



 <p>MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ</p>		 <p>ZEMĚ PROGRAM APLIKOVANÉHO VÝZKUMU MINISTERSTVA ZEMĚDĚLSTVÍ 2017-2025</p>
 <p>VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE</p>	 <p>VUTM</p>	 <p>Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně</p>

Metodika QK1710156-CM3

s názvem

„Detekce potravinářsky nežádoucích bakterií v procesech zpracování syrovátky s využitím molekulárně biologické metody LAMP“ (Typ výsledku „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali

Eva Šviráková¹, Irena Němečková², Leona Buňková³

¹Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

²Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

³Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Vydáno v listopadu 2021

ISBN 978-80-7592-101-7 (VŠCHT Praha)

Vydavatel

Pro:

Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Univerzitu Tomáše Bati ve Zlíně

vydala: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,

Technická 1905/5, Praha 6, 166 28.

Forma vydání

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/QK1710156_CM3.pdf

1. vydání 2021

ISBN 978-80-7592-101-7 (VŠCHT Praha)

Podíl autorů na tvorbě metodiky

Eva Šviráková: podíl 85 %

Irena Němečková: podíl 10 %

Leona Buňková: podíl 5 %

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení

• Odborník z daného oboru:

Ing. Lukáš Valihrač, Ph.D., Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

• Pracovník státní správy:

MVDr. Kateřina Březinová, Ph.D., Státní veterinární správa

Dedikace na projekt

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1710156 s názvem: „Nové přístupy a metody analýzy pro zajištění kvality, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti sýrů, optimalizace jejich výroby a zefektivnění procesů hygieny a sanitace při současném snížení zátěže životního prostředí odpadními vodami“ s finanční podporou NAZV Ministerstva zemědělství ČR.

Cíl metodiky

Cílem uplatnění metodiky je v podmínkách *in vitro* detekovat potravinářsky nežádoucí bakterie v procesech zpracování syrovátky s využitím molekulárně biologické metody LAMP.

Předložená metodika zkoumá a hodnotí potenciál molekulárně biologické metody LAMP při její aplikaci do potravinářské laboratorní praxe. Metodika konkrétně cílí na detekci zdravotně nežádoucích bakterií, tj. patogenních a podmíněně patogenních bakterií (např. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Enteritidis, *Campylobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*) ze syrovátky s využitím metody LAMP v laboratorních podmínkách. Některé z těchto bakterií mají statut nežádoucích bakterií způsobujících kažení potravin.

Metodika umožňuje hodnotit tekutou sladkou a kyselou syrovátku, rekonstituovanou sladkou a kyselou syrovátku, syrovátkové nápoje.

Vlastní popis metodiky

A) Vzorky pro analýzu

- Aa)** Metodika umožňuje hodnotit následující formy syrovátky: tekutou sladkou a kyselou syrovátku, rekonstituovanou (tj. obnovenou) sladkou a kyselou syrovátku, syrovátkové nápoje.
- Ab)** Tekuté vzorky syrovátky (tj. tekutá sladká a kyselá syrovátka, syrovátkové nápoje) se vyšetřují bez úpravy.
- Ac)** Vzorky sušené syrovátky se musí rekonstituovat (tj. obnovit) následujícím způsobem: sušená syrovátka (10,0 g) se smíchá se sterilní destilovanou vodou (90,0 g). K homogenizaci se použije mixer.

B) Příprava vzorků pro analýzu LAMP

- Ba)** Alikvot každého vzorku syrovátky (5 μ l) se pipetuje do Eppendorfových zkumavek obsahujících roztok pro resuspendaci a lýzi buněk pro LAMP (500 μ l) (např. lze použít roztok RALF, Amplex Diagnostic GmbH, DEU).
- Bb)** Zkumavky s obsahy se zahřejí v termobloku pro LAMP (např. lze použít termoblok Genie[®] HotBlock MiniT-30; Hangzhou Allsheng Instruments CO., LTD, CHN) na teplotu 99 °C, s výdrží 2 min.
- Bc)** Směs se následně odstředí na laboratorní odstředivce při otáčkách 3800 ot·min⁻¹, po dobu 30 s, při pokojové teplotě.
- Bd)** Alikvot (25 μ l) supernatantů se pipetuje do mikrozkušavek (které jsou spojeny do stripu) kitu pro LAMP (např. lze použít kit Eazyplex[®] BloodScreen GP/GN Assay; Amplex Diagnostic GmbH, DEU) obsahujícího lyofilizované reagencie.

