



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Certifikovaná metodika určená pro kvantifikaci probiotik v doplňcích stravy pomocí qPCR

Autoři:

Mgr. Petr Králík, Ph.D.

Mgr. Radka Dziedzinská, Ph.D.

Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, FVHE, Veterinární
univerzita, Brno

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK22020101 „Multiplexní detekce DNA
probiotických bakterií a kvasinek v doplňcích stravy pomocí technologií xMAP a qPCR“.

Osvědčení o uplatnění certifikované metodiky č. 21/2024

ISBN 978-80-7305-969-9

2024

Oponenti certifikované metodiky:

prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Mgr. Lenka Bartošová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Státní zemědělská a potravinářská inspekce

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

1	Předmluva	3
2	Cíl metodiky.....	4
3	Vlastní popis metodiky	4
3.1	Úvod.....	4
3.2	Izolace DNA	5
3.3	Provedení qPCR.....	6
3.3.1	Příprava plazmidových kvantifikačních standardů	8
3.3.2	Analýza a intepretace výsledků	8
4	Srovnání „novosti postupů“	9
5	Popis uplatnění metodiky.....	9
6	Ekonomické aspekty.....	9
7	Seznam použité související literatury	10
8	Seznam publikací, které předcházely metodice	10

1 Předmluva

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství přinášejí hostiteli prokazatelný zdravotní prospěch. Nejčastěji se jedná o bakterie rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, dále *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Escherichia* a kvasinky rodu *Saccharomyces*. Převážná většina probiotických výrobků v České republice není registrována jako léčivé přípravky, ale do oběhu jsou uváděna jako doplňky stravy s obsahem probiotik. Důvodem je především to, že léčiva musí procházet složitou administrativou zahrnující klinické hodnocení a registraci lékovou autoritou. Hlavním účelem registrace je minimalizace předvídatelných rizik spojených s uvedením léčiva na trh. Tato přísná pravidla se na probiotika, jakožto doplňky stravy, nevztahují. Na trhu v České republice je k dispozici široký výběr těchto produktů v různých galenických formách, jako jsou tobolky, tablety, roztoky, pastilky, žvýkácí tablety a želé. Liší se také svým složením, doporučenou denní dávkou a samozřejmě také cenou.

Probiotické kultury mohou být v preparátu přítomny buď samostatně nebo ve směsích. Výrobce doplňků stravy je dle zákona o potravinách a tabákových výrobcích (110/1997) povinen spotřebitele informovat o složení výrobku, o jeho čistotě, doporučené denní dávce a uvést označení produktu pro citlivé skupiny populace. U výrobků s probiotickými kulturami je výrobce povinen uvádět rodové a druhové názvy kultur, údaje o kvantitě živých/aktivních mikroorganismů (u kultivačních metod se uvádí KTJ – kolonie tvořící jednotky).

Kontrola kvality probiotických preparátů je klíčová, přítomnost specifických kmenů v dostatečném množství je rozhodující pro účinnost i bezpečnost výrobku. Jakákoliv odchylka od deklarovaného složení je považována za nežádoucí kontaminaci. Pro každý bakteriální druh musí být uveden jeho správný taxonomický název, označení kmene a informace o jeho množství.

Pro zajištění autentizace těchto výrobků je nezbytné, aby existovaly moderní a vysoce spolehlivé metody umožňující ověřit identitu a případně kvantifikovat množství probiotických kmenů. Tradiční metody využívající mikrobiologické kultivace jsou nedostačující. Různé probiotické kmeny stejného rodu ve stejném výrobku kultivačně neumožňují spolehlivé rozlišení. Biochemická konfirmace vykultivovaných kultur je málo efektivní, proto se k identifikaci stále častěji využívá metoda hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. I tato metoda však má svá omezení, která spočívají zejména v limitovaném spektru komerčně dostupných knihoven, kdy je spolehlivě určen jen rod, ne vždy však druh mikroorganismu. Proto je žádoucí, aby vedle klasických kultivačních metod byla vyvinuta dostupná alternativa detekce a identifikace významných druhů probiotických bakterií a kvasinek přímo v potravinových doplňcích pomocí metod založených na přímém průkazu DNA pomocí metod PCR. Specificky metoda kvantitativní PCR (qPCR) umožní vedle potvrzení druhového zařazení jednotlivých probiotických kmenů také kvantifikaci DNA na základě plazmidového gradientu.

