

Funkční vzorek

Název: Kolorimetrické hodnocení RT-LAMP reakce v reálném čase pomocí 8-kanálového LED systému

Autorský kolektiv: Petra Stejskalová, Pavel Neužil, Ondřej Zítka

Tento výsledek vznikl za podpory TAČR v rámci projektu TN02000017

Informace podléhají obchodnímu tajemství

Obsah

1. ÚVOD	3
Informace o výsledku	3
2. POPIS VÝSLEDKU.....	4
Oblast technologie	4
Dosavadní stav technologie	4
Popis zařízení.....	5
Popis softwaru.....	9
3. VÝSLEDKY.....	11
Optimalizační výsledky	11
Testování funkčního vzorku	13
Využitelnost zařízení.....	15
4. FOTODOKUMENTACE.....	16

1. ÚVOD

Výstupem projektu je funkční vzorek 8 kanálového LED systému, který umožňuje analýzu kolorimetrické RT-LAMP amplifikace v reálném čase.

Informace o výsledku

Identifikační číslo výstupu: TN02000017/-V02

Název výstup: Kolorimetrické hodnocení RT-LAMP reakce v reálném čase pomocí 8-kanálového LED systému

Druh výstupu/výsledku: Gfunk - Funkční vzorek

Termín dosažení výsledku dle návrhu projektu: 31. 12. 2024

Termín dosažení výsledku dle skutečnosti: 31.12.2024

Autorský tým: Petra Stejskalová, Pavel Neužil, Ondřej Zítka,

2. POPIS VÝSLEDKU

Oblast technologie

Moderní diagnostika se neustále posouvá směrem k jednodušším, rychlejším a cenově dostupnějším řešením, která mohou být využívána přímo v místě péče o pacienta nebo v terénu. Technické řešení se týká vývoje unikátního systému na bázi LED, který umožňuje analýzu kolorimetrické RT-LAMP amplifikace v reálném čase i po jejím skončení. Tento přístroj je navržen s důrazem na snadné použití a přenositelnost. Díky svým kompaktním rozměrům a jednoduchému ovládání je ideální pro point-of-care testování mimo laboratorní prostředí, a to bez nutnosti vyškoleného personálu. Jednou z klíčových vlastností tohoto zařízení je využití kolorimetrické detekce, která eliminuje potřebu složitých optických systémů, které jsou nedílnou součástí přístrojů pro RT-LAMP analýzu s fluorescenční variantou detekce. Díky tomu se výrazně snižují výrobní náklady zařízení, aniž by to mělo negativní dopad na jeho funkčnost nebo přesnost.

Dosavadní stav technologie

Diagnostika patogenů hraje klíčovou roli v moderní medicíně, veterinární péči, zemědělství i ochraně životního prostředí. Schopnost rychle a přesně identifikovat mikroorganismy, které způsobují infekční onemocnění, je zásadní pro efektivní léčbu, prevenci šíření nemocí a správné rozhodování v krizových situacích, jako jsou epidemie. Mezi základní diagnostické přístupy patří tradiční kulturační metody, které umožňují izolaci a identifikaci živých patogenů a testování jejich citlivosti na léčiva. Tyto metody jsou však časově náročné a často omezené při detekci patogenů, které rostou pomalu nebo obtížně. Významnou roli hrají také imunologické metody, jako je ELISA nebo rychlé imunochromatografické testy, které detekují specifické antigeny nebo protilátky. Vzhledem k nižší citlivosti jsou tyto testy vhodné spíše pro screeningové testování. Současné diagnostické protokoly proto stále častěji spoléhají na molekulární metody, jako je tradiční PCR analýza, sekvenování DNA nebo izotermální techniky, jako je LAMP. Tyto technologie dokážou s vysokou citlivostí detekovat genetický materiál patogenů i v minimálním množství vzorku, což umožňuje rychlou diagnózu například u virových infekcí. Mezi těmito metodami si stále větší pozornost získává technologie LAMP, která přináší zásadní výhody v rychlosti, jednoduchosti a dostupnosti oproti PCR. Metoda LAMP využívá amplifikaci nukleových kyselin za konstantní teploty, což eliminuje potřebu nákladných termocyklérů jako je tomu u PCR a umožňuje snadnější a rychlejší analýzu. Díky své vysoké citlivosti dokáže detekovat velmi malé množství genetického materiálu patogenu v raných fázích infekce do 30 minut. Klíčovým aspektem úspěšného využití LAMP technologie je však způsob detekce amplifikovaných produktů, což určuje nejen citlivost a specifitu diagnostického procesu, ale také jeho praktičnost a možnosti nasazení v terénu. Nejrozšířenější variantou je fluorescenční detekce pomocí fluorescenčně značených barviv nebo specificky navržených sond jako je tomu u PCR. Tento typ detekce disponuje svou citlivostí a možností kvantifikace amplifikace. Nicméně pro záznam fluorescenčního signálu je