Poznámka.

Kit Eazyplex[®] BloodScreen GP Assay se použije pro grampozitivní bakterie.
Kit Eazyplex[®] BloodScreen GN Assay se použije pro gramnegativní bakterie

C) Vlastní analýza LAMP

- Ca)** Mikrozkušavky se vzorky (ve stripu) kitu pro LAMP (viz bod části Bd – Příprava vzorků pro analýzu LAMP) se vloží do reakčního termobloku pro LAMP (např. lze použít reakční termoblok Genie[®] II; Amplex Diagnostic GmbH, DEU), kde proběhne vlastní analýza – amplifikační reakce LAMP.
- Cb)** Vlastní analýza LAMP se uskuteční při teplotě 65 °C a proběhne do 20 min.

D) Vyhodnocení výsledků

- Da)** Metoda LAMP může poskytnout jak kvalitativní výsledky (vyjádřené ve formě: bakterie je přítomná (+) nebo bakterií není přítomná (–)), tak kvantitativní výsledky. Postupuje se podle návodů výrobce přístroje pro amplifikaci LAMP (např. lze použít návody výrobce reakčního termobloku Genie[®] II; Amplex Diagnostic GmbH, DEU).
- Db)** V případě pozitivního záchytu bakterie (tj. bakterie je přítomná, +) se doporučuje uskutečnit následně mikrobiologické kultivační stanovení. Důvodem tohoto stanovení je zjištění životaschopnosti detekované bakterie, např. s využitím plotnové metody (ČSN EN ISO 7218, 2008).

Poznámka. Přestože metoda LAMP poskytuje vysoce spolehlivé výsledky relativně rychle (nejdéle do 60 min) a v profilu jednoduché experimentální realizovatelnosti, životaschopnost bakterií určit nedokáže, jelikož je designovaná na amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA nebo RNA).

E) Mez detekce metody LAMP

Mez detekce metody LAMP je odvislá od detekovaného bakteriálního rodu/druhu a pohybuje se v rozmezí řádů 10^3 – 10^5 KTJ·ml⁻¹, respektive 10^0 – 10^1 KTJ·reakce⁻¹.

F) Příklad

Fa) Zadání

Detekce nežádoucích bakterií v syrovátce s využitím metody LAMP.

