostředku a zhodnotit, zda představují přijatelná rizika (Anonymous, 2017).

**Multicentrickou klinickou zkouškou** se rozumí klinická zkouška prováděná podle jednoho plánu klinické zkoušky na více odborných pracovištích vícero zkoušejícími. Klinické zkoušky musí být prováděny v souladu s Helvetskou deklarací (Anonymous, 2017).

### Aplikace metody LAMP do klinické praxe

V posledních letech došlo k rychlému vývoji nových metodik amplifikace nukleových kyselin, díky kterým bylo umožněno vzniku rychlejších, robustnějších a především kompatibilnějších technik aplikovatelných v praxi, v terénních podmínkách (Asiello a Baeumner, 2011). Za pozornost stojí právě metoda LAMP intenzivně rozvíjená zejména pak v klinické praxi (Notomi a kol., 2000). U metody LAMP je zvýšení robustnosti dosaženo díky využití enzymu Bst DNA polymerasy, jenž není tak snadno inhibován jako enzym DNA polymerasa používaný při metodě PCR (Bektaş a Chapela, 2014). Další výhodou této metody je fakt, že nevyžaduje žádná speciální činidla a může být používána v laboratoři vhodné pro usku-

tečňování molekulárně-biologických analýz (Mori a kol., 2013; Notomi a kol., 2015). Metoda LAMP přináší příslib ekologičtější aplikace založené na mobilních testovacích soupravách (Bektaş a Chapela, 2014). Záslouhou řady výzkumných týmu, stojících za rychlým rozvojem metody LAMP, bylo její použití v klinické praxi významně zjednodušeno (Mori a kol., 2013).

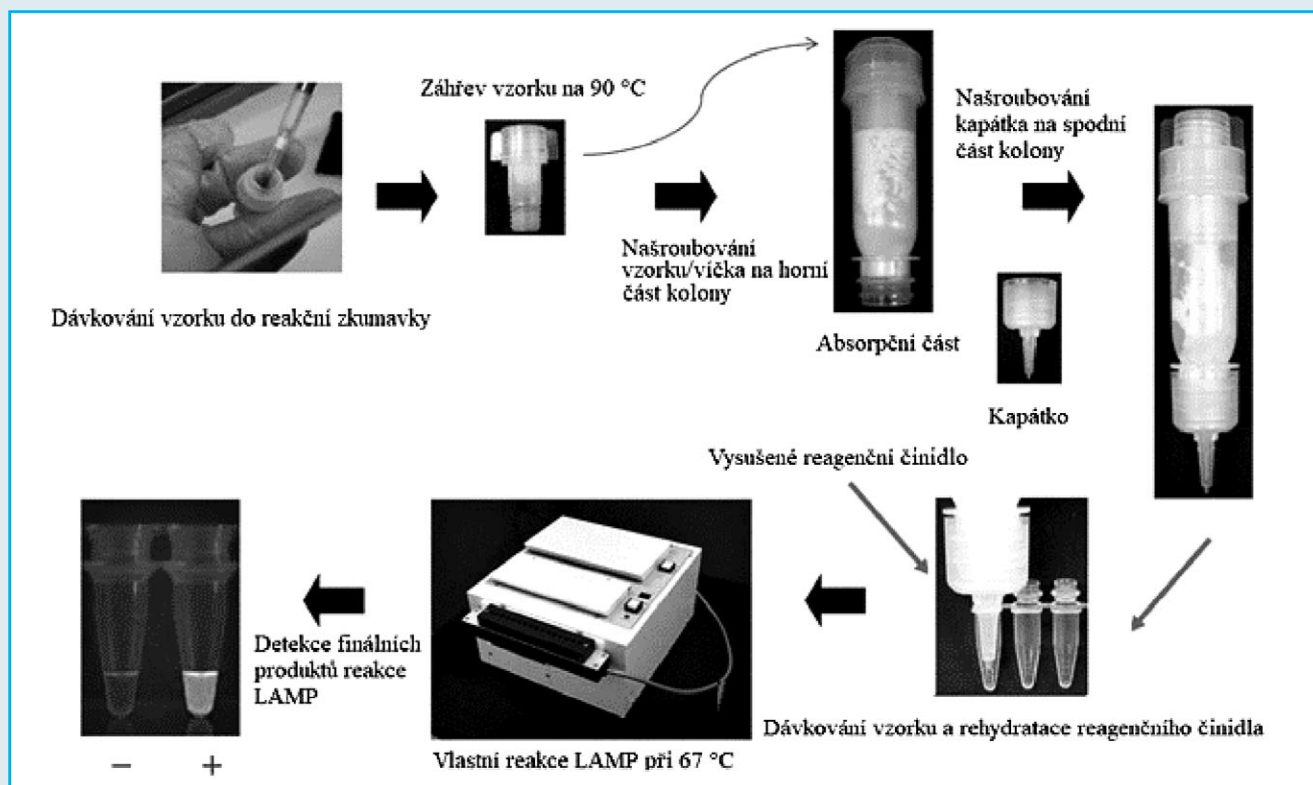
Na urychlení vývoje a aplikace metody LAMP do klinické praxe mělo vliv především propuknutí virového onemocnění – syndromu těžké akutní dýchavičnosti (Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS) v Japonsku před rokem 2008. Pro detekci virů byla schválena jediná metoda, a to právě metoda LAMP v diagnostickém profilu *in vitro* (IVD) (Mori a kol., 2013). V současné době se v Japonsku počet detekovatelných schválených mikrobiálních/virových agens, s vazbou na použití detekční metody LAMP, zvýšil na počet 8. Konkrétně šlo o zvířecí koronavirus SARS, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella* sp., virus hepatitidy A, virus chřipky A subtypu H1N1 (pandemie v roce 2009 s nástupem onemocnění ptačí chřipky), virus chřipky A subtypu H5N1 (vysoce nebezpečný podtyp viru ptačí chřipky, který se objevil v Asii v roce 1997) a lidského papilomaviru (Human Papilloma Virus", HPV) (Mori a kol., 2013). Jinou možností uplatnění metody LAMP je amplifikace nukleových kyselin s využitím molekulárního diagnostického testu OSNA (amplifikace nukleové kyseliny v jednom kroku), který představuje automatizovaný molekulárně detekční systém s využitím metody Real Time-LAMP (RT-LAMP), vhodný pro detekci rakovinných buněk metastazujících na lymfatických uzlinách. Tato metoda byla rovněž schválena v Japonsku v diagnostickém profilu IVD (Mori a kol., 2013).