potřeba specializovaného přístroje jako je termocyklér, spektrofotometr nebo reader fluorescence, což činí tento typ detekce vhodným pouze v laboratorním prostředí. Další možností detekce je měření zákalu v reálném čase vznikajícího v průběhu LAMP amplifikace pomocí turbidimetrie. Výhodou metody je sledování amplifikace bez nutnosti barviv, která mohou být toxická. Aby bylo měření přesné, metoda opět vyžaduje komplexní přístrojové vybavení, což omezuje její použití v terénu. Tento typ detekce není příliš oblíbený z hlediska nižší citlivosti oproti fluorescenční metodě, a z tohoto důvodu se využívá nejméně. Velmi citlivou metodou je elektrochemická detekce, která umožňuje sledování změn elektrických vlastností (např. impedance, vodivost) v průběhu amplifikace, nicméně stejně jako předchozí metody vyžaduje vyšší technickou náročnost a použití specializovaných senzorů. V posledních letech se stává velmi oblíbenou vizuální detekce, která je jednou z nejjednodušších a nejdostupnějších možností, při níž dochází k vyhodnocení amplifikaci na základě změny pH nebo barvy reakční směsi pouhým okem. Tento typ detekce se nejčastěji používá pro hodnocení reakce po jejím průběhu a často může dojít k subjektivní interpretaci barev pozorovatele. Vzhledem k jednoduchosti metody, která nevyžaduje specializované vybavení, a komerčnímu potenciálu LAMP technologie se na trhu začínají objevovat komerčně dostupné systémy umožňující sledovat změnu barvy během LAMP amplifikace. Mezi tyto systémy patří například platforma PEBBLE od společnosti Metabiom nebo ID NOW od společnosti Abbott. Všechny aktuálně dostupné systémy jsou však zaměřeny na jedinou aplikaci a umožňují detekci pouze jednoho patogenu. Navíc jejich pořizovací cena zůstává relativně vysoká, což výrazně omezuje jejich konkurenceschopnost. Předložené zařízení umožňuje sledování průběhu kolorimetrické reakce v reálném čase až u osmi vzorků zároveň. Systém je založen na osvětlení vzorku třemi elektroluminiscenčními diodami (LED) s různými vlnovými délkami pro každý kanál a fotodiodovým detektorem, který snímá a zaznamenává signál. Systém disponuje svou velikostí, velmi přehledným softwarem a možností univerzálního použití. Vzhledem k jednoduchosti systému bez potřeby specializovaného vybavení zařízení jeví jako slibný nástroj pro terénní diagnostiku a diagnostiku v rozvojových zemích s omezenou infrastrukturou.

Popis zařízení

Zařízení se skládá z několika funkčních jednotek, které zajišťují kompaktnost celého systému a umožňují provedení kolorimetrické LAMP reakce. Trojrozměrný model zařízení, včetně pohledu na jeho vnitřní uspořádání, je uveden na obrázku 1, zatímco elektrické schéma je zobrazeno na obrázku 2.

Zařízení lze napájet buď prostřednictvím USB kabelu připojeného k PC nebo pomocí externího adaptéru na 9 VDC, díky čemuž není nutné připojení ke stálému zdroji elektrického napětí.