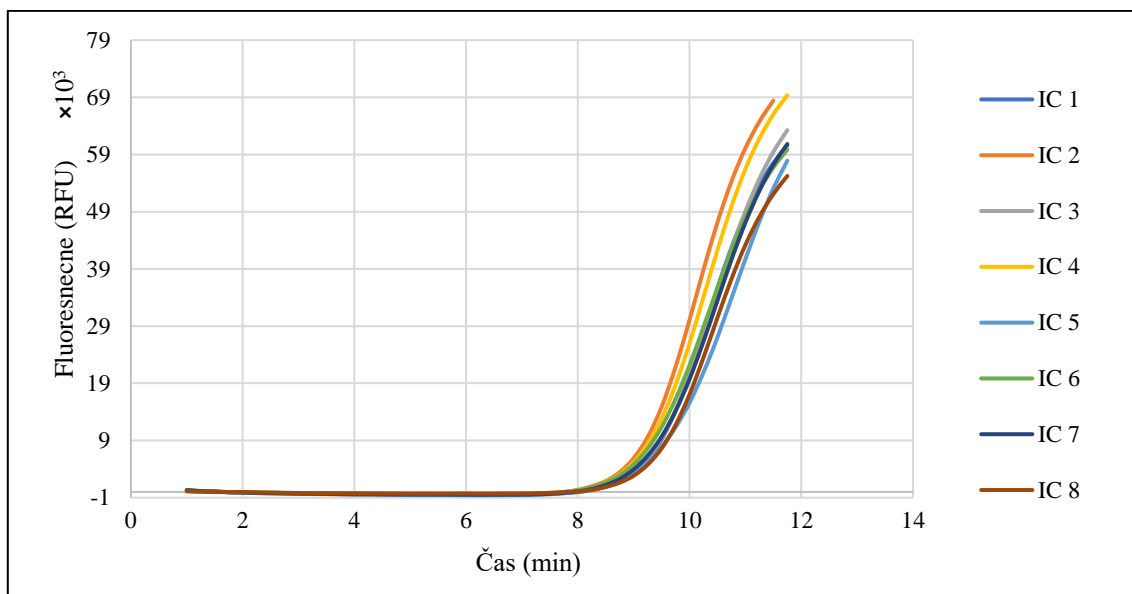
Fb) Upřesněné zadání

- **Bakterie.** Detekce 3 sbírkových bakteriálních kmenů *Enterococcus faecalis* CCM 7247, *Enterococcus faecium* CCM 2308 a *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* CCM 4685 (CCM, CZE).
- **Syrovátka.** Detekce uskutečněná ve sladké rekonstituované syrovátce, která byla modelově inokulovaná (inokulum 10^3 KTJ·ml⁻¹) jednotlivými bakteriálními kmeny (viz bod výše).
- **Metoda LAMP.** Průběh amplifikace LAMP v reálném čase je demonstrován na vybraném kmeni *Enterococcus faecalis* CCM 7247 (dále v textu část Fc) Interpretace výsledků – Průběh amplifikace LAMP v reálném čase, Obr. 2a) a 2b)).

Fc) Interpretace výsledků

Validace metody LAMP

Průběh validačního testu LAMP byl monitorován v reálném čase s tím, že pozitivní projev amplifikace LAMP byl indikován prudkým zvýšením signálu fluorescence. Ten byl zaznamenáván softwarem použitého přístroje – tj. reakčního termobloku LAMP (Genie® II, Amplex Diagnostic GmbH, DEU), který vykreslil typické amplifikační křivky (viz Obr. 1).



Obr. 1: Záznam validačního testu pro 8 inhibičních kontrol s typickými amplifikačními křivkami; IC... inhibiční kontrola (Inhibition Control).

Amplifikační křivky byly softwarem přístroje LAMP matematicky vyhodnoceny a byl určen čas amplifikace (v angličtině označovaný jako 'Tt: Time threshold' nebo 'Tp: Time-to-positivity'). Analýza LAMP s využitím kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU) obsahovala právě jednu inhibiční kontrolu, která byla při pozitivní amplifikační odezvě potvrzením validity testu LAMP. Stran výsledků validace metody LAMP bylo konstatováno, že metoda vykazovala přesné a správné výsledky.

Specifita metody LAMP

V Tab. 1 jsou uvedeny výsledky testu specifity pro metodu LAMP s využitím kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), a to pro detekci gram pozitivních bakterií. Průměrný počet bakterií se pohyboval v rozmezí řádů 10^7 – 10^8 KTJ·ml⁻¹.

Tab. 1: Test specifity pro metodu LAMP s využitím kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU) pro detekci grampozitivních bakterií

Bakteriální kmen	Analyty detekované kitem Eazyplex® BloodScreen GP Assay													
	vanA		vanB		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus sp.</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Streptococcus sp.</i>		Inhibiční kontrola	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7247	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 2308	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> CCM 4685	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

+... pozitivní reakce LAMP, -... negativní reakce LAMP, vanA... vankomycin rezistentní *Enterococcus* fenotyp vanA; vanB... vankomycin rezistentní *Enterococcus* fenotyp vanB

Stran specifity metody LAMP, při využití kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), bylo konstatováno, že takto designované master mixy, které obsahovaly specifické primery a navržené postupy příprav analýz LAMP, poskytly 100% specifitu pro danou skupinu grampozitivních bakterií.

