

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

35 355

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C12Q 1/6848 (2018.01)

C12Q 1/6888 (2018.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-38858**
(22) Přihlášeno: **31.05.2021**
(47) Zapsáno: **31.08.2021**

- (73) Majitel:
Biologické centrum AV ČR, v.v.i., České
Budějovice, České Budějovice 2, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Jan Perner, Ph.D., Římov, CZ
Bc. Tereza Hatalová, Sokolov, CZ
Mgr. Václav Hönig, Ph.D., České Budějovice,
České Budějovice 3, CZ
RNDr. Martin Palus, Ph.D., Planá, CZ
RNDr. Radek Šíma, Ph.D., České Budějovice,
České Budějovice 6, CZ
- (74) Zástupce:
PatentCentrum Sedlák & Partners s.r.o., Okružní
2824, 370 01 České Budějovice, České Budějovice
3

- (54) Název užitého vzoru:
**Sada pramerů pro amplifikační kontrolu pro
detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou
izotermické amplifikace LAMP a kit pro
detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou
izotermické amplifikace LAMP**

Sada primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP a kit pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP

5

Oblast techniky

Technické řešení se týká oblasti molekulární biologie, konkrétně sady primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP a kitu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP.

Dosavadní stav techniky

15 Koronavirus SARS-CoV-2 je původcem onemocnění označovaného jako COVID-19. Od konce roku 2019 dochází k rychlému šíření tohoto onemocnění po celém světě. V průběhu roku 2020 se svět dostává do stavu celosvětové pandemie infekčního onemocnění COVID-19.

20 Celosvětová pandemie přinesla celou řadu výzev nejen zdravotnického charakteru. Jednou ze zásadních výzev pro zdravotnické systémy na celém světě je vývoj rychlých, přesných a finančně únosných diagnostických či detekčních postupů. Včasná identifikace infikovaných osob má význam jak pro brzké zahájení léčby, tak zejména pro zavedení včasné karantény jakožto zásadního prostředku pro omezení či zpomalení šíření pandemie. V případě onemocnění COVID-19 je potřeba včasné identifikace infikovaných a potenciálně infekčních osob ještě umocněna, protože dochází k šíření infekce i u osob zcela bez příznaků: infikované osoby před 25 vypuknutím symptomů tzv. presymptomatický přenos; jedinci, kteří jsou infikováni, ale onemocnění prodělávají bez příznaků tzv. asymptomatický přenos; či jedinci, kteří virus šíří déle, než je běžné, prodělávají relapsy onemocnění apod.

30 Vzhledem k aktuálně rozvinutému používání molekulárně-biologických metod ve zdravotnictví, jsou od začátku pandemie zlatým standardem detekce koronaviru SARS-CoV-2 či diagnostiky COVID-19 metody založené na technologii reverzně transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase RT-qPCR. Tyto metody prokazují přítomnost virové genetické informace ve formě ribonukleové kyseliny (RNA) ve vzorku. Jejich zásadní výhodou je vysoká citlivost 35 (obecně nízké desítky kopií detekované RNA), a vysoká specifita. Naopak nevýhodami jsou jejich relativní náročnost na provedení, reagenty, přístrojové vybavení, personál a vysoká cena.

Vzhledem k celosvětovému rozsahu této epidemie mělo a stále má rozsáhlé testování globální dopady na vytíženost zdravotnických zařízení provádějících odběry a specializovaných laboratoří 40 provádějících vyšetření i na zdroje potřebných chemikálií, laboratorních plastů, ochranných pomůcek apod. Globální nedostatek se promítá až na úroveň primárních surovin - např. nedostatek plastů, které se používají pro výrobu laboratorních špiček či mikrozkušavek.