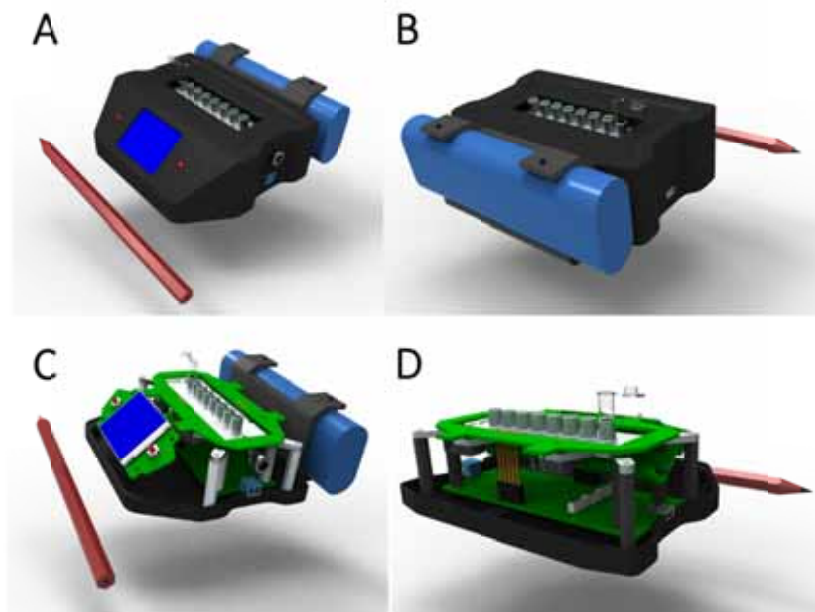
Přední stranu systému tvoří ovládací panel obsahující 2 tlačítka a LCD displej. Tlačítka slouží k zapnutí/vypnutí zařízení nebo v kombinaci s displejem k navigaci mezi jednotlivými programy, nastavování parametrů, sledování průběhu reakce či úpravě podmínek. Pro dobrou přehlednost, plynulejší pohyb, vyšší rozlišení a přesnější barvy byl vybrán LCD displej

o rozměrech 320x160 mm využívající technologii TFT (thin film transistor) (obrázek 3). Za účelem externího ovládání je k dispozici software kompatibilní s počítači a mobilními zařízeními.

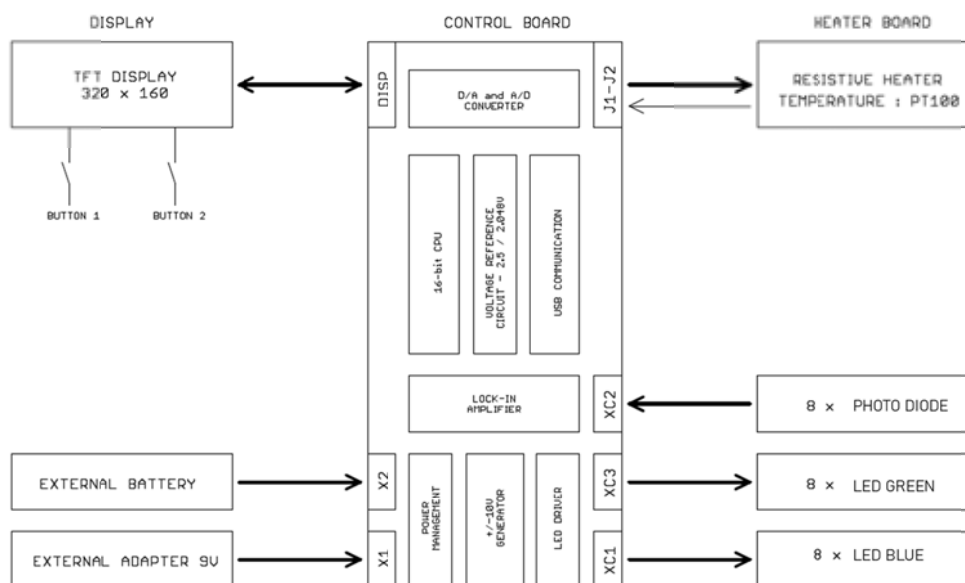
Systém je navržen tak, aby umožňoval provádění více testů současně, včetně negativních a pozitivních kontrol. Obsahuje osm samostatných jamek, do kterých lze vložit buď jednotlivé PCR zkumavky o objemu 0,1 ml nebo 0,2 ml, nebo PCR stripy se stejnými objemy. Každá jamka je oddělena, což minimalizuje riziko kontaminace vzorků. Každá jamka navíc obsahuje vlastní sadu tří elektroluminiscenčních diod s různými vlnovými délkami a optická vlákna, která vedou signál k fotodiodovému detektoru (obrázek 4, 5). Tyto LED diody, umístěné v horní části jamek, osvětlují obsah zkumavek s reakční směsí. Z tohoto důvodu je nutné, aby součástí reakčního kitu byly zkumavky s plně transparentním víčkem.