### Požadavky na úpravu klinických vzorků pro jejich následné vyhodnocení metodou LAMP

V souvislosti s využitím metody LAMP pro vyšetření klinických vzorků je zapotřebí vývoje detekčních činidel pro konkrétní patogenní mikroorganismus, ať už se jedná o patogenní bakterii, virus nebo jinou formu (Mori a kol., 2013; Notomi a kol., 2015). Samotná extrakce nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) se často provádí s využitím již dříve vyvinutých extrakčních metod. Obecně je zjednodušování genetických analýz relativně náročné. Z důvodu podpory laboratorního rutinního testování se u metody LAMP s výhodou uplatňují, zejména při předběžné úpravě vzorků, speciální komerční soupravy (Notomi a kol., 2015).

### Detekce patogenních mikroorganismů s využitím metody LAMP v klinické praxi

Jako příklad detekce patogenních mikroorganismů s využitím metody LAMP v klinické praxi se dá uvést detekce bakterií ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex, způsobujících tuberkulózu; stručný postup této detekce je uveden na Obr. 2 (Notomi a kol., 2015). Je nutno zmínit, že tuberkulóza patří k jedné z největších hrozeb celosvětového zdravotnictví. Tímto onemocněním je latentně infikována přibližně jedna třetina světové populace, a to převážně



**Obr. 2** Schéma základních kroků modifikovaného metodického postupu TB-LAMP, s využitím detekční soupravy (Eiken Chemical Company Ltd, Tokyo, JPN) určené pro detekci bakterií ze skupiny *Mycobacterium tuberculosis* komplex. Testovaný klinický vzorek se dávkuje do reakční zkumavky a je zahříván. Poté se zkumavka spojí s kolonou obsahující absorbent a s kapátkem, umístěným v dolní části kolony. Následně je purifikovaná DNA/RNA eluována do reagenční zkumavky prostřednictvím kapátka. Reagenční zkumavka obsahuje jednotlivé reagence pro metodu LAMP, které se nacházejí ve víčku zkumavky. Po promíchání dojde v reagenční zkumavce k rehydrataci reakčních činidel a následně inkubaci vzorku. Výsledné reakční amplifikáty jsou detekovány pomocí fluorescenčního detektoru, jenž je součástí inkubační cely (Notomi a kol., 2015).

v rozvojových zemích. Přestože se pro detekci plicní tuberkulózy nejplošněji používala a dosud používá metoda přímého mikroskopického vyšetření hlenu/sekretu z dýchacích cest (Sputum Smear Microscopy), bylo zjištěno, že tato metoda není dostatečně citlivá a specifická. Jinou možností bylo a je použití kultivační metody, především pro její dostatečnou citlivost, navzdory dlouhé době 4 až 6 týdnů při poskytování finálních výsledků. Kultivační metoda má navíc jisté omezení kvůli vybavení konkrétní laboratoře potřebným zařízením a pomůckami (Notomi a kol., 2015).