Z analýzy LAMP také vyplynulo, že testované bakterie obsahovaly specifický gen, pro který byly navrženy konkrétní specifické primery obsažené v master mixech. Konkrétně se jednalo o následující geny: gen EF0027 kódující protein regulující transkripci pro *Enterococcus faecalis*, gen *tufA* pro *Enterococcus sp.* a gen *tufA* pro *Streptococcus sp.*

Mez detekce metody LAMP

Mez detekce ('limit of detection') pro metodu LAMP, ve vazbě na testované bakterie s využitím kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), byla stanovena ve formě nejnižšího detekovatelného počtu bakterií vyjádřeného v KTJ·ml⁻¹, respektive KTJ·reakce⁻¹, jak uvádí Tab. 2.

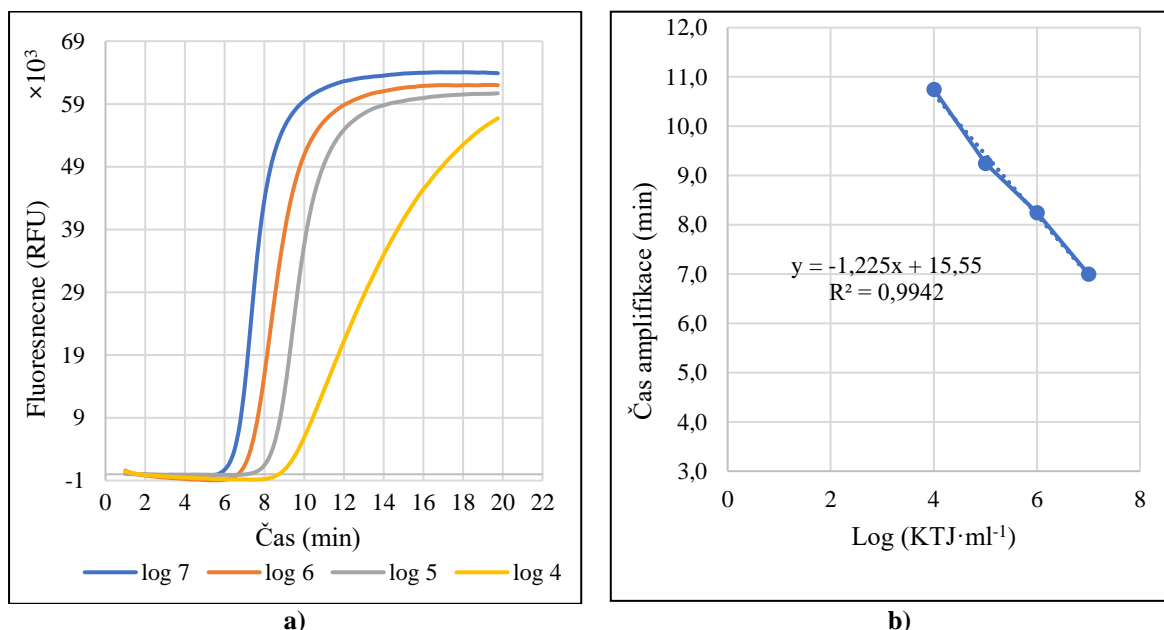
Tab. 2: Mez detekce pro metodu LAMP, ve vazbě na testované bakterie s využitím kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), vyjádřená jako nejnižší detekovatelný počet bakterií (KTJ·ml⁻¹, resp. KTJ·reakce⁻¹)

Bakteriální kmen	Kultivační agar	Nejnižší detekovatelný počet buněk (KTJ·ml ⁻¹)	Nejnižší detekovatelný počet buněk (KTJ·reakce ⁻¹)
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7247	BHI	$3,8 \cdot 10^4$	$9,4 \cdot 10^0$
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 2308	BHI	$1,6 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^1$
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> CCM 4685	BHI	$4,3 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^0$

V souvislosti s mezemi detekce metody LAMP pro testované grampozitivní bakterie bylo konstatováno, že meze detekce byly individuálně různé a pohybovaly se v rozmezí řádů 10^3 – 10^5 KTJ·ml⁻¹, respektive 10^0 – 10^1 KTJ·reakce⁻¹.

Průběh amplifikace LAMP v reálném čase

Při stanovení meze detekce pro testované bakterie s využitím metody LAMP se zjišťuje přímá úměra mezi časem amplifikace (kdy je amplifikace vyhodnocena za pozitivní; v angličtině 'Tt': Time treshold nebo, 'Tp': Time-to-positivity) a počtem buněk kmenů. Počty buněk testovaných kmenů byly stanoveny s využitím plotnové metody (ČSN EN ISO 7218, 2008), po jejich aerobních kultivacích v agaru BHI, při teplotě 37 °C, po 72 h.



