



Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělská
a technologická

Metodika pro přenosnou detekci bakteriálních patogenů metodou LAMP

Metodika byla vypracována jako výstup projektu TAČR Trend FW11020010 - Neinvazivní diagnostika infekčních onemocnění laboratorních hlodavců s využitím genomických dat



Autoři:

Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D., Ing. Pavel Beran, Ph.D., doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

České Budějovice, 2026

Metodika pro přenosnou detekci bakteriálních patogenů metodou LAMP

Metodika byla vypracována jako výstup projektu TAČR Trend FW11020010 -
Neinvazivní diagnostika infekčních onemocnění laboratorních hlodavců s využitím
genomických dat

Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.

Ing. Pavel Beran, Ph.D.

doc. Ing. Michael Rost, Ph.D.

České Budějovice, 2026

Metodika pro přenosnou detekci bakteriálních patogenů metodou LAMP
Dagmar Stehlíková a kol., 2026
stehld@fzt.jcu.cz

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií, České Budějovice 2026
www.fzt.jcu.cz,

Vypracováno za podpory projektu TAČR Trend FW11020010 - Neinvazivní diagnostika
infekčních onemocnění laboratorních hlodavců s využitím genomických dat

Recenzenty metodiky byli:

- 1) doc. Ing. Pavel Nevřkla, Ph.D., Ústav chovu a šlechtění zvířat, AF, Mendelova
univerzita v Brně
- 2) MVDr. Tomáš Jarosil, Státní veterinární správa

Text: ©2026., Stehlíková D., Beran, P., Rost, M.

Vydáno bez jazykové úpravy

ISBN: 978-80-7694-165-6

Obsah

Uvedení problému a cíl metodiky.....	1
Vlastní popis metodiky	3
Úvod.....	3
Srovnání novosti postupů.....	3
Optimalizace metody.....	4
Postup detekce <i>Mycoplasma pulmonis</i>	5
Popis uplatnění metodiky.....	13
Ekonomické aspekty.....	13
Seznam publikací předcházející metodice	14
Seznam použité literatury.....	14

Uvedení problému a cíl metodiky

Metodika je zaměřena na zavedení molekulárně-biologických metod do detekčních programů bakteriálních patogenů u laboratorních hlodavců.

Laboratorní hlodavci, zejména myši a potkani, představují nejčastěji využívané modelové organismy v biomedicíně výzkumu. Jejich zdravotní stav má zásadní vliv nejen na welfare zvířat, ale také na validitu, reprodukovatelnost a interpretaci experimentálních výsledků. Přítomnost infekčních agens je často subklinická, přesto však může významně ovlivňovat fyziologické, imunologické a patologické parametry a tím zkreslovat výsledky výzkumu (Jacoby a Lindsey, 1998). Z těchto důvodů jsou systematické programy zdravotního monitoringu nedílnou součástí systému zajištění kvality v chovných i experimentálních zařízeních.

Evropská federace pro laboratorní zvířata (FELASA, Federation of European Laboratory Animal Science Associations) vydává doporučení pro zdravotní monitoring hlodavců s cílem harmonizovat sledování infekčních patogenů napříč evropskými pracovišti. FELASA identifikuje soubor virových, bakteriálních a parazitárních agens, jejichž přítomnost může negativně ovlivnit zdravotní stav zvířat a výsledky experimentů, a doporučuje jejich pravidelné sledování vhodnými diagnostickými metodami (Mähler a kol., 2014). Mezi sledované bakterie patří mimo jiné i *Mycoplasma* spp., které jsou považovány za významné oportunní patogeny laboratorních hlodavců.

Mycoplasma pulmonis je původcem murinní respirační mykoplazmózy a patří mezi nejčastěji se vyskytující infekční agens u laboratorních potkanů a myší, zejména v chovech s nedostatečným hygienickým zabezpečením. Infekce má často chronický a subklinický průběh, avšak může vést k poškození dýchacího aparátu, středního ucha i reprodukčního systému, ke snížení fertility a ke změnám imunologických a hematologických parametrů (Davis a kol., 1991; Deák a kol., 2025). Tyto změny mohou významně interferovat s experimentálními modely, zejména v oblasti imunologie, respirační fyziologie a zánětlivých procesů, což zdůrazňuje potřebu citlivé a včasné detekce tohoto patogenu v rámci zdravotního monitoringu. V moderním sledování jsou uváděny rozdílné míry prevalence, přičemž některá zařízení hlásí detekci *M. pulmonis* u 1,8–8,9 % testovaných zvířat (Na et al., 2010).

V současné době se pro monitoring bakteriálních onemocnění využívají hlavně metody kultivační. Avšak zavádění molekulárně-biologických metod přináší velkou úsporu času a financí a s velkou citlivostí zachycují onemocnění. Takovou metodou je například real-time PCR, která umožňuje neinvazivní zdravotní kontroly u živých zvířat (bez usmrcení a následné pitvy) z exkrementů nebo bukalních stěrů. Avšak tato metoda cílí pouze na výzkumná pracoviště disponující kvalitním přístrojovým vybavením a pracoviště s technickým a znalostním zázemím nezbytným pro aplikaci moderních postupů. Tato metodika nabízí využití další molekulární metody, která je využitelná v prostředí bez nákladných přístrojů s nekvalifikovaným personálem.

LAMP:

Metoda Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) je izotermická amplifikační technika určená k rychlé a vysoce specifické detekci nukleových kyselin. Na rozdíl od polymerázové řetězové reakce (PCR) probíhá při konstantní teplotě, čímž odpadá nutnost teplotního cyklování a použití složitého laboratorního vybavení. Díky vysoké citlivosti, krátké době analýzy a jednoduché interpretaci výsledků je metoda LAMP vhodná zejména pro diagnostiku v terénních a nízkonákladových podmínkách (Notomi a kol., 2000).