Na základě optimalizace byla zvolena kombinace bílé, zelené a modré LED diody, která umožňuje nejcitlivější detekci barevných změn. Optická vlákna jsou umístěna ve spodní části jamek, což umožňuje práci s velmi malými objemy reakční směsi.

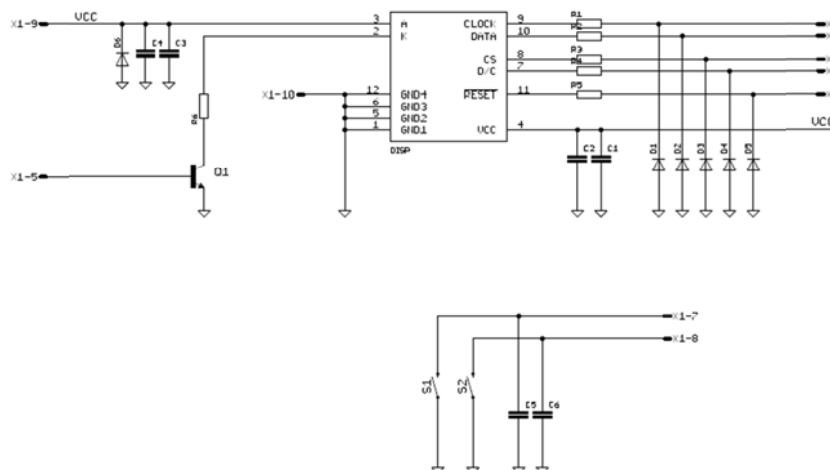
LAMP amplifikace probíhá při konstantní teplotě; v rámci testů byla na základě navržených primerů stanovena teplota 65 °C. Regulaci a reakci na rychlou změnu teploty zajišťuje platinový teplotní rezistor PT100 s pozitivním tepelným koeficientem umístěný ve voděodolném pouzdře z nerezové oceli, který umožňuje přesné měření teplot až do 350 °C (obrázek 6).



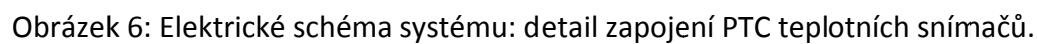
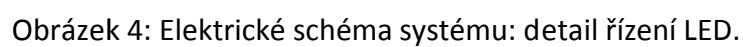
Obrázek 1: 3D model zařízení pro kolorimetrickou LAMP. (A) pohled zařízení z přední strany, (B) pohled zařízení ze zadní strany, (C) vnitřní konstrukce zařízení z přední strany, (D) vnitřní konstrukce zařízení ze zadní strany.

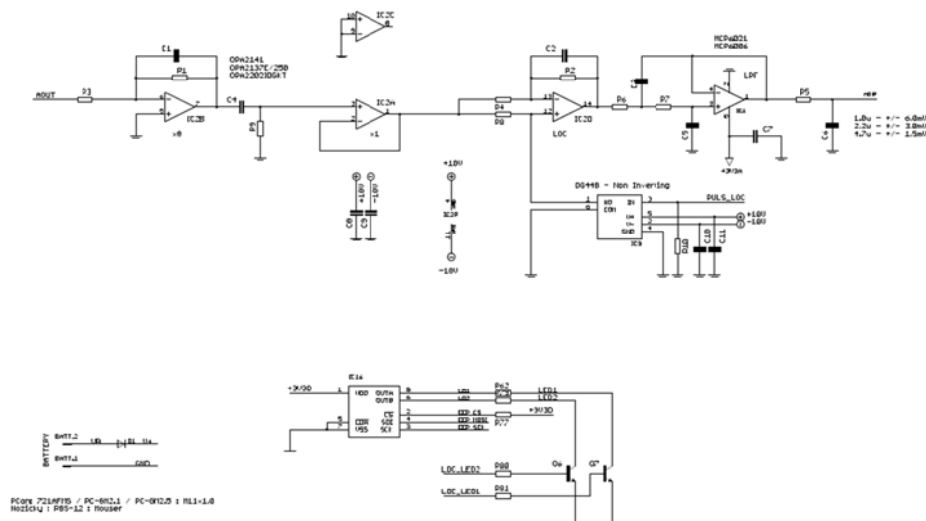


Obrázek 2: Blokové schéma systému pro kolorimetrickou LAMP metodu zahrnující základní funkční jednotky.



Obrázek 3: Elektrické schéma systému: detail LCD displeje včetně tlačítek.





