

**XXVI. konference mladých mikrobiologů**

# **TOMÁŠKOVY DNY 2017**



**Masarykova univerzita**  
Brno 2017

**XXVI. konference mladých mikrobiologů**

# **TOMÁŠKOVY DNY 2017**



**Masarykova univerzita**  
Brno 2017

**Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice  
u svaté Anny v Brně**

**Československá společnost mikrobiologická**

**Společnost pro mikrobiologii a epidemiologii ČLS JEP**

**Společnost pro lékařskou mikrobiologii ČLS JEP**

**In co-operation with American Society for Microbiology.**

Redakce: Organizační tým Tomáškových dnů, Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv.  
Anny v Brně

**Sborník vznikl za podpory grantu INGO II (LG).**

© 2017 Masarykova univerzita  
ISBN 978-80-210-8585-5

## Sponzoři



ČADERSKÝ-ENVITEK spol. s r.o. BRNO



## Tomáškovy dny 2017 – program

8. 6. 2017 (Sál 1)

**10:00 – 10:15** Slavnostní zahájení, začátek valné hromady ČSSM

**10:15 – 11:15** Zvaný host Eugene Rosenberg (Tel Aviv University):  
„Microbiota of Plants, Animals and Humans: Hologenome Concept of Evolution“

**11:15 – 12:15** Nejlepší mladí mikrobiologové (Sál 1)

**01. Distribuce a charakteristika *Listeria monocytogenes* v České republice**

T. Gelbíčová

**02. Faktory virulence a rezistence k antibiotikům u *Arcobacter* spp.**

D. Šilha, B. Vacková, L. Šilhová

**03. Arbovirusové infekce vo vektoroch a zvieratách**

T. Csank, P. Drzewnioková, L. Korytár, P. Major, J. Čurlík, P. Lazar, E. Bocková,  
B. Vargová, V. Majláthová, I. Majláth, M. Gyuranecz, T. Bakonyi, J. Pistl

**12:15 – 12:30** Valná hromada ČSSM

**12:30 – 14:00** Oběd

**14:00 – 15:40** Klinická mikrobiologie (Sál 1)

**04. Kazuistika. Nečekaný původce sepse u jinak zcela zdravého pacienta.**

J. Závora

**05. Štúdium baktérií *Cronobacter* spp. v klinických vzorkách, ich identifikácia a typizácia**

V. Belanová, A. Lichvariková, K. Šoltýs, H. Drahovská

**06. Sledování výskytu gramnegativních bakterií produkujících karbapenemázy ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové**

R. Kukla, R. Bolehovská, L. Plíšková, L. Ryšková, H. Žemličková

**07. Detekce produkce Panton-Valentinova leukocidinu u recidivujících stafylokokových infekcí**

K. Habalová

**08. Efektívny manažment pacienta s infektom respiračného traktu**

M. Šefranková

**09. Izolace a antimikrobiální aktivita laktobacilů vaginálního mikrobiomu těhotných žen**

**14:00 – 15:40 Klinická mikrobiologie (Sál 1)**

**10. Rezistence *Escherichia coli* z vaginálních výtěrů u těhotných patientek. Retrospektivní sledování těhotných patientek od srpna 2016 do prosince 2016 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze.**

A. Vaňková, V. Adámková, L. Kupidlovská

**11. Vyšetření vaginálního mikrobiomu metodou sekvenování nové generace**

Z. Uhlířová

**15:40 – 16:00 Přestávka**

**16:00 – 17:15 Antimikrobiální rezistence, faktory virulence (Sál 1)**

**12. Tvorba biofilmu jako faktor virulence u *Propionibacterium acnes***

P. Muchová, F. Růžička

**13. Možnosti fluorometrického stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace v klinické praxi**

K. Poláková, L. Vacek

**14. Charakterizácia a fenotypizácia koliformných baktérií rezistentných voči antibiotikám izolovaných z nemocničných odpadových vôd**

K. Lépesová, P. Olejníková, T. Mackuľak, L. Birošová

**15. Genotypová analýza a virulence multirezistentních izolátů *Streptococcus pneumoniae*, sérotypu 19A a19F v České Republice**

L. Mališová, P. Španělová, V. Jakubů, H. Žemličková

**16. Antimikrobiální aktivita extraktu z chmelových šištic (*Humulus lupulus L.*) proti vybraným mikrobiálním původcům alimentárních onemocnění**

S. Kučerová, I. Brožková, L. Česlová

**17. xMAP Technologie: Detekce parazitických agens**

N. Reslová, L. Škorpíková, K. Snížková, M. Kašný, P. Králík

**19:00 – 22:00 Společenský večer**

9. 6. 2017 (Sál 1)

9:00 – 9:35 Mykologie (Sál 1)

**18. Výskyt mikromycetární infekce u pacientů s popáleninovým traumatem**

J. Holoubek, B. Lipový, M. Hanslíánová, M. Cvanová, H. Řihová, Y. Kaloudová,  
J. Jarkovský, I. Suchánek, P. Brychta

**19. Kombinácia antifungálnych zlúčenín ako nástroj boja proti fungálnym infekciám**

Z. Ježíková, T. Pagáč, B. Pfeiferová, P. Olejníková

**20. Potencovanie účinku antifungálne aktívnych azolov novosyntetizovanými derivátmi 1,4-dihydropyridínov**

B. Pfeiferová, P. Olejníková, Z. Ježíková

9:35 – 10:00 Prionové infekce (Sál 1)

**21. Prionové kmeny vykazujú rozlišnou senzitivitu k fotodynamické inaktivaci v závislosti na použitém derivátu ftalocyaninu**

M. Kostelanská

**22. The importance of precise study design for prion infection studies: The evaluation of proteinase-activated receptor 2 significance in scrapie inoculated mice.**

Z. Hanusová

10:00 – 10:45 Poster session (Sál 3)

10:45 – 11:45 Veterinární mikrobiologie (Sál 1)

**23. Salmonelóza spojená s chovem plazů (reptile-associated salmonellosis) – kazuistika.**

Z. Tomáščíková, M. Mrázková, M. Kaňáková, H. Sedláčková, R. Karpíšková

**24. Aujezskyho choroba u černé zvěře v České republice**

M. Bena, P. Vašíčková

**25. Virové zoonózy u volně žijících obratlovců v ČR – opomíjené riziko?**

P. Straková, H. Blažejová, M. Heroldová, I. Rudolf, Z. Hubálek

**26. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in diaphragm pillar of wild boars (*Sus scrofa*) in the Czech Republic**

M. Hušáková, M. Bena, I. Slaná

**27. Prevalence *Toxoplasma gondii* u pernaté zvěře určené k lidské spotřebě v České republice: molekulární detekce pomocí qPCR.**

L. Škorpíková, A. Lorencová, M. Slaný, N. Reslová, M. Kašný, R. Plhal, J. Drimaj,  
J. Kamler, J. Lamka

11:45 Slavnostní zakončení (Sál 1)

9. 6. 2017 (Sál 2)

**9:00 – 10:00 Mikrobiologie potravin a biotechnologie I (Sál 2)**

**28. Zelenina a bylinky z farem a tržní sítě jako zdroj bakteriální kontaminace?**  
V. Michná, P. Králík, M. Morávková

**29. Charakterizace a identifikace zdravotně i technologicky rizikových bakterií *Asaia* spp.**  
J. Kyznar, L. Zdeňková, S. Purkrťová, E. Šviráková

**30. Celogenómové sekvenovanie baktérii vhodných ako štartovacie alebo pomocné kultúry pri príprave bryndze**  
A. Lichvariková, V. Belanová, M. Hyblová, T. Kuchta, H. Drahovská

**31. Mykoparazitická aktivita *Trichoderma atroviride* a úloha ABC transportérov**  
T. Pagáč, Z. Ježíková, P. Olejníková

**32. Nízokoteplotná plazma – alternatívny spôsob ochrany zrna pšenice pred znehodnotením vláknitými hubami**  
L. Hoppanová, D. Hudecová, V. Medvecká, J. Šimončicová, B. Kaliňáková, A. Zahoranová

**10:00 – 10:45 Poster session (Sál 3)**

**10:45 – 11:45 Mikrobiologie potravin a biotechnologie II (Sál 2)**

**33. Detekce norovirů ve vzorcích vod**  
J. Hrdý, P. Vašíčková, M. Kubánková, P. Mikel

**34. Stress-induced physiological regulation of carotenoid synthesis in *Rhodotorula glutinis***  
J. Tkáčová, T. Klemková, M. Čertík

**35. Produkcia kyseliny  $\gamma$ -linolénovej polosuchými kultiváciami s využitím vláknitej huby *Cunninghamella echinulata***  
M. Janák, T. Klemková, P. Gajdoš, M. Čertík

**36. *Umbelopsis isabellina* as a potential producer of gamma-linolenic acid and carotenoid pigments in process of solid state fermentations**  
O. Slaný, T. Klemková, M. Čertík

**37. Optimalizace příkrmových fermentací pro expresi rekombinantních proteinů v *Escherichia coli***  
K. Sedláčková, Z. Valentová, R. Chaloupková, L. Chrást, J. Damborský

**11:45 Slavnostní zakončení (Sál 1)**



## Postery

**P 01. Využití zeolitových filtrů při chovu ryb a jejich vliv na rozvoj nitrifikačních mikroorganismů**

K. Skleničková, D. Koloušek, E. Šviráková, M. Pečenka, I. Růžičková

**P 02. Komparativní analýza dvou odlišných linií plazmidů kódujících exfoliativní toxin B u klinických kmenů *Staphylococcus aureus***

T. Botka, V. Růžičková, K. Svobodová, R. Pantůček, P. Petráš, D. Čejková, J. Doškař

**P 03. Penetrace hyf *Serpula lacrymans* (dřevomorka domácí) zdivem činžovního domu: případ Praha Vršovice**

J. Gabriel, K. Švec

**P 04. Composition, functional diversity and genetic determinants of resistance in the chicken caecum microbiota after antibiotic treatment**

D. Marosevic, J. A. Frank, M. Kaevska, Z. Jaglic

**P 05. Genetic background of MLS<sub>B</sub> and tetracycline resistance in livestock associated Enterococci from Czech Republic**

D. Marosevic, M. Kaevska, Z. Jaglic

**P 06. Dlouhodobá studie prevalence protilátek proti vybraným zoonotickým patogenním mikroorganismům v populaci hlodavců**

A. Cvrček, A. Žáková, J. Janeček, N. Nádeníčková, B. Švejdová, H. Nejezchlebová

**P 07. Identifikace bakterií v polymikrobiálních vzorcích pomocí analýzy délky terminálních restričních fragmentů**

T. Mráčková, H. Obručová, I. Kotásková, V. Holá, F. Růžička, T. Freiburger

**P 08. Stanovenie mikroorganizmov čeľade *Enterobacteriaceae* v surovom mlieku na princípe detekcie spotreby kyslíka**

V. Lehotová, M. Petruľáková, Ľ. Valík

**P 09. Vliv mléčných oligosacharidů na střevní bakterie**

R. Švejtil, K. Sochorová, H. Jiroušková, V. Rada

**P 10. Mutagenesis of the immunomodulatory M3 protein of MHV-68 reveals residue essential for interaction with CCL5 and CXCL8 chemokines**

R. Matůšková, P. Belvončíková, M. Kúdelová

**P 11. Infectious dose of Murine gammaherpesvirus 68 in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia**

M. Jánošová, M. Vrbová, P. Belvončíková, M. Slovák, M. Kúdelová

**P 12. Heme arginate as a latency reversing agent for HIV cure**

M. Madlenakova, P. Shankaran, V. Hajkova, Y. Fujikura, D. Jilich, J. Belacek, Z. Melkova

**P 13. Štúdium cytotoxického a antiherpetického účinku prírodných látok**

M. Pospíšilová, K. Briestenská, J. Mistríková

**P 14. Bronchoskopické obrazy ventilátorové pneumonie pacientů s toxickou epidermální nekrolýzou**

J. Holoubek, B. Lipový, H. Řihová, I. Suchánek

**P 15. Effect of indole acetic acid derivatives on viability of pancreatic INS-1E cell line injured by methylglyoxal**

S. Micháliková, J. Viskupičová, M. Štefek, M. Májecková

**P 16. Soil yeasts and their killer activity**

H. Dudášová, R. Vadkertiová

**P 17. Vplyv myšieho gamaherpesvírusu 68 ožiareného ultrafialovým svetlom na normálne a transformované bunky**

V. Mrázová, M. Mikušová, M. Vrbová, E. Nováková, M. Šupolíková, F. Golais

**P 18. Use of Raman spectroscopy for identification of staphylococci**

K. Rebrošová, F. Růžička, O. Samek, M. Šiler, P. Petráš, J. Sokolová, V. Holá

		9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00	17:00
8.6.	Sál 1		Z Eugene Rosenberg	Nejlepší mladi mikrobiologové	VH	Oběd	Klinická mikrobiologie	P	Antimikrobiální rezistence, faktory virulence	

9.6.	Sál 1	Mykologie	Prionové infekce	Veterinární mikrobiologie	Slavnostní zakončení
	Sál 2	Mikrobiologie potravin a biotechnologie I	Mikrobiologie potravin a biotechnologie II	P	
	Sál 3			Poster session	

Z = Slavnostní zahájení, začátek valné hromady ČSSM

VH = Valná hromada ČSSM

P = Přestávka

## **Microbiota of Plants, Animals and Humans: Hologenome Concept of Evolution**

Eugene Rosenberg (1)

(1) Professor Emeritus, Department of Molecular Microbiology & Biotechnology, Tel Aviv University, Israel

The hologenome concept of evolution postulates that the holobiont (host + symbionts) with its hologenome (host genome + microbiome) is a level of selection in evolution. Multicellular organisms can no longer be considered individuals by the classical definitions of the term.

Every natural animals and plant is a holobiont consisting of the host and diverse symbiotic microbes and viruses. Microbial symbionts can be transmitted from parent to offspring by a variety of methods, including cytoplasmic inheritance, coprophagy, direct contact during and after birth, and via the environment. A large number of studies have demonstrated that these symbionts contribute to the anatomy, physiology, development, innate and adaptive immunity, behavior and finally also to genetic variation and to the origin and evolution of species. Acquisition of microbes and microbial genes is a powerful mechanism for driving the evolution of complexity. Evolution proceeds both via cooperation and competition, working in parallel.

# 01. Distribuce a charakteristika *Listeria monocytogenes* v České republice

T. Gelbíčová (1)

(1) Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, CZ

*Listeria monocytogenes* je původcem závažného alimentárního onemocnění s vysokou mírou mortality. V současnosti je v členských státech Evropské unie, včetně České republiky, zaznamenáván stoupající trend ve výskytu humánních listerióz. Na vzniku listerióz se podílí zejména konzumace potravin k přímé spotřebě.

Izoláty *L. monocytogenes* byly charakterizovány na základě serotypizace, makrorestrikční analýzy, zařazení do klonálních komplexů metodou PCR, PCR detekce vybraných faktorů virulence, sekvenace genu *inlA* a *inlB*, MLST (multilocus sequence typing) a celogenomového sekvenování (WGS).

V České republice se u lidí i potravinách nejčastěji vyskytuje *L. monocytogenes* serotypu 1/2a, klonálního komplexu CC8. Od roku 2012 byla většina humánních kmenů izolována ze sporadických případů listerióz. Molekulárními metodami byla potvrzena jedna epidemie listeriózy probíhající v letech 2012 až 2016, která se podílela na zvýšení počtu případů tohoto onemocnění v Moravskoslezském kraji.