Ve srovnání s metodami PCR dosahuje LAMP obdobné nebo vyšší citlivosti a specifity při výrazně kratší době amplifikace. Výsledky reakce lze detekovat různými vizuálními či fluorescenčními způsoby, často bez nutnosti elektroforetické analýzy, což dále zvyšuje její praktickou využitelnost (Foo a kol., 2020).

Základem reakce LAMP je sada čtyř až šesti specifických oligonukleotidových primerů, které rozpoznávají několik odlišných oblastí cílové sekvence, společně s DNA-dependentní DNA polymerázou s vytěšňovací aktivitou, nejčastěji Bst DNA polymerázou izolovanou z *Bacillus stearothermophilus*. Použití této polymerázy umožňuje kontinuální syntézu DNA bez nutnosti denaturačního kroku (Soroka a kol., 2021)

Klíčovým faktorem úspěšnosti metody LAMP je správný návrh primerů, který musí splňovat požadavky na jejich vzájemné uspořádání, teploty tání, stabilitu koncových sekvencí, vyvážený obsah GC párů a minimalizaci tvorby sekundárních struktur. Nedodržení těchto parametrů může vést ke snížení specifity nebo ke vzniku nespecifických amplifikačních produktů (Yang a kol., 2024).

Cílem metodiky je uvést přesný metodický návod pro odběr vzorků, izolaci DNA, provedení LAMP analýzy a vyhodnocení u bakterie *Mycoplasma pulmonis* u laboratorních hlodavců.

Vlastní popis metodiky

Úvod

LAMP metoda spočívá v syntéze pomocí nahrazování templátového vlákna DNA za využití polymerázy s vysokou schopností vytěšňovat templátové vlákno a zároveň syntetizovat vlákno nové (Notomi a kol., 2000). V počáteční fázi reakce jsou využívány jak vnější (F3, B3), tak vnitřní primery (FIP, BIP), později dochází k syntéze pouze za pomoci vnitřních primerů. Dále byly využity i loop primery (LF, LB), které slouží k zrychlení reakce a zvyšují specifitu (Nagamine a kol., 2002).

Metodika je založena na průkazu přítomnosti specifického úseku vybraném pomocí programu KEC z celého genomu (Beran a kol., 2021). Vizualizace produktů LAMP je rozdělena na:

1. **Real-time LAMP:** Pro detekci amplifikační reakce metodou LAMP v reálném čase se využívají specializované platformy umožňující kontinuální monitorování fluorescence během průběhu amplifikace. V této metodice byl použit přenosný real-time LAMP přístroj Genie[®] III (OptiGene, UK), který je konstruován speciálně pro izotermální amplifikaci nukleových kyselin a umožňuje záznam fluorescenčních dat v reálném čase. Součástí funkční výbavy přístroje je rovněž analýza křivky tání, která slouží ke kontrole specifčnosti amplifikace a umožňuje odhalení nespecifických nebo nežádoucích produktů reakce vznikajících během LAMP amplifikace. Analýza křivky tání je považována za účinný nástroj pro rozlišení specifických a nespecifických amplikonů, zejména u fluorescenčně detekovaných LAMP reakcí (Rolando a kol., 2020). V případě, že je laboratoř vybavena real-time PCR cyklerem, lze metodu real-time LAMP provádět rovněž na tomto zařízení, a to za předpokladu, že přístroj umožňuje stabilní udržování konstantní reakční teploty a kontinuální měření fluorescence (Gadkar a kol., 2018).
2. **UV:** Alternativním způsobem vizualizace výsledků LAMP reakce je post-amplifikační barvení pomocí fluorescenčních interkalujících barviv, která vážou dvouvláknovou DNA a jsou následně detekovatelná pod UV nebo modrým světlem. Typickým příkladem používaného barviva je SYBR[®] Green I, který umožňuje vizuální rozlišení pozitivních a negativních reakcí na základě intenzity fluorescence. Nevýhodou této metody je skutečnost, že barvivo se přidává až po ukončení amplifikace, což vyžaduje otevření reakční zkumavky (Panno a kol., 2020).

Srovnání novosti postupů

Předkládanou metodiku s názvem “Metodika odběru a izolace DNA a kvantitativní detekce významných bakteriálních patogenů” lze hodnotit jako novou metodiku, neboť v současné době není k dispozici ucelená metodika pro molekulární detekci patogenů u laboratorních hlodavců. Dosud dostupné informace jsou jen dílčí a rozptýlené ve vědeckých publikacích a monografiích (FELASA, 2014).

Výzkumná nejistota spočívá v biologické podstatě. Limitou může být nedostatečná rozlišovací schopnost molekulárních metod či nedostatečná citlivost daná kontaminací

vzorku nebo přítomností zvířecí DNA. Limity také představuje design a organizace experimentu a dodržení všech metodických postupů. Nově navržená LAMP metodika je ověřena pro tzv. mimo laboratoř/v terénu), kde by se měla stát nástrojem pro prvotní rychlou analýzu bakterie *Mycoplasma pulmonis*. Předkládaná metodika pak popisuje všechny kroky analýzy od odběru vzorku, přes izolaci DNA po LAMP analýzu tak, aby bylo dosaženo optimálního výsledku.

Optimalizace metody

Primery

Primery (Tabulka 1) jsou navrženy v programu PrimerExplorer (<https://primerexplorer.jp/lampv5/index.html>) za využití templátů celého genomu (Beran a kol.). Navržené primery a sondy jsou in silico testovány pro zjištění teoretické specificity pro cílové organismy a vybrané primery byly použity pro laboratorní testování. Specificita je testována na rozsáhlém souboru patogenů u laboratorních hlodavců (Tabulka 2).

Tabulka 1: Primery pro detekci *Mycoplasma pulmonis* metodou LAMP

LAMP	<i>Mycoplasma pulmonis</i>
primery	Sekvence primerů (5'-3')
F3	GGGAGTGCGTTACATTAGCT
B3	CCGAAGACCTTCATCCTGC
FIP	GTCCCAGTGTGGCTGTTTCAGTAGGGTAATGGCCTACCAAGG
BIP	TGAGATACGGCCCAGACTCCTGCTGTGTCCTCCATCAGAC
LF	CTCTCAACTCAGCTATACATCATCG
LB	CGGGAGGCAGCAGTAGGGAA

Tabulka 2: Seznam použitých izolátů

Název	Sbírka	Číslo sbírky
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	DSMZ	13414
<i>Citrobacter rodentium</i>	DSMZ	16696
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	DSMZ	20755
<i>Filobacterium rodentium</i>	DSMZ	100392
<i>Helicobacter hepaticus</i>	DSMZ	22909
<i>Helicobacter mastomyrinus</i>	DSMZ	22886
<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSMZ	5175
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSMZ	4799
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	DSMZ	22144
<i>Pasteurella multocida</i>	DSMZ	5282
<i>Pasteurella multocida subsp. multocida</i>	DSMZ	5281

<i>Pasteurella pneumotropicus</i> (<i>Pasteurella pneumoniae</i>)	DSMZ	21403
<i>Proteus mirabilis</i>	DSMZ	28629
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	DSMZ	939
<i>Rodentibacter heidelbergensis</i>	DSMZ	103978
<i>Rodentibacter heylii</i>	DSMZ	112292
<i>Rodentibacter pneumotropicus</i>	DSMZ	21403
<i>Rodentibacter rattii</i>	DSMZ	103977
<i>Salmonella</i> spp.	DSMZ	554
<i>Staphylococcus aureus</i>	DSMZ	799
<i>Streptobacillus moniliformis</i>	DSMZ	12112
<i>Streptococcus agalactiae</i>	DSMZ	2134
<i>Streptococcus canis</i>	DSMZ	20715
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	DSMZ	23147
<i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> (skupina C)	DSMZ	20727
<i>Streptococcus mitis</i>	DSMZ	12643
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSMZ	11868
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	DSMZ	18670
<i>Streptococcus pyogenes</i>	DSMZ	20565
<i>Bordetella hinzii</i>	DSMZ	11333
<i>Clostridium perfringens</i>	DSMZ	25589
<i>Paenibacillus sordellii</i>	DSMZ	29974
<i>Clostridioides difficile</i>	DSMZ	29688
<i>Helicobacter</i> spp	DSMZ	113690
<i>Helicobacter</i> spp	DSMZ	108729

Postup detekce *Mycoplasma pulmonis*

Tento systém detekce byl optimalizován tak, aby byl použitelný pro real-time detekci *M. pulmonis* na přenosné platformě a také pro využití bez sofistikovaného zařízení (UV). Avšak izolace DNA, primery a reakční směs zůstává neměnná. Rozdíl je pouze ve vizualizaci výsledků.

Při pracovním postupu vždy používat ochranné rukavice. Pro každé vyšetření využívat systému pozitivní kontroly (cílová DNA), negativních kontrol tj. jiná než cílová DNA a NTC (z ang. No Template Control) - vzorek bez DNA. Reagencie nechat pozvolna rozmrazit v temnu a vyhnout se opakovanému rozmrazování, což snižuje senzitivitu.

Odběr vzorků

Odběr vzorků pro izolaci DNA probíhá bukláním stěrem (FLOQSwabs® Flocked Swabs, 80 mm)

u myší a potkanů v dvou opakováních od každého zvířete nebo se využívá směsný odběr na základě oddělených chovných prostor.

Izolace DNA

DEP-25 DNA Extraction Kit (Top-Bio)

Stěrové kartáčky jsou přeneseny do zkumavek. K vzorku je přidáno 75 µl DEP-25 START-Blue reagens, kde se buňky uvolní promícháním. Vzorky se zahřejí na 95°C po dobu 20 min v teplotním bloku. Solidní tkáně nejsou v řadě případů úplně solubilizovány; to však neovlivní následné použití extraktu pro genotypizaci. Vzorky se ochladí na pokojovou teplotu, přidá se 75 µl DEP-25 STOP reagens a obsah se promíchá. Po přidání STOP reagens, se START-Blue reagens změní na bezbarvý roztok. Použije se 2 µl extraktu jako zdroj templátové DNA pro následnou LAMP.

Reakční cyklus LAMP

LAMP probíhají na přenosné platformě Genie® III (OptiGene, UK), Tvorba grafů a zpracování dat probíhá přímo na zařízení nebo software od firmy Optigene. V případě použití UV je reakční cyklus stejný, avšak je zahříván na 65°C v teplotním bloku po dobu 60 min. Vzorky jsou obarveny po amplifikaci přidáním 1 µl SYBR® Green I. Poté jsou vzorky prosvíceny UV světlem. Hodnotí se změna barvy (oranžová – negativní; zelená pozitivní).

Všechny reakční směsi jsou v stejných poměrech dle tabulky 3. Reakční cyklus byl zahříván při 65 °C po dobu 60 min. tento čas může být zkrácen na 30 min, vzhledem k velmi rychlé amplifikaci u testovaných vzorků. Na obrázku 1 je patrný nárůst fluorescence u všech vzorků v cca 10 minutách. Tento fakt je ovlivněn zejména v použití loop primerů (LF a LB), které zajišťují urychlení izotermální amplifikace.

Tabulka 3: Složení reakční směsi na 1 vzorek.

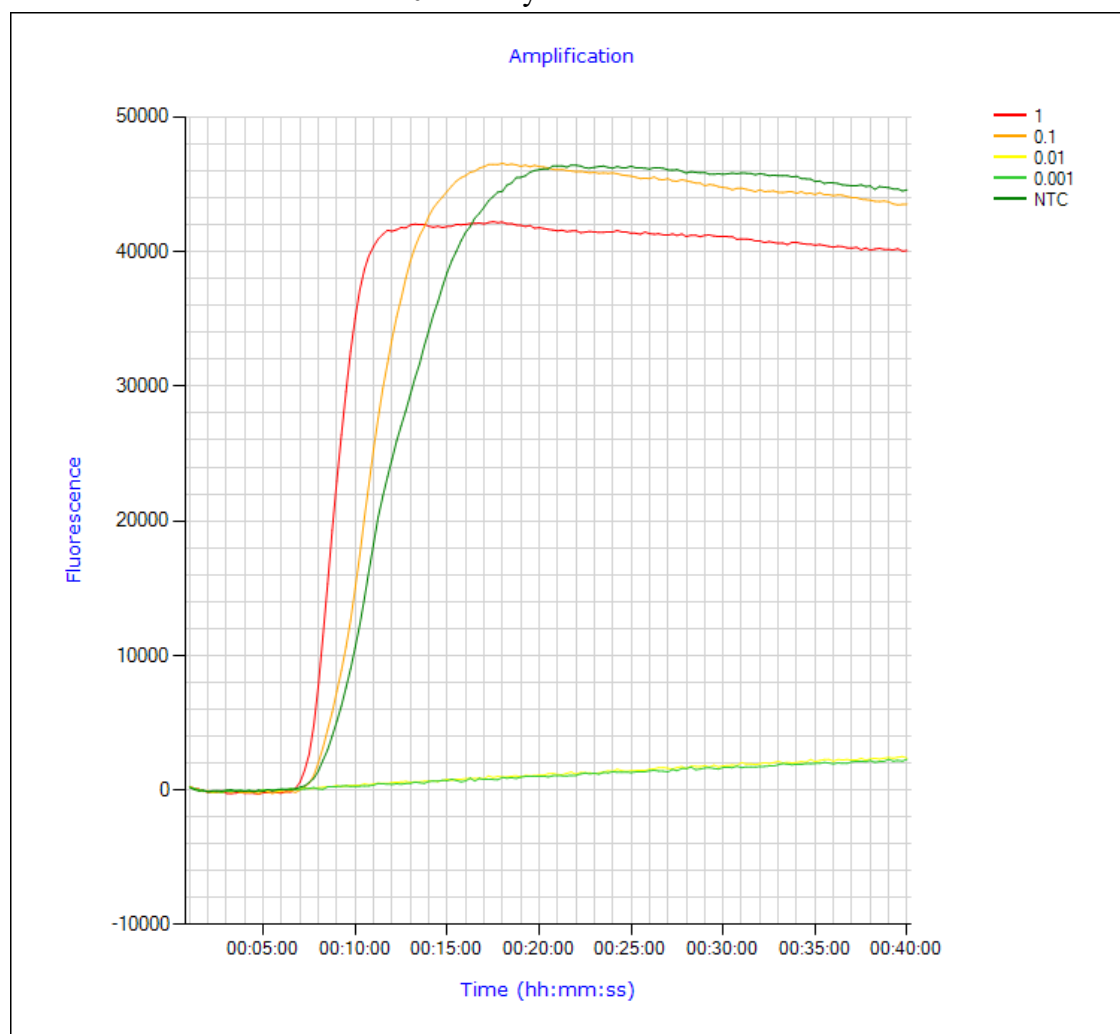
reagencie	finální koncentrace(µM)	finální objem	pracovní koncentrace (uM)	množství na jeden vzorek (µl)
FIP	1,6	25	10	4
BIP	1,6	25	10	4
F3	0,2	25	10	0,5
B3	0,2	25	10	0,5
LF	0,4	25	10	1
LB	0,4	25	10	1
Isothermal master mix (Optigene)				12
DNA				2
celkem				25

Validace a limity reakce

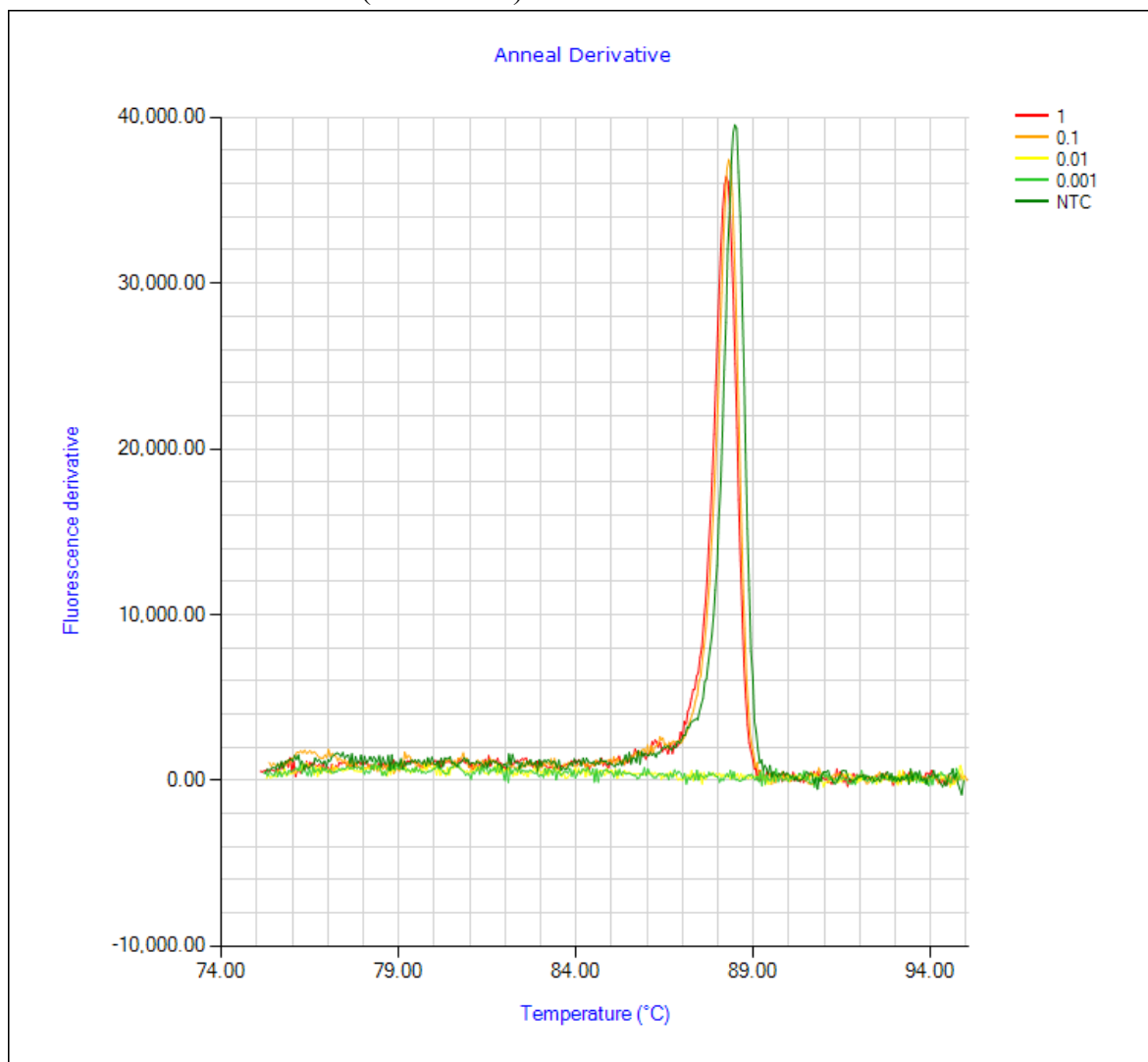
Ověření výsledků bylo provedeno prostřednictvím PCR za pomoci vnějších primerů LAMP reakce s následným potvrzením gelovou elektroforézou a rovněž zavedenou metodikou Taq Man qPCR na detekci cílového agens zaměřenou na stejný unikátní úsek genomu jako LAMP metodika. Pro vyloučení falešně pozitivního výsledku byla provedena kontrola s vybranými mikroorganismy (Tabulka 2). Test neodhalil při cross-species a cross-genus ověřování amplifikaci jiného druhu nebo rodu, která by byla potvrzena.

Citlivost reakce byla stanovena pomocí desítkového ředění s počáteční koncentrací vzorku v reakci 1 ng/μl. Detekční limit byl stanoven na 0,01 ng/μl (Obrázek 1). Citlivost reakce byla prokázána pro reakční dobu 40 min, s kratší reakční dobou neklesá účinnost LAMP reakce. Křivka tání byla u všech vzorků 88.3 °C (Obrázek 2).

Obrázek 1: Citlivost reakce – 10× ředěný vzorek



Obrázek 2: Citlivost reakce (Křivka tání)



Postup vyhodnocení:

Real-time LAMP (Genie® III)

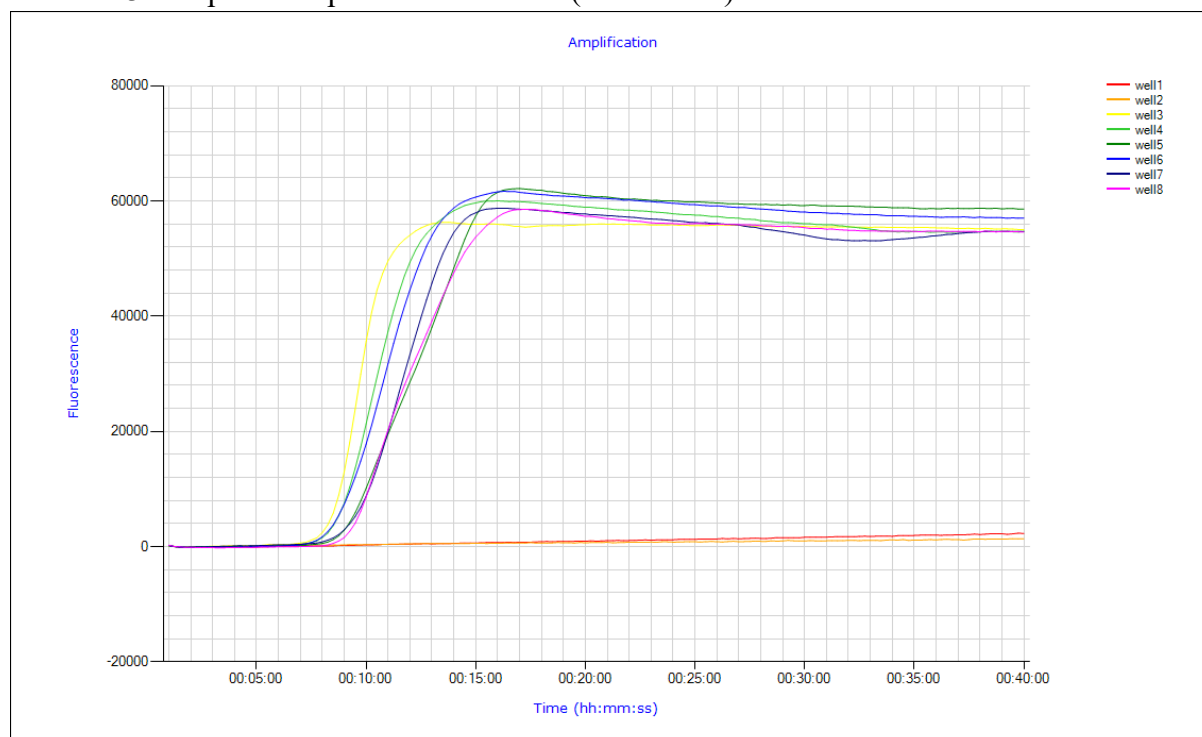
Při použití přenosného real-time LAMP přístroje Genie® III je výsledek vyhodnocován na základě kontinuálního záznamu fluorescence v průběhu izotermální amplifikace při konstantní teplotě 65 °C. Pozitivní vzorek je charakterizován typickým exponenciálním nárůstem fluorescenčního signálu v průběhu reakce, přičemž k nárůstu fluorescence u testovaných vzorků dochází zpravidla během prvních 10–15 minut reakce. Negativní vzorky a kontrola bez templátové DNA (NTC) nevykazují signifikantní nárůst fluorescence po celou dobu reakce (Obrázek 3).

Součástí vyhodnocení real-time LAMP je také analýza křivky tání (melt curve analysis), která slouží k ověření specifity amplifikovaného produktu. Při zahřívání reakční směsi v rozmezí 88.2 – 88.6 °C je u specifické reakce pozorován vznik jednoho homogenního amplifikačního produktu, reprezentovaného jedním teplotním vrcholem. Přítomnost více vrcholů indikuje tvorbu nespecifických amplikonů a takový výsledek je hodnocen jako nespolehlivý (Obrázek 4).

Každé měření je prováděno minimálně ve dvou technických opakováních a zahrnuje pozitivní kontrolu (cílová DNA, PC), negativní kontrolu (necílová DNA) a NTC, což umožňuje spolehlivé posouzení validity reakce.

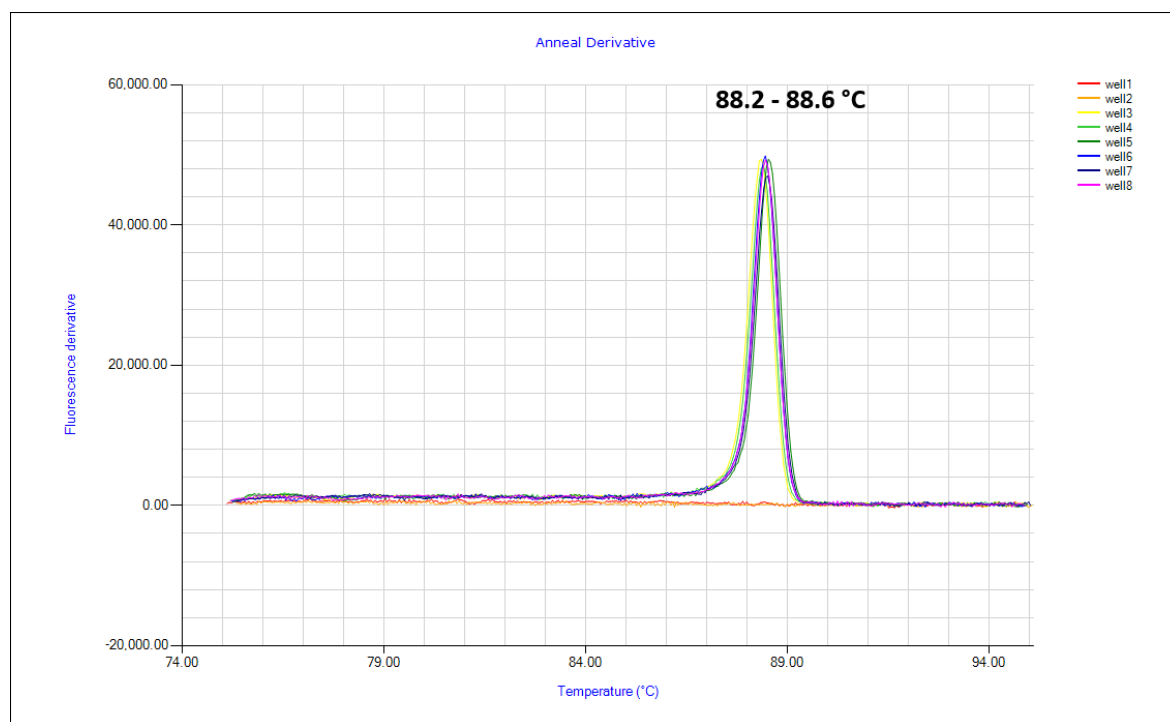
Sofistikované zařízení – Genie® III (OptiGene, UK)

Obrázek 3: Amplifikace při metodě LAMP (v minutách)



Pozitivní vzorky na *M. pulmonis* – žlutý (PC), světle zelený, tmavě zelený, modrý, černý, růžový; negativní vzorky – červený (NTC) a oranžový

Obrázek 4: Křivka tání



Pozitivní vzorky na *M. pulmonis* – žlutý (PC), světle zelený, tmavě zelený, modrý, černý, růžový; negativní vzorky – červený (NTC) a oranžový

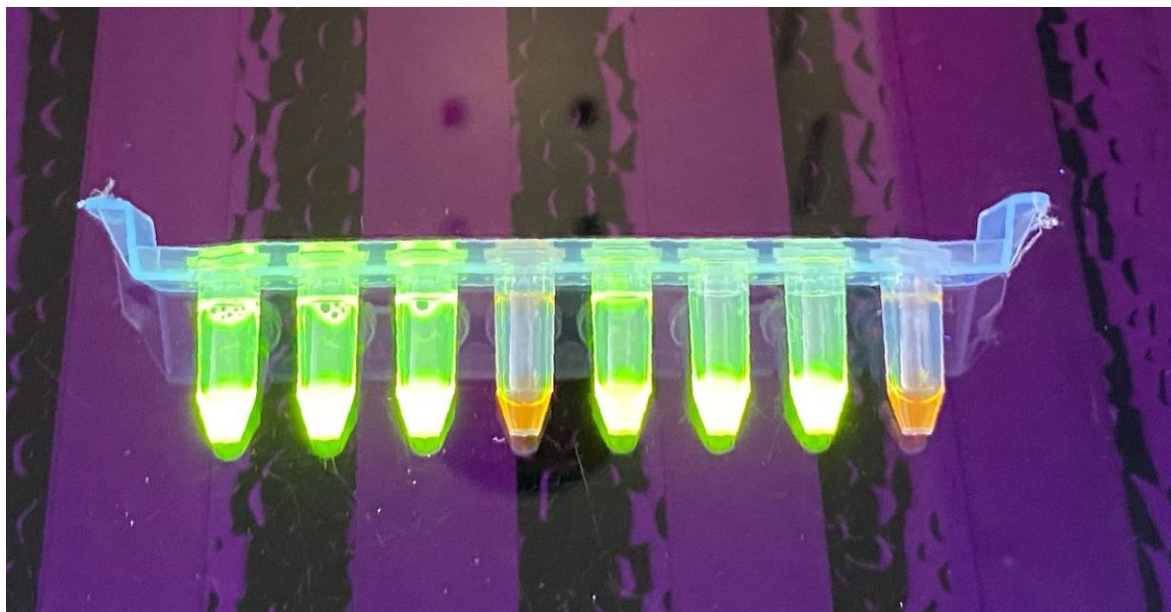
UV vizualizace

Alternativní vizualizace výsledků LAMP reakce je založena na post-amplifikačním barvení produktů pomocí fluorescenčního barviva SYBR[®] Green I. Po ukončení amplifikace je ke každému vzorku přidán 1 µl barviva a reakční zkumavky jsou následně hodnoceny pod UV světlem.

Pozitivní výsledek je charakterizován výraznou změnou barvy reakční směsi z oranžové na zelenou v důsledku vazby barviva na dvouvláknovou DNA. Negativní vzorky si zachovávají původní oranžové zbarvení. Kontrola bez templátu (NTC) nesmí vykazovat změnu barvy; její zbarvení slouží jako základní referenční bod pro hodnocení ostatních vzorků (Obrázek 5).

Tento způsob vyhodnocení umožňuje rychlou a jednoduchou orientační interpretaci výsledků bez nutnosti sofistikovaného přístrojového vybavení, avšak vyžaduje přísné dodržování opatření proti kontaminaci, jelikož reakční zkumavky musí být po amplifikaci otevřeny.

Obrázek 5: UV vizualizace



Zelený – pozitivní, oranžový negativní; 1.vlevo – PC; 1.vpravo NTC

Použité přístroje a pomůcky:

- Rukavice
- zkumavky
- Stěrové kartáčky 80 mm (FLOQSwabs® Flocked Swabs, Copan)
- Přenosná centrifuga
- Sada automatických pipet
- Špičky
- Vortex
- Teplotní blok a UV světlo nebo přenosná real-time platforma (Genie III, Optigene)
- optické stripy (u real-time LAMP)

Chemikálie:

- primery (6)
- kit na extrakci DNA
- master mix pro LAMP
- SYBR® Green I (u real-time LAMP)

Popis uplatnění metodiky

Využití metodiky pro přenosnou detekci bakteriálních patogenů metodou LAMP je možné provádět přímo v chovech bez kvalifikovaného personálu a bez sofistikovaného vybavení. Metodika v první části zahrnuje teoretický úvod do problematiky. V praktické části jsou uvedeny přesné protokoly od přípravy odběru materiálu, izolaci DNA po vlastní provedení LAMP analýzy a vyhodnocení. Vyhodnocení je rozděleno dle využívané vizualizace na real-time a pomocí UV.

Tato metodika byla vyvinuta a optimalizována k precizní molekulární detekci bakteriálního patogenu *Mycoplasma pulmonis* pro hodnocení zdravotního stavu laboratorních zvířat přímo v chovech. Tato metodika pak může umožnit přenos znalostí a postupů z akademických pracovišť do běžného provozu.

Při vizualizaci real-time LAMP je možné metodiku využít i na výzkumných pracovištích a diagnostických molekulárních laboratořích. Není doporučeno použití UV vizualizace v uzavřených prostorách, kde může vzniknout kontaminace do prostředí. Metodika bude uplatněna prostřednictvím firmy AnLab s.r.o. S tímto subjektem byla uzavřena smlouva o uplatnění metodiky.

Ekonomické aspekty

Molekulární analýzy popisované v této metodice budou součástí vyšetřovacích programů zdravotní kontroly dle požadavků FELASA pouze ze vzorků odebraných ze zvířat bez nutnosti jejich utracení. Toto testování je možné udělat přímo v chovech bez proškoleného personálu pro prvotní rychlý záchyt patogenu. Tyto vzorky by byly následně také zaslány kurýrní společností do firmy AnLab s.r.o., takže by odpadla i časově, organizačně a finančně náročná přeprava laboratorních zvířat. Zavedení LAMP části přinese výhodu zejména v rychlém, specifickém a neinvazivním určení výskytu patogenu ještě před rozšířením v chovech a v některých případech ještě před objevením symptomů onemocnění.

Pomocí tohoto metodického postupu lze objektivně vyhodnotit přítomnost *M. pulmonis* bez usmrcení zvířat. Pro provedení analýz není potřebné disponovat vybavenou molekulárně-biologickou laboratoří. Náklady na analýzu pak představují kity pro izolaci, která je proveditelná bez velkých laboratorních přístrojů. Pro vlastní LAMP analýzu jsou potřebné primery, a termostabilní master mixy. Typová cena analýzy po optimalizaci je pak na úrovni 60 Kč za jeden vzorek bez nákladů na pořízení přístrojového vybavení, odpisů, energií a personálu. Pro molekulárně biologickou laboratoř uvedený metodický postup může znamenat zajímavé rozšíření portfolia nabízených služeb a ekonomický přínos v podobě zisku z prováděných analýz.