Z tohoto důvodu je od začátku pandemie vysoká poptávka po méně náročných alternativách pro 45 průkaz viru v klinických vzorcích, jak na finanční a časové, ale i personální a jiné zdroje. Jednou z takových alternativ jsou tzv. antigenní testy. Ty jsou založené na detekci virových proteinů ve vzorku. Splňují požadavky na jednoduchost užívání a rychlost, nicméně obecně vykazují nedostatečnou specifitu a zejména senzitivitu 79 % vůči RT-qPCR u symptomatických pacientů, 59 % u asymptomatických pacientů.

50

Metody izotermální amplifikace, včetně varianty smyčkou zprostředkované izotermické amplifikace neboli LAMP, umožňují spojit rychlost a nenáročnost provedení s vysokou citlivostí testu. V principu fungují na podobném mechanismu jako RT-qPCR: při reakci dochází ve vzorku ke specifické amplifikaci cílové virové RNA a amplifikační produkt je následně detekován. 55 Nicméně v případě izotermální metody není pro amplifikaci nutné cyklování teplot. Samotná

amplifikace může být v optimálním nastavení podmínek výrazně efektivnější a tedy rychlejší. V neposlední řadě jsou LAMP reakce vysoce robustní vůči inhibitorům reakce a nabízejí tak možnost použití jako templát pro amplifikaci pouze hrubý extrakt ze vzorku a vypustit další finančně, přístrojově i časově náročný proces izolace RNA. Metoda LAMP navíc umožňuje různé způsoby vizualizace amplifikačního produktu – nejrozšířenější jsou techniky založené na kolorimetrických reakcích, které jsou v principu odečitatelné pouhým okem, či přístupy založené na fluorescenci s přesným kvantifikovatelným odečtem pomocí fluorescenčních readerů, či RT-qPCR cyclerů patřících ke standardnímu vybavení diagnostických laboratoří, ale i za pomoci jednoduchých fluorescenčních lamp.

Úkolem technického řešení je navrhnout sadu primerů pro amplifikační kontrolu a kit pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP, které by poskytovalo včasnou identifikaci infikovaných a potenciálně infekčních osob a které by eliminovaly ekonomické náklady a časovou náročnost na metodu.

Podstata technického řešení

Vytčený úkol je vyřešen pomocí sady primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP. Podstata řešení spočívá v tom, že sada primerů sestává z následujících oligonukleotidových primerových párů:

F3:	CCCTGAAGTACCCCATCGA	SEQ ID 7
B3:	ACAGCCTGGATAGCAACGT	SEQ ID 8
FIP:	GAGCCACACGCAGCTCATTGTACACGGCATCGTCACCAAC	SEQ ID 9
BIP:	CTGAACCCCAAGGCCAACCGGCTGGGGTGTGAAGGTC	SEQ ID 10
LoopF:	GTGCCAGATTTTCTCCATGTCGTC	SEQ ID 11
LoopB:	CGAGAAGATGACCCAGATCATGT	SEQ ID 12.

Navržené páry primerů (F3, B3, FIP, BIP, LOOP-F, LOOP-P) pro detekci amplifikační kontroly jsou využitelné v rámci rychlé a efektivní diagnostiky koronaviru SARS-CoV-2. Páry oligonukleotidových primerů jsou určeny k provedení amplifikační kontroly – ověření, že některé součásti analyzovaného vzorku neinhibují detekční reakci.

Způsob detekce s využitím uvedené sady primerů umožňuje rychlé, ekonomické a časově nenáročné kvalitativní zjištění přítomnosti koronaviru SARS-CoV-2. LAMP reakce obecně zahrnuje enzym polymerázu, sadu primerů, a v případě detekce RNA i reverzní transkriptázu pro přepis RNA do DNA, čímž vzniká komplementární DNA neboli cDNA, která dále slouží jako templát pro amplifikaci polymerázou. Rychlost této metody je závislá zejména na specifitě použitých primerů, procesivitě enzymů, ale i celkové optimalizaci složení amplifikační reakce.