S ohledem na distribuci výskytu či odlišné genetické charakteristiky určitých serotypů či klonálních komplexů je diskutována otázka rozdílné virulence u *L. monocytogenes*. Kmeny klonálních komplexů CC121 (serotyp 1/2a) a CC9 (serotyp 1/2c) je možné izolovat především z potravin a potravinářských podniků, přesto i tyto kmeny mají schopnost vyvolat onemocnění u lidí. Všechny testované kmeny *L. monocytogenes* serotypu 1/2c izolované z potravin i od lidí nesly mutaci kódující předčasný terminační kodon v genu *inlA*. V sekvenci genu *inlB* nebyly zjištěny žádné změny, které by mohly vést k expresi zkráceného internalinu B. Testované kmeny rovněž nesly další geny podílející se na adhezenci a invazivitě *L. monocytogenes* k hostitelským buňkám.

Přestože všechny kmeny *L. monocytogenes* na základě fenotypu vykazovaly citlivost k testovaným antimikrobiálním látkám, sekvenací byla odhalena přítomnost inserce IS1542 v genu *inlA* u kmene z kuřecího masa prokazující možnost přenosu mobilních genetických elementů spojovaných s antimikrobiální rezistencí.

Data získaná na základě WGS umožňují nejen zlepšení v confirmaci epidemií listerióz, ale současně poskytují také informace o genetických faktorech podílejících se na virulenci, rezistenci k antimikrobikům, dezinfekčním prostředkům, či perzistenci bakterií.

## 02. Faktory virulence a rezistence k antibiotikům u *Arcobacter* spp.

D. Šilha (1), B. Vacková (1), L. Šilhová (1)

(1) Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice, CZ

### Úvod

Bakterie rodu *Arcobacter* patří do čeledi *Campylobacteraceae*. Tyto bakterie mohou způsobovat onemocnění gastrointestinálního traktu, v některých případech se závažným klinickým obrazem. Doposud byly v literatuře v souvislosti s arkobakteriózou popsány druhy *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. thereius*.

### Metodika

U izolovaných arkobakterů (n=100) byla sledována citlivost k 18 antibiotikům (*AK30*, *AMC30*, *AMP10*, *ATM30*, *KF30*, *C30*, *CIP5*, *DA2*, *DO30*, *ENR5*, *E15*, *CN10*, *NA30*, *OX1*, *P10*, *S10*, *TE30*, *TOB10*), a to diskovou difúzní metodou. Bakteriální suspenze ( $10^8$  CFU/ml) byla připravena z čerstvé kultury a inokulována na Mueller-Hinton agar s 5 % koňské krve a 20 mg/l  $\beta$ -NAD (bioMérieux, Francie). Antibiogramy byly hodnoceny pomocí automatického analyzátoru BACMED 6iG2 (Aspiag, ČR), popř. kalibrovaným měřidlem. Klasifikace výsledků byla provedena na základě CLSI standardů a předchozích publikací.

Detekce 8 genů majících vztah k faktorům virulence (*cadF*, *ciaB*, *cj1349*, *irgA*, *hecA*, *hecB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*) byla provedena molekulárně-biologickou metodou *m*PCR s následnou elektroforetickou separací.

### Výsledky

Z testovaných kmenů arkobakterů byl pouze jediný kmen (1,0 %) citlivý na všechna testovaná antibiotika. U arkobakterů byla zaznamenána vysoká rezistence k aztreonamu (95,0 %), clindamycinu (97,5 %), ampicilinu (86,3 %) a kyselině nalidixové (88,8 %). Celkově nejvíce arkobakterů bylo rezistentních k  $\beta$ -laktamovým ATB. Multirezistence byla zaznamenána dokonce u 93,8 % izolátů *A. butzleri* a 70,0 % *A. cryaerophilus*.

Virulenční faktory byly sledovány u 76 kmenů arkobakterů, z nichž u 96,1 % byl detekován gen *ciaB*, 71,1 % *cj1349*, 76,1 % *pldA*, 11,8 % *irgA*, 26,3 % *hecA*, 82,9 % *tlyA*, 94,7 % *mviN* a u 26,3 % *hecB*.

### Závěr

Arkobaktery jsou velmi často přítomny ve vzorcích masa, vod a mořských plodů. Jejich potenciál způsobit onemocnění byl již popsán, zejména u některých druhů. Dle výsledků této studie se ukazuje, že doposud známé faktory virulence jsou významně zastoupeny v genomu těchto izolátů. Výše uvedené výsledky studie potvrzují vysokou rezistenci těchto bakterií k ATB.

Tato práce vznikla za finanční podpory projektu SGFChT 07/2017.

### 03. Arbovírusové infekcie vo vektoroch a zvieratách

T. Csank (1), P. Drzewnioková (1), L. Korytár(1), P. Major (1), J. Čurlík (1), P. Lazar (1), E. Bocková (1), B. Vargová (2), V. Majláthová (2), I. Majláth (3), M. Gyuranecz (4), T. Bakonyi (5), J. Pisl (1)

(1) Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, SK

(2) Parazitologický ústav, SAV, Košice, SK

(3) Prírodovedecká fakulta, UPJŠ, Košice, SK

(4) Veterinársky výskumný ústav, Maďarská akadémia vied, Budapešť, HU

(5) Univerzita veterinárskeho lekárstva, Budapešť, HU

Arbovírusy (arthropod-borne virus) sú vírusy prenášané článkonožcami (vektormi), ktoré spôsobujú niekoľko významných vektormi prenášaných chorôb človeka a zvierat. Na našom území sa vyskytujú komármi (napr. vírus Západného Nílu – WNV a vírus Usutu – USUV), ako aj kliešťami prenášané arbovírusy (napr. vírus kliešťovej encefalitídy – TBEV a vírus Tribeč – TRBV). Rezervoármi WNV a USUV sú vtáky; TBEV a TRBV sú udržiavané v prostredí pomocou hlodavcov. Cicavce, vrátane človeka sú koncovými hosťiteľmi. V našej štúdii sme sa zamerali na výskyt týchto arbovírusov v ich vektoroch a hosťiteľoch – zvieratách na území Slovenska.

Vírusovú RNA WNV a USUV sme vo vyšetrovaných komároch nedokázali. TBEV a TRBV boli zaznamenané v kliešťoch *I. ricinus*. TBEV sekvencie sme zaznamenali v číhajúcich kliešťoch v oblastiach Slovenského krasu. V lokalite Prešov – Dúbrava sme v kliešťoch *I. ricinus* odobraných z pasúcich sa kôz dokázali TBEV aj TRBV. TRBV sme izolovali na bunkovej kultúre Vero E6. Sekvenčná analýza všetkých TBEV ukázala príbuznosť s endemickými kmeňmi Hypr a Neudoerfl; v prípade TRBV sa jednalo o príbuznosť s prototypovým kmeňom Tribeč izolovaným na Západnom Slovensku v 60-tych rokoch.

Celkové (ELISA) a neutralizačné protilátky (nAb; VNT) voči WNV u voľne žijúcich vtákov a vtákov žijúcich v zajatí sme dokázali vo ôsmich okresoch Slovenska s najvyššou prevalenciou u dravcov. USUV nAb boli zaznamenané len v jednom prípade, u sýkorky. U hospodárskych zvierat (kone, kozy, ovce, hovädzí dobytok) boli nAb dokázané voči WNV, TBEV aj TRBV. Sérologická diagnostika flavivírusových infekcií je obtiažná, nakoľko sú časté skrížené reakcie. U koní sme zaznamenali v prípade ELISA skríženú reakciu, avšak pomocou neutralizačného testu sme boli schopní odlíšiť WNV od TBEV infekcie. U vtákov bola WNV RNA dokázaná v orálnych a kloakálnych výteroch a v mozgoch. Pomocou sekvenčnej analýzy sme dokázali prítomnosť línie 1 a línie 2 WNV.

Detekcia a predikcia aktivity arbovírusov v populácii vektorov a v hosťiteľoch hrá nezastupiteľnú úlohu v ich efektívnej kontrole. Prispieva k presnej terapii a včasnému varovaniu v prípade potenciálnej, respektíve včasnej epidémie, kontrole vektorov a pri plánovaní preventívnych, alebo vakcinačných programov.

Podakovanie: práca bola podporená grantmi VEGA 1/0729/16 a ITMS kód: 26220120002 (INFEKTZOON)

#### **04. Kazuistika. Nečekaný původce sepse u jinak zcela zdravého pacienta.**

J. Závora (1), V. Adámková (1), L. Kupidlovská (1)

(1) Klinická mikrobiologie a antibiotické centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ

Atypičtí, obzvláště pomalu a špatně rostoucí původci sepse jsou často velkým oříškem pro laboratoř klinické mikrobiologie. Kultivace je zdlouhavá či nemožná a to platí i pro vyšetření citlivosti bakterií na antibiotika. Často se takové agens nedá identifikovat bez použití metod molekulární biologie, ke kterým ovšem nemá každá laboratoř přístup. Identifikace je přitom jedním z hlavních faktorů braných v potaz při rozhodování o správné antibiotické terapii. U pacienta se sepsí to může znamenat záchranu života.

Prezentuji případ 56-letého muže, u kterého se z plného zdraví vyvinul septický šok s multiorgánovým selháním. Pacient byl bez komorbidit a závažných rizikových faktorů. Na pacientově prstě se nacházel drobný, téměř zhojený defekt bez otoku či zarudnutí, který byl označen za psí kousnutí. Stav pacienta se prudce zhoršoval a bylo nutné nasadit kombinaci širokospektrých antibiotik.

Po šesti dnech od hospitalizace pacienta byla pomocí metody PCR bakterie identifikována jako *Capnocytophaga canimorsus*. Je to pleomorfní, pomalu rostoucí, gram-negativní tyčka, součást běžné flóry ústní dutiny psů a koček. Považuje se za potenciálně patogenní obzvláště u cirhotiků, alkoholiků, asplenických či jinak imunokompromitovaných pacientů. Kromě sepse může ještě způsobit meningitidu, osteomyelitidu, peritonitidu či endokarditidu.

I přes včasné nasazení antibiotik se u pacienta v průběhu onemocnění vyvinulo mnoho komplikací, které významně prodloužily jeho pobyt v nemocnici a vedly k trvalým následkům na pacientově zdraví.



## 05. Štúdium baktérií *Cronobacter* spp. v klinických vzorkách, ich identifikácia a typizácia

V. Belanová (1), A. Lichvariková (1), K. Šoltýs (1), H. Drahovská (1)

(1) Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, SK, belanova@fns.uniba.sk

(2) Vedecký park UK, Ilkovičova 8, 842 16 Bratislava, SK

*Cronobacter* spp. je Gram-negatívny, fakultatívne anaeróbny oportunistický patogén patriaci do čeľade *Enterobacteriaceae*. U novorodencov spôsobuje život ohrozujúce infekcie ako nekrotizujúca enterokolitída, meningitída či sepsa, pričom prevažná väčšina týchto infekcií je spojená s konzumáciou kontaminovanej sušenej dojčenskej výživy. Riziko infekcie je vyššie aj u starších ľudí a imunodeficientných pacientov. Výskyt kmeňov tohto rodu u zdravých ľudí doposiaľ nie je podrobne preskúmaný. Šírenie baktérií rodu *Cronobacter* v prostredí podporuje ich vysoký stupeň tolerancie voči rôznym typom environmentálnych stresov, čo značne komplikuje ich elimináciu. Cieľom predkladanej práce bolo stanoviť prevalenciu kmeňov *Cronobacter* u hospitalizovaných pacientov a analyzovať izolované kmene molekulárno-biologickými metódami. Klinické vzorky boli odobraté 400 pacientom v rokoch 2015-2016 na rôznych klinikách LF UK. Kultivačnými technikami a metódami PCR a MALDI-TOF sme identifikovali a typizovali 18 kmeňov *Cronobacter*, čo predstavuje 4,5% prevalenciu. Kmene patrili k druhom *C. sakazakii* (štyri kmene sérotypu CS O:1 a 12 kmeňov sérotypu CS O:2) a *C. malonicus* (dva kmene sérotypu CMa O:2), čo je v súlade s preferenčným výskytom druhu *C. sakazakii* v klinických vzorkách. Celogenómové sekvenovanie sme uskutočnili na platforme Illumina s využitím Nextera knižníc, sekvencie sme zložili pomocou programov Spades a CLC Bio a anotovali pomocou programu Rast. Na základe celogenómových sekvencií sme izoláty zaradili do troch MLST typov (dva kmene patrili k ST 515, jeden kmeň k ST 514 a 10 kmeňov patrilo k ST 513) a troch klonálnych komplexov (12 kmeňov patrilo ku klonálnemu komplexu 4, dva kmene ku klonálnemu komplexu 7 a jeden kmeň bol zaradený ku klonálnemu komplexu 8). Klonálny komplex 4 predstavuje najvirulentnejší typ spomedzi baktérií rodu *Cronobacter* a je najčastejšie spájaný s infekciami novorodencov a dospelých. Tieto poznatky korešpondujú s množstvom zachytených a identifikovaných klinických kmeňov v našej štúdií. Kmene so sekvenčným typom 513 boli na príslušnom oddelení izolované pri opakovaných odberoch počas rokov 2015 a 2016, čo naznačuje, že tieto izoláty tu pretrvávajú.

Získané poznatky prispejú k pochopeniu šírenia, výskytu a perzistencie kmeňov *Cronobacter*.

### PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektu Univerzitný vedecký park Univerzity Komenského v Bratislave, ITMS 26240220086.

## 06. Sledování výskytu gramnegativních bakterií produkujících karbapenemázy ve Fakultní nemocnici v Hradci Králové

R. Kukla (1), R. Bolehovská (2), L. Plíšková (2), L. Ryšková (1), H. Žemličková (1, 3)

- (1) Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové
- (2) Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové
- (3) Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav Praha

### Úvod

Mezi nejčastější bakterie produkující karbapenemázy patří *Pseudomonas aeruginosa* a *Acinetobacter* sp. V současnosti dochází k nárůstu producentů karbapenemáz také u druhů z čeledi *Enterobacteriaceae*, zejména u *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* a dalších. Karbapenemázy svou schopností enzymaticky hydrolyzovat většinu beta-laktamových antibiotik včetně karbapenemů výrazně snižují léčebné možnosti závažných infekcí. Karbapenemázy se obecně dělí na serinové beta-laktamázy - typy KPC, OXA-48 a metalo-beta-laktamázy - typy IMP, VIM a NDM.

### Metodika

U kmenů z čeledi *Enterobacteriaceae* s MIC meropenemu > 0,125 mg/l (n = 45) nebo s inhibiční zónou < 25 mm a *Pseudomonas aeruginosa* s MIC meropenemu > 2 mg/l nebo s inhibiční zónou < 24 mm (n = 103) byly provedeny fenotypové testy pro zjištění přítomnosti karbapenemáz (detekce hydrolýzy meropenemu – β CARBA test a MALDI-TOF MS; průkaz synergie v přítomnosti inhibitorů karbapenemáz). Produkce karbapenemáz byla potvrzena PCR průkazem genů pro tyto enzymy (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>). Uvedené kmeny byly sbírány od roku 2016 do současnosti.

### Výsledky

Ze 103 kmenů *Pseudomonas aeruginosa*, byla u 21 (20,4 %) zjištěna produkce karbapenemáz. Metodou PCR byly u 20 prokázány *bla*<sub>IMP</sub> geny, u jednoho *bla*<sub>VIM</sub>. U druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* (n = 45) byla produkce karbapenemázy prokázána u 9 (20,0 %) kmenů. Jednalo se o 4 kmeny *Klebsiella pneumoniae*, 2 kmeny *Citrobacter freundii* a 1 kmen *Escherichia coli*, *Morganella morganii* a *Proteus mirabilis*. U všech kmenů jsme metodou PCR prokázali *bla*<sub>KPC</sub> gen.

### Závěr

Vzhledem k narůstající incidenci multi-rezistentních bakterií je nutné disponovat metodami pro jejich detekci. Včasná a správná diagnostika bakteriálních kmenů produkujících karbapenemázy je nezbytná pro provádění preventivních opatření a k zamezení šíření těchto mikroorganismů ve zdravotnických zařízeních.