Seznam publikací předcházející metodice

Stehlíková, D., Beran, P., Rost, M. a Čurn, V. (2026). Genomes-based loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and specific detection of walnut pathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. *Journal of Plant Pathology*, 1-10.

Beran, P., Stehlíková, D., Cohen, S. P., Rost, M., Beranova, K. a Čurn, V. (2023). Utilization of a new hundred-genomes pipeline to design a rapid duplex LAMP detection assay for *Xanthomonas euvesicatoria* and *X. vesicatoria* in tomato. *Plant Disease*, 107(6), 1822-1828.

Beran, P., Stehlíková, D., Cohen, S. P. a Čurn, V. (2021). KEC: unique sequence search by k-mer exclusion. *Bioinformatics*, 37(19), 3349-3350.

Stehlíková, D., Beran, P., Cohen, S. P. a Čurn, V. (2020). Development of real-time and colorimetric loop mediated isothermal amplification assay for detection of *Xanthomonas gardneri*. *Microorganisms*, 8(9), 1301.

Ježková, J., Prediger, J., Holubová, N., Sak, B., Konečný, R., Feng, Y., Xioa, L., **Rost, M., McEvoy, J. a Kváč, M. (2021).** *Cryptosporidium ratti* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) and genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in brown rats (*Rattus norvegicus*) in the Czech Republic. *Parasitology*, 148(1), 84-97.

Tůmová, L., Ježková, J., Prediger, J., Holubová, N., Sak, B., Konečný, R., Květoňová, D., Hlásková, L., **Rost, M., McEvoy, J., Xiao L. a Santín, (2023).** *Cryptosporidium mortiferum* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the species causing lethal cryptosporidiosis in Eurasian red squirrels (*Sciurus vulgaris*). *Parasites & Vectors*, 16(1), 235.

Ježková, J., Limpouchova, Z., Prediger, J., Holubova, N., Sak, B., Konečný, R., **Rost, M., a Kváč, M. (2021).** *Cryptosporidium myocastoris* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae), the Species Adapted to the Nutria (*Myocastor coypus*). *Microorganisms*, 9(4), 813.

Seznam použité literatury

Beran, P., Stehlíková, D., Cohen, S. P., & Čurn, V. (2021). KEC: unique sequence search by K-mer exclusion. *Bioinformatics*, 37(19), 3349-3350.

Davis, J. K., Davidson, M., & Schoeh, T. R. (1991). Murine Respiratory Mycoplasmosis: A Model to Study Effects of Oxidants.

Deák, Á., Bedőcs-Baráth, B., Varga, Á., Mátrai, Á. A., Bácskai, T., Deák-Pocsai, K., & Németh, N. (2025). Significance of Hemorheological Tests During *Mycoplasma Pulmonis* Infection in Laboratory Rats. *Animals*, 15(4), 563.

FELASA Working Group on Revision of Guidelines for Health Monitoring of Rodents and Rabbits, Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., ... & Raspa, M. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals*, 48(3), 178-192.

Foo, P. C., Nurul Najian, A. B., Muhamad, N. A., Ahamad, M., Mohamed, M., Yean Yean, C., & Lim, B. H. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction as viable

PCR substitute for diagnostic applications: a comparative analysis study of LAMP, conventional PCR, nested PCR (nPCR) and real-time PCR (qPCR) based on *Entamoeba histolytica* DNA derived from faecal sample. *BMC biotechnology*, 20(1), 34.

Gadkar, V. J., Goldfarb, D. M., Gantt, S., & Tilley, P. A. (2018). Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. *Scientific reports*, 8(1), 5548.

Jacoby, R. O., & Lindsey, J. R. (1998). Risks of infection among laboratory rats and mice at major biomedical research institutions. *ILAR journal*, 39(4), 266-271.

Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., & Raspa, M. (2014). Recommandations FELASA pour la surveillance sanitaire des colonies de souris, rats, hamsters, cobayes et lapins, dans les unités d'élevage et expérimentales. *STAL*, 40(3), 23-42.

Na, Y. R., Seok, S. H., Lee, H. Y., Baek, M. W., Kim, D. J., Park, S. H., ... & Park, J. H. (2010). Microbiological quality assessment of laboratory mice in Korea and recommendations for quality improvement. *Experimental animals*, 59(1), 25-33.

Nagamine, K., Hase, T., & Notomi, T. J. M. C. P. (2002). Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and cellular probes*, 16(3), 223-229.

Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), e63-e63.

Panno, S., Matic, S., Tiberini, A., Caruso, A. G., Bella, P., Torta, L., ... & Davino, S. (2020). Loop mediated isothermal amplification: principles and applications in plant virology. *Plants*, 9(4), 461.

Rolando, J. C., Jue, E., Barlow, J. T., & Ismagilov, R. F. (2020). Real-time kinetics and high-resolution melt curves in single-molecule digital LAMP to differentiate and study specific and non-specific amplification. *Nucleic acids research*, 48(7), e42-e42.

Soroka, M., Wasowicz, B., & Rymaszewska, A. (2021). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?. *Cells*, 10(8), 1931.

Yang, N., Zhang, H., Han, X., Liu, Z., & Lu, Y. (2024). Advancements and applications of loop-mediated isothermal amplification technology: a comprehensive overview. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1406632.

Název: Stehlíková D. a kol. (2026): Metodika pro přenosnou detekci bakteriálních patogenů metodou LAMP

Autorský kolektiv:
Ing. Dagmar Stehlíková, Ph.D.

Vydal: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta zemědělské a technologická
Na Sádkách 1780
370 05 České Budějovice

Vydáno bez jazykové úpravy

Metodika byla schválena Ministerstvem zemědělství ČR, dopisem ze dne 25.06.2026 (č.j. JU/2026/016623), jako uplatněná metodika s doporučením pro její využití v praxi.

Kontakt na autory: stehld@fzt.jcu.cz

ISBN: 978-80-7694-165-6