Obr. 2: Amplifikační křivky znázorňující nárůst intenzity fluorescence během amplifikace DNA pro vybraný kmen *Enterococcus faecalis* CCM 7247 o různých počtech buněk uvedených ve formě log (KTJ·ml⁻¹) (a); kalibrační křivka pro kmen *Enterococcus faecalis* CCM 7247 získaná vynesením času amplifikace v závislosti na počtech buněk uvedených ve formě log (KTJ·ml⁻¹) (b).

Při zaznamenávání průběhu amplifikace LAMP v reálném čase (viz Obr. 2a) bylo konstatováno, že se doba, kdy byla amplifikace vyhodnocena jako pozitivní, se úměrně zvyšovala se snižujícím se počtem bakterií, a že tedy existovala lineární závislost mezi časem amplifikace a počtem bakterií.

Při vynesení této závislosti do grafu (viz Obr. 2b) byla získána kalibrační křivka, kterou bylo možno následně použít pro zjištění neznámého počtu bakterií. Metoda LAMP byla tedy schopna poskytnout nejenom kvalitativní výsledky typu bakterie je přítomna (+) či bakterie není přítomna (-), ale i kvantitativní výsledky.

V Tab. 3 jsou souhrnně uvedeny rovnice přímek, charakterizující lineární vztah mezi časem amplifikace (min) a počtem bakterií ($\text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$), spolu s hodnotami druhé mocniny korelačního koeficientu R^2 (tzv. koeficientu determinace).

Tab. 3: Rovnice přímek charakterizující lineární vztah mezi časem amplifikace LAMP a počtem bakterií ($\text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$), včetně druhé mocniny korelačního koeficientu (R^2)

Bakteriální kmen	Kultivační bujón	Rovnice přímky	Korelační koeficient (R^2)
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7247	BHI	$y = -1,225x + 15,55$	0,994
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 2308	BHI	$y = -0,925x + 14,999$	0,970
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> CCM 4685	BHI	$y = -2,362x + 27,034$	0,948

y... čas amplifikace; x... $\log(\text{KTJ} \cdot \text{ml}^{-1})$

Detekce bakterií ze syrovátky s využitím metody LAMP

Ohledně evaluace metody LAMP, z důvodu zjištění její vhodnosti pro aplikaci v laboratorní potravinářské praxi a zároveň pro posouzení vhodnosti komerčního kitu Eazyplex[®] BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), byla realizována detekce grampozitivních bakterií *Enterococcus faecalis* CCM 7247, *Enterococcus faecium* CCM 2308, *Streptococcus dysgalactiae* CCM 4685 ve sladké rekonstituované syrovátce.

Syrovátka byla nejdříve rekonstituována (obnovena), následně pasterována v autoklávu v proudící páře (při teplotě 98 °C, po dobu 20 min) z důvodu vyloučení rizika falešně pozitivní zpětné detekce, a poté zaočkována testovanými bakteriemi (inokulum 1,0 obj. %). Výsledky experimentů byly prezentovány v kvalitativním profilu (viz Tab. 4).

Tab. 4: Detekce bakterií ve sladké rekonstituované syrovátce, při použití kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), s využitím metody LAMP

Bakteriální kmen	Kit Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU)																
	<i>Enterococcus faecalis</i>				<i>Enterococcus sp.</i>				<i>Streptococcus sp.</i>				Kontrola inhibice				
	Paralela																
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7247	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 2308	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> CCM 4685	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	

+... pozitivní reakce LAMP, -... negativní reakce LAMP

Poznámka. Výsledky pro detekci vankomycin rezistentní *Enterococcus* fenotyp vanA, vankomycin rezistentní *Enterococcus* fenotyp vanB a *Streptococcus pneumoniae* byly negativní a nejsou v tabulce zobrazeny.

Bylo konstatováno, že u testovaných bakterií došlo k jejich detekci ve sladké rekonstituované syrovátce ze 100 % (což platilo pro 12 testovaných případů z celkem 12 uskutečněných případů; 12/12), a to s využitím kitu Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU) designovaného pro grampozitivní bakterie, a navrženého pro amplifikaci genu EF0027 pro *Enterococcus faecium*, genu *tufA* pro *Enterococcus sp.* a genu *tufA* pro *Streptococcus sp.* Na základě těchto zjištění se dá metoda LAMP označit za slibnou pro detekci enterokoků a streptokoků v podmínkách potravinářské laboratorní praxe.

Srovnání novosti postupů

Metoda LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), překládaná do jazyka českého jako „izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou“, patří mezi molekulárně biologické metody využívané pro amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA nebo RNA), zejména v souvislosti s detekcí různých mikroorganismů/bakterií, včetně patogenních (Notomi a kol., 2015).

Metoda LAMP našla své využití primárně v oblasti klinické praxe. Na trhu jsou k dispozici komerčně dostupné kity pro metodu LAMP, designované pro detekci patogenních nebo podmíněných patogenních mikroorganismů/bakterií ze vzorků krve. Jedná se např. o kit Eazyplex® BloodScreen GN Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), který je designovaný pro detekci následujících gramnegativních patogenních a podmíněně patogenních bakterií: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa/Pseudomonas fluorescens/*

Pseudomonas putida, bakterie čeledi Enterobacteriaceae, a také pro specifickou skupinu mikroorganismů (CTX-M-1) s genem pro produkci enzymu CTX-M a specifickou skupinu mikroorganismů (CTX-M-9) s genem pro produkci enzymu CTX-M. Další kit, Eazyplex® BloodScreen GP Assay (Amplex Diagnostic GmbH, DEU), je naopak designován pro detekci následujících grampozitivních patogenních či podmíněně patogenních bakterií: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* sp., vancomycin rezistentní *Enterococcus* fenotyp vanA, vancomycin rezistentní *Enterococcus* fenotyp vanB.

Metoda LAMP, běžně používaná v klinické praxi, může být spolu s komerčně dostupnými kity transferována do oblasti potravinářství. Konkrétně může být použita v oblasti potravinářské laboratorní praxe vědecko-výzkumných nebo akademických pracovišť. U reality tohoto transferu se pro metodu LAMP významně rozšiřuje její pole využitelnosti (Hu a kol., 2018). Nezbytností je však design nových pracovních postupů/metod a jejich bezproblémová experimentální realizace.

V souvislosti s námi předkládanou metodikou jde o aplikaci metody LAMP pro detekci potravinářsky nežádoucích bakterií v procesech zpracování syrovátky, což představuje její novost. Hlavní výhodou metodiky je mimo jiné urychlení doby reakce detekce potravinářsky nežádoucích bakterií v syrovátce na dobu 20–60 min, a to při srovnání jejich detekce s využitím jiných molekulárně biologických metod (např. u metody PCR se doba reakce pohybuje v rozmezí 60–120 min) nebo metod klasické mikrobiologie (např. u plotnové metody s využitím selektivních médií se doba detekce pohybuje v rozmezí 24–48 h).

Popis uplatnění metodiky

- Metodika byla na základě smlouvy o využití výsledků uplatněna u uživatele, kterým je Českomoravský svaz mlékárenský z. s.
- Metodika je určena k aplikaci do potravinářství, konkrétně do potravinářské laboratorní praxe. Je vhodná zejména pro laboratoře zaměřené na výzkum a vývoj v oborech zemědělství a potravinářství, konkrétně v následujících oblastech: zpracování mléka a mlékárenských výrobků, hygieny a sanitace, aplikované potravinářské mikrobiologie.
- Metodika se uplatní při jistění zdravotní mikrobiologické bezpečnosti potravin, zejména na bázi syrovátky, a to díky rychlé a spolehlivé detekci potravinářsky nežádoucích bakterií.