## 07. Detekce produkce Panton-Valentinova leukocidinu u recidivujících stafylokokových infekcí

K. Habalová (1), R. Kračmarová (2)

(1) Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

(2) Klinika infekčních nemocí, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Perzistentní nosičství *Staphylococcus aureus* na nosní sliznici je přítomno u 30 % zdravé populace, transientní kolonizace se popisuje až u 70 % lidí. Dalšími častými místy kolonizace jsou kůže, perineum a hltan. *S. aureus* vyvolává hnisavá onemocnění kůže a jejich adnex a purulentní komplikace ran a popálenin. Je příčinou osteomyelitidy, artritidy i akutní endokarditidy. Zejména u imunitně oslabených, predisponovaných jedinců může způsobit bakteriémií a sepsi. Závažným terapeutickým problémem jsou kmeny rezistentní k meticilinu (MRSA) a kmeny intermediálně citlivé nebo zcela rezistentní k vankomycinu (VISA, VRSA).

*S. aureus* produkuje řadu exotoxinů. Dle typu toxinu mohou toxigenní kmeny způsobovat specifická onemocnění, např. enterotoxikózu, syndrom toxického šoku nebo puchýřnaté dermatitidy typické pro dětský věk. Panton-Valentinův leukocidin (PVL) je stafylokokový cytotoxin, který způsobuje lýzu neutrofilů a makrofágů tím, že v jejich membráně tvoří póry. Zabraňuje tak účinné imunitní odpovědi těchto fagocytárních buněk. Izoláty produkující PVL vyvolávají nejčastěji recidivující hnisavá onemocnění (abscesy, furunkly, karbunkly a nekrotické kožní léze) u dětí a mladších dospělých a zpravidla se vyskytují u komunitních infekcí. Závažná nekrotizující pneumonie je méně častá, ale nezřídka končí letálně i u mladých, dosud zdravých osob.

Udává se, že PVL produkuje přibližně 2% kmenů *S. aureus*. Ve státech Severní Ameriky je produkce PVL popisována především u komunitních, meticilin-rezistentních kmenů *S. aureus* (CA-MRSA). V Evropě spíše převládají kmeny k oxacilinu citlivé (MSSA).

Průkaz produkce PVL u kmene *S. aureus* je možný přímo, metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). V této práci byla použita metoda multiplex PCR k současnému průkazu genů pro PVL, *mecA* a *mecC* (průkaz genů meticilinové rezistence) u izolátů *S. aureus* získaných od ambulantních i hospitalizovaných pacientů v období let 2014 – 2016, kteří byli léčeni pro recidivující stafylokokové kožní infekce. V závěru je celá problematika shrnuta na kazuistice z klinické praxe.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu 2017 - SVV 260 398.

## 08. Efektívny manažment pacienta s infekciou respiračného traktu

M. Šefranková (1)

(1) Klinická mikrobiológia, Alpha medical, Ružomberok, SK

Za jeden z najvýznamnejších objavov minulého storočia sa považuje objav nových antibiotík, ktorý odštartoval v roku 1928 Alexander Fleming. Hovorí sa aj o zlatom veku antibiotík. Od deväťdesiatych rokov minulého storočia došlo k explozívnomu nárastu rezistencie mikrobiálnych patogénov na väčšinu antimikrobiálnych liečiv. Farmaceutický priemysel pomaly reaguje na vývoj rezistencie. Za posledných 10 rokov priniesol na trh len 5 významných antibiotík. Rezistencia sa stala obrovským problémom, ktorému sa venuje celosvetová pozornosť na úrovni vlád niektorých štátov a nadnárodných organizácií, ako sú EÚ a WHO. Na Slovensku sleduje tieto údaje SNARS - databáza obsahujúca dáta o citlivosti baktérií. V snahe predchádzať alarmujúcemu nárastu je teda nevyhnutné pristupovať k efektívnemu manažmentu pacienta s infekčným ochorením. Ak to zdravotný stav dovoľuje, urobiť odber biologického materiálu na mikrobiologické vyšetrenie a následne pristúpiť k racionálnej ATB terapii. Jeden z najvýznamnejších faktorov, ktorý môže vo veľkej miere ovplyvniť spotrebu ATB je stanovenie C - reaktívneho proteínu. Aj podľa odborného usmernenia Ministerstva zdravotníctva SR o štandardnom diagnostickom postupe pri indikácii antibiotík je stanovenie CRP jeho súčasťou. V snahe monitorovať praktizovanie tohto usmernenia som oslovila 100 lekárov formou dotazníka. Jeho predmetom bolo, či daná ambulancia disponuje zariadením na detekciu CRP, do akej miery ho lekár vyšetruje, aké sprievodné vyšetrenia indikuje, aké ATB preferuje a aký je dopyt po ATB zo strany pacienta. Prístroj na stanovenie CRP má 80 %. Jednoznačne ho však využíva len 23 % a to i napriek tomu, že dané vyšetrenie je všetkými tromi zdravotnými poisťovňami hradené z verejného zdravotného poistenia. 50 % lekárov konštatovalo, že pred zahájením ATB terapie indikuje laboratórne vyšetrenia, neuviedli však konkrétne.  $\beta$  - laktámové ATB preferuje 35 %, makrolidy 11 % a až 27 % lekárov inklinuje k širokospektrálnym. Z prieskumu vyplynulo, že takmer polovica pacientov sa dožaduje ATB liečby a to aj napriek neodporúčaniu lekárom. K eliminovaniu nárastu rezistencie napomáha správna antibiotická politika. Stanovenie citlivosti signifikantného bakteriálneho pôvodcu na antibiotiká je jednou z najdôležitejších činností laboratórií klinickej mikrobiológie. Všetky laboratóriá klinickej mikrobiológie spoločnosti Alpha medical, stanovujú citlivosť okrem kvalitatívnej aj kvantitatívnu metódou a to pomocou špičkového automatizovaného systému Vitek. Zariadenie okrem stanovenia citlivosti deteguje aj mechanizmy rezistencie testovaného bakteriálneho kmeňa, čo je jeho významnou devízou. Výsledky testov citlivosti sú interpretované a každoročne aktualizované podľa medzinárodnej antibiotickej smernice EUCAST. K zvráteniu hrozivého trendu narastúcej rezistencie je rovnako veľmi potrebná edukácia odbornej a laickej verejnosti.

Kľúčové slová: antibiotiká, rezistencia, C – reaktívny proteín, odborné usmernenie, edukácia

## 09. Izolace a antimikrobiální aktivita laktobacilů vaginálního mikrobiomu těhotných žen

M. Kumherová (1), K. Bialasová (1), M. Kosová (1), J. Šmidrkal (1), P. Junková (2), J. Mašata (3)

- (1) Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CZ;
- (2) Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CZ;
- (3) Gynekologicko-porodnická klinika, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice, Praha, CZ

Vaginální mikrobiom zdravých žen je dynamicky se měnícím ekosystémem. U zdravých těhotných žen bývají dominantními bakterie rodu *Lactobacillus*. Mezi nejčastěji vyskytující se druhy patří *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* a *L. jensenii*. Laktobacily vaginálního traktu jsou pro svého hostitele důležité především z ochranného hlediska. Ochranná funkce vaginálních laktobacilů je založena na dvou mechanismech – specifická adheze k epitelu a produkce antimikrobiálních látek (organické kyseliny, peroxid vodíku, bakteriociny). Abnormální složení a přítomnost vaginální infekce v prvním trimestru těhotenství může vést k předčasnému porodu či nízké porodní váze novorozence. Z výše uvedeného lze říci, že znalost biologie a metabolické aktivity vaginálních laktobacilů je výchozím bodem pro prevenci a léčbu vaginálních infekcí.

Cílem práce bylo charakterizovat zastoupení laktobacilů ve vaginálním mikrobiomu těhotných žen a vybrat antimikrobiálně aktivní kmeny vhodné pro případnou aplikaci do vaginálního traktu pro prevenci infekcí. Laktobacily byly izolovány z vaginálních stěrů od 33 těhotných žen z ČR. Stěry byly dodány Gynekologicko-porodnickou klinikou 1. LF UK. Stěry byly vytřepány do bujónu de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) s následným zaočkováním ploten (agar MRS, krevní agar). Po kultivaci byla provedena základní identifikace (mikroskopický obraz, katalasový test). Získané čisté kultury byly identifikovány pomocí PCR (sekvenace genu 16S rRNA) a pomocí MALDI-TOF MS. U izolátů laktobacilů byla testována antimikrobiální aktivita vůči sbírkovým kmenům (*E. coli* CCM 4517, *E. coli* CCM 4787, *S. aureus* CCM 4516, *C. albicans* CCM 8215) pomocí agarové vpichové metody.

Bylo zjištěno, že se laktobacily vyskytovaly ve 25 (76 %) stěrech těhotných žen. Nejčetněji zastoupeným druhem byl *L. crispatus* (52 %). Dále byly identifikovány následující druhy: *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. jensenii*, *L. rhamnosus*, *L. iners*, *L. casei* a *L. plantarum*. Také bylo zjištěno, že většina kmenů vykazovala antimikrobiální aktivitu vůči testovaným patogenům. Nejvyšší antimikrobiální aktivitu vykazoval *L. fermentum* a *L. rhamnosus* vůči všem testovaným patogenům. Schopnost antimikrobiální inhibice byla kmenově specifická.

Práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 20-SVV/2017).

## **10. Rezistence kmenů *Escherichia coli* z vaginálních výtěrů u těhotných pacientek – retrospektivní sledování těhotných pacientek od srpna 2016 do prosince 2016 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze.**

A.Vaňková (1), V. Adámková (1), L. Kupidlovská (1)

(1) Klinická mikrobiologie a antibiotické centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ

*Escherichia coli* je jedna z nejčastějších bakterií kolonizujících pochvu u těhotných i netěhotných pacientek. Přítomnost *Escherichia coli* v hrdle děložním a pochvě u těhotných je spojena se zvýšeným rizikem novorozeneckých a mateřských komplikací. Infekce může progredovat až do obrazu fetální sepse. V případech, kdy je nutné podání antibiotik se v klinické gynekologické praxi používají aminopeniciliny – ampicilin a amoxicilin/klavulanát, při těžších infekcích a z vitálních důvodů pak aminoglykosid gentamicin. Pro pacientky, které jsou alergické na peniciliny je vhodný cefalosporin druhé generace- cefuroxim. Vyšetření citlivosti na *E. coli* se provádí vzhledem ke vzrůstající rezistenci na ampicilin. Tento screening rezistence se využívá při případné antibiotické profylaxi u rizikových skupin rodiček nebo následné léčbě novorozeneckých infekcí.

Ve svém projektu jsem hodnotila kultivační nálezy *Escherichia coli* v pochvě v období srpen 2016 až prosinec 2016 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze. Použité byly klasické kultivační metody a disková difúzní metoda pro zjištění citlivosti antibiotik. Sledovala jsem citlivost kmenů na ampicilin, amoxicilin/klavulanát, cefuroxim a gentamicin.

Pracovala jsem se souborem čítajícím 1267 žen, z toho 745 byly pacientky s rizikovým těhotenstvím a 522 pacientek mělo normální průběh těhotenství. Ve skupině rizikových pacientek bylo kultivačně zjištěno 107 případů *Escherichia coli* v pochvě. Převládala rezistence na ampicilin. Z nich byla většina kmenů – 37 % rezistentních na ampicilin. Ve skupině nerizikových pacientek bylo kultivačně zjištěno 56 případů *E.coli* ve vaginálních výtěrech. V této skupině také převládala rezistence na ampicilin a to ve 14 procentech.

Záchyt *Escherichia coli* u těhotných pacientek nabývá na významu, vzhledem ke vzrůstající incidenci časně se vyskytujících závažných infekcí novorozenců způsobených právě touto bakterií. Rychlá diagnostika a terapie jsou klíčové v prevenci novorozeneckých infekcí.

## 11. Studium vaginálního mikrobiomu metodou sekvenování nové generace

Z. Uhlířová (1), L. Plíšková (2), R. Bolehovská (2), V. Buchta (1)

(1) Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, CZ

(2) Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové, Hradec Králové, CZ

Lidský mikrobiom představuje společenství všech mikroorganismů osídlujících zevní a vnitřní integumenty člověka. Složení, diverzita a dynamika jednotlivých mikrobiomů se liší a je do značné míry charakteristická. Zatímco centrální roli pro zdraví a v nemoci hraje střevní mikrobiom, pro reprodukci je klíčová poševní mikrobiota. Za fyziologického stavu se vaginální mikrobiota kavkazské populace skládá typicky z bakterií rodu *Lactobacillus*. Pod vlivem různých přirozených (menstruace) a nepříznivých faktorů (antibiotika) mohou být laktobacily nahrazeny anaerobními bakteriemi a vyvolávat více či méně trvající dysbiotický stav. Nejčastěji se takový stav prezentuje jako bakteriální vaginóza, charakterizovaný vysokým podílem bakterií *Prevotella* spp., *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp., *Sneathia* spp., *Atopobium vaginae*, který zvyšuje riziko nákazy pohlavně přenosnými nemocemi ale také různých porodnických komplikací, např. předčasného porodu.

Sekvenování nové generace (MPS – masivní paralelní sekvenování) umožňuje sekvenovat velké množství vzorků najednou a tím analyzovat daný mikrobiom. Příprava knihovny obnáší amplifikaci bakteriální DNA (pro analýzu byla vybrána hypervariabilní oblasti V4/V5 genu společného všem bakteriím 16S rRNA), označení ampliconů značkami pro zpětné rozlišení, přečištění, kvantifikaci a poolování produktů. Výsledkem každého běhu je velké množství sekvenačních dat, které následně zpracovává bioinformatik.

Cílem práce bylo získat informace o spektru bakterií ve vaginálním mikrobiomu pomocí MPS na přístroji Illumina MiSeq u vybrané skupiny pacientek s chronickým vulvovaginálním dyskomfortem. Soubor obsahoval téměř sto párových vzorků od pacientek na Porodnické a gynekologické klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové. U sledované skupiny pacientek byly nejvíce zastoupeny druhy *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* a *L. johnsonii*. Dále byly přítomny *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus agalactiae* a i zástupci z řádu *Bacteroidales*, *Clostridiales*.

Metoda MPS s využitím přístroje Illumina MiSeq umožnila zjistit větší druhovou rozmanitost a komplexnost mikrobiomu oproti klasické mikrobiální kultivaci, včetně identifikace kultivačně náročných organismů.

Práce byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-29225A.

## 12. Tvorba biofilmu jako faktor virulence u *Propionibacterium acnes*

P. Muchová (1), F. Růžička (1,2)

(1) Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(2) Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno, CZ

### Úvod:

*Propionibacterium acnes* je grampozitivní fakultativně aerobní tyčinka, která je běžným komenzálem kůže. Všeobecně je tato bakterie známá kvůli svému podílu na tvorbě akné. Mimo jiné se však ukazuje jako nezanedbatelný původce systémových infekcí po lékařské intervenci (záněty chlopních náhrad, infekce po kloubních operacích a infekty jiných implantovaných materiálů). Jedním z předpokládaných faktorů virulence kmenů *P. acnes* je schopnost tvořit biofilm. Tato vlastnost znamená pro bakterie výhodu, pevná adhezivní vrstva lépe snáší mechanické vlivy a rovněž biofilm lépe odolává antibiotické terapii.

### Metodika:

Testováno 48 kmenů od pacientů s invazivní infekcí *Propionibacterium acnes* izolované z klinického materiálu na Mikrobiologickém ústavu Fakultní nemocnice u sv. Anny a 48 kmenů izolovaných z kožních stěrů zdravých dobrovolníků. Kmeny od zdravých dobrovolníků byly získány setřením kůže v oblasti šíje. Všechny kmeny byly identifikovány na základě charakteristického růstu a pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI TOF (Bruker) v programu.

Tvorba biofilmu byla zjišťována pomocí Christensenovy metody a měřením metabolické aktivity biofilmu roztokem resazurinu (Sigma Aldrich).

### Výsledky:

Tvorba biofilmu se prokázala u klinických izolátů (44/48), z toho u 10 kmenů se jednalo o intenzivní tvorbu. U vzorků od zdravých dobrovolníků se jako biofilm pozitivní jeví 18 kmenů, z toho ani jeden silně. Rozdíl mezi skupinami kmenů byl porokázán na hladině významnosti  $p < 0,001$ .

### Závěr:

Kmeny izolované z klinického materiálu mají vyšší tendenci k tvorbě kvalitnějšího biofilmu oproti kontrolní skupině kožních izolátů. Zastoupení biofilm neformujících kmenů mezi klinickými izoláty lze vysvětlit kontaminací při odběru. Analyzované množství kmenů bude zdvojnásobeno a podrobena výzkumu dalších faktorů virulence (rozdílné hemolyzační vlastnosti).

### Poděkování:

Práce byla podpořena projektem MUNI/A/0955/2016



### **13. Možnosti fluorometrického stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace v klinické praxi**

K. Poláková (1), L.Vacek (1,2)

(1) Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(2) Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny a Lékařské fakulty Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Biofilm představuje značný problém zvláště v nemocničních zařízeních, kde je příčinou až 65 % nozokomiálních nákaz. Tyto infekce vedou k závažným stavům, které pacienty ohrožují na životě z důvodu zvýšené rezistence biofilmu k antibiotikům. Koncentrace antibiotika nutná k eradikaci biofilmu je totiž o několik řádů vyšší než u planktonní formy.

Z tohoto důvodu je nutné stanovit hodnoty MBEC, resp. MBIC pro bakterie žijící v biofilmu. Značný počet studií se zabývá problematikou zjišťování hodnoty MBEC, resp. MBIC u konkrétních kmenů mikrobů. K tomuto účelu je možné využít řadu metod, které se od sebe liší citlivostí, pracností i finanční a časovou náročností.

V této práci byly zvoleny dvě metody a jejich výsledky byly mezi sebou porovnávány a byla hodnocena jejich vzájemná korelace. Bylo zjištěno, že hodnoty získané metodou založenou na redukci resazurinu s následným stanovením relativní fluorescence korelují se zjištěnými počty kolonie tvořících jednotek ( $p < 0,001$ ).

Dále bylo zjištěno, že fluorescenčním stanovením redukce resazurinu není možné stanovit hodnotu MBEC kvůli nedostatečné citlivosti. Metoda je ovšem vhodná pro zjišťování hodnoty MBIC, v této práci byla použita a definována hodnota MBIC<sub>50</sub>. Naproti tomu metoda založená na stanovení počtu kolonie tvořících jednotek je vhodná jak pro stanovení hodnoty MBEC, tak i MBIC. Těmito metodami byla hodnocena účinnost antibiotik oxacilin a ciprofloxacin na růst bakterií *Staphylococcus aureus*, resp. *Escherichia coli* v biofilmu. Úplná eradikace nebyla prokázána ani v jednom z případů. Stanoveny byly pouze hodnoty MBIC, resp. MBIC<sub>50</sub>.

Výsledky měření mohou být použity pro další studii, která by si kladla za cíl stanovit hodnotu breakpointů pro daná antibiotika, a tím ověřila využitelnost závěrů této práce pro klinické použití.

## 14. Charakterizácia a fenotypizácia koliformných baktérií rezistentných voči antibiotikám izolovaných z nemocničných odpadových vôd

K. Lépesová (1), P. Olejníková (2), T. Mackuľak (3), L. Birošová (1)

(1) Oddelenie výživy a hodnotenia kvality potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava, SR

(2) Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava, SR

(3) Oddelenie environmentálneho inžinierstva, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava, SR

Zdravotnícke zariadenia zohrávajú dôležitú úlohu pri vzniku a šírení baktérií rezistentných voči mnohým antibiotikám (ATB), ktoré sa pomocou nemocničných odtokových vôd dostávajú do čistiarní odpadových vôd (ČOV). Spomedzi všetkých mechanizmov rezistencie u baktérií sa do popredia záujmu dostala produkcia širokospektrálnych  $\beta$ -laktamáz (ESBL) a AmpC schopných hydrolyzovať ATB penicilínového typu, ako aj monobaktámy a cefalosporíny. Vďaka individuálnym rozdielom v aminokyselinovej sekvencii enzýmov existuje niekoľko stoviek ESBL kódovaných rôznymi *bla* génmi, ktoré boli zaznamenané po celom svete hlavne u baktérií čeľade *Enterobacteriaceae*.

Koliformné baktérie vykazujúce rezistenciu voči ATB boli izolované z odpadových vôd odtekajúcich z dvoch zdravotníckych zariadení. Jednotlivé izoláty rezistentných baktérií boli identifikované pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie a následne sa charakterizovala ich citlivosť na rôzne ATB pomocou dilučnej metódy. Na detekciu tvorby ESBL u rezistentných izolátov bol použitý dvojitý diskový test synergie (DDST). Intenzita biofilmovej tvorby koliformných baktérií bola stanovená spektrofotometricky pomocou kryštálovej violete.

Z nemocničných odtokov bolo celkovo izolovaných 20 kmeňov koliformných baktérií. Odtoková voda pochádzajúca z onkologickej nemocnice obsahovala predovšetkým kmene identifikované ako *Lelliottia amnigena* (7), *Citrobacter freundii* (4) a *Enterobacter cloacae* (2), z ktorých viac ako polovica bola multirezistentná. Z odpadovej vody odtekajúcej z psychiatrickej liečebne bol 1 izolát identifikovaný ako *Escherichia coli* a ďalších 5 sa radilo do rodu *Citrobacter*. Všetky izoláty vykazovali multirezistentný charakter. Pomocou DDST fenotypizačnej metódy bola zistená ESBL aktivita až u 4 izolátov *C. freundii*, u 2 izolátov *L. amnigena* a u 1 izolátu *E. cloacae*. Jeden izolát *L. amnigena* sa vyznačoval hyperprodukciou AmpC v kombinácii s tvorbou ESBL. Koliformné baktérie izolované z nemocníc patrili medzi silných až veľmi silných producentov bakteriálneho biofilmu.

**Podakovanie:** Autori ďakujú STU za finančnú podporu v rámci Grantovej schémy na podporu mladých výskumníkov a Vedeckej grantovej agentúre VEGA (projekt č. 1/0096/17).

## 15. Genotypová analýza a virulence multirezistentních izolátů *Streptococcus pneumoniae*, sérotypu 19A a 19F v České Republice

L. Mališová (1), P. Španělová (1), V. Jakubů (1), H. Žemličková (1,2)

(1) Státní zdravotní ústav, Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Praha, CZ

(2) Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN v Hradci Králové, CZ

Vakcinace je jedinou účinnou ochranou proti pneumokokovým onemocněním. Polyvalentní polysacharidové vakcíny jsou postupně nahrazovány konjugovanými vakcínami. První 7-valentní konjugovaná vakcína byla do praxe zavedena v roce 2006. Od roku 2010 se v České republice používají 2 konjugované vakcíny (PCV10 a PCV13) lišící se počtem zahrnutých sérotypů. Zavedení celoplošné vakcinace vedlo ke snížení incidence invazivních pneumokokových onemocnění, vliv vakcinace na pokles antibiotické rezistence byl ovšem kompenzován nárůstem nevakcinačních sérotypů. Nejvyšší podíl na šíření rezistence má sérotyp 19A, který je kapsulární variantou klonu Taiwan<sup>19F</sup>-14, který byl sdružen se sérotypem 19F. Hlavním cílem této práce bylo geneticky zmapovat výskyt multirezistentních izolátů *Streptococcus pneumoniae* v České Republice v období po zavedení vakcinace. Celogenomovou analýzou byla následně porovnána virulence vybraných pneumokokových izolátů u obou sérotypů, 19A a 19F.

### Metodika

Izoláty *S. pneumoniae* byly získané v průběhu Respirační a EARS-Net studie v roce 2014. U všech vzorků byla vyšetřena minimální inhibiční koncentrace (MIC) vybraných antibiotik. Quellungovou reakcí byl určen sérotyp všech pneumokokových izolátů. Sekvenační typ (ST) byl určen pomocí Multilocus Sequence Typing (MLST). U 4 izolátů sérotypu 19A, 19F byly následně metodou celogenomového sekvenování (Illumina MiSeq) studovány faktory virulence. Sekvenační analýzy byly hodnoceny pomocí softwaru Bionumerics 7.5.

### Výsledky a závěr

MLST analýza rezistentních pneumokokových izolátů (19A, n=26; 19F, n=10) odhalila genetickou různorodost výskytu *S. pneumoniae* v České Republice. Celkově bylo zjištěno 9 ST u 19A sérotypu (ST 230, 276, 416, 1464, 1756, 2013, 3863, 11197, 11198) a 3 ST u sérotypu 19F (ST 179, 271, 1464), které náležely do 6 klonálních linií. Nejvíce bylo zastoupené ST 416 (n = 16; 44%) a ST 1464 (n = 9; 25%). Celogenomová analýza 2 izolátů dominantních klonů prokázala přítomnost pilu 1 u obou izolátů a pilu 2 u ST 1464.

Práce byla podpořena Interním grantem, Státní zdravotní ústav – SZU, 75010330 a grantem Agentury zdravotnického výzkumu MZd ČR 16-27109A.

## **16. Antimikrobiální aktivita extraktu z chmelových šištic (*Humulus lupulus* L.) proti vybraným mikrobiálním původcům alimentárních onemocnění**

S. Kučerová. (1), I. Brožková (1), L. Česlová (2)

(1) Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice, CZ;

(2) Katedra analytické chemie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice, CZ

I přes velký pokrok v medicíně a množství vědeckých poznatků jsou alimentární infekce a intoxikace stále velkým problémem. Vznikají požitím potravin kontaminovaných bakteriemi nebo jejich toxiny. Navíc se v posledních letech značně zvýšila odolnost bakterií vůči celé řadě biocidních látek používaných v potravinářských provozech. Hledání nových antimikrobiálních látek může pomoci v boji s tímto problémem. Cílem této práce bylo ověření přežívání vybraných mikroorganismů v přítomnosti extraktu z chmelových šištic.

Sušené chmelové šištic byly extrahovány do ethanolu v ultrazvukové lázni a následně byl extrakt zakoncentrován. Testování citlivosti bylo prováděno diskovou difúzní metodou ve třech opakováních. Extrakt z chmelových šištic vykazoval alespoň malou antimikrobiální účinnost proti všem testovaným bakteriím. Větší velikosti inhibičních zón byly naměřeny pro gram-pozitivní bakterie. Ethanolový extrakt nejvíce inhiboval růst bakterie *Clostridium perfringens*. Naopak nejmenší velikost inhibičních zón byla naměřena pro bakterii *Yersinia enterocolitica*. Následně byla provedena analýza extraktu pomocí HPLC s cílem přibližně identifikovat spektrum látek v něm obsažených.

Je známo, že přírodní produkty jsou zdrojem antimikrobiálních látek, a navíc splňují současnou tendenci využívání přírodních látek. Pokud bude provedena další série testů, mají sloučeniny obsažené v chmelových šišticích velkou budoucnost jako přísady do potravin s antimikrobiálními účinky.

Tato studie vznikla za podpory projektu SGS 2017 004 Fakulty chemicko-technologické Univerzity Pardubice.

## **17. xMAP Technologie: Detekce parazitických agens**

N. Reslová (1,2), L. Škorpíková (1,2), K. Snižková (1), M. Kašný (1,3), P. Králík (2)

(1) Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ.

(2) Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Brno, CZ.

(3) Katedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ.

Parazitární zoonózy jsou zaznamenávány po celém světě, přičemž často mají endemický charakter. Z hlediska přenosu parazitů ze zvířat na člověka je známo několik nejčastějších cest, např. přímý kontakt, skrze vektorový organismus, konzumací kontaminované syrové či tepelně neopracované potravy anebo prostřednictvím infekčních stadií rozptýlených v prostředí. Ačkoli se technologický vývoj posouvá mílovými kroky kupředu, současná diagnostika některých parazitárních onemocnění zůstává založena pouze na stanovení anamnézy, klinických příznaků a vizuální identifikaci parazitárních objektů. Konvenční metody založené na mikroskopii, biochemických testech, ELISA testech nebo PCR jsou dostupné, ale jsou často nespolehlivé a využitelné jen pro jeden druh patogenu. Z těchto důvodů se v oblasti diagnostiky parazitů objevuje prostor pro vývoj citlivějších, spolehlivějších a komplexních testů.

Analýzy založené na magnetických mikrosférách a xMAP technologii jsou využitelné pro multiplexní a simultánní detekci odlišných analytů z komplexního vzorku. Přístupy xMAP technologie jsou dostupné ve formátech pro nukleové kyseliny i imunoanalýzy a umožňují tak detekci a typizaci velkého množství patogenních agens nebo záchyt protilátky či antigenu v rámci jednoho testu. Vzhledem k možnostem adaptace, představuje technologie přínos pro koncové uživatele a je proto hojně využívána farmaceutickými, klinickými i výzkumnými laboratořemi.

Cílem našeho výzkumu je využít potenciál xMAP technologie pro vývoj multiplexní oligonukleotidové ligační PCR (MOL-PCR) pro detekci nukleových kyselin nejen intestinálních parazitů v oblastech s běžnými koinfekcemi, ale také povýšit konvenční ELISA test na multiplexní úroveň.

Výzkum byl podpořen z projektů Ministerstva zemědělství ČR (RO0516), Ministerstva vnitra ČR (VI20152020044) a institucionální podpory Masarykovy Univerzity (MUNI/A/1362/2016).

## 18. Výskyt mikromycetární infekce u pacientů s popáleninovým traumatem

J. Holoubek (1), B. Lipový (1,2), H. Řihová (1), Y. Kaloudová (1), M. Hanslianová (3), M. Cvanová (4), J. Jarkovský (4), I. Suchánek (1), P. Brychta (1,2)

(1) Klinika popálenin a rekonstrukční chirurgie FN Brno

(2) Lékařská fakulta, Masarykova univerzita

(3) Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno

(4) Institut biostatistiky a analýz Lékařské fakulty Masarykovy univerzity

**Úvod:** Infekční komplikace u těžkého termického traumatu je jednou ze základních komplikací léčby a jako taková má přímý dopad na mortalitu a morbiditu pacienta. Dominantní zastoupení ve spektru potencionálně patogenních mikroorganismů dnes stále hrají především bakterie, nicméně mikromycetární infekce jsou dnes rovněž na vzestupu a jejich závažnost exponenciálně roste.

Tento jev je dán nejen porušením integrity kožního krytu a s tím související ztráta mechanické a imunologické ochrany kůže, ale také fakt, že antimikrobiální terapie vede k výrazné selekci rezistentních kmenů bakterií a rovněž k možnosti snazšího pomnožení kvasinek a plísní.

**Materiál a metodika:** Monocentrická, retrospektivní studie, do které byli zařazeni všichni dospělí popálení pacienti, kteří byli hospitalizováni v letech 2007-2015 a u kterých byla v průběhu hospitalizace izolována mikromyceta. Pro hodnocení závažnosti termického traumatu byl použit ABSI (Abbreviated burn severity index). Výsledky byly statisticky zpracovány.

**Výsledky:** Ve sledovaném období bylo hospitalizováno celkem 61 pacientů s termickým traumatem, u nichž byla potvrzena infekce kvasinkou nebo vláknitou houbou. Z tohoto počtu bylo 37 mužského a 24 ženského pohlaví (M:F ratio 1,5:1). Věk pacientů v průměru dosahoval 57,3 let. Letalita souboru dosahovala 9,8 procent (celkem 6 pacientů) a rozsah popálené plochy činil průměrně 21,6 % TBSA.

Celkový počet vykultivovaných mikromycet činil 90 kmenů, z nichž 79 bylo zástupců kvasinek a 11 zástupců vláknitých hub. U 30 pacientů byla mikromyceta izolována z popálené plochy, u 19 pacientů z dolních dýchacích cest, u 15 pacientů z urogenitální oblasti a u 7 pacientů z hemokultury. Dominantní zastoupení měly kmeny non-albicans kandid (60), naproti tomu *Candida albicans* byla izolována pouze v 16 případech. Kmeny *Aspergillus fumigatus* a *Fusarium* sp. byly izolovány v celkovém počtu 4, respektive 2 ze všech izolací.

**Závěr:** V této studii se nám úspěšně podařilo identifikovat spektrum nejvýznamnějších zástupců z řad kvasinek a vláknitých hub, stejně jako se podařilo definovat základní epidemiologické data popálených pacientů s mikromycetární infekcí.

## 19. Kombinácia antifungálnych zlúčenín ako nástroj boja proti fungálnym infekciám

Ježíková Zuzana (1), Pagáč Tomáš (1), Pfeiferová Barbora (1), Olejníková Petra (1)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, FCHPT STU v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovensko

Antifungálna liečba ako nástroj boja proti fungálnym infekciám je postavená na báze monoterapie. Nedostatok antifungálnych zlúčenín a neustále sa rozvíjajúca rezistencia fungálnych patogénov však vyžadujú nové alternatívy na zvýšenie účinnosti existujúcich látok. Kombinácia známych zlúčenín na princípe synergického efektu je jednou z budúcich možností boja proti fungálnym infekciám. Cieľom tejto práce je sledovať synergický účinok azolov v kombinácii s 1,4-dihydropyridín-2,3,5-trikarboxylátom (zlúčenina H) na liečbu fungálnych infekcií, ako aj schopnosť novosyntetizovaného derivátu H inhibovať fungálne ABC transportéry, a tak zabrániť efluxu aktívnych zlúčenín von z bunky. Antifungálna aktivita a synergický resp. inhibičný účinok sa vyhodnocovali na základe výsledkov získaných mikrodilučnou metódou, meraním transportu fluorescenčnej sondy prostredníctvom inhibície efluxných púmp testovanými zlúčeninami, fluorescenčnou mikroskopiou a metódou real-time PCR. Samotný novosyntetizovaný derivát neúčinkoval inhibične na rast modelových kvasiniek. Pozoroval sa však jeho synergický účinok s flukonazolom a vorikonazolom, v dôsledku čoho došlo k inhibícii rastu testovaného kmeňa kvasiniek. Sledovaním účinku testovaného derivátu H na schopnosť kvasinky akumulovať fluorescenčnú prílohu sa potvrdila úloha ABC transportéra CDR1. V tomto prípade má derivát H úlohu ako inhibítor CDR1 transportnej pumpy. Tieto tvrdenia sme potvrdili fluorescenčnou mikroskopiou, kde sme sledovali schopnosť divých a mutantných kmeňov efluxovať/akumulovať referenčnú prílohu z/do vnútra bunky. Na záver sme sledovali vplyv testovaných zlúčenín na mieru expresie génov PDR transportérov (CDR1 a CDR2) a 14 $\alpha$ -demetylázy lanosterolu (ERG11). Expresia génu *CDR1* je v porovnaní s kontrolou zvýšená v prítomnosti flukonazolu, zlúčeniny H aj v prípade kombinácie oboch zlúčenín. *CDR2* a *ERG11* gény vykazujú zvýšenú mieru expresie iba v prítomnosti flukonazolu. Prídavok derivátu H znížil expresiu génu *ERG11* 10-násobne, čím prispieva k zvýšeniu citlivosti *C. albicans* na flukonazol.

Podakovanie: Táto práca vznikla s finančnou podporou APVV-0719-12 a VEGA1/0870/14.

## 20. Potencovanie účinku antifungálne aktívnych azolov novosyntetizovanými derivátmi 1,4-dihydropyridínov

B. Pfeiferová (1), Z. Ježíková (1), P. Olejníková (1)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava, SK

*Candida albicans* je súčasťou normálnej ľudskej mikrobioty. U citlivých jedincov však môže vyvolať infekciu. Na to aby *C. albicans* jedinca infikovala, musí byť schopná adherovať na biotické resp. abiotické povrchy. Adherencia je zabezpečená proteínami rodiny Als, najmä Als3, ktorý je unikátny pre *C. albicans*. Keďže ide o adhezín, Als3 sprostredkuje prichytenie na bunky epitelu, endotelu a proteíny extracelulárneho matrixu.

V našej práci sme sa zamerali na otestovanie novosyntetizovaného derivátu 1,4-dihydropyridínu (ďalej len H) a jeho synergického účinku s komerčnými antifungálnymi látkami – azolmi (flukonazol, vorikonazol).

1,4-dihydropyridíny sú známe blokátory vápnikových kanálov L typu, vďaka čomu sa využívajú v liečbe srdcovo cievnych ochorení, najmä hypertenzie. Skúmanie farmakologických vlastností derivátov známych liečiv, ktoré už majú v terapii svoje uplatnenie, má vo farmaceutickom priemysle vzrastajúci trend.

V našej práci sme sledovali formáciu biofilmu kvasinky *C. albicans* použitím farbenia kryštálovou violetou a TTC. Sledovaný biofilm sme ovplyňovali vybranými antifungálnymi zlúčeninami v kombinácii s H.

Mikrodilučnou metódou sme sledovali citlivosti disperzných buniek na vybrané antifungálne zlúčeniny.

Keďže je pre formáciu biofilmu dôležitá úloha adhezínu Als3, sledovali sme expresiu ALS3 po ovplyvnení zlúčeninou H a kombináciou flukonazolu+H.

Pozorovali sme zníženú formáciu biofilmu *C. albicans* pôsobením kombinácie flukonazolu+H, vorikonazolu+H, aj samotným derivátom H.

Derivát H v kombinácii s antifungálnymi zlúčeninami znížil schopnosť tvorby biofilmu *C. albicans*.

Zaznamenali sme zníženú expresiu génu ALS3 po ovplyvnení buniek zlúčeninou H a kombináciou flukonazol+H, v porovnaní s kontrolou.

Zároveň sme zaznamenali zmeny v citlivostiach disperzných buniek z biofilmu na azoly.

Zo získaných výsledkov možno usúdiť, že kým flukonazol indukoval rezistenciu disperzných buniek voči azolom, prídavok derivátu H zabránil vzniku tejto rezistencie.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0096/17.



## 21. Prionové kmeny vykazují rozlišnou senzitivitu k fotodynamické inaktivaci v závislosti na použitém derivátu ftalocyaninu

M. Kostelanská (1), T. Moško (1), L. Kubáč (2), K. Holada (1)

(1)Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha, CZ

(2)Centrum organické chemie s.r.o., Rybitví, CZ

Úvod: Prionové choroby jsou fatální neurodegenerativní onemocnění postihující savce, při nichž dochází k přeměně nativního buněčného prionového proteinu (PrP<sup>C</sup>) v jeho patogenní isoformu – prion (PrP<sup>TSE</sup>). Priony se vyznačují existencí rozmanitých strukturních variant, označovaných jako prionové kmeny. Ty vykazují vysokou odolnost vůči sterilizačním metodám a z ní plynoucí a dokumentované riziko nozokomiální nákazy priony. Fotodynamická inaktivace (PDI) prionů je založena na produkci reaktivního singletního kyslíku (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) z molekulárního kyslíku prostřednictvím světlem aktivovaného ftalocyaninu. Pozitiva této metody spočívají v nenáročnosti na podmínky provedení (teplota a tlak) a využití netoxické sloučeniny ftalocyaninu. Naším cílem je studium vlivu různých prionových kmenů a derivátů ftalocyaninů na účinnost PDI a aplikace této metody při procesu sterilizace neurochirurgických nástrojů.

Metodika: Byly testovány tři typy ftalocyaninů (AlPc, SiPc a ZnPc), u nichž byl metodou tenkostěnné chromatografie detekován stupeň jejich sulfonace. Hladina ftalocyaniny generovaného <sup>1</sup>O<sub>2</sub> byla monitorována nepřímou v roztoku jodidu draselného detekcí trijodidu. Zdrojem prionů byly mozkové homogenáty myši infikovaných kmeny prionů ME7, RML a BSE. Při PDI byly 1% (w/v) mozkové homogenáty preinkubovány s deriváty ftalocyaninů o finální koncentraci 1 µg/mL a exponovány světlu o vlnové délce 660 nm (Super Bright Red diody) po dobu 90 min. Po následné inkubaci s/bez proteinázy K byl prostřednictvím Western blotu detekován reziduální PrP<sup>TSE</sup>/PrP<sup>C</sup>.

Výsledky: Ftalocyaniny AlPc, SiPc a ZnPc vykazovaly postupně 2, 2-3 a 1-3 sulfonové skupiny. Ačkoliv SiPc produkoval nejvyšší koncentraci <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, po PDI testovaných kmenů ME7, BSE a RML s využitím SiPc byl stále detekován PrP<sup>TSE</sup>. Naproti tomu, účinnost AlPc a ZnPc byla při PDI v porovnání s SiPc signifikantně vyšší (P < 0.05). Při PDI v přítomnosti ZnPc byl inaktivován kmen RML; při PDI s AlPc byl inaktivován jak kmen RML, tak BSE.

Závěr: Efektivita PDI závisí jak na použitém derivátu ftalocyaninu, tak na typu inaktivovaného kmene prionů. Nalezené rozdíly musí být zohledněny při optimalizaci metody PDI prionů pro rutinní použití ve zdravotnictví.

Projekt byl podpořen GAUK-140215 a GAČR 16-15020S.

## **22. The importance of precise study design for prion infection studies: The evaluation of proteinase-activated receptor 2 significance in scrapie inoculated mice**

Z. Hanusová (1), T. Moško (1), R. Matěj (2,3), K. Holada (1)

(1) Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ

(2) Department of Pathology and Molecular Medicine, Thomayer Teaching Hospital, Prague, CZ

(3) Department of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ

Prion diseases, also called transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), represent a group of fatal, incurable neurodegenerative disorders that can affect mammals, including humans. Recent studies suggest that the progress of neurodegeneration in brain during various pathological conditions could be mediated by proteinase-activated receptors (PARs). We previously showed that the deletion of proteinase-activated receptor 2 (PAR2) was connected to the delayed onset of clinical symptoms and prolonged survival of mice intracerebrally inoculated with mouse-adapted scrapie prions in comparison to control C57Bl/6J mice. To explore the outcome of this finding, we performed a subsequent study with refined experimental protocol utilizing littermates obtained by breeding of PAR2<sup>+/-</sup> mice and inoculated them peripherally or intracerebrally with high doses of prions. To eliminate the adverse effects of subjective factors, the experiment was performed as blinded and mice of different genotypes were housed together. Mice were observed for signs of scrapie and their weight was periodically monitored as an objective measure of the disease progression. Peripheral prion infection led to the longer incubation period and disease duration compared to the intracerebral infection; however, we failed to observe the beneficial effect of PAR2 deficiency on the course of experimental prion infection in mice, independently on the route of prion administration. Our findings suggested that the genetic background difference and/or other non-genetic factors probably influenced the previous study and thus emphasized the importance of objective study design and selection of rigorous genetic controls needed to minimize the negative effect of using transgenic or targeted mutant murine models for prion pathogenesis studies.

Acknowledgements: The study was supported by projects GACR-P303/12/1791, GAUK-1322713 and PRVOUK-P24/LF1/3.

## **23. Salmonelóza spojená s chovem plazů (reptile-associated salmonellosis) – kazuistika**

Z. Tomáštková (1), M. Mrázková (2), M. Kaňáková (2), H. Sedláčková (3), R. Karpíšková (1)

(1) Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, CZ

(2) Územní pracoviště Šumperk, Oddělení protiepidemické, Krajská hygienická stanice Olomouckého kraje se sídlem v Olomouci, Olomouc, CZ

(3) Centrum hygienických laboratoří, Oddělení biologických analýz, Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě, Olomouc, CZ

Salmonelóza je zoonóza s převážně alimentární cestou přenosu. K onemocnění zpravidla dochází po konzumaci kontaminovaných potravin, ale možnou cestou přenosu je i kontakt s infikovanými zvířaty. Za významné rezervoáry salmonel jsou kromě ptáků považováni i plazi.

Salmonelóza spojená s chovem plazů (reptile-associated salmonellosis: RAS) je celosvětově pozorovaným fenoménem. K onemocnění člověka může dojít per orálně po přímém či nepřímém kontaktu s plazy. Případy RAS jsou popisovány zejména v souvislosti s nízkým věkem pacientů a mají závažnější průběh. V České republice jsou případy RAS popisovány vzácně.

Kojenec ve stáří jednoho měsíce byl přijat v nemocnici pro febrilní stav doprovázený průjmem. Bakteriologické vyšetření stolice prokázalo přítomnost *Salmonella* Oranienburg. Byla zahájena kauzální terapie cefalosporiny 3. generace s podpůrnou léčbou. Pacient byl po šestidenní hospitalizaci propuštěn do domácí péče.

Při epidemiologickém šetření v domácnosti byl zjištěn chov plazů. V této souvislosti byly odebrány rektální výtěry rodinných příslušníků, vzorky sušené umělé mléčné výživy a trusu chovaných plazů. V trusu plazů byla detekována *Salmonella* Oranienburg, ostatní vzorky byly negativní.

Izoláty salmonel ze stolice pacienta a z trusu plazů byly typizovány metodou makrorestrikční analýzy. Vzájemné srovnání pulzotypů ukázalo 100% shodu u obou izolátů. Tímto byl potvrzen zdroj nákazy pacienta, kterým byli doma chovaní plazi.

Rostoucí obliba chovu plazů v domácnostech představuje rizikový faktor z hlediska možného přenosu salmonel na člověka. Detekce neobvyklých sérotypů salmonel by měla být podnětem k zahájení epidemiologického šetření za účelem dosledování zdroje nákazy. Chovatelé plazů, praktičtí lékaři i veřejnost by měli být o problematice RAS informováni.

Studie byla finančně podpořena projektem MŠMT LO 1218.

## 24. Aujezskyho choroba u černé zvěře v České republice

M. Bena (1,2), P. Vašíčková (1)

(1) Výzkumný ústav veterinárního lékařství v.v.i., Brno, CZ

(2) Mendelova univerzita v Brně, lesnická a dřevařská fakulta, ústav ochrany lesů a myslivosti, Brno, CZ

V posledních desítkách let dochází u většiny druhů spárkaté zvěře k postupnému zvyšování úlovků. Nejvýznamnější změny nastaly u prasete divokého, které se stalo dominantním druhem pro produktivitu honiteb. Např. zatímco ještě v roce 1982 bylo v celé České republice (ČR) uloveno jen 10 233 kusů prasat divokých, v posledních letech roční úlovky přesahují 150 000 kusů.

Aujezskyho chorobu způsobuje prasečí herpesvirus 1 (SHV-1), což je celosvětově rozšířené onemocnění. SHV-1 jako přirozené hostitele infikuje prasata domácí a divoká, přičemž u jiných savců (např. pes, skot a ovce) vyvolává fatální onemocnění. Prvním typickým příznakem infekce SHV-1 je intenzivní svědění, v jehož důsledku se infikovaná zvířata olizují, odírají a okusují. Onemocnění rychle progreduje, zvířata slábnou, objevují se křeče, neklid a rychlé povrchové dýchání. Při obrně hltanu z tlamy vytékají sliny, jazyk volně visí a do 24 - 48 hod dochází k úhynu.

Největší riziko přenosu SHV-1 je z infikovaných prasat divokých na lovecké psy, během společných lovů a individuálních dosledů, kde psi přicházejí do bezprostředního kontaktu s prasaty divokými, zejména s jejich krví. Tato infekce není přenosná na člověka či jiné primáty.

Cílem této studie je zjistit výskyt SHV-1 u prasat divokých (černé zvěře) v lokalitách rozmístěných po celé ČR. Na přítomnost SHV-1 (respektive jeho DNA) jsou analyzovány vzorky sér, mízních uzlin a jater, které pocházely od 361 prasat. Dosud bylo metodou qPCR vyšetřeno 200 sér (104 samic a 96 samců), z toho bylo pozitivních 8 prasat divokých (4 %; 5 samců a 3 samice) a 259 vzorků jater, ve kterých byla prokázána přítomnost SHV-1 u 1 prasete divokého (0,28 %).

Tato studie je zaměřena na zachycení aktuálně probíhající nemoci, oproti studii státní veterinární správy v letech 2011 – 2013, kde je zřejmé, že zhruba 1/3 divokých prasat v ČR má v těle protilátky proti SHV-1. Ne všechna sérologicky pozitivní prasata jsou aktivními vylučovateli viru a přítomnost protilátek nepotvrzuje klinický průběh onemocnění.

Tyto výsledky byly získány s podporou projektu Ministerstva vnitra ČR VI20152020044.

## 25. Virové zoonózy u volně žijících obratlovců v ČR - opomíjené riziko?

P. Straková (1,2), H. Blažejová (1), M. Heroldová (1), Z. Juřicová (1), I. Rudolf (1,2), Z. Hubálek (1,2)

(1) Ústav biologie obratlovců AV ČR v.v.i., Květná 8, Brno, CZ;

(2) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, CZ

### Úvod

Jako zoonotická onemocnění (zoonózy) se označují onemocnění přenosná ze zvířat na člověka. Z velkého výčtu zoonotických virů vyskytujících se v Evropě jsme se zabývali detekcí hantavirů u volně žijících hlodavců, flavivirů západonilské horečky (WNV) a Usutu (USUV) u volně žijícího vodního ptactva a viru hepatitidy E (VHE) u divokých prasat a další lovné zvěře. Na tyto viry se stále pohlíží jako na tzv. emergentní (tj. nově se objevující) viry a v některých zemích jsou dlouhodobě monitorovány.

### Metodika a Výsledky

Z 386 hlodavců odchycených v roce 2014 a vyšetřených metodou RT-PCR na přítomnost hantavirů byl jeden hraboš mokřadní, odchycený v Beskydech, pozitivní na Tula virus. V dalších letech (2015, 2016) byli hlodavci na přítomnost hantavirů negativní.

Po prvním testování 146 lysek černých neutralizačním testem (PRNT90) s WNV bylo odhaleno 18 pozitivních ptáků (12,3 %). Tyto pozitivní vzorky byly následně vyšetřené i s virem klíšťové encefalitidy a USUV. Z 18 WNV pozitivních ptáků mělo 9 lysek specifickou reakci s USUV, 2 s WNV a 7 nebylo sérologicky rozlišeno. Dále byly specifické protilátky proti WNV detekovány u 53 z 1 023 vyšetřených sudokopytníků (5,2 %).

Komerčně dostupnou metodou ELISA na detekci protilátek proti VHE bylo nalezeno 31 (8,5 %) séropozitivních divokých prasat odchycených v letech 1990-2008 na území jižní Moravy. Nejstarší takto pozitivní divoké prase pocházelo z roku 1990 z Nového Šaldorfu. Vyšetřená lovná zvěř ze stejných lokalit byla negativní.

### Závěr

Onemocnění přenášená hlodavci (hantavirózy), anebo i další zoonotická onemocnění, u kterých hrají obratlovci nezastupitelnou ekologickou roli, nabývají v posledních letech značně na významu. WNV přenášený komáry, jehož rezervoárem jsou ptáci, se v Evropě šíří do nových oblastí, ve kterých zatím lidské případy nebyly detekovány. Podobně i virus Usutu se po úspěšné introdukci pomocí migrujícího ptactva etabloval ve střední Evropě a je hrozbou pro ptačí populace. Výzkumu VHE, kde jsou rezervoárovými zvířaty divoká prasata, se věnuje velká pozornost díky narůstající incidenci onemocnění v lidské populaci. Surveillance rezervoárových obratlovčích hostitelů na vybrané nákazy je proto nezbytným krokem pro prevenci a kontrolu těchto onemocnění v České republice.

## **26. Occurrence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in diaphragm pillar of wild boars (*Sus scrofa*) in the Czech Republic**

M. Husakova (1,2), M. Bena (1,3), I. Slana (1)

(1) Veterinary Research Institute Brno, CZ

(2) Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, CZ

(3) Mendel University, Faculty of Forestry and Wood Technology, Brno, CZ

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*MAP*) as an etiological agent of paratuberculosis, granulomatous enteritis (Johne's disease), infects mainly domestic animals such as cattle, sheep, goats but also wildlife species including deer and wild boar. Paratuberculosis often manifests subclinically without evident symptoms which makes the disease concerning from an epidemiological point of view. During the subclinical phase, animals shed the agent into the environment by faecal shedding which can be a source of infection for other animals. However, *MAP* can permeate also to muscle tissue. This becomes concerning because *MAP* is also suspected to be a zoonotic agent contributing to the development of the human's Crohn's disease.

Tissue samples (diaphragm pillar) were obtained from a total of 361 hunted wild boars during the 2015/2016 and 2016/2017 hunting seasons throughout the Czech Republic and investigated for an occurrence of *MAP*. Samples were processed for a lysis and DNA isolation process and identified by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) for the presence of an insertion sequence *IS900*.

The main reason for the detection of *MAP* in diaphragm pillars of wild boars is food safety, because the meat of wild boars can be a part of human diet. Another reasons are monitoring of *MAP* entering the food chain via meat and animal health.

This work was supported by project LO1218 of MEYS of the Czech Republic under the NPU I program.

## 27. Prevalence *Toxoplasma gondii* u pernaté zvěře určené k lidské spotřebě v České republice: molekulární detekce pomocí qPCR.

L. Škorpíková (1,2), A. Lorencová (2), M. Slaný (2), N. Reslová (1,2), R. Plhal (3), J. Drimaj (3), J. Kamler (3), J. Lamka (4)

- (1) Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ;
- (2) Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Brno, CZ;
- (3) Ústav ochrany lesů a myslivosti, Lesnická a dřevařská fakulta Mendelovy univerzity v Brně, Brno, CZ;
- (4) Katedra farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy v Hradci Králové, Hradec Králové, CZ.

Jednobuněčný prvok *Toxoplasma gondii* (kmen Apicomplexa) je obligátně intracelulární parazit, způsobující onemocnění lidí i zvířat nazývané toxoplazmóza. Definitivním hostitelem jsou výlučně kočičité šelmy, mezihostitelem se mohou stát téměř všechny druhy teplokrevných živočichů. Hlavním zdrojem nákazy pro hostitele, včetně člověka, je především syrové či tepelně nedostatečně upravené maso obsahující tkáňové cysty *T. gondii* nebo potraviny kontaminované oocystami z trusu infikovaných koček. Odhaduje se, že *T. gondii* je nakažena přibližně jedna miliarda lidí a toxoplazmóza se tak řadí mezi nejrozšířenější parazitární zoonózu světa.

Zavedení vhodné diagnostické metody je tedy zásadní pro prevenci, sledování a kontrolu šíření infekce *T. gondii*. Cílem této studie bylo zjistit výskyt *T. gondii* u pernaté zvěře (kachna divoká - *Anas platyrhynchos* a bažant obecný - *Phasianus colchicus*) ulovené v České republice v letech 2015 – 2016. Za účelem spolehlivé detekce a kvantifikace tkáňových cyst parazita byla optimalizována qPCR analýza založená na amplifikaci specifického *B1* genu a *529rep* elementu.

Z celkového počtu 630 vyšetřených ptáků byla *T. gondii* zachycena u 15 vzorků z 280 testovaných kachen divokých (prevalence 5,4 %) a u 12 vzorků z 350 bažantů obecných (prevalence 3,4%). U obou zkoumaných druhů pernaté zvěře byla parazitární DNA detekována nejčastěji v srdci a mozku.

Naše výsledky prokázaly přítomnost *T. gondii* u kachen divokých a bažantů obecných v České republice. Tito zástupci pernaté zvěře mohou tedy být považováni za potenciální rezervoár infekce *T. gondii* a tím i možný zdroj nákazy pro další živočichy a především pro člověka.

Tento výzkum byl podpořen Ministerstvem zemědělství České republiky (QJ1210113 a RO0517); Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LD15056).

## 28. Zelenina a bylinky z farem a tržní sítě jako zdroj bakteriální kontaminace?

V. Michná (1,2), P. Králík (1), M. Morávková (1)

(1) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, CZ

(2) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Čerstvá zelenina a bylinky jsou považovány za důležitou součást potravy, bohatou z hlediska obsahu vitamínů a vlákniny a zároveň rychlou na přípravu. Většinou se konzumují syrové bez předchozí tepelné úpravy, čímž se zvyšuje riziko vzniku alimentárních nákaz. Ke kontaminaci může docházet v různých fázích od růstu na polích nebo ve sklenících, až po přípravu na prodejní pulty. Riziko kontaminace představuje také kontakt s kontaminovanou závlahovou vodou nebo vodou na oplachování, půdou, hnojem, fekáliemi nebo s divoce žijícími zvířaty. Krátká doba trvanlivosti čerstvých potravin vede k zavádění rychlých detekčních systémů jako je real-time PCR (qPCR). Výhoda této metody spočívá v možnosti identifikovat a kvantifikovat více patogenů současně.

Dílčím cílem této studie bylo zhodnotit mikrobiální kontaminaci celé, syrové zeleniny (mrkev, okurka, salát) a bylin z farem a tržní sítě v České republice. Byly sledovány a kvantifikovány bakterie *Listeria monocytogenes* a *Cronobacter* spp. a zároveň byl monitorován i výskyt *Escherichia coli* jako indikátor fekálního znečištění. Vzorky byly vyšetřeny pomocí qPCR a zároveň použitím standardních kultivačních metod.

V této studii bylo vyšetřeno 623 vzorků zeleniny a bylin z farem a z tržní sítě. Celkem 5 vzorků (0,8 %) bylo pozitivních na přítomnost *L. monocytogenes* pomocí qPCR (0,6 % kultivačně). V 78 vzorcích (12,5 %) byl detekován *C. spp.* pomocí qPCR (9,3 % kultivačně). Jak vzorky z farem (200 vzorků – 46,2 %) tak vzorky z tržní sítě (76 vzorků – 40 %) byly pozitivní na přítomnost *E. coli*. Množství *L. monocytogenes* ve vzorcích se pohybovalo od  $6 \times 10^0$  do  $10^1$  genomových ekvivalentů na g zpracovaného vzorku a od  $10^0$  do  $6 \times 10^4$  genomových ekvivalentů na g zpracovaného vzorku pro *E. coli*.

Získané výsledky ukazují, že konzumace syrové zeleniny a bylin může představovat riziko vzniku alimentárních onemocnění, proto bychom měli zeleninu a bylinky před konzumací dobře omýt, tepelně upravit popřípadě odstranit slupky, pokud to jde.

Práce byla podporována z projektu Ministerstva zemědělství QJ1210114 a RO0516.



## 29. Charakterizace zdravotně a technologicky rizikových *Asaia* spp. izolovaných z kontaminovaných nealkoholických nápojů

J. Kyznar (1), E. Šviráková (1)

(1) Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, CZ

Bakterie rodu *Asaia* představují v potravinářském průmyslu technologicky rizikové bakterie kontaminující suroviny, výrobky i zařízení často při výrobě nealkoholických nápojů. Způsobují texturní a sensorické defekty výrobků díky dobré snášenlivosti nízkého pH a vysokého osmotického tlaku, bohaté aktivitě enzymů a schopnosti využívat uhlíkaté substráty. Jsou tolerantní vůči běžným konzervačním činidlům, tvoří biofilmy. Druhy *A. bogorensis* a *A. lannensis* jsou oportunistickými patogeny způsobujícími vážné nozokomiální infekce u imunokompromitovaných jedinců. Cílem práce byla charakterizace 11 kmenů *Asaia* spp., izolovaných z kontaminovaných nealkoholických nápojů, a 3 sbírkových kmenů, po předchozích identifikacích.

Kmeny byly podrobeny makroskopii a mikroskopii, růstové aktivitě v Sabouraudově bujónu / agaru, toleranci ke kultivačním teplotám (20, 25 a 30 °C) a k pH kultivačního média (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 5,6; 6,0), resistenci k antibiotikům (amoxycilinu, ampicilinu, aztreonamu, cefotaximu, ciprofloxacinu, enrofloxacinu, chloramfenikolu, kolistinu, k. nalidixové, meropenemu, neomycinu, streptomycinu, sulfametoxazolu/trimetoprimu, sulfoamidu, trimetoprimu). Byla využita metoda optické mikroskopie, plotnová metoda, denzitometrická metoda a disková difúzní metoda.

Kmeny rostly dobře v prostředí o pH 3–6 během 4týdenních aerobních kultur; v prostředí o pH 2 nerosty. Kmeny rostly dobře a dynamicky při 25 a 30 °C a nebyly u nich pozorovány lag-fáze. Kmeny rostly méně intenzivně při 20 °C, byly u nich zjištěny lag-fáze a nejdelší generační doby. Ani po 4 týdnech nedošlo u žádného kmene k poklesu buněčné populace či snížení vitality buněk; fáze odumírání buněk nebyly pozorovány. Kmeny vykazovaly vysokou resistenci k 15 antibiotikům.

Výsledky této práce mohou být aplikovány při jednorázovém i screeningovém jistění zdravotní bezpečnosti, technologické nerizikovosti a požadované jakosti různých potravinářských výrobků, nejenom nealkoholických nápojů, při cílené eliminaci bakterií rodu *Asaia*.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QK1710156 (2017–2021, MZE/QK), v programu QK – Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025 „ZEMĚ“, s dobou řešení projektu: 02/2017–12/2021.

### 30. Celogenómové sekvenovanie baktérii vhodných ako štartovacie alebo pomocné kultúry pri príprave bryndze

A. Lichvariková (1), V. Belanová (1), M. Hyblová (2), T. Kuchta (3), H. Drahovská (1),

(1) Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, lichvarikova.aneta@gmail.com

(2) Vedecký park UK, Ilkovičova 8, 842 16 Bratislava, Slovenská republika

(3) NPPC, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika

Baktérie mliečneho kvasenia (LAB, Lactic Acid Bacteria) predstavujú skupinu Gram-pozitívnych nesporulujúcich baktérií. Tieto všadeprítomné baktérie sa vyznačujú produkciou kyseliny mliečnej počas fermentácie. Baktérie mliečneho kvasenia predstavujú priemyselne dôležitú skupinu mikroorganizmov. Svoje uplatnenie našli najmä v mliekarenskom priemysle pri príprave jogurtov, syrov či kyslej smotany. Medzi priemyselne dôležité LAB baktérie patria rody *Lactobacillales*, pričom najvýznamnejšie sú *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. Produkcia kyseliny mliečnej ako aj antimikrobiálnych peptidov typických pre LAB, vytvárajú fyzikálno-chemické prostredie, ktoré zabraňuje rastu konkurenčných mikrobov. Navyše, LAB produkujú aromatické zlúčeniny, bakteriocíny, exopolysacharidy ako aj dôležité enzýmy. Týmto spôsobom LAB zvyšujú trvanlivosť a mikrobiálnu bezpečnosť, zlepšujú kvalitu a chuť fermentovaných výrobkov.

V našej práci sme stanovili celogenómovú sekvenciu 4 kmeňov určených ako potenciálne štartovacie alebo pomocné kultúry pre výrobu ovčieho hrudkového syra pochádzajúce z výskumného ústavu mliekarenského v Žiline. Celogenómové sekvenovanie bolo uskutočnené využitím Nextera knižníc na sekvenátore MiSeq (Illumina). Sekvencie boli zložené pomocou program CLC Bio (Qiagen). Analýzou pomocou program K-mer Finder sme dané kmene zaradili do druhov *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*, *L. casei* a *L. paraplantarum*. Získané sekvencie sme anotovali pomocou programu RAST a porovnali s najbližšími príbuznými kmeňmi. Súčasťou práce tiež bola identifikácia profágových regiónov jednotlivých kmeňov. Nakoľko peptidázy kyslomliečnych baktérii ovplyvňujú chuť a textúru mliečnych výrobkov, zamerali sme sa na identifikáciu génov kódujúcich tieto proteíny, a to najmä na gény *pepX*, *pepN*, *bcaT* a *prtP*. Medzi významné peptidázy patria aj lipolytické enzýmy ktoré sme identifikovali na základe anotovaných sekvencií. V ďalšej fáze výskumu budú sekvenčné data podrobené hlbšej analýze. Tieto poznatky prispievajú k zvýšeniu kvality mikrobiologického zloženia štartovacích kultúr pri príprave ovčieho hrudkového syra.

#### PodĎakovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektu APVV-14-0025.

### 31. Mykoparazitická aktivita *Trichoderma atroviride* a úloha ABC transportérov

Pagáč Tomáš (1), Ježíková Zuzana (1), Olejníková Petra (1)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemicko potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 812 37, Bratislava; tomaspagac1@gmail.com

Fungálne patogény rastlín sú častým pôvodcom rôznych ochorení rastlín, čoho výsledkom je pokles produkcie predovšetkým hospodársky významných plodín. Riešenie tohto problému prostredníctvom chemických látok s antifungálnym účinkom sa osvedčil ako účinná zbraň v boji s fytopatogénmi, avšak použitie týchto látok má nepriaznivý vplyv na životné prostredie s potenciálom rozvoja rezistencie voči týmto látkam. Biologická ochrana rastlín sa javí ako vhodná alternatíva v boji s rastlinnými patogénmi. Zástupcovia vláknitých húb rodu *Trichoderma* sp. sú známe svojou symbiózou s koreňovým systémom rastlín, pričom dokážu účinne atakovať fytopatogénne huby, čím poskytujú rastline potrebnú ochranu. V tejto práci sme sa zamerali na mykoparazitickú aktivitu vláknitej huby *Trichoderma* sp.

Vplyv *Trichoderma atroviride* a *Trichoderma viride* na tri vybrané fytopatogénne huby (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium culmorum*) sa pozoroval počas duálnej konfrontačnej kultivácie, antimikróbna aktivita izolovaného antrachinónového metabolitu *Trichoderma viride* F742 (1-acetyl-2,4,5,7-tetrahydroxyantrachinón) sa vyhodnotila makrodilučnou a mikrodilučnou metódou u vybraných baktérií, kvasiniek a vláknitých húb. Zároveň sa pozoroval expresný profil vybraných ABC transportérov rodiny G a MDR transportérov *Trichoderma atroviride* počas duálnej konfrontačnej kultivácie s cieľom overiť ich možnú úlohu v mykoparazitizme.

Kmeň *Trichoderma atroviride* vykazoval výraznú mykoparazitickú aktivitu voči vybraným fytopatogénnym hubám. Izolovaný antrachinónový metabolit *Trichoderma viride* F742 vykazoval výrazný bakteriostatický účinok voči gramnegatívnym baktériám. Čiastočná inhibícia rastu sa pozorovala pri rastlinnom fytopatogéne *Fusarium culmorum*. Inhibičný účinok sa pozoroval aj pri kvasinkách *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Vyhodnotenie expresných profilov vybraných ABC transportérov rodiny G a MDR transportérov môže naznačovať ich možnú úlohu v mykoparazitizme.

Zapojenie fungálnych ABC transportérov a ich úloha v mykoparazitizme môže prispieť k celkovému pochopeniu mechanizmu mykoparazitickej interakcie. Pre úplné pochopenie ich funkcie by sme chceli vykonať delečné experimenty, ktoré by jednoznačne preukázali zapojenie týchto génov v mykoparazitickej interakcii.

Práca vznikla s podporou grantu VEGA1/0870/14, APVV-0719-12.

### 32. Nízokoteplotná plazma – alternatívny spôsob ochrany zrna pšenice pred znehodnotením vláknitými hubami

L. Hoppanová, (1), D. Hudecová (1), V. Medvecká (2), J. Šimončicová (1), B. Kaliňáková (1), A. Zahoranová (2)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie Slovenskej technickej univerzity, Bratislava, SK

(2) Katedra experimentálnej fyziky, Fakulta matematiky, fyziky a informatiky Univerzity Komenského, Bratislava, SK

Obilniny sa veľkou mierou podieľajú na výžive nielen obyvateľstva, ale aj hospodárskych zvierat. Pri ich infikovaní vláknitými hubami dochádza k ich znehodnoteniu. V súčasnosti sa nežiaducim účinkom húb snažíme zabrániť použitím fungicídov na poliach a v skladových podmienkach zabezpečením optimálnych podmienok pre skladovanie zrna. V ostatnom období je snaha o ekologizáciu životného prostredia. Keďže parametre kvality potravín sa čoraz viac zameriavajú na biologickú hodnotu a zníženie zdravotného rizika, využitie nízokoteplotnej plazmy (NTP) ako alternatívy má značný potenciál. Ide o čisto fyzikálnu metódu, ktorá inaktivuje mikroorganizmy, je lacná a ľahko aplikovateľná.

Účinku NTP boli vystavené zrná pšenice (odrody Bodyček a Forhand) umelo infikované vláknitými hubami – *Aspergillus flavus*, *Alternaria alternata* a *Fusarium culmorum*. Ako zdroj NTP bol použitý difúzny koplanárny povrchový bariérový výboj vo vzduchu a pri atmosférickom tlaku. Vplyv NTP na umelú mykocenózu bol stanovený hodnotením rastu mikromycét na povrchu zrna pomocou indexu napadnutia. Zároveň bola porovnaná efektívnosť ošetrenia umelo infikovaného zrna hubou *F. culmorum* NTP, moridlom Vitavax 2000 a ich kombináciou.

Pri odrode Bodyček ako aj odrode Forhand stúpala odolnosť húb voči účinku plazmy v poradí *A. flavus*, *A. alternata* a *F. culmorum*. Pri porovnaní efektívnosti ošetrenia zrna infikovaného *F. culmorum* NTP, moridlom Vitavax 2000 a ich kombináciou sme zistili, že efektívnosť ošetrenia klesá v poradí NTP + moridlo Vitavax 2000, moridlo Vitavax 2000 a NTP.

Na základe dosiahnutých výsledkov môžeme konštatovať, že NTP ovplyvňuje rast vybraných zástupcov vláknitých húb na povrchu zrn pšenice, pričom odroda pšenice nezohráva veľkú rolu. Pred samotným ošetrením zrna NTP je potrebné zvážiť jeho ďalšie použitie: uskladnené zrno – dlhšie časy, ktoré potláčajú životaschopnosť mykocenózy; zrno určené na výsev – kratšie časy, ktoré pri kombinovanom ošetrení výrazne znižujú množstvo chemického moridla.

Táto práca bola podporená grantami VEGA 1/0904/14 a Program na podporu mladých vedcov STU Bratislava, 2017.

### 33. Detekce norovirů ve vzorcích vod

J. Hrdý (1,2), P. Vašíčková (1), M. Kubánková (1,3), P. Mikel (1,2)

(1) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i, Brno, CZ

(2) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, CZ

(3) Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, CZ

Při hodnocení kvality vodních zdrojů je dodnes ve většině případů zvažována pouze možná přítomnost bakteriálních původců onemocnění. Vážné riziko však může představovat i kontaminace patogenními virovými agens. Mezi nejčastější nebakteriální původce onemocnění člověka spojené s kontaminovanou vodou patří zástupci rodu *Norovirus* způsobující epidemické gastroenteritidy. Jedná se povětšinou o krátce trvající onemocnění projevující se nevolností, zvracením, křečemi v břišní oblasti, bolestí svalů a nekrvavým průjmem. Ve většině případů není nutná lékařská intervence. Onemocnění malých dětí, postarších osob či imunokompromitovaných jedinců však může mít závažnější nebo až fatální následky. Navíc je nutné vzít v úvahu i výrazný socioekonomický dopad vzniklých epidemií.

Mezi roky 2013 až 2017 byly analyzovány vzorky vod různého původu z oblasti celé České republiky na přítomnost humánních norovirů (NoV GI a NoV GII). Většina vzorků, zejména v případě pitných vod, byla testována v epidemiologické souvislosti s výskytem gastroenteritid.

Pro zakoncentrování virových částic bylo využito 2 izolačních metod, metody filtrace přes negativně nabitě membránové filtry a metody přímé organické flokulace. Izolace nukleových kyselin byla provedena metodou založenou na magnetické separaci. Detekci přítomnosti daného genetického materiálu umožnila reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce probíhající v reálném čase.

Celkem bylo vyšetřeno 149 vzorků, z toho 102 vzorků vod pitných a 47 vzorků vod užitkových. Po provedené analýze byla prokázána přítomnost NoV GI nebo NoV GII v případě 27 vzorků vod pitných a 13 vzorků vod užitkových.

Ze získaných výsledků vyplývá, že NoV GI a NoV GII se ve vodních zdrojích na našem území vyskytují. Tento fakt je tedy nutné vzít v potaz v případě hodnocení bezpečnosti užívání vodních zdrojů.

Práce byla provedena za podpory projektů MZE QJ1210114 a MŠMT LO1218.

### 34. Stress-induced physiological regulation of carotenoid synthesis in *Rhodotorula glutinis*

J. Tkáčová (1), T. Klempová (1), M. Čertík (1)

(1) Institute of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic

Carotenoids are ubiquitous compounds with conjugated polyene chain participating in their valuable features, which ensure their widespread application in commercial field. Because of enormous demand for these compounds, attention has been focused on microbial sources of carotenoids. *Rhodotorula glutinis* is known as a significant producer of these pigments. Numerous external fermentation factors, environmental and physical conditions influence cultivation of *R. glutinis* and accumulation of carotenoid pigments in the yeast cells. Therefore, the study is focused on physiological regulation of carotenoid production by addition of external stress factors into production media.

Cultivation of *R. glutinis* CCY 20-2-26 was performed in 20 mL of media (35 g/L of glucose and 5 g/L of yeast extract) at 28°C, 180 rpm for 192 hours. In order to induce carotenoid overproduction, various stress factors such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (6 mM), CuSO<sub>4</sub> (3 mM), FeCl<sub>3</sub> (2 mM), Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> (0.25 mM) and cultivation under inert atmosphere (N<sub>2</sub>) were applied after 168 hours of cultivation time as carbon-source was completely utilised. Isolated fatty acids were analysed by gas chromatography (GC-6890 N, Agilent) and carotenoids by high-performance liquid chromatography (HP 1100, Agilent) with DAD detector.

When glucose was exhausted, stress factors were added into media to monitor changes of carotenoid synthesis. By comparison with control sample (without stress factor addition) maximal enhancement of pigment accumulation was reached by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induction (<500 µg/g biomass) and achieved 1.3 mg/g biomass with yield 12.8 mg/L. Interestingly, although inert atmosphere led to decrease of carotenoid accumulation in the cells, the pigment yield was still higher (9.5 mg/L) in comparison with reference. Moreover, changes of carotenoid profile were observed. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced β-carotene and torularhodin synthesis, N<sub>2</sub> atmosphere and Se<sup>4+</sup> favoured formation of β-carotene, Cu<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> ions rapidly inhibited all carotenoids of their pathway. In addition, activity of catalase and peroxidase was also studied. N<sub>2</sub> atmosphere and Se<sup>4+</sup> decreased activity of catalase and peroxidase, but H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elevated activity of both enzymes. Presence of Fe<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions resulted in zero activity of both enzymes.

The work was supported by grants VEGA 1/0574/15.

### **35. Produkcia kyseliny $\gamma$ -linolénovej polosuchými kultiváciami s využitím vláknitej huby *Cunninghamella echinulata***

M. Janák (1), T. Klempová (1), P. Gajdoš (1), M. Čertík (1)

(1) Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie Slovenskej technickej univerzity, Bratislava, SK

Polosuché kultivácie sú kultivácie prebiehajúce na tuhých, vo vode nerozpustných substrátoch za neprítomnosti voľnej vody a predstavujú zaujímavú alternatívu riešenia rôznych poľnohospodárskych a potravinárskych odpadov, vedúcu k produkcii nových typov potravín, alebo krmovín obohatených napríklad o polynenasýtené mastné kyseliny, pigmenty, enzýmy a pod. Kyselina  $\gamma$ -linolénová (GLA), patriaca medzi polynenasýtené mastné kyseliny, predstavuje prekursor prostaglandínov v ľudskom organizme. Ich patologický nedostatok môže viesť k ochoreniam ako diabetes, k rôznym kožným ochoreniam a spôsobuje oslabenie imunity. Tukotvorné nižšie vláknité huby radu *Mucorales* sú známi producenti polynenasýtených mastných kyselín. Nižšie vláknité huby rodu *Cunninghamella* sa zaraďujú medzi dobrých producentov GLA a sú schopné využitia rôznych odpadových substrátov z poľnohospodárstva (odpadový jačmeň, pšeničné otruby) a potravinárstva (odpadové oleje a tuky).

Polosuché kultivácie s vláknitou hubou *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 prebiehali v HDPE vreckách. Ako substráty boli použité pšeničné otruby (PO) a odpadový jačmeň (OJ). Tiež bola sledovaná stimulácia produkcie GLA prídavkom odpadového tuku. Profil a obsah mastných kyselín vo fermentovanom substráte bol stanovený plynovou chromatografiou.

Huba *C. echinulata* vykazovala dobrý rast na oboch substrátoch, kde po 5 dňoch rastu bola pozorovaná 22% využitia jačmeňa a 30% využitia pšeničných otrúb. Počas fermentácie sa zvýšila akumulácia mastných kyselín 4,4-násobne vo fermentovanom OJ (6,1 %) a 1,7-násobne vo fermentovanom PO (5,3 %). Zároveň dochádzalo k nárastu obsahu GLA v mastných kyselinách na 8 % (OJ) a 15,0 % (PO), čo viedlo k maximálnym výtťažkom 9,5 mg GLA/g fermentovaného OJ a 11,2 mg GLA/g fermentovaného PO. Stimulácia produkcie GLA odpadovým tukom bola potvrdená len v prípade kultivácií na pšeničných otrubách, kde bolo dosiahnuté takmer 10% navýšenie obsahu GLA. Produkcia GLA polosuchými fermentáciami je zároveň testovaná aj vo fermentačnom tanku.

Práca bola podporená grantom VEGA 1/0574/15 (MŠVVŠ SR), APVV-14-0397 a projektom „Lipofungi“ No. 268305 (Research Council of Norway).

### **36. *Umbelopsis isabellina* as a potential producer of gamma-linolenic acid and carotenoid pigments in process of solid state fermentations**

O. Slaný (1), T. Klempová (1), M. Čertík (1)

(1) Institute of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology STU, Bratislava, SK

Solid state fermentation (SSF) plays an interesting role as an alternative way for industrially important feed production. SSF is environment-friendly process, which produce just a little wastewater and requires low energy while maintaining high product yields. SSF is used for production of many industrially relevant compounds such as polyunsaturated fatty acids, carotenoid pigments ( $\beta$ -carotene), enzymes, etc. This research was focused on production of gamma-linolenic acid (GLA) and carotenoid pigment  $\beta$ -carotene using filamentous fungi *Umbelopsis isabellina*.

Strain *U. isabellina* CCF2412 was obtained from the Culture Collection of Fungi (Charles University, Prague). Substrates (crushed corn, corn waste, cornmeal, oat flakes, barley meal, barley flakes, wheat bran, wheat germ, rye bran, amaranth) were inoculated by adding a spore suspension and static cultivation was performed in HDPE bags for 7 days. Analysis of pigments was carried out with an HP 1100 chromatograph (Agilent) equipped with DAD detector. Fatty acids were analyzed by chromatograph GC-6890 N (Agilent) equipped with the flame ionization detector.

Screening of several cereal substrates showed that fungal strain effectively utilized them. The highest amount of GLA and  $\beta$ -carotene in bioproduct (BP) was reached after cultivation on cornmeal (GLA: 4.2 g/kg BP;  $\beta$ -carotene: 13.8 mg/kg BP). Next step was optimization of fermentation conditions using cornmeal – different temperatures and different amounts of added water into substrate were tested. Maximal amount of  $\beta$ -carotene was reached using of mixture of substrate and water in ratio 1:1,5 and good yields of GLA was also obtained, while fermentation was carried out at 28 °C. In order to monitor production of GLA and  $\beta$ -carotene in BP, growth kinetics was investigated. Yield of GLA increased every day up to 8.3 g/kg BP and amount of  $\beta$ -carotene reached the value 54.8 mg/kg BP after 7 days of fermentation.

Bioproducts obtained by SSF cultivations were applied as an additive in feed for chickens, especially for broilers. Accelerated growth of chickens and improved quality of their meat was observed.

The work was supported by grants VEGA 1/0574/15 and APVV-14-0397.



### **37. Optimalizace příkrmových fermentací pro expresi rekombinantních proteinů v *Escherichia coli***

K. Sedláčková (1), Z. Valentová (1), R. Chaloupková (1), L. Chrást (1), J. Damborský (1)

(1) Loschmidtovy laboratoře, Ústav experimentální biologie a Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

Velkokapacitní produkce rekombinantních proteinů je jednou z klíčových součástí moderních biotechnologií. Rekombinantní proteiny produkované bakteriemi nebo kvasinkami nacházejí své využití v humánní i veterinární medicíně, potravinářském průmyslu, při výrobě pracích prášků nebo bioremediaci toxických látek. Třepané lahve jsou vhodné pro laboratorní použití, ale pro náročnější použití jsou nevýhodné především z důvodu špatně kontrolovatelných podmínek růstu a nedostatečné dostupnosti kyslíku, který je v mnoha bioprocesech limitujícím faktorem. Fermentory jsou zařízení, které řeší tyto problémy a jsou proto vhodné pro kultivace rekombinantních mikroorganismů a heterologní expresi proteinů.

Naše práce je zaměřena na optimalizaci exprese a purifikace špatně exprimovatelných proteinů v bakterii *Escherichia coli*. Kultivace jsme prováděli v laboratorním fermentoru Labfors 3 (INFORS HT) s počátečním objemem 3 litry definovaného media s glycerolem jako jediným zdrojem uhlíku. Všechny kultivace probíhaly při 30 °C a pH 7. Limit  $dO_2$  byl stanoven na 25 % s kaskádou otáček míchání 600 – 1300 rpm a průtokem vzduchu 3 – 5 l/hod, odpovídající 1 – 1,3 vvm. Příkrmové fermentace (angl. fed-batch) jsou pro expresi rekombinantních proteinů nejlepší, a proto jsme v rámci tohoto projektu otestovali několik různých příkrmových strategií.

Pomocí optimalizace příkrmové fermentace jsme dosáhli výrazných zvýšení optické hustoty kultury až na OD 200 a sušiny nad 50 g/l. Proteiny exprimované v *E. coli* jsme purifikovali pomocí metaloafinitní chromatografie. U proteinu z rodiny fibroblastových růstových faktorů, který má významnou roli v hojení ran nebo kosmetice, jsme dosáhli výtěžku přes 1 gram proteinu na litr, zatímco v třepané láhvi se výtěžky tohoto proteinu průměrně pohybují okolo 20 mg/l. V případě halogenalkandehalogenasy DhcA jsme dosáhli výtěžku 280 mg/l z běžných výtěžků v třepané láhvi 4 mg/l, u haloalkoholdehalogenasy HhcC jsme získali 840 mg/l, přičemž výtěžek v třepané láhvi je 130 mg/l.

V této studii jsme ukázali, že optimalizace kultivačních podmínek a příkrmové strategie může významně přispět ke zvýšení výtěžků rekombinantních proteinů, včetně proteinů s nízkými výtěžky. U růstového faktoru jsme navýšili produkci na padesátinásobek.

## P 01.

### Využití zeolitových filtrů při chovu ryb a jejich vliv na rozvoj nitrifikačních mikroorganismů

K. Skleničková (1), D. Koloušek (2), E. Šviráková (3), M. Pečenka (1), I. Růžicková (1)

(1) Ústav technologie vody a prostředí, Fakulta technologie ochrany prostředí, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, CZ

(2) Ústav chemie pevných látek, Fakulta chemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, CZ

(3) Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha, CZ

Nejprve byla zjištěna specifická selektivita zeolitových materiálů při sorpci amonných kationtů ( $\text{NH}_4^+$ ), které byly vyprodukovány rybami, z akvarijní vody. Dalším stanovovaným parametrem byla vzájemná interakce zeolitových sorbentů a nitrifikačních mikroorganismů. Smyslem práce je především prodlužovat údržnost vody, ve které dochází při využívání zeolitových filtrů k méně hojnému nárůstu mikrobiální populace. Dezintegraci vody zpomaluje pomyslná „kompetice“ mezi zeolity a nitrifikačními organismy.

Byly testovány tři zeolitové preparáty (ozn. KlinoMn, BBC a geopolymerní zeolit A), dva z nich byly přírodního typu. Přírodní KlinoMn byl povrchově upraven vrstvou oxidu manganičitého ( $\text{MnO}_2$ ). Posledním preparátem byl v laboratoři připravený geopolymerní zeolit A. Všechny sorbenty byly vloženy do dvoukomorového filtru, přes který cirkulovala akvarijní voda v měsíčních cyklech. Žádný z preparátů negativně neovlivnil život ryb. Jediný negativní účinek se projevil u filtru s geopolymerním zeolitem A. Byl spojen se zvyšováním pH akvarijní vody, a to kvůli iontové výměně kationtů  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$  během experimentů.

Při aplikaci jednotlivých zeolitových materiálů do filtru, disponovaly přítomné nitrifikační bakterie v akváriu s nižší koncentrací  $\text{NH}_4^+$  pro své biochemické procesy, což se projevilo méně intenzivním nárůstem jejich populace. Procesy znečišťování akvarijní vody byly zpomalovány, na základě probíhající „kompetice“ o ionty  $\text{NH}_4^+$ . V akvarijní vodě byly jako hlavní nitrifikační zástupci identifikovány AOB (bakterie oxidující amonia), a to za pomoci molekulárně biologické metody FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace), která poskytla kvalitativní výsledky. Bakterie rodů *Nitrospira* a *Nitrobacter*, představující běžnou populaci nitrifikačních bakterií akvárií, nebyly však ve vzorcích zeolitových filtrů zjištěny.

Ze všech testovaných materiálů se ukázal být nejvhodnějším přírodní povrchově upravený preparát KlinoMn, který udržoval hodnotu pH vody v optimálním rozmezí hodnot 7,0–7,2. Tento sorbent je možno dlouhodobě používat při filtraci akvarijních vod, protože udržuje relativně nízké koncentrace  $\text{NH}_4^+$  a čistou vodu bez zákalu. Výsledky byly porovnány se systémem bez využití zeolitového filtru.

Tato práce je podporována Grantovou agenturou ČR, projektem GA16-13778S.

## **P 02.**

### **Komparativní analýza dvou odlišných linií plazmidů kódujících exfoliativní toxin B u klinických kmenů *Staphylococcus aureus***

T. Botka (1), V. Růžičková (1), K. Svobodová (1), R. Pantůček (1), P. Petráš (2), D. Čejková (3), J. Doškař (1)

(1) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy university, Brno, CZ

(2) Státní zdravotní ústav, Národní referenční laboratoř pro stafylokoky, Praha, CZ

(3) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, CZ

Schopnost některých kmenů *S. aureus* produkovat exfoliativní toxiny je podmíněna obsahem specifických mobilních genetických elementů. Z hlediska medicínské praxe jsou nejvýznamnější exfoliativní toxiny A a B, které jsou kódovány geny lokalizovanými na profága, respektive plazmidu.

V této práci byly charakterizovány plazmidy kódující exfoliativní toxin B (ETB plazmidy), které byly izolovány z klinických kmenů zodpovědných za hromadná epidermolytická onemocnění v českých porodnicích. Byla provedena genotypizace a restriční analýza plazmidů i jejich hostitelských kmenů. Na základě sekvenční analýzy byla navržena multiplex PCR pro detekci všech sekvenčních typů ETB plazmidů.

Sekvenování, multiplex PCR a komparativní analýza ukázaly, že většina ETB plazmidů sdílí společnou „core“ sekvenci, typickou přítomností genů pro bakteriociny, inhibitor epidermální diferenciace typu C či rezistenci ke kadmiu. Tvoří tak ucelenou linii (I), jejíž zástupce lze rozdělit do čtyř sekvenčních typů podle přítomnosti specifických genomových úseků. Ty jsou tvořeny replikačními geny či transpozony kódujícími rezistenci k antibiotikům. Všechny plazmidy této linie byly detekovány v kmenech klonálního komplexu CC121, které často obsahovaly i profága s genem pro exfoliativní toxin A. Z bezprofágového kmene sekvenčního typu ST130 byl izolován dosud nepopsaný typ ETB plazmidu, obsahující geny pro konjugaci a také nové varianty genů pro exfoliativní toxin B a další faktory virulence. Geny lokalizované v „core“ sekvenci linie I se u něj nevyskytují.

Přestože se dosud předpokládalo, že ETB plazmidy jsou relativně uniformní, byl v této práci izolován a detailně popsán nový, sekvenčně zcela odlišný typ. Svými vlastnostmi tak reprezentuje novou dosud nepopsanou linii (II) ETB plazmidů, mající však velký vliv na patogenitu toxinogenních kmenů *S. aureus*.

### **P 03.**

#### **Penetrace hyf *Serpula lacrymans* (dřevomorka domácí) zdivem činžovního domu: případ Praha Vršovice**

J. Gabriel (1), K. Švec (1)

(1) Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Praha, CZ

Dřevomorka domácí (*Serpula lacrymans*) patří mezi nejrozšířenější agresivní houby hnědé hniloby; pro svůj růst a rozmnožování vyžaduje dřevní hmotu, kterou rozkládá charakteristickým způsobem na kostky či až prášek tmavohnědé barvy. Z dřevní hmoty primárně využívá (světlou) celulózu; není schopna rozkládat (hnědý) lignin, který dává rozloženému dřevu barvu. Houba vytváří zprvu vatovité mycelium, později syrrocia až o velikosti několika decimetrů čtverečních a posléze charakteristické žlutozelené plodnice, které mohou dosahovat až rozsahu několika metrů čtverečních. Vodu a živiny přijímá myceliem a rhizomorfy (svazky hyf o výsledné tloušťce až jednotek mm). Rhizomorfy jsou schopny proniknout kamenným či cihlovým zdivem. V této případové studii z prosince 2016 resp. ledna 2017 popisujeme rhizomorfy o délce několika metrů, které pronikly z ložiska v zanedbaném obecním domě zdivem do světlíku a odtud se rozšířily do bytů v sousedním soukromém domě. Výstavba pochází ze začátku 20. století a blok činžovních domů je sice na kopci, avšak odtoky dešťové vody jsou po stavebním zásahu ze 70. let velmi omezené. Houba vytvořila rozsáhlé plodnice ve sklepě, syrrocia pod podlahou a zdokumentována je i půlcentimetrová vrstva uvolněných spor. Identifikace houby byla v tomto případě jednoznačná, vizuální, ale pro jistotu byly prohlédnuty i spory. V současné době probíhají doporučené sanační práce, spočívající zatím pouze v mechanické očištění a nátěru komerčním protihoubovým přípravkem. Jiný druh sanace vzhledem k rozsahu poškození a tloušťce zdiva resp. velikosti světlíku patrně nebude možný. V tomto případě byl po odběru vzorků, pořízení fotodokumentace a návrhu sanačních prací vypracován soudně-znalecký posudek. Případ vzhledem k neochotě problém řešit zřetelně míří k soudnímu dvoru. Součástí posteru je i kritický přehled současných fyzikálních technik využitelných k likvidaci dřevomorky domácí.

## **P 04.**

### **Composition, functional diversity and genetic determinants of resistance in the chicken caecum microbiota after antibiotic treatment**

D. Marosevic (1), J. A. Frank (1), M. Kaevska (1), Z. Jaglic (1)

(1) Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

(2) Department of Chemistry, Biotechnology and Food Science, Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norway

Excessive application of antibiotics in both clinical and agricultural settings has led to the selection and spread of resistant pathogenic as well as commensal bacteria. Resistance determinants are often harboured and shared *via* transposable elements among gut microbiota under antibiotic pressure. A model study in chicken was designed in order to evaluate how caecum microbial community structure and gene content enriched with *Enterococcus faecalis* harbouring the plasmid pAM $\beta$ 1 carrying the *erm*(B) resistance gene is affected one week after the cessation of antibiotic treatment. Four week old chicken were treated with tylosin, lincomycine, and chlortetracycline for a week. Seven days later, chicken caeca were collected and the microbial community composition and functional diversity characterised using small subunit (SSU) rDNA amplicon sequencing and shotgun metagenomics. The most abundant caecal phylotypes identified belong to the *Firmicutes* phylum, followed by *Proteobacteria* and *Actinobacteria*. In comparison to caecal samples not treated with antibiotics, representatives of the *Actinobacteria* phylum were enriched in caeca treated with antibiotics. When evaluating the gene content, less than 0.1% of the 25,573 to 115,210 coding sequences could be identified as antibiotic resistance genes, with no significant difference between caeca exposed to antibiotics and the negative control, suggesting a rapid return to the baseline resistance gene level in the caecum. However, genes that confer resistance against macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS<sub>B</sub>) group of antibiotics were found only in caeca treated with antibiotics. Evidence for transposons that harbour both resistance genes against tetracycline and MLS<sub>B</sub> antibiotics were found in chicken caeca treated with antibiotics, as well as among the untreated, emphasizing once more the potential present in the gut microbiota to mobilize and exchange genetic material that could provide selective advantage under antibiotic pressure.

## **P 05.**

### **Genetic background of MLS<sub>B</sub> and tetracycline resistance in livestock associated Enterococci from Czech Republic**

D. Marosevic (1), M. Kaevska (1), Z. Jaglic (1)

(1) Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

#### ***Abstract***

*Enterococcus* spp. are part of the commensal microbiota in the mammalian gut, but in recent years *E. faecium* and *E. faecalis* became one of the most common causes of nosocomial infections worldwide due to the accumulation of many antibiotic resistance and virulence genes. Animals, and especially food producing animals, are often accentuated as a possible reservoir of both resistant bacteria and genetic determinants of resistance, which could be transferred to human pathogens. The objective of this study was to investigate the genetic background of erythromycin and tetracycline resistance in life-stock associated enterococci in order to elucidate their genetic linkage and the implications this may have on public health. We performed whole genome sequencing of 33 strains isolated from turkey cloacal swabs and cow mammary glands. The most often found resistance genes were *erm*(B) (n=32) and *tet*(L) (n=17). This combination of genes was most common in *E. faecalis* (n=10) and *E. faecium* (n=7), while *E. gallinarum* (n=9) were exclusively carrying *erm*(B) and *tet*(M) always in combination with the vancomycin resistance operon and aminoglycoside resistance genes *ant*(6)-Ia and *aph*(3')-III. The combination of antibiotic resistance genes point to a difference in circulating genes among different live-stock associated enterococcal species. Although human infections with *E. gallinarum* are extremely rare, it seems that this species is more burdened with antibiotic resistance genes compared to the opportunistic pathogens *E. faecium* and *E. faecalis* and could serve as a reservoir for other pathogenic bacteria.

## P 06.

### Dlouhodobá studie prevalence protilátek proti vybraným zoonotickým patogenním mikroorganismům v populaci hlodavců

A. Cvrček (1,2), A. Žáková, J. Janeček, N. Nádeníčková, B. Švejdová, H. Nejezchlebová

(1) Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno

(2) Ústav experimentální biologie, Recetox, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, Úvod

**Úvod:** Zoonózy tvoří skupinu onemocnění přenosných ve společenstvech zvířat, přenosná i na člověka. Populace drobných savců žijících na území ČR jsou významnými rezervoáