

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM 4

Metodika nekultivační analýzy mikroflóry sýrů, solných lázní a nálevů s využitím denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE)

Autoři:

Doc. RNDr. Alena Španová, CSc., Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (40 %)

Doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc., Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (40 %)

Ing. Irena Němečková, Ph.D, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. (20 %)

Certifikovaná metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu QJ1210300 v programu KUS s finanční podporou NAZV MZe ČR.

I. Cíl metodiky

Cílem metodiky je detekovat nežádoucí mikroorganismy (patogenní mikroorganismy, mikroorganismy způsobující kažení) i žádoucí mikroorganismy (např. probiotika) přítomné v sýrech, solných lázních a nálevech, a to zejména v případech, kdy klasické kultivační postupy jsou nedostačující. Jedná se především o detekci mikroorganismů, pro které nejsou k dispozici dostatečně selektivní metody pro izolaci, detekci a následnou identifikaci neznámých původců kažení, detekci patogenních mikroorganismů přítomných v nízkých koncentracích, detekci subletálně poškozených nebo z jiného důvodu nekultivovatelných mikroorganismů, apod. Metodika je založena na využití denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) s následnou identifikací pomocí molekulárně biologických metod.

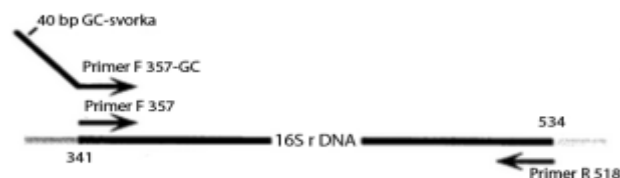
II. Vlastní popis metodiky

II.1. Princip metody

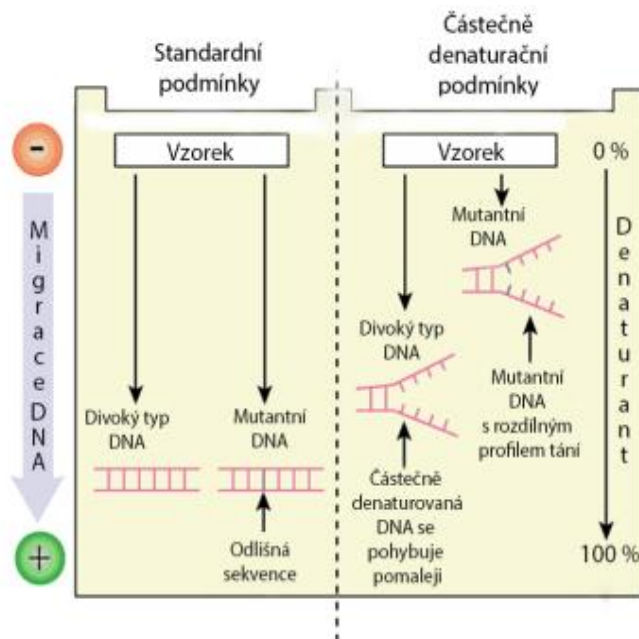
Moderní molekulárně biologické metody nacházejí uplatnění při identifikaci původců vad mlékárenských výrobků (Jebavá a spol. 2013, Šviráková a spol. 2014,2015).

Analýze pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) předchází izolace a amplifikace směsné bakteriální DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s jedním primerem s GC svorkou. Pro amplifikaci se obvykle využívají primery, které ohraničují gen kódující 16s rRNA (Obr. 1), který obsahují všechny bakterie. Výsledkem jsou produkty PCR (amplikony) stejné délky ale různé sekvence. Samotná analýza pomocí DGGE metody je založena na elektroforetické mobilitě produktů PCR v polyakrylamidovém gelu za podmínek, kdy mobilita není závislá na velikosti produktu PCR ale na jeho sekvenci. PCR produkty jsou postupně denaturovány pomocí lineárního gradientu denaturačních činidel (formaldehyd, močovina). Na 5' konci primeru je přisyntetizována GC svorka (čtyřicetinukleotidový úsek obsahující GC sekvence), která brání úplné denaturaci produktů PCR (ds DNA). Mobilita denaturovaných amplikonů je značně omezena. Nejdříve denaturují produkty PCR, které jsou bohaté na AT páry, v místě s vyšší koncentrací denaturujících látek denaturují produkty PCR bohatší na GC páry. Díky tomu mohou být rozděleny a detekovány jako diskrétní pásy stejně velké amplikony s různorodou sekvencí. DGGE je vysoce senzitivní metoda pro detekci změn i v jedné nukleotidové sekvenci (Muyzer a kol. 1993, Fasoli a kol. 2003, Leite a kol. 2012). Srovnání průběhu migrace produktů PCR s různou sekvencí nukleotidů za podmínek konvenční gelové elektroforézy a denaturační gradientové elektroforézy produktů PCR (ds DNA) je zobrazeno na Obr. 2.

Poté se jednotlivé pásy z gelu vyříznou, eluuje se z nich DNA, která se reamplifikuje a osekvenuje. Porovnáním se sekvencemi uloženými v databázích se provede identifikace neznámých druhů bakterií. Alternativně lze identifikaci provést rovněž srovnáním polohy pásů s kontrolními kmeny. Tento jednodušší, rychlejší a levnější postup se uplatní zejména při analýze cílené na známé bakteriální druhy.



Obr. 1: Schématický diagram úseku rDNA amplifikovaného pomocí PCR, upraveno dle práce Muyzer a kol. (1993)



Obr. 2: Srovnání průběhu migrace produktů PCR s různou sekvencí nukleotidů za podmínek konvenční gelové elektroforézy a denaturační gradientové elektroforézy, upraveno dle práce Muzer a kol. (1993)

Metodika se sestává z následujících kroků:

1. příprava vzorků sýrů a solných nálevů pro analýzu,
2. lyze buněk a izolace DNA v kvalitě vhodné pro PCR,
3. amplifikace DNA s párem primerů (jeden primer s GC svorkou),
4. rozdělení produktů PCR pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy,
5. vyříznutí a eluce DNA z PCR-DGGE produktů a reamplifikace s primery bez GC svorky,
6. přechistění ampliconů a sekvenování,
7. případně srovnání polohy pásu s pásem ze známého bakteriálního druhu.

II.2. Přístroje, materiál, chemikálie

Přístroje:

centrifuga na Eppendorfovy zkumavky, automatické pipety o objemu 1000, 20-200, 2-20 a 0,5-10 μ l, termostat na 55 $^{\circ}$ C, cykler, zařízení pro konvenční PCR s gelovou elektroforézou pro detekci produktů PCR, zařízení pro denaturační gradientovou elektroforézu včetně zdroje napětí.

Materiál:

Eppendorfovy zkumavky 1,5 ml, špičky modré, žluté, bílé, 0,2 ml zkumavky (pro konvenční PCR), třecí miska, běžné laboratorní sklo na přípravu roztoků.

Chemikálie:

- pro lyzi buněk (20 % SDS, lysozym, proteinasa K (100 µg/ml), 1 M Tris-HCl, pH 7,8; 0,5 M EDTA pH 8,0),
- pro izolaci DNA a pro srážení DNA (fenol, směs chloroform-isoamylalkohol (24:1), 3 M octan sodný, 96% ethanol, TE pufr (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 1 mM EDTA, pH 8,0),
- komponenty pro PCR (PCR pufr, Taq DNA polymerasa s 3'-5' exonukleasovou aktivitou, dNTP, primery),
- pro konvenční agarózovou gelovou elektroforézu (agarosa, kys. boritá, Tris-base, EDTA, TBE pufr (45 mM kyselina boritá, 45 mM Tris-base, 1 mM EDTA, pH 8,0, velikostní standard DNA),
- pro denaturační gradientovou gelovou elektroforézu (TAE pufr (20 mM Tris-acetát, pH 7,4; 0,5 mM EDTA, pH 8,0; 10 mM octan sodný), persíran amonný 0,05%, TEMED 0,05%, 8% akrylamid/bisakrylamid (37,5:1), 7 M močovina, 40% formamid.

II.3. Postup práce

II.3.1. Příprava vzorků pro analýzu

a) sýry

Vzorky sýrů pro analýzu lze zpracovat s využitím třecí misky nebo Stomacheru.

Zpracování sýrů s použitím třecí misky: 5g sýra se rozetře ve sterilní třecí misce s 12,5 ml sterilní destilované vody, vzniklá suspenze se přefiltruje přes sterilní gázu. Následně se buňky ve 3 ml filtrátu sedimentují odstředěním při 10 000 g po dobu 3 minut a pak se promyjí 1 ml sterilní destilované vody a opět sedimentují. Tím jsou buňky připraveny pro lyzi.

Zpracování sýrů s použitím Stomacheru: 5 g sýru se vloží do homogenizačního sáčku s membránou BagFilter a přidá se 12,5 ml sterilní destilované vody. Homogenizace ve Stomacheru trvá 15 minut. Následně buňky ve 3 ml homogenizátu sedimentují odstředěním při 10 000 g po dobu 3 minut a pak se promyjí 1 ml sterilní destilované vody a opět sedimentují. Tím jsou buňky připraveny pro lyzi.

b) solné lázně a nálevy

Ze vzorků solných lázní a nálevů se odebere po 3 ml vzorku, které se odstředí při 10 000 g po dobu 3 minut. Jestliže je množství sedimentovaných buněk nedostačující (sediment není viditelný), je možné k získané peletě přidat další 3 ml vzorku a odstředění zopakovat. Pak se sediment buněk promyje 1 ml sterilní destilované vody a buňky se opět sedimentují. Tím jsou buňky připraveny k lyzi.

c) kontrolní kmeny

Kontrolní kmeny se přes noc pomnoží v bujónu a za podmínek vhodných pro daný bakteriální druh. Poté se odeberou 3 ml kultury, které se odstředí při 10 000 g po dobu 3 minut. Získaný sediment buněk se promyje 1 ml sterilní destilované vody. Tím jsou buňky připraveny k lyzi.

II.3.2. Lyze buněk a izolace DNA v kvalitě pro PCR

Sedimenty buněk ze vzorků se resuspendují v 1 ml čerstvě připraveného lyzačního roztoku s lysozymem (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 15 mM EDTA, pH 8,0; lysozym 10 mg/ml). Vzniklá suspenze se inkubuje 60 minut při laboratorní teplotě. K suspenzi se pak přidá 75 μ l 20% SDS, 10 μ l proteinasy K (100 μ g/ml) a směs se inkubuje při 55 °C po dobu 18 hodin.

Z takto připravených lyzátů buněk se izoluje DNA, např. fenolovou extrakcí, pomocí komerčního kitu nebo magnetických mikročastic (Rittich a kol. 2006, 2009). Pro komplexní vzorky sýrů je vhodná izolace DNA pomocí magnetických mikročastic dle Metodiky SVS/2015/135589-G (Španová a kol., 2015). Koncentrace DNA rozpuštěné v TE pufru se stanoví spektrofotometricky z hodnoty absorbance při 260 nm (Sinden 1994).

II.3.3. Amplifikace DNA s primery s GC svorkou

Amplifikovat lze DNA izolovanou ze vzorků, která je zředěna v TE pufru na koncentraci 100 ng/ μ l. Pro amplifikaci se použijí primery, z nichž jeden je s GC svorkou (F357GC, R518) (Muyzer a kol. 1993, Liu a kol. 2012). Sekvence primerů je uvedena v Tabulce 1. Složení směsi pro PCR je uvedeno v Tab. 2. Směs pro PCR obsahuje LA polymerasu s 3'-5' exonukleasovou aktivitou. Podmínky amplifikace jsou uvedeny v Tab. 3.

Velikost produktů PCR se ověří pomocí agarosové gelové elektroforézy. Společně s amplikony se na gel nanese DNA standard (100 bp žebříček) (Obr. 3).

Tab. 1: Primery, jejich sekvence a velikost produktu PCR (Muyzer a kol. 1993, Liu a kol. 2012)

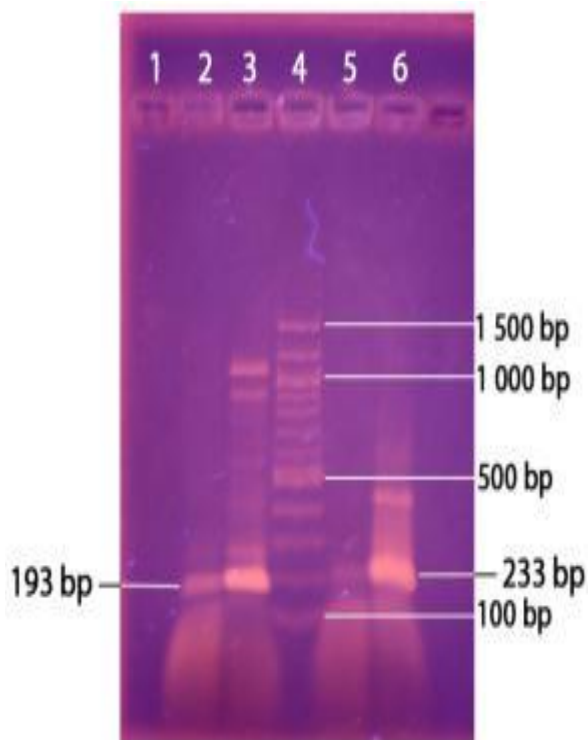
Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu [bp]
F357	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG- 3'	193
R518	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG- 3'	
F357-GC	5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGG GGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG- 3'	233
R518	5'-ATTACCGCGGCTGCTGG- 3'	

Tab. 2: Složení směsi pro PCR

Komponenta	Objem [μ l]
Voda pro PCR	26
LA pufr 10x kompletní	5
dNTP (10 mM)	3
F primer 357GC (10 pmol/ μ l)	2
R primer 518 (10 pmol/ μ l)	2
DMSO enhancer	2
MgCl ₂	8
LA polymerasa (5 U/ μ l)	1
DNA (100 ng/ μ l)	1

Tab. 3: Program amplifikace

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]	Počet cyklů
Startovací krok	95	300	1
Denaturace DNA	95	60	
Hybridizace primerů	50	45	30
Syntéza DNA	72	60	
Poslední krok	72	600	1



Obr. 3: Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR. Amplifikována byla DNA *L. fermentum* (100 ng/μl) s primerem F357a R518 (193 bp) (běhy č. 2 a 3) a F357GC a R518 (233 bp) (běhy č. 5 a 6).

Velikost produktů PCR s primery F357GC s GC svorkou a R518 je 233 bp, velikost reamplifikovaných produktů PCR s primery F357 bez GC svorky a R518 je 193 bp.

II.3.4. Rozdělení produktů PCR pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy

Pro elektroforézu se používá polyakrylamidový gel s postupně se zvyšující koncentrací denaturujících látek. Produkty PCR amplifikované pomocí primerů s GC svorkou se analyzují pomocí DGGE s využitím 40-60% denaturačního gradientu v 0,8mm 8% polyakrylamidovém gelu v 0,5x TAE pufru. Denaturační gradient byl vytvořen smícháním 8% roztoku akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid 37,5:1), který obsahoval močovinu a formamid (100% denaturant odpovídá 7M močovině a 40% formamidu). Gradient se zvyšuje ve směru běhu elektroforézy.

Na gel se nanese 5 μl produktu PCR. DGGE probíhá nejprve 10 minut při napětí 125 V a potom po dobu 20 hodin při napětí 75 V při teplotě 60 °C. Po ukončení elektroforézy se gel barví v roztoku ethidium bromidu (0,5 μg/ml) po dobu 1 hodiny. Gel se dokumentuje fotograficky.

II.3.5. Zpracování PCR-DGGE produktů (vyříznutí pásů z gelu, eluce DNA do TE pufu)

Pásy s rozdělenými produkty PCR (PCR-DGGE produkty) se očíslovají, vyříznou z gelu pomocí skalpelu, umístí do zkumavek s 50 μ l TE pufu a eluují v chladničce při 4 – 8 °C po dobu 18 – 20 hodin. Eluovaná DNA se reamplifikuje s primery bez GC svorky (F357, R518, Tab. 1). Směs pro PCR se připraví dle Tab. 2, amplifikace probíhá za podmínek uvedených v Tab. 3. Velikost produktů reamplifikace se ověří pomocí gelové elektroforézy na agarose (Obr. 3).

II.3.6. Přečištění ampliconů a sekvenování

Reamplifikované produkty se přečistí pomocí vhodného kitu nebo srážením ethanolem. Při srážení ethanolem se k produktům PCR (50 μ l) přidá 2,5 μ l 3 M octanu sodného, 125 μ l 96% ethanolu a amplicony se sráží při -20 °C po dobu 1 hodiny. DNA (produkt PCR) se sedimentuje centrifugací při 10 000 g po dobu 15 minut. Sediment se propláchně 70% ethanolem, znovu centrifuguje, usuší a rozpustí v 50 μ l TE pufu.

Takto přečištěné produkty jsou připraveny pro sekvenování. Sekvenování probíhá buď přímo v laboratoři dle zavedeného postupu, nebo lze využít služeb některé z laboratoří, které tuto službu nabízejí. Porovnáním získaných sekvencí s databázemi se bakteriální DNA identifikuje.

II.3.7. Srovnání polohy pásu s pásem ze známého bakteriálního druhu

V případě, kdy je ve vzorcích prokazována přítomnost konkrétních, předem známých, druhů bakterií, lze v bodě II.3.4. na gel spolu s produkty PCR získanými amplifikací DNA ze vzorků nanést i produkty PCR získané amplifikací DNA izolované z kontrolních referenčních kmenů. Průkaz přítomnosti těchto druhů bakterií ve vzorcích pak probíhá na základě shody v poloze jednotlivých pásů pro vzorky a pro referenční kmeny. Postup dle bodů II.3.5. a II.3.6. je pak možné vynechat.

III. Srovnání novosti postupů a jejich zdůvodnění

Metodika je zaměřena na detekci technologicky nebo zdravotně rizikových mikroorganismů v sýrech, solných lázních a nálevech, pro které byla optimalizována. V principu je její použití možné rozšířit i na další typy komplexních potravinářských vzorků za předpokladu, že na těchto vzorcích bude předem vyzkoušena. Rovněž lze metodiku využít

při průkazu přítomnosti žádoucích bakterií, např. probiotik, ve vzorcích se směsnou kulturní mikroflórou metabolicky a fyziologicky příbuzných druhů bakterií mléčného kvašení.

Metodika byla navržena tak, aby s její pomocí bylo možné zachytit i méně obvyklé či obtížně kultivovatelné druhy bakterií. Z tohoto důvodu je metoda vhodná k detekci mikroorganismů, pro něž klasické kultivační analýzy nedostačují např. proto, že není k dispozici dostatečně selektivní metoda identifikace, není předem známo ani rámcové systematické zařazení detekovaných bakterií, detekované bakterie jsou přítomny ve velmi nízké koncentraci nebo jsou subletálně poškozené či z jiného důvodu obtížně kultivovatelné.

Tato metodika byla v rámci procesu optimalizace aplikována na sýry, ve kterých byla hledána příčina kažení (vydutý obal, hnilobný zápach či zápach po kyselině máselné, zákal nálevu). Mezi výsledky klasické kultivační mikrobiologické analýzy vzorků bez vady a vzorků s vadou nebyly shledány systematické rozdíly. Naproti tomu pomocí této metodiky bylo zjištěno, že původcem vad byly pravděpodobně bakterie rodu *Halanaerobium*. Jedná se o bakterie, které nejsou běžnými původci kažení a nejsou kultivovatelné za podmínek metod běžně používaných v laboratořích zabývajících se potravinářskou mikrobiologií. Díky aplikaci navržené metody se podařilo identifikovat a ve spolupráci s výrobcem sýrů i odstranit příčinu kažení.

Metoda DGGE se využívá pro analýzu vzorků, které obsahují neznámé mikroorganismy a u nichž lze předpokládat přítomnost mikroorganismů, jejichž podmínky laboratorní kultivace nejsou známy. Metoda se dá použít k profilování komplexních mikrobiálních populací (Muyzer a kol. 1992), včetně profilování bakteriálních populací v potravinách (Cocolin a kol. 2007, Leite a kol. 2012, Liu a kol. 2012). Pro komplexní analýzu sýrů, solných lázní a nálevů, jak popisuje metodika QJ1210300 CM 4, nebyla metoda DGGE dosud optimalizována.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika QJ1210300 CM 4 pro nekultivační analýzu mikroflóry v sýrech, solných lázních a nálevách pomocí DGGE bude uplatněna u uživatele Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. Jedná se o pracoviště, které metodiku využije při výzkumu komplexní mikroflóry potravinářských vzorků, především sýrů a vzorků živočišného původu. Metodika QJ1210300 CM 4 je využitelná v laboratořích zabývajících se kontrolou potravin z hlediska mikrobiologické bezpečnosti, plnění legislativních parametrů, odhalování příčin kažení a dalších aplikací, které jsou vybaveny potřebným zařízením pro PCR a DGGE metody.

V. Ekonomické aspekty

Výhodou metodiky QJ1210300 CM 4 je, že metodika umožňuje detekovat i tzv. nekultivovatelné bakterie nebo bakterie, pro jejichž kultivaci dosud nejsou známy dostatečně selektivní metody. Tím se rozšiřuje spektrum parametrů, které mohou být hodnoceny, ať už pro interní potřebu dané laboratoře nebo formou poskytnutých služeb. Metodika může být použita i pro detekci běžných mikrobiálních kontaminantů či bakteriálních kultur použitých při výrobě. Je tedy univerzálně využitelná na všechny vzorky sýrů, solných lázní či nálevů a popř. i další potraviny. V úvahu je však nutné vzít, že se jedná o metodu kvalitativní, nikoliv kvantitativní.

Pro laboratoře, které jsou vybaveny zařízením pro provádění PCR a pro provádění DGGE je navrhovaný postup analýzy DNA relativně levný. Vyžaduje běžné chemikálie používané pro práci s DNA a běžný umělohmotný materiál. Pro izolaci DNA a čištění produktů PCR mohou být použity komerčně dostupné kity, čímž se ale náklady na analýzu poněkud prodraží.

Celkové náklady na materiál potřebný ke zpracování 1 vzorku bez kitů (1 izolace DNA, amplifikace, DGGE) lze odhadnout na řádově asi 100 Kč. Při započítání nákladů na přístroje, osobní a režijní náklady se náklady na zpracování vzorku včetně ověření kvality DNA v PCR pohybují kolem 300 Kč. Čas potřebný k provedení analýzy se zkrátí, neboť lze současně na 1 gelu analyzovat větší počet vzorků. Se započtením nákladů potřebných na sekvenování produktu PCR se náklady na zpracování 1 vzorku zvýší na asi 400 Kč. Při analýze asi 100 vzorků ročně budou celkové náklady 40 tis. Kč. Vzhledem k tomu, že se pracuje v malých objemech, jsou náklady na analýzu nižší než u klasických kultivačních metod. Zavedením výše uvedené metodiky se rozšíří spektrum prováděných analýz a poskytovaných služeb. Jestliže bude formou služeb analyzováno odhadem 100 vzorků ročně, jsou roční tržby odhadovány na 50 tis. Kč, což přinese zisk cca 10 tis. Kč. Za 5 let to činí tržby odhadem 250 tis. Kč a zisk odhadem 50 tis. Kč.

VI. Seznam použité literatury

- Sinden, R. R. (1994): DNA Structure and Function, Academic Press, San Diego. ISBN 9780126457506.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59 (3): 695-700.
- Cocolin, L., Diez, A., Urso, R., Mantisou, K., Comi, G., Bergmeier, I., Beimfohr, C. (2007): Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. Int. J. Food Microbiol. 120: 100-109.

- Leite, A.M.O., Mayo, B., Rachid, C.T.C.C., Peixoto, R.S., Silva, J.T., Paschoalin, V.M.F., Delgado, S. (2012): Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiol.* 31: 215-221.
- Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F., Torriani, S. (2003): Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* 82 (1): 59-70.
- Liu, W., Bao, Q. (2012): Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbial. Res.* 167: 100-115.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Španová, A., Rittich, B., Němečková, I. (2015): Metodika izolace DNA v kvalitě pro PCR z komplexních vzorků pomocí magnetických mikročastic. Uplatněno v Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i., 6. 11. 2015. Osvědčení SVS č. SVS/2015/135589-G ze dne 10. 12. 2015 (NAZV KUS QJ1210300).
- Čakajdová, M., Trachtová, Š., Mohelský, T., Němečková, I., Španová, A., Rittich, B. (2014): Identifikácia baktérií v solných nálevoch nezrejúcich syrov pomocou denaturačnej gradientovej gélovej elektroforézy. *Mlékařské listy – Zpravodaj* 147: XLIX-L (NAZV KUS QJ1210300, interní grant FCH-S-14-2325).
- Jebavá, I., Purkrťová, S., Hanušová, J., Savická, D., Šviráková, E., Němečková, I., Demnerová, K. (2013): Identifikace mikrobiálních původců vad mlékařenských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 138: X-XIV (NAZV KUS QJ1210300).
- Šviráková, E., Mühlhansová, A., Němečková, I., Junková, P., Purkrťová, S., Jelínková, M., Felsberg, J. (2015): Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 150: XIV-XX (NAZV KUS QJ1210300).
- Šviráková, E., Mühlhansová, A., Junková, P., Purkrťová, S., Jelínková, M., Felsberg, J. (2015): Identification of *Acinetobacter* spp. isolated from dairy products and production facility using sequencing and MALDI-TOF MS. Poster. IDF World Dairy Summit. 20. - 24. 9. 2015, Vilnius, Litva (NAZV KUS QJ1210300).
- Šviráková, E., Hanušová, J., Mühlhansová, A., Jebavá, I., Purkrťová, S. (2014): Identifikace *Bacillus* sp. izolovaných z mlékařenských výrobků a výrobního zařízení pomocí PCR a MALDI TOF MS. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 146: XXV-XXVIII (NAZV KUS QJ1210300).

- Šviráková, E., Chramostová, J., Mühlhansová, A., Purkrtová, S., Jebavá, I., Němečková, I. (2014): Technologicky rizikové mikroorganismy v bílých sýrech a solných nálevech. Poster. V: Sborník „Celostátní přehlídka sýrů 2014, Výsledky přehlídek a sborník přednášek konference Mléko a sýry“, str. 139-144, Praha, 23. - 24. 1. 2014. ISBN 978-80-7080-838-2 (NAZV KUS QJ1210300).
- Jebavá, I., Purkrtová, S., Hanušová, J., Savická, D., Šviráková, E., Němečková, I., Demnerová, K. (2013): Identifikace mikrobiálních původců vad mlékárenských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. Mlékařské listy – Zpravodaj 138: X-XIV (NAZV KUS QJ1210300).
- Rittich, B., Španová, A., Horák, D., Beneš, M.J., Klesnilová, L., Petrová, K., Rybníkář, A. (2006): Isolation of microbial DNA by newly designed magnetic particles. Colloid Surf B-Interfaces 52: 143-148. (GAČR 203/05/2256, NAZV 1G57037, MŠM 0021622415).
- Rittich, B., Španová, A., Šálek, P., Němcová, P., Trachtová, Š., Horák, D. (2009): Separation of PCR-ready DNA from dairy products using magnetic hydrophilic microspheres and poly(ethylene glykol)-NaCl water solutions. J. Magn. Mater. 321: 1667-1670. (NAZV 1G57037, NAZV 1G58097, MŠM 0021622415).

VIII. Přílohy, dokumenty a doklady

- Smlouva s uživatelem - Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.
- Posudek odborníka v daném oboru – Mgr. Marta Dušková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
- Posudek ze státní správy - MVDr. Jiří Hlaváček, Státní veterinární správa ČR
- Osvědčení odborného orgánu státní správy - Státní veterinární správa ČR

V Praze dne.....

Za zhotovitele: Ing. Irena Němečková, Ph.D.

.....

Certifikovaná metodika QJ1210300 CM 4 vznikla s finanční podporou NAZV, č. projektu QJ1210300 v programu KUS.