Předmětem předkládaného technického řešení je dále kit pro detekci koronaviru SARS-CoV-2, který obsahuje komerčně dostupný Master Mix neboli soubor reagensů pro reakční směs pro amplifikaci (WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix, New England Biolabs M1804), který obsahuje polymerázu Bst II získanou z mikroorganismu *Bacillus stearothermophilus*. Kit dále obsahuje sadu primerů, jejichž sekvence byla publikována (Huang, W. E., Lim, B., Hsu, C. - C., Xiong, D., Wu, W., Yu, Y., Jia, H., Wang, Y., Zeng, Y., Ji, M., et al. (2020). RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology* 13, 950–961.) a je volně dostupná, dále reverzní transkriptázu, směs nukleotidů, nukleáz-prostou vodu pro PCR a pufr. Podstata technického řešení spočívá v tom, že kit dále obsahuje druhou sadu výše popsanych

- primerů pro amplifikační kontrolu, která umožňuje detekci amplifikační kontroly a směs stabilizačních aditiv, které zvyšují jeho stabilitu vzhledem k variabilitě vzorků a možné přítomnosti inhibitorů a fluorescenční barvivo. Kit tedy s výhodou obsahuje kombinaci reagensů neboli barviv umožňujících jak kolorimetrickou, tak fluorescenční detekci amplifikačního produktu. Finální složení Master Mixů detekčního kitu podle tohoto technického řešení je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Složení Master Mixů pro detekční kit.

	Původní koncentrace	Objem	Finální koncentrace
WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix (New England Biolabs; M1804)	2 ×	10 μl	0,9 ×
F3 primer	16 μM	0,66 μl	0,48 μM
B3 primer	16 μM	0,66 μl	0,48 μM
FIP primer	2 μM	0,66 μl	0,06 μM
BIP primer	2 μM	0,66 μl	0,06 μM
LoopF	4 μM	0,66 μl	0,120 μM
LoopB	4 μM	0,66 μl	0,120 μM
Fluorescenční barvivo (New England Biolabs; B1700S)	50 ×	0,40 μl	0,91 ×
Betain	4,0M	2,0 μl	0,364M
Guanidin hydrochlorid	4,0M	0,2 μl	0,036M
PCR H ₂ O		1,4 μl	
RNA		4,0 μl	
Celkový objem		22 μl	

- Výhody sady primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP a kitu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP spočívají v tom, že poskytují amplifikační kontrolu – tedy kontrolu, že amplifikační reakce proběhla a nebyla inhibována případnými inhibitory ve vzorku.

15

Příklad uskutečnění technického řešení

- Řešení bylo aplikováno formou přípravy kitu obsahujícího dva Master Mixy, které obsahovaly stejné veškeré komponenty reakce, kromě vzorku. Jeden je určený pro detekci cílové RNA SARS-CoV-2, druhý je amplifikační kontrolou, že u daného vzorku nedochází k inhibici amplifikační reakce. Pro detekci byly použity reálné klinické vzorky, a to výtěr z nosohltanu vytřepaný do 1 ml fosfátem pufrovaného fyziologického roztoku neboli PBS nebo 1 až 2 ml transportního media.

25

Úprava primárního vzorku

- Úprava primárního vzorku proběhla ve dvou variantách – izolace RNA kolonkovou metodou a zpracování vzorku pomocí hrubé extrakce. V případě izolace RNA kolonkovou metodou byla RNA izolována komerčním kitem QIAmp Viral Minikit (Qiagen) ze 140 μl vzorku dle návodu dodaného výrobcem. Pro hrubou extrakci bylo smícháno 50 μl extrakčního média, směs byla promíchána a inkubována 5 min při 95 °C. Takto upravený vzorek byl použit jako templát do reakce.

Amplifikační reakce

Složení obou Master Mixů je stejné, jako je uvedeno v tabulce 1, kromě použitých sekvencí primerů, které jsou vybrány ze sady SARS-CoV-2 Master Mix neboli známé sady primerů pro detekci SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP a v druhém provedení ze sady kontrolní Master Mix neboli sady primerů pro amplifikační kontrolu metodou izotermické amplifikace LAMP.

Tabulka 2: Složení Master Mixů pro detekční kit.

	Původní koncentrace	Objem	Finální koncentrace
WarmStart Colorimetric LAMP Master Mix (New England Biolabs; M1804)	2 ×	10 µl	0,9 ×
F3 primer	16µM	0,66 µl	0,48µM
B3 primer	16µM	0,66 µl	0,48µM
FIP primer	2µM	0,66 µl	0,06µM
BIP primer	2µM	0,66 µl	0,06µM
LoopF	4µM	0,66 µl	0,120µM
LoopB	4µM	0,66 µl	0,120µM
Fluorescenční barvivo (New England Biolabs; B1700S)	50 ×	0,40 µl	0,91 ×
Betain	4,0M	2,0 µl	0,364M
Guanidin hydrochlorid	4,0M	0,2 µl	0,036M
PCR H ₂ O		1,4 µl	
RNA		4,0 µl	
Celkový objem		22 µl	

SARS-CoV-2 Master Mix obsahuje známou sadu primerů pro detekci SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP:

15 F3: CCCCAAATGCTGTTGTT SEQ ID 1
 B3: TAGCACGTGGAACCCAAT SEQ ID 2
 FIP: GGTTTTCAAGCCAGATTCATTATG
 20 GATGTCACAATTCAGAAGTAGGA SEQ ID 3
 BIP: TCTTCGTAAGGGTGGTCGCA
 25 GCACACTTGTTATGGCAAC SEQ ID 4
 LoopF: TCGGCAAGACTATGCTCAGG SEQ ID 5
 LoopB: TTGCCTTTGGAGGCTGTGT SEQ ID 6.

30 Kontrolní Master Mix obsahuje sadu primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP:

35 F3: CCCTGAAGTACCCCATCGA SEQ ID 7
 B3: ACAGCCTGGATAGCAACGT SEQ ID 8

FIP: GAGCCACACGCAGCTCATT
 GTACACGGCATCGTCACCAAC SEQ ID 9
 5 BIP: CTGAACCCCAAGGCCAACC
 GGCTGGGGTGTGAAGGTC SEQ ID 10
 10 LoopF: GTGCCAGATTTTCTCCATGTCGTC SEQ ID 11
 LoopB: CGAGAAGATGACCCAGATCATGT SEQ ID 12.

15 Každá sada vzorků obsahovala negativní kontrolu izolace, negativní beztemplátovou kontrolu a pozitivní kontrolu – cDNA získanou reverzní transkripcí z RNA izolované z buněčné kultury infikované virem SARS-CoV-2. V prvním kroku cyklu pro amplifikaci dochází ke štěpení případných kontaminujících produktů z předchozích amplifikací značených deoxyridin-trifosfátem neboli dUTP, pomocí enzymu uracil DNA-N-glykosylázy neboli UNG. Následná amplifikace probíhala během inkubace v real – time PCR cycleru (Lightcycler 480, Roche)
 20 s nastavením cyklu podle tabulky 2.

Tabulka 3: Nastavení cyklu pro amplifikaci.

Teplota	Čas		Odečet fluorescence
24 °C	5 min	digesce dUTP/UNG	
63 °C	30 min	amplifikace	1× za minutu
95 °C	5 min	inaktivace případného zbytkového viru	

25 Vyhodnocení výsledku na základě fluorescence bylo provedeno pomocí software pro LightCycler 480, za použití algoritmu „Second Derivative Maximum Method“. V případě pozitivních vzorků došlo k překročení prahové hodnoty fluorescence. Čas překročení prahové hodnoty fluorescence byl pro jednotlivé vzorky vztažen k Ct („cycle threshold“) hodnotě získané z předchozí analýzy RT-qPCR. Vyhodnocení na základě kolorimetrie bylo provedeno porovnáním barvy reakční směsi
 30 po amplifikaci s pozitivní a negativní kontrolou, kdy červená označuje negativní vzorek a žlutá pozitivní vzorek.