Kromě již výše uvedeného příkladu využití metody LAMP v klinické praxi se dá tato metoda využít také pro detekci virů způsobujících takzvanou "Aleutskou chorobu norků" neboli plazmocytózu postihující zejména norky a fretky (Zhang a kol., 2015), dále pro rychlou detekci viru HIV-1 (Curtis a kol., 2008), také k diagnostice malárie (Lucchi a kol., 2010; Morris a kol., 2015) nebo pro detekci bakterií *Mycoplasma synoviae* (Kursa a kol., 2015), *Staphylococcus aureus* (Wang a kol., 2015) a *Pectobacterium carotovorum* (Yasuhara-Bel a kol., 2016).

## Závěr

Závěrem je možné uvést, že molekulárně-biologická metoda LAMP představuje moderní nově vyvinutou meto-

du pro rychlou, průkaznou a jednoznačnou detekci patogenních či indikátorových mikroorganismů vyskytujících se v různých potravinářských, klinických a environmentálních matricích.

Mezi hlavní výhody této metody patří rychlost, vysoká specifita a selektivita vlastní reakce LAMP, a také robustnost. K nevýhodám metody se dá zařadit nutnost vývoje sušených reagenčních činidel pro konkrétní detekovaný mikroorganismus, což vyžaduje nejenom čas, ale i další výzkum.

Výsledky této teoretické rešerše mohou být použitelné ve formě základních i nadstavbových informací při budoucích experimentálních aplikacích metody LAMP jak v oblasti potravinářské praxe při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti a technologické nerizikivosti potravinářských surovin a výrobků, tak také v oblasti klinické a environmentální praxe.

## Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QK1710156 (2017-2021, MZE/QK), v programu QK - Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025 "ZEMĚ", s dobou řešení projektu: 02/2017-12/2021.

## Literatura

Níže uvedené, plně citované, literární odkazy byly citovány podle normy ČSN ISO 690 (2011) v následujícím znění: ČSN ISO 690. *Informace a dokumentace – Pravidla pro bibliografické odkazy a citace informačních zdrojů*. Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2011, 40.