2 Cíl metodiky

Cílem metodiky bylo vytvoření doplňkového postupu pro confirmaci výsledků dosažených pomocí multiplexní metody založené na MOL-PCR a 16S rDNA sekvenování určené pro identifikaci probiotických bakterií v doplňcích stravy (Certifikovaná metodika určená pro komplexní identifikaci složení probiotik v doplňcích stravy pomocí metody MOL-PCR a sekvenování

) a pro jejich kvantifikaci. Doplňkový postup je založen na metodě kvantitativní PCR (qPCR) a zahrnuje následující druhy nejčastěji využívaných probiotických bakterií: *Ligilactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum subsp. infantis*, *Bifidobacterium longum subsp. longum*, *Lactobacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Limosilactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophilus*, *Heyndrickxia coagulans*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus gasseri*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus jensenii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus pyogenes*. Uvedený postup je možné použít komplementárně k MOL-PCR a sekvenování nebo samostatně v závislosti na požadavcích zadavatele nebo provádějící laboratoře.

Všechny tři metody (MOL-PCR, qPCR a 16S rDNA sekvenování) se vzájemně doplňují a představují komplementární nástroje na analýzu probiotických preparátů podle požadavků zadavatele. Oproti MOL-PCR a qPCR, které dokáží přesně identifikovat přítomnost pouze předem vybraných druhů probiotik, umožňuje sekvenování analyzovat probiotický doplněk stravy komplexně a odhalit i přítomnost nedeklarovaných komponent nebo dokonce kontaminant. qPCR oproti tomu umožňuje kvantifikovat množství daného bakteriálního nebo kvasinkového kmene a srovnat dosažené počty s deklarací výrobce.

Metodika zahrnuje postup izolace DNA z probiotických preparátů, samotnou analýzu pomocí qPCR s následnou interpretací dat.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Úvod

Technika polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction, PCR) byla poprvé publikována v roce 1985 a stala se jedním ze základních nástrojů pro studium DNA. Bez tohoto objevu by nebyly

možné revoluční pokroky v biologických a medicínských oborech, které byly dosaženy v posledních 30 letech. Postup PCR v podstatě napodobuje replikaci DNA v živé buňce, ovšem bez využití složitého enzymatického aparátu buňky, který nejsme schopni *in vitro* replikovat. Naopak se využívá jediného faktoru, který jsme schopni v čase kontrolovaně měnit, a to změny teploty. To souvisí s chemickou podstatou DNA, která při teplotách nad 90 °C denaturuje, tedy z dvouřetězcové formy přechází do jednořetězcového stavu, který je nezbytný pro správný průběh replikace DNA. Změnám teplot je přizpůsobena i polymeráza, která provádí samotnou replikaci DNA a která je schopná opakovaně odolat teplotám nad 90 °C.

Při replikaci neboli amplifikaci DNA *in vitro* dochází namnožení pouze vybraného úseku DNA, který je ohraničen pomocí dvou krátkých oligonukleotidů, které se nazývají primery. Celá reakce se odehrává v přísně kontrolovaných podmínkách pufovaného roztoku obsahujícího specifické ionty, které jsou nezbytné pro správné fungování vlastní reakce. PCR se provádí v cyclerech, přístrojích, které jsou schopné rychle měnit teploty a umožňují tak, aby PCR vůbec proběhla. Výsledkem PCR je namnožení vybraného úseku DNA do takového množství, které je vhodné pro další aplikace.

Jednou z nejčastěji používaných modifikací PCR je metoda tzv. kvantitativní nebo real time PCR (qPCR), která je založena na přidání fluorescenční značky do probíhající reakce a její snímání v reálném čase. Tento postup mimo jiné umožňuje kvantifikovat množství DNA v neznámém vzorku na základě srovnání s kalibrační křivkou (Kralik and Ricchi, 2017).

3.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena mírně modifikovaným postupem kitu DNeasy mericon Food Kit (Qiagen).

1. Navážit 2 g obsahu probiotických kapslí nebo prášku
2. Přidat 10 ml Food Lysis Buffer a 25 ul Proteinase K, vortexovat 10 s
3. Inkubovat v termomixeru 60 min při 60 °C za stálého třepání 1000 rpm, poté inkubovat přes noc v termobloku při 60 °C. Pokud nedojde k naprosté lýzi vzorku, případně ráno přidat inkubaci v termomixeru při 60 °C za stálého třepání 1000 rpm.
4. Vzorky ochladit na teplotu 15 – 25 °C
5. Centrifugovat 5 min při 2500 × g
6. Do nové zkumavky napipetovat 500 ul chloroformu a přidat 700 – 800 ul čirého supernatantu získaného v kroku 5.
7. Vortexovat 15 s a centrifugovat 15 min při 14000 × g

8. Do nové zkumavky napipetovat 700 ul Buffer PB a 700 ul horní vodné fáze získané v kroku 7. Vortexovat 10 s, krátce centrifugovat
9. Roztok z kroku 8. přenést na kolonu (max 750 ul), centrifugovat 1 min při 17900 × g, vylít odpad
10. Do kolon přidat 500 ul Buffer AW2, centrifugovat 1 min při 17900 × g, odpad vylít a následně centrifugovat 1 min při 17900 × g, odpad vylít
11. Kolonu vložit do čisté zkumavky, přidat 100 ul Buffer EB, inkubovat 5 min při pokojové teplotě, centrifugovat 1 min při 17900 × g. Následně nanést na kolonu 50 ul Buffer EB, inkubovat 5 min při pokojové teplotě, centrifugovat 1 min při 17900 × g

Izolovaná DNA se skladuje při -20 °C. Před dalším použitím je nutné DNA naředit na koncentraci 1 ng/ μl. Určení koncentrace a kontrola kvality získané DNA se provede pomocí UV spektrofotometru, který umožňuje měření v mikrolitrových objemech a zároveň provede výpočty běžně udávaných hodnot. Obecně platí, že purifikovaná DNA by měla splňovat kritéria daná měřením absorbance při 230 nm (látky fenolické povahy), 260 nm (nukleové kyseliny) a 280 (proteiny) nm, resp. poměr A260/A280 < 2,0 naznačuje kontaminaci proteiny a poměr A260/A230 < 2,0 naznačuje kontaminaci fenolickými metabolity (Green and Sambrook, 2012).

3.3 Provedení qPCR

Pro potřeby konfirmace a kvantifikace probiotických preparátů pomocí qPCR byly připraveny singleplexní systémy pro každý bakteriální nebo kvasinkový druh. Zvažovalo se i poskládání jednotlivých druhů multiplexů, ale složení jednotlivých probiotických preparátů je natolik unikátní, že nelze jednotlivé druhy poskládat do multiplexů podle nějakého logického klíče. Navíc při multiplexování může dojít ke ztrátě citlivosti, což může být problém při kvantifikaci.

Pro amplifikaci jednotlivých druhů probiotických druhů byly vybrány specifické úseky genomové DNA. Záměrem bylo vyhnout se cílení do vícekopiových genů pro 16S (18S) rDNA, kdy by následně mohl být problém s interpretací kvantitativních dat.

Všechny sondy byly označeny barvivem FAM a zhášečem BHQ1.

Tabulka 1. Sekvence primů a sond

Druh	Forward primer		Reverse primer		Sonda	
	Název	Sekvence	Název	Sekvence	Název	Sekvence
<i>Ligilactobacillus salivarius</i>	LS_qPCR_F	acacgtttcttagctgaattaatccc	LS_qPCR_R	gtgcagttaccatgtattgatgaga	LS_qPCR_P	tcatgcgatgacaggctggaga
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	BBi_qPCR_F	ctggcagccgtgacactact	BBi_qPCR_R	tgaactggccgtttacggctct	BBi_qPCR_P	agccagcgatgacaatcttgca
<i>Bifidobacterium breve</i>	BBr_qPCR_F	tcatcacggcaaggtcaaga	BBr_qPCR_R	agaacagctggaacaattcgac	BBr_qPCR_P	cgtatacacagcgctcgca
<i>Bifidobacterium longum subsp. infantis</i>	BLI_qPCR_F	atgatgcgctgccactgtta	BLI_qPCR_R	cggtagcgtcaatgtatctcc	BLI_qPCR_P	ccacgagcggttatcagc
<i>Bifidobacterium longum subsp. longum</i>	BLL_qPCR_F	gtgtggattacctgcctaccatc	BLL_qPCR_R	gtcgcaaccttgaccactt	BLL_qPCR_P	agttccagcccacagccgat
<i>Lactobacillus casei</i>	LC_qPCR_F	ttcctggtagctatgtggca	LC_qPCR_R	ggatgatcgtatgctgcgc	LC_qPCR_P	ttggatcggttctgtattgactgct
<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	LPc_qPCR_F	ccggaagatgctgatcctgc	LPc_qPCR_R	gccatccagcctgccattg	LPc_qPCR_P	aattgccgagtgatgaatccg
<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	LR_qPCR_F	tcgattacatgagctggcgg	LR_qPCR_R	aggcgatactgatgagcaaga	LR_qPCR_P	gcgtcatcgttccgtagcggatat
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA_qPCR_F	tcagttgatggcgtgtgttac	LA_qPCR_R	cagcattgtaatcagcgggag	LA_qPCR_P	actgctgaccaactattgatcaca
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>	LF_qPCR_F	taattgtcgcctgatcgcc	LF_qPCR_R	atttccccacgttaaccacc	LF_qPCR_P	tggtaaccgtccctcgtcg
<i>Lactobacillus helveticus</i>	LH_qPCR_F	cacagcaatttacttctctggca	LH_qPCR_R	cctaatacgttgtaacttgggc	LH_qPCR_P	cagatgctaagaagaatcacgcct
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	LP_qPCR_F	tacactgttcgcaagctg	LP_qPCR_R	cagactgttcagggcagctgc	LP_qPCR_P	cgttgattggtccgctcgtgaaa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPn_qPCR_F	aaatctgcccgtgtcttgg	KPn_qPCR_R	accagatgccccaatttca	KPn_qPCR_P	agccgttctcgtcgttaca
<i>Lactococcus lactis</i>	LL_qPCR_F	ccagcagaagaagcaccgtc	LL_qPCR_R	acgcggaactatcaagct	LL_qPCR_P	ttcctgttaaagctcgggttc
<i>Pediococcus acidilactici</i>	PAC_qPCR_F	ttcgttctgtggcagccttt	PAC_qPCR_R	acatttcacggcaccttcc	PAC_qPCR_P	ccatccagcaattctccaaaagaata
<i>Streptococcus salivarius</i>	SS_qPCR_F	acacagatgcacaaggaaatct	SS_qPCR_R	cgttttgatctcagtcgacc	SS_qPCR_P	tgagtggttaccttcagttgggt
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ST_qPCR_F	ctgctgtttggatcgtgcc	ST_qPCR_R	cacgacacatgcaaacct	ST_qPCR_P	tccaacgcgataagaaccagc
<i>Heyndrickxia Weizmannia coagulans</i>	WC_qPCR_F	agtatcatgcaaacgggccc	WC_qPCR_R	cttccccagactcatgcag	WC_qPCR_P	tgaaccgcaagtgctgtcg
<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i>	BAL_qPCR_F	acctccaatccctgttct	BAL_qPCR_R	gatccgcatggtggaactct	BAL_qPCR_P	caaaccgactactatggggc
<i>Enterococcus faecalis</i>	EFs_qPCR_F	cttatgtggcgaggtgtc	EFs_qPCR_R	tggcacgaatggtacttgtgg	EFs_qPCR_P	acgcaatggcaaaatcatgacgaa
<i>Enterococcus faecium</i>	EFm_qPCR_F	ggaattacgtggtcctgtgga	EFm_qPCR_R	ccatccgtcacaagtcagc	EFm_qPCR_P	cttccgtcaatctggtctgcc
<i>Bacillus subtilis</i>	BS_qPCR_F	gcgacatcagaactgct	BS_qPCR_R	agctccttgatctgtacgca	BS_qPCR_P	agccgccctctacaagtt
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LGs_qPCR_F	tcaaagaatatcaaacccaagg	LGs_qPCR_R	agggattagcatgaattcattgatt	LGs_qPCR_P	tcttgactaaccccggcca
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	LRe_qPCR_F	aactaccaagcattcgtgc	LRe_qPCR_R	tgtccaaatgcggtgaaactt	LRe_qPCR_P	agcaaacgcagcggatgacagct
<i>Staphylococcus aureus</i>	SSa_qPCR_F	ggtgaaggtggtactggtgc	SSa_qPCR_R	accagatgccccaatttca	SSa_qPCR_P	agatggtgtggttaccgct
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	LDB_qPCR_F	actaaaagatacgttagatcagaagt	LDB_qPCR_R	agctcctgaacgtaaaattgg	LDB_qPCR_P	accgctgttctgtcctcaaggt
<i>Streptococcus pyogenes</i>	SP_qPCR_F	acctcaaattccgcaactca	SP_qPCR_R	tgctctcaactggcaaggt	SP_qPCR_P	actggttccaagacattgtgacca
<i>Lactobacillus jensenii</i>	LJ_qPCR_F	aaagtgtctcattcgatacaacg	LJ_qPCR_R	gctgtgcagcagtagtt	LJ_qPCR_P	cgacattctggtatgactgctgg
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC_qPCR_F	tgtaccaattattaatcgcaggaa	SC_qPCR_R	gatgaggattcttcagcgttag	SC_qPCR_P	tgagggtagcgtggtgacct