Master Mixy jsou rozpipetovány po 18 µl do plastu vhodného pro reakce typu PCR neboli polymerázové řetězové reakce, jako jsou PCR zkumavky, PCR stripy nebo 96 jamkové PCR destičky. K Master Mixům jsou přidány 4 µl vzorku ve formě izolované RNA nebo hrubého extraktu. Následuje inkubace při 63 °C po dobu 30 minut. Reakci je možné ukončit inkubací 5 min
 35 při 95 °C, čímž je dosaženo i definitivní inaktivace infekčních virových částic SARS-CoV-2 potenciálně přítomných ve vzorku. Následuje vyhodnocení pomocí kolorimetrie, kdy červená označuje negativní vzorek a žlutá pozitivní vzorek. Další možnost vyhodnocení je pomocí fluorescence s excitací při 497 nm v případě pozitivního vzorku. Odečet fluorescence ve vlnové délce v rozmezí od 483 do 533 nm; např. v real-time PCR cycleru s filtrem pro detekci v kanále Sybr/Fam (483 nm až 533 nm), případně Cyan 500 (450 nm až 500 nm).
 40

45 Výsledky detekce RNA SARS-CoV-2 pomocí RT-qPCR v porovnání s detekcí pomocí LAMP ve variantě izolované RNA kolonkovou metodou, tak pro vzorek zpracovaný hrubou extrakcí jsou pro fluorescenční i kolorimetrickou vizualizaci uvedeny v tabulce 3. V tabulce 3 jsou negativní výsledky označeny „negativní“ či „neg.“ a pozitivní výsledky „pozitivní“ či „poz.“. Pokud nebyla z technických důvodů provedena některá z detekcí, je v příslušné buňce uvedeno „n.a.“. Výsledek předchozí detekce RNA koronaviru SARS-CoV-2 pomocí RT-qPCR je uveden pro jednotlivé
 50 detekované geny jako hodnota Ct („Cycle Threshold“). Čím nižší je hodnota Ct, tím vyšší byla

- 5 koncentrace cílové genetické informace v původním vzorku. Dále jsou uvedeny výsledky detekce pomocí LAMP pro variantu použití izolované RNA jako templátu a pro variantu použití hrubého extraktu ze vzorku. V případě pozitivní amplifikace je uveden čas, kdy byla překročena prahová fluorescence a to, jak pro amplifikační kontrolu (AK), tak pro samotnou detekci koronaviru (SARS). Vzorky, u kterých nebyla shoda mezi výsledky různými metodami, jsou označeny červeně.

Tabulka 4: Výsledky testování klinických vzorků metodou LAMP v porovnání se standardizovanou detekční/diagnostickou metodou RT-qPCR.