Ekonomické aspekty

- Metodika je určena k provádění v sektoru laboratorní potravinářské praxe. Konkrétně v laboratořích vybavených pro práce z oblasti klasické mikrobiologie a molekulární biologie.
- Při realizaci metody LAMP je zapotřebí mít následující přístroje: termoblok pro LAMP (pro zahřev vzorků), laboratorní odstředivku (pro odstředování vzorků), reakční termoblok pro LAMP (pro amplifikace vzorků). Pořizovací cena těchto přístrojů se pohybuje řádově ve stovkách až miliónech Kč. Cena jednoho kitu pro metodu LAMP (např. Eazyplex® BloodScreen GP/GN Assay; Amplex Diagnostic GmbH, DEU) se pohybuje okolo 35 tis. Kč (vč. DPH), přičemž kit obsahuje 24 pozic. Z toho plyne, že cena jedné reakce LAMP vyjde na cca 1,5 tis. Kč (vč. DPH). Prediktivně lze očekávat snížení pořizovacích nákladů na přístroje a kity pro metodu LAMP díky tomu, že se tato metoda stane rozšířenější a používanější.
- Vzhledem k tomu, že metoda LAMP představuje metodu využitelnou v potravinářství při jistění mikrobiologické bezpečnosti zejména potravin na bázi syrovátky, pro koncového

uživatele bude ekonomický přínos záviset na závažnosti mikrobiologického problému, který se díky této metodice podaří vyřešit. Snížení nákladů se dá uvažovat také v oblasti sociální a zdravotní, např. při snižování počtu pracovních neschopností, při omezení výskytu alimentárních onemocnění, a to v řádu stovek až miliónu Kč za každý vyřešený problém.

Seznam použité související literatury

ČSN EN ISO 7218 (2008): Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiální zkoušení. Praha, Český normalizační institut.

HU L., MA M.L., ZHENG S., HE X., HAMMACK S.T., BROWN W.E., ZHANG G. (2018): Development of a novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of *Salmonella* ser. Enteritidis from egg products. Food Control, 88, s. 190–197.

NOTOMI T., MORI Y., TOMITA N., KANDA H. (2015): Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. Journal of Microbiology, 53 (1), s. 1–5.

Seznam publikačně-prezentačních aktivit, které metodice předcházely

ŠVIRÁKOVÁ E., HRUBÁ M., LOUPANCOVÁ K. (2019): Application of the LAMP method for food pathogens detection. 8th Congress of European Microbiologists – FEMS 2019, Glasgow, UK, 7.–11. 7. 2019. (Poster PW407)

ŠVIRÁKOVÁ E., BAMBASOVÁ L., LOUPANCOVÁ K. (2019): Aplikace metody LAMP v potravinářství. XLIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 27.–29. 5. 2019. V: Sborník příspěvků XLIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin (ed. Cejpek K.), R17, s. 56–62, VŠCHT Praha, Praha 2019. (Elektronický sborník, ISBN 978-80-7592-057-7)

LOUPANCOVÁ K., BAMBASOVÁ L., ŠVIRÁKOVÁ E. (2019): Aplikace metody LAMP v potravinářství. XLIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, Skalský Dvůr u Bystřice nad Pernštejnem, 27.–29. 5. 2019. (Přednáška 28. 5. 2019)

LOUPANCOVÁ K., KYZNAR J., HRUBÁ M., ŠVIRÁKOVÁ E. (2018): Využití molekulárně biologické metody LAMP v potravinářství. XXVII. Konference mladých mikrobiologů Tomáškovy dny 2018, Masarykova universita, Brno, 7.–8. 6. 2018. V: Sborník abstraktů, s. 40, Masarykova Univerzita. (Tištěný sborník, ISBN 978-80-210-8585-5.)

LOUPANCOVÁ K., KYZNAR J., HRUBÁ M., ŠVIRÁKOVÁ E. (2018): Využití molekulárně biologické metody LAMP v potravinářství. XXVII. Konference mladých mikrobiologů TOMAŠKOVY DNY 2018, Brno, 7.–8. 6. 2018. (Přednáška 8. 6. 2018)

ŠVIRÁKOVÁ E., KYZNAR J., LOUPANCOVÁ K. (2017): Využití metody LAMP pro rychlou detekci patogenních mikroorganismů v potravinářské a klinické praxi. *Mlékařské listy – Zpravodaj* 164, 28 (5), s. 31–38. (Recenzovaný článek, ISSN 1212-950X)