Obrázek 7: Elektrické schéma systému: tvorba symetrického napájení +/- 10V (PWR).

Popis softwaru

Součástí navrženého zařízení je vyvinut software, který umožňuje ovládání zařízení, sledování průběhu amplifikační reakce a záznam výsledků. Software zahrnuje pět základních oken, z nichž každé má specifickou funkci:

1. Uvítací okno

Okno poskytuje základní informace o softwaru, včetně čísla jeho aktuální verze, které může být v případě doplnění speciálních požadavků změněno (obrázek 8 A).

2. Manual control

Okno umožňuje manuální ovládání klíčových funkcí systému, jako je regulace a kontrola nastavené teploty reakce, nastavení snímaných pozic a regulace jasu LED diod (obrázek 8 B).

3. Protocol control

V tomto okně lze definovat podmínky reakce pro jednotlivé fáze amplifikace a vytvářet protokoly. Tyto protokoly je možné uložit a následně opakovaně používat (obrázek 8 C).

4. Data

Okno slouží ke kalibraci pozic, nastavení pozadí reakce a sledování hodnot zaznamenaných detektorem během reakce pro jednotlivé pozice (obrázek 8 D).

5. Data chart

Toto okno umožňuje sledovat RT-LAMP amplifikaci v reálném čase prostřednictvím křivky, vytvořené na základě hodnot zaznamenaných detektorem. Amplifikační křivky mohou být zkopírovány nebo uloženy, případně mohou být uložena pouze raw data a křivka může být vytvořena pomocí externího nástroje (obrázek 8 E).



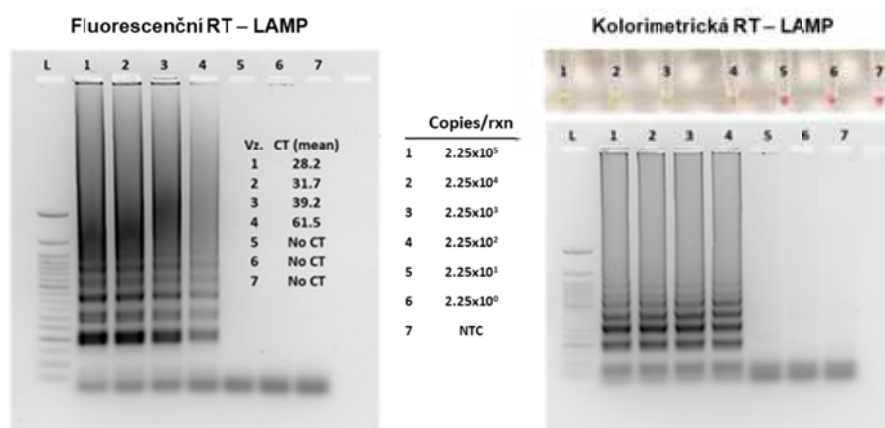
Obrázek 8: Software zařízení pro kolorimetrickou LAMP reakci.

3. VÝSLEDKY

Optimalizační výsledky

1. Analýza senzitivity RT-LAMP: fluorescenční vs. kolorimetrická detekce

Cílem tohoto experimentu bylo porovnat senzitivitu RT-LAMP amplifikace při fluorescenční a kolorimetrické detekci. Pro experiment byla použita uměle syntetizovaná RNA. Fluorescenční detekce byla provedena za použití komerčně dostupného kitu WarmStart LAMP Kit (DNA & RNA) od společnosti New England Biolabs. Pro kolorimetrickou detekci byl použit WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix (DNA & RNA) od stejného výrobce. V případě, že by fluorescenční detekce vykazovala vyšší senzitivitu, bylo by nutné zařízení uzpůsobit pro tento typ detekce. Limit detekce ($2,25 \times 10^2$ kopií/reakce) byl pro obě metody shodný.



Obrázek 9: Porovnání RT-LAMP reakce s fluorescenční a kolorimetrickou detekcí.

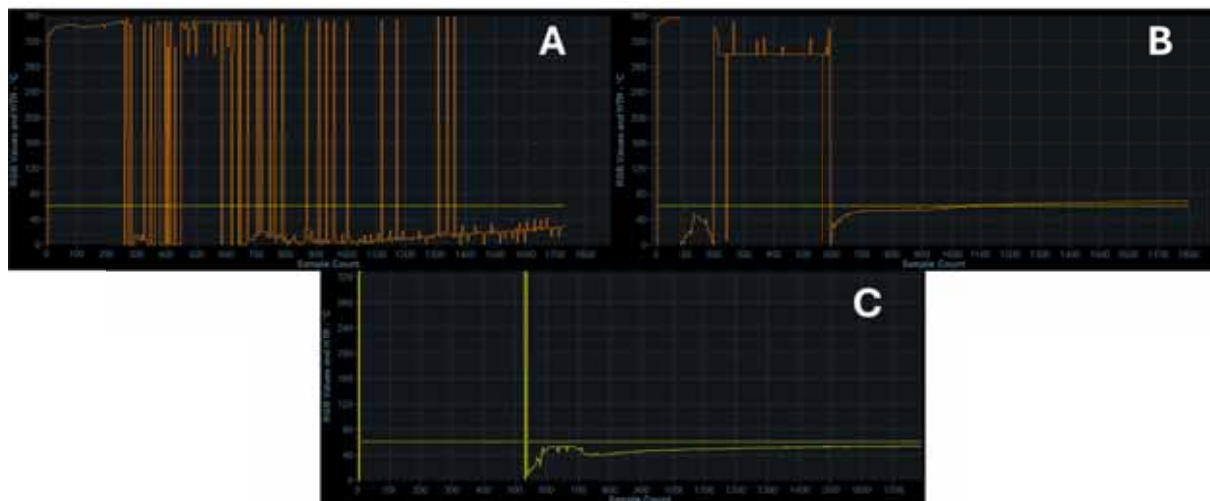
2. Testování zařízení pomocí kalibračních barev

V první fázi testování byly provedeny experimenty s různými kalibračními barvami, které byly detekčním systémem snímány, zaznamenány a následně vyhodnoceny. Systém prokázal schopnost rozlišit jednotlivé barvy s vysokou přesností a citlivostí. Tato vlastnost představuje významnou výhodu pro budoucí aplikace, zejména v možnosti provádět RT-LAMP reakce s využitím různých barviv.

3. Testování různých typů reakčních zkumavek

V tomto testu byly použity různé plastové zkumavky s cílem vybrat nejvhodnější materiál pro vyhodnocení cLAMP reakce pomocí vyvinutého zařízení. Testování zahrnovalo dva typy PCR zkumavek, které byly deklarovány jako opticky čiré: zkumavky s plochým víčkem a zkumavky s vydutým víčkem. Dále byl testován jeden typ PCR stripů určených pro RT-PCR reakce. Výsledky ukázaly, že nejvíce kompatibilní variantou jsou PCR stripy s ultra transparentními víčky. Tyto stripy poskytovaly konzistentní rychlost vyzařování světla a stabilní data ve

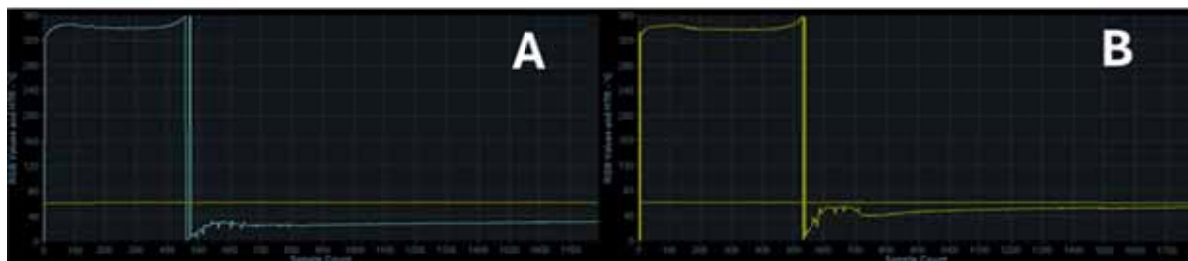
srovnání s testovanými zkumavkami (obrázek 10 C). Naopak, zkumavky s vydutým víčkem (obrázek 10 A) a zkumavky s plochým víčkem (obrázek 10 B) se ukázaly jako nevhodné pro kolorimetrickou RT-LAMP reakci v kombinaci s vyvinutým systémem.



Obrázek 10: Testování RT-LAMP reakce s různými typy reakčních zkumavek.

4. Testování různé velikosti PCR stripů

Na základě předchozího testování byly jako nejvhodnější varianta pro RT-LAMP reakce vybrány PCR stripy od společnosti ELISABETH PHARMACON, spol. s r.o. V další fázi experimentů bylo provedeno testování těchto PCR stripů s různými objemy. Standardně se pro RT-PCR reakce používají mikrozkušavky o objemu 0,2 ml. Cílem vyvinutého zařízení je zvládnout detekovat amplikony v průběhu reakce z velmi malého objemu reakční směsi za účelem snížení nákladů na reakční směs. Tím se otevírá i možnost využití mikrozkušavek s menším objemem. V rámci testování byly porovnávány PCR stripy s objemem 0,2 ml a 0,1 ml, přičemž hlavním cílem bylo zjistit, zda menší plocha víčka, větší vzdálenost zkumavek od LED systému a změna úhlu ovlivní průběh a vyhodnocení kolorimetrické reakce. Získané výsledky ukázaly, že nebyly pozorovány žádné rozdíly v průběhu a vyhodnocení RT-LAMP reakce, která byla provedena ve stripech s objemem 0,1 ml (obrázek 11 A) a 0,2 ml (obrázek 11 B). Na základě těchto výsledků lze uvažovat o přizpůsobení objemu reakční zkumavky v závislosti na požadovaném objemu reakčního mixu, což přispívá k větší flexibilitě a úspoře nákladů.



Obrázek 11: Testování RT-LAMP reakce s různými velikostmi PCR stripů.

Testování funkčního vzorku

1. Testování zařízení s reálnými vzorky

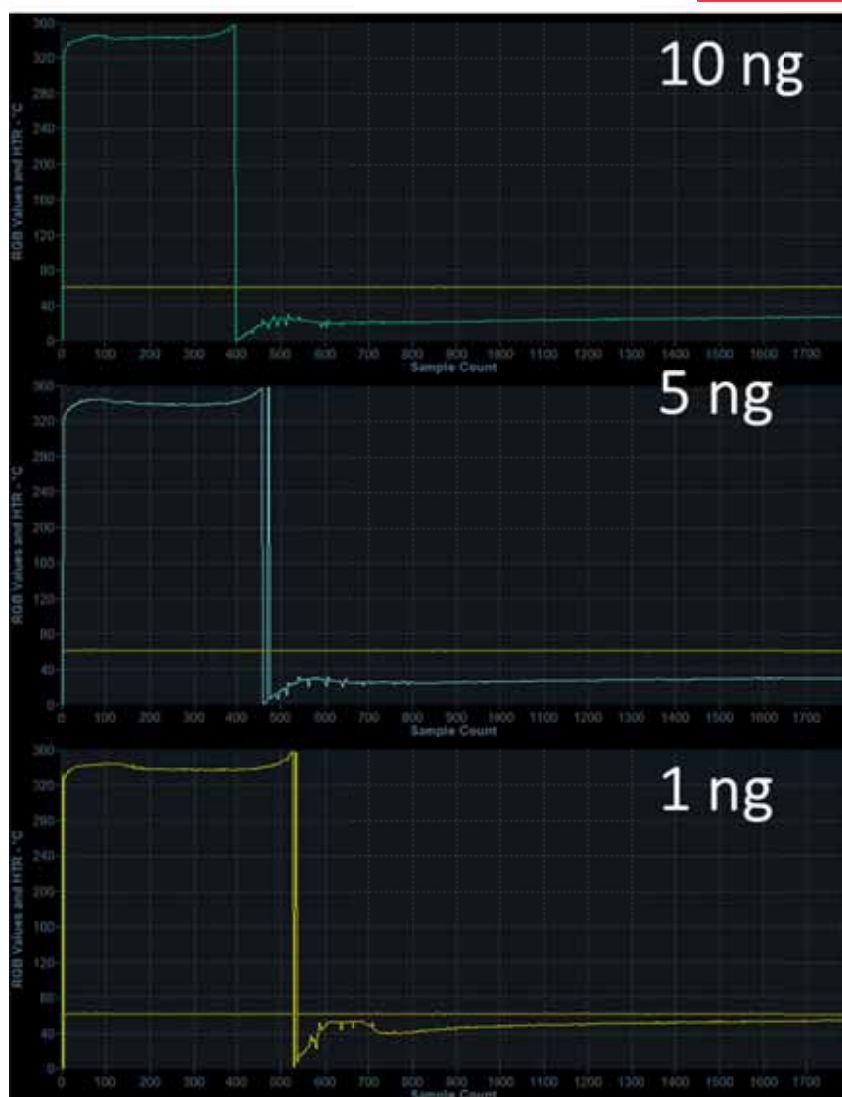
Poslední fází vývoje bylo ověření funkčního vzorku zařízení pomocí reálných vzorků DNA, které probíhalo až do konce roku 2024. V rámci této fáze bylo provedeno více než 500 testů s identickým protokolem. Tyto testy byly simultánně realizovány na prototypu zařízení i na komerčním systému, což umožnilo přímé srovnání výsledků. Pro testování byl použit LAMP master mix od společnosti Biovendor – Laboratorní medicína a.s., konkrétně cLAMP Lyo-Master Mix s lyofilizovanými komponenty. Jako templát byla využita plazmidová DNA o specifické koncentraci, která byla rovněž dodána firmou Biovendor – Laboratorní medicína a.s. Tato DNA slouží jako standard pro interní testování. Na obrázku 12 je znázorněn rozdíl v amplifikaci mezi vzorkem obsahujícím templátovou DNA a vzorkem bez přítomnosti cílové DNA.



Obrázek 12: Testování zařízení s reálnými vzorky.

2. RT-LAMP reakce s různou koncentrací templátové DNA

Zařízení by mělo být dostatečně citlivé, aby dokázalo rozlišit různé koncentrace templátové DNA v reakci. To by umožnilo nejen provádět kvalitativní analýzu, tedy rozhodnutí, zda je vzorek infikován či nikoliv, ale také kvantitativní analýzu, která určí množství DNA ve vzorku. Na obrázku 13 je znázorněna amplifikační křivka pro tři různé koncentrace templátové DNA. Výsledky ukazují, že zařízení vykazuje vysokou citlivost. Díky tomu je možné nejen detekovat přítomnost patogenu, ale také přesně stanovit množství jeho DNA, které se ve vzorku nachází.



Obrázek 13: Testování citlivosti zařízení s různými koncentracemi templátové DNA.

3. Možnosti interpretace výsledků

Kolorimetrická LAMP amplifikace se často vyhodnocuje až po ukončení reakce, kdy vizuální změna barvy indikuje výsledek. V posledních letech se však na trhu objevily miniaturizované komerční systémy, které umožňují sledovat změnu barvy v reálném čase na základě amplifikační křivky. Tento způsob interpretace výsledků je pro vědecké pracovníky nebo zaškolený personál zcela přehledný a jasný. Pro běžného uživatele však může být tento typ interpretace méně intuitivní. Proto jsme kladli důraz na co nejjednodušší a uživatelsky přívětivou prezentaci výsledků. Reakci lze sledovat několika způsoby v reálném čase i po skončení reakce. První možností je vytvoření amplifikační křivky z hodnot zaznamenaných detektorem, která znázorňuje průběh amplifikace (obrázek 14 A) nebo grafické znázornění barevné změny od začátku do konce analýzy (obrázek 14 B). Tyto přístupy zajišťují, že výsledky jsou snadno srozumitelné nejen pro odborníky, ale i pro uživatele bez odborného zaškolení.



Obrázek 14: Možnosti interpretace výsledků.

Využitelnost zařízení

Popisované zařízení nachází využití pro POC testování v humánní i veterinární medicíně. Jeho hlavním cílem je zajistit přesnou, rychlou a dostupnou identifikaci mikroorganismů způsobujících infekční onemocnění. Tato schopnost je klíčová pro efektivní léčbu, prevenci šíření nemocí a správné rozhodování v krizových situacích, například během epidemií. Zařízení se vyznačuje kompaktními rozměry, intuitivním a uživatelsky přívětivým softwarem, a širokými možnostmi univerzálního použití. Díky své jednoduchosti a absenci nutnosti specializovaného vybavení se jeví jako slibný nástroj pro diagnostiku v terénních podmínkách nebo v rozvojových zemích s omezenou infrastrukturou. Kromě medicínských aplikací může zařízení nalézt uplatnění i v dalších oblastech, například v zemědělství nebo při řešení ekologických otázek, jako je hodnocení environmentálního znečištění.

4. FOTODOKUMENTACE



Obrázek 15: Prototyp POCT zařízení z předního a zadního pohledu.



Obrázek 16: Prototyp POCT zařízení, pohled z boční strany.



Obrázek 17: Pohled na osm jamek prototypu pro analýzu osmi vzorků současně.