	Vzorek	Výsledek		Výsledek			Výsledek		
		RT-qPCR [CT hodnota]		LAMP - izolovaná RNA [min.]			LAMP - hrubá extrakce [min.]		
		geny E; RdRP	gen N	Fluorescence AK	Fluorescence SARS	Kolorimetrie AK/SARS	Fluorescence AK	Fluorescence SARS	Kolorimetrie AK/SARS
RT-qPCR pozitivní vzorky	2	19,76	22,82	17,70	9,68	poz./poz.	8,57	19,95	poz./poz.
	13	17,06	20,82	18,05	8,91	poz./poz.	18,86	8,66	poz./poz.
	20	21,07	26,66	17,71	9,83	poz./poz.	18,18	9,72	poz./poz.
	21	26,08	30,24				27,00	13,24	poz./poz.
	38	24,33;21,72	21,37	15,29	9,05	poz./poz.	15,71	9,10	poz./neg.
	40	19,50;19,13	18,40	13,45	8,19	poz./poz.	16,06	8,30	poz./neg.
	44	20,23;19,76	19,10	13,07	8,35	poz./poz.	16,41	9,14	poz./poz.
	48	25,38;25,06	23,51	12,19	10,08	poz./poz.	15,52	10,41	poz./poz.
	50	27,98;25,37	23,85	12,09	10,10	poz./poz.	16,25	10,10	poz./poz.
	49	22,32;21,86	20,37	12,12	8,77	poz./poz.	14,27	8,98	poz./poz.
	1	30,14	32,50	17,40	12,81	poz./poz.			
	3	19,24	21,46	16,67	9,14	poz./poz.			
	5	19,01	23,84	22,34	9,35	poz./poz.			
	7	22,22	23,32	17,57	10,90	poz./poz.			
	10	19,00	22,75	17,95	8,79	poz./poz.			
	11	26,54	31,43	17,04	9,93	poz./poz.			
	14	21,41	25,37	16,98	9,86	poz./poz.			
	17	16,74	20,90	17,58	7,49	poz./poz.			
	19	21,55	26,22	19,05	9,72	poz./poz.			
	22	32,20;31,34	30,88	11,77	12,87	poz./poz.			
	28	20,54;16,78	16,62	15,54	10,09	poz./poz.			
	23	31,97;31,29	30,35	13,07	14,14	poz./poz.			
	25	27,96;27,46	27,59	13,22	9,73	poz./poz.			
	15	35,75	37,61	16,82	negativní	poz./neg.			
	24	32,69;27,47	36,78	11,90	15,08	poz./poz.	15,52	negativní	poz./neg.
26	38,37;34,56	36,78	16,46	14,45	poz./poz.	16,81	negativní	poz./neg.	
6	32,46	36,73	18,16	14,35	poz./poz.	19,06	negativní	poz./neg.	
46	35,20;34,61	33,32	11,06	15,60	poz./poz.	13,25	negativní	poz./neg.	
12	29,93	33,72	18,51	12,92	poz./poz.	18,80	negativní	poz./neg.	
RT-qPCR hraniční vzorky	18	33,74	negativní	20,20	14,01	poz./poz.	20,56	negativní	poz./neg.
	16	33,66	negativní	17,79	14,90	poz./poz.	17,91	negativní	poz./neg.
	47	negativní	39,23	13,03	negativní	poz./neg.	17,51	negativní	poz./neg.
	8	38,45	negativní	17,58	negativní	poz./neg.			
	9	36,27	negativní	18,38	negativní	poz./neg.			
	27	negativní	39,12	neg.	negativní	poz./neg.			
4	37,24	negativní	18,91	negativní	poz./neg.				
RT-qPCR negativní vzorky	29	negativní	negativní	12,06	negativní	poz./neg.	n.a.	negativní	poz./neg.
	30	negativní	negativní	11,95	negativní	poz./neg.	14,75	negativní	poz./neg.
	31	negativní	negativní	12,68	negativní	poz./neg.	15,79	negativní	poz./neg.
	32	negativní	negativní	13,24	negativní	poz./neg.	14,95	negativní	poz./neg.
	33	negativní	negativní	14,61	negativní	poz./neg.	16,16	negativní	poz./neg.
	34	negativní	negativní	14,79	negativní	poz./neg.	16,19	negativní	poz./neg.
	35	negativní	negativní	12,19	negativní	poz./neg.	14,78	negativní	poz./neg.
	36	negativní	negativní	14,31	negativní	poz./neg.	23,11	negativní	poz./neg.
	37	negativní	negativní	18,62	negativní	poz./neg.	16,15	negativní	poz./neg.
	39	negativní	negativní	14,28	negativní	poz./neg.	18,24	negativní	poz./neg.
	41	negativní	negativní	14,85	negativní	poz./neg.	16,00	negativní	poz./neg.
	42	negativní	negativní	12,38	negativní	poz./neg.	15,00	negativní	poz./neg.
	43	negativní	negativní	13,98	negativní	poz./neg.	14,07	negativní	poz./neg.
	45	negativní	negativní	12,30	negativní	poz./neg.	16,74	negativní	neg./neg.
	51	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
	52	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
	53	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
	54	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
	55	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
	56	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
	57	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.
58	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
59	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
60	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
61	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
62	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
63	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
64	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	
65	negativní	negativní	n.a.	negativní	n.a./neg.	n.a.	negativní	n.a./neg.	

V porovnání se standardizovanou metodikou RT-qPCR vykazovala aplikace metody LAMP ve všech modifikacích 100 % specifitu (29 z 29 RT-qPCR negativních vzorků). Senzitivita metody LAMP aplikovaná na izolovanou RNA pro fluorescenční i kolorimetrické vyhodnocení dosáhla 85,3 % (29 z 34 RT-qPCR pozitivních vzorků). U čtyř vzorků se navíc jednalo o hraničně pozitivní detekci i v RT-qPCR. Senzitivita očištěná o tyto čtyři vzorky s hraničním výsledkem dosahuje 96,7 % (29 z 30 RT-qPCR pozitivních vzorků). V případě aplikace LAMP na templát z hrubé extrakce ze vzorku výtěru z nasofaryngu se po jeho naředění fosfátového pufru neboli PBS pufrem či transportním médiem posunul limit detekce přibližně na Ct 30 až 32, což po očištění o tři hraničně pozitivní vzorky dává senzitivitu 66,7 % (10 z 15). Pro tento typ analýzy se ovšem nejednalo o vhodný vzorek, pro skutečně validní zhodnocení této metody zpracování vzorku je potřeba použít vzorky vytřepané přímo do extrakčního média, aby nedocházelo k neúměrnému ředění vzorku oproti izolaci RNA. Detekce amplifikační kontroly byla úspěšná ve 100 % vzorků, u kterých byla provedena (32 z 32).

15

Průmyslová využitelnost

Sada primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP a kit pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP podle tohoto technického řešení lze využít pro detekci onemocnění COVID-19 ve vzorcích humánního či veterinárního původu, či ve vzorcích z prostředí jako jsou stěry povrchů apod.

20

NÁROKY NA OCHRANU

5 1. Sada primerů pro amplifikační kontrolu pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP, **vyznačující se tím**, že sestává z následujících oligonukleotidových primerových párů:

F3: CCCTGAAGTACCCCATCGA SEQ ID 7

10 B3: ACAGCCTGGATAGCAACGT SEQ ID 8

FIP: GAGCCACACGCAGCTCATTGTACACGGCATCGTCACCAAC SEQ ID 9

BIP: CTGAACCCCAAGGCCAACCGGCTGGGGTGTGAAGGTC SEQ ID 10

15 LoopF: GTGCCAGATTTTCTCCATGTCGTC SEQ ID 11

LoopB: CGAGAAGATGACCCAGATCATGT SEQ ID 12.

20 2. Kit pro detekci koronaviru SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP obsahující sadu primerů pro detekci SARS-CoV-2 metodou izotermické amplifikace LAMP, soubor reagentů pro reakční směs pro amplifikaci a nukleáz-prostou vodu pro PCR, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje sadu primerů pro amplifikační kontrolu podle nároku 1, a směs stabilizačních aditiv obsahující betain a guanidin hydrochlorid a fluorescenční barvivo.

25 3. Kit podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že směs stabilizačních aditiv obsahuje betain o koncentraci 0,364M a guanidin hydrochlorid o koncentraci 0,036M.

30 4. Kit podle nároku 2 nebo 3, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje barvivo pro kolorimetrickou detekci amplifikovaného produktu.