- ANONYMOUS. Java Runtime Environment (JRE) is required for PrimerExplorer, **2015**. In: *LAMP primer designing software PrimerExplorer* [online]. 24. 11. 2015 [cit. 20. 9. 2017]. Dostupné z: <http://primerexplorer.jp/e/>
- ANONYMOUS. Klinické zkoušky. Státní ústav pro kontrolu léčiv [online]. (cit. 29. 7. 2017). Dostupné z: <http://www.sukl.cz/zdravotnicko-prostredky/klinicke-zkousky-zp>.
- ASIELLO, P. J., BAEUMNER, A. J. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification: A review. *Lab on a Chip*, **2011**, 11(8), 1420–1430.
- BEKTAŞ, A., CHAPELA, I. Loop-mediated isothermal amplification of single pollen grains. *Journal of Integrative Plant Biology*, **2014**, 56(8), 741–748.
- BHUNIA, A. K. *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis*. 1<sup>st</sup> ed. Springer: New York, **2008**.
- CURTIS, K. A., RUDOLPH, D. L., OWEN, S. M. Rapid detection of HIV-1 by reverse-transcription, loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*, **2008**, 15(2), 264–270.
- HARA-KUDO, Y., YOSHINO, M., KOJIMA, T., AND IKEDO, M. Loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Salmonella*. *FEMS Microbiological Letters*, **2005**, 253, 155–161.
- HYŽÁKOVÁ, A. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mléčných výrobcích: Bakalářská práce*. Brno: Masarykova univerzita Přírodovědecká fakulta Ústav experimentální biologie, **2013**.
- LI, X., ZHANG, S., ZHANG, H., TAO, H., YU, J., ZHENG, W., LIU, C., LÜ, D., XIANG, R., LIU, Y. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *phoP* gene for the detection of *Salmonella* in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, **2009**, 133(3), 252–258.
- KARPIŠKOVÁ, R., KOLÁČKOVÁ, I., VYLETĚLOVÁ, M., JANŠTOVÁ, B. Studie "Mléčné automaty" - nálezy původců alimentárních onemocnění v syrovém mléce. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*, **2011**, 20(6), 212–214.
- KOKKINOS, P. A., ZIROS, P. G., BELLOU, M., VANTARAKIS, A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the detection of *Salmonella* in food. *Food Analytical Methods*, **2014**, 7(2), 512–526.
- KUMAR, P. P., AGARWAL, R. K., THOMAS, P., SAILO, B., PRASANNAVAHANA, A., KUMAR, A., KATARIA, J. L., SINGH, D. K. Rapid detection of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium by loop mediated isothermal amplification (LAMP) test from field chicken meat samples. *Food Biotechnology*, **2014**, 28(1), 50–62.
- KURSA, O., WOŹNIAKOWSKI, G., TOMCZYK, G., SAWICKA, A., MINTA, Z. Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* by loop-mediated isothermal amplification. *Archives of Microbiology*, **2015**, 197, 319–325. DOI: 10.1007/s00203-014-1063-2.
- LAW, J. W., MUTALIB, N. A., CHAN, K., LEE, L. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food, **2015**, 6, 1227. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01227.
- LUCCHI, N. W., DEMAS, A., NARAYANAN, J., SUMARI, D., KABANY-WANYI, A., KACHUR, P., BARNWELL, J. W., UDHAYAKUMAR, V. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS One*, **2010**, 5(10), DOI: 10.1371/journal.pone.0013733.
- MARUYAMA, F., KENZAKA, T., YAMAGUCHI, N., TANI, K., AND NASU, M. Detection of bacteria carrying the *stx2* gene by in situ loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, **2003**, 69(8), 5023–5028.
- MORI, Y., NAGAMINE, K., TOMITA, N., NOTOMI, T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2001**, 289(1), 150–154.
- MORI, Y., KITAO, M., TOMITA, N., NOTOMI, T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **2004**, 59(2), 145–157.
- MORI, Y., KANDA, H., NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **2013**, 19, 404–411.
- MORRIS, U., KHAMIS, M., AYDIN-SCHMIDT, B., ABASS, A. K., MSELLEM, M. I., NASSOR, M. H., GONZÁLEZ, I. J., MARTENSSON, A., ALI, A. S., BJÖRKMANN, A., COOK, J. Field deployment of loop-mediated isothermal amplification for centralized mass-screening of asymptomatic malaria in Zanzibar: a pre-elimination setting. *Malaria Journal*, **2015**, 14(205), 1–6. DOI: 10.1186/s12936-015-0731-2.
- NAGAMINE, K., HASE, T., NOTOMI, T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes*, **2002**, 16(3), 223–229.
- NOTOMI, T., OKAYAMA, H., MASUBUCHI, H., YONEKAWA, T., WATANABE, K., AMINO, N., HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, **2000**, 28(12), e63 (ii-vii).
- NOTOMI, T., MORI, Y., TOMITA, N., KANDA, H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, **2015**, 53(1), 1–5.
- OHTSUKA, K., YANAGAWA, K., TAKATORI, K., HARA-KUDO, Y. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of *Salmonella* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **2005**, 71(11), 6730–6735.
- PARIDA, M., POSADAS, G., INOUE, S., HASEBE, F., MORITA, K. Real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *Journal of Clinical Microbiology*, **2004**, 42(1), 257–263.
- PRIYANKA, B., PATIL, R. K., DWARAKANATH, S. A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*, **2016**, 144(3), 327–338. DOI: 10.4103/0971-5916.198677.
- SHAO, I., ZHU, S., JIN, C., CHEN, F. Development of multiplex loop-mediated isothermal amplification-RFLP (mLAMP-RFLP) to detect *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. in milk. *International Journal of Food Microbiology*, **2011**, 148(2), 75–79.
- TECHATHUVANAN, C., DRAUGHON, F. A., D SOUZA, D. H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Salmonella*-Typhimurium from pork. *Journal of Food Sciences*, **2010**, 75(3), M165–M172.
- TOMITA, N., MORI, Y., KANDA, H., NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, **2008**, 3(5), 877–882.
- WANG, L., SHI, L., ALAM, M. J., GENG, Y., AND LI, L. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*, **2008**, 41, 69–74.
- WANG, X., WU, L., WANG, Y., M, Y., CHEN, F., OU, H. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isothermal amplification. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2015**, 175(2), 882–891. DOI: 10.1007/s12010-014-1328-x.
- YAMAZAKI, W., ISHIBASHI, M., KAWAHARA, R., AND INOUE, K. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiology*, **2008**, 8 (163).
- YASUHARA-BEL, J., MARRERO, G., SILVA, A. D., ALVAREZ, A. M. Specific detection of *Pectobacterium carotovorum* by loop-mediated isothermal amplification. *Molecular Plant Pathology*, **2016**, 17(9), 1499–1505.
- ZHANG, Z., WANG, B., HU, S., ZHANG, J., HE, X., ZHENG, S. Detection of Aleutian disease virus by loop-mediated isothermal amplification. *Virus-Disease*, **2015**, 26(3), 203–206. DOI: 10.1007/s13337-015-0265-9.

## Korespondenční autor:

Ing. Eva Šviráková, Ph.D., Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3/5, 166 28 Praha 6 – Dejvice, Česká republika, e-mail: eva.svirakova@vscht.cz

Přijato do tisku: 11. 9. 2017

Lektorováno: 5. 10. 2017