Tabulka 2. Příprava amplifikační reakce

	1×
EliZyme Probe Mix	10 µl
Voda	4,75 µl
Forward primer (100 µM)	0,1
Reverse primer (100 µM)	0,1
Sonda (100 µM)	0,05
DNA (1 ng/ µl)	5 µl
Celkem	20 µl

Finální koncentrace každého z primerů je v PCR reakci 500 nM a sondy 250 nM.

Tabulka 3. PCR protokol

95 °C	2 min	
95 °C	5 s	
60 °C	30 s	47× Snímání fluorescence v kanálu FAM
10 °C	Forever	

3.3.1 Příprava plazmidových kvantifikačních standardů

Každý ze získaných PCR produktů byl naklonován do plazmidového vektoru pDrive Cloning Vector (Qiagen) a transformován do chemokompetentních buněk *Escherichia coli*. Po selekci pozitivních kolonií a pomnožení byly plazmidové inzerty ověřeny sekvenováním. Zásobní kultury *Escherichia coli* obsahující plazmidové konstrukty byly skladovány při $-70^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$. U potvrzených plazmidů byla určena koncentrace a čistota pomocí měření absorbance. Ze zásobního roztoku plazmidů byl desítkovým ředěním připraven standardní gradient v rozmezí 1×10^6 až 1×10^0 kopií/µl. Plazmidový gradient se ředil v TE pufru s přidavkem carrier DNA 50 ng/µl, aby byla zajištěna stabilita konstruktu v čase a předcházelo se ztrátám během pipetování, především u standardů s nízkou koncentrací.

3.3.2 Analýza a interpretace výsledků

Na základě srovnání s kvantifikačním gradientem je možné přesně určit množství konkrétního druhu v probiotickém výrobku. Kvantitativní výsledky poskytuje každý software pro ovládání qPCR přístroje v režimu absolutní kvantifikace. Tuto hodnotu je pak nutné přepočíst na celkovou hmotnost DNA získanou ze 2 g probiotického výrobku. Vzhledem ke způsobu izolace DNA pomocí soupravy DNeasy mericon Food Kit lze zanedbat ztráty při izolaci DNA, protože tento kit poskytuje vysoký výtěžek kvalitní DNA z matric jako jsou právě probiotické preparáty.

Příklad výpočtu:

- DNA izolovaná ze 2 g probiotického preparátu = 65 ng/µl (eluce do 100 µl)
- Naředění izolované DNA $65 \times - 1$ ng/µl
- Absolutní množství určitého druhu probiotika získané podle kalibrační křivky z qPCR – 5×10^6 kopií/qPCR reakci, i.e. 10^6 kopií/µl

$10^6 \times 65 \times 100/2 = 3,25 \times 10^9$ buněk daného probiotického organismu na 1 g produktu

4 Srovnání „novosti postupů“

Popsaný postup založený na qPCR nebyl nikdy doposud vytvořen. V současné době neexistuje žádný ucelený soubor qPCR metod zacílených na genomovou DNA probiotických bakterií. Při výběru specifických genů se vycházelo primárně z publikovaných dat srovnání celogenomových sekvencí a vytipování kandidátních oblastí, do kterých byly následně navrženy primery a sondy. Všechny qPCR systémy byly ověřeny prakticky na referenčních kmenech popsaných bakterií a nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita mezi sledovanými druhy. Zkušenosti získané během řešení projektu budou využity i v rámci přípravy dalších projektů.

Celý postup byl navržen tak, aby využil komerčně dostupné technologie (postup izolace DNA) a spojil je s moderní technologií. Dosavadní postupy analýzy probiotických doplňků stravy založené na kultivaci a následné identifikaci izolátů pomocí MALDI-TOF nedokáží komplexně analyzovat probiotický přípravek s např. 12 druhy probiotických bakterií. Důvodem jsou jednak rozdílné nároky různých druhů na prostředí či živiny při kultivaci, ale také variabilní množství jednotlivých druhů v přípravku. Další komplikací, která může nastat při identifikaci jednotlivých bakteriálních druhů ve výrobku, je identifikace izolátů pomocí MALDI-TOF. Problémem je především vysoká podobnost např. laktobacilů mezi sebou a s tím spojená nedokonalost knihoven používaných při identifikaci. Navíc i když by kultivační vyšetření mělo poskytnout informaci o množství jednotlivých bakteriálních druhů ve výrobku, je ověření deklarovaného množství, vzhledem k rozdílným kultivačním podmínkám a komplexnosti vzorku, obtížně proveditelné a interpretovatelné. Kvantifikace množství daného bakteriálního druhu ve výrobku pomocí qPCR je oproti tomu velmi jednoduchá a časově nenáročná.

5 Popis uplatnění metodiky

Celý projekt vznikl na zadání Státní zemědělské a potravinářské inspekce, která potřebuje vhodné nástroje pro provádění úředních kontrol. Metodika bude primárně sloužit k pokrytí požadavků SZPI. V rámci projektu proběhlo předání metodiky do laboratoří SVÚ Jihlava, kde bude metodika akreditována a bude sloužit primárně pro potřeby úředních kontrol, ale bude k dispozici i pro další zájemce o analýzy probiotických preparátů.

Výše popsaný postup je vyčerpávající a umožňuje provedení metodiky v jakékoli jiné laboratoři, která disponuje běžným laboratorním vybavením, kam se dnes řadí i přístroje na provádění qPCR.

6 Ekonomické aspekty

Náklady na zavedení metodiky do laboratoře, která rutinně provádí měření pomocí qPCR, lze odhadnout na nižší tisíce Kč, za které je nutné pořídit primery, sondy a mastermix. Další náklady pak

může představovat výroba plazmidového kvantifikačního standardu, ale i v tomto případě jsou náklady v řádech nižších tisíců Kč. Izolace DNA je založena na komerčně dostupném kitu.

Ekonomický přínos pro uživatele SZPI bude spočívat především v efektivnější kontrole trhu s probiotickými doplňky stravy. Zde je ekonomický přínos pro státní správu obtížné vyčíslit. Lze však hovořit o přínosu společenském spočívajícím v efektivnější kontrole probiotických preparátů a ochraně spotřebitelů před falšovanými potravinami. Přímý ekonomický přínos bude měřitelný u SVÚ Jihlava, který obohatí své portfolio akreditovaných metod. qPCR umožní významnou úsporu nákladů a času, které jsou nyní potřebné pro komplexní kulturační analýzu a následnou identifikaci získaných izolátů pomocí MALDI-TOF nebo sekvenování.

7 Seznam použité související literatury

Kralik, P., & Ricchi, M. (2017). A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything. *Frontiers in microbiology*, 8, 108.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>

Green, M. and Sambrook, J. (2012) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th Edition, Vol. II, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

8 Seznam publikací, které předcházely metodice

Dušková M., Kolářková I., Zapletalová M., Novák D., Králík P., Karpíšková R. Průkaz probiotických kultur v komerčních doplňcích stravy na českém trhu. *Výživa a potraviny*, 2023, 1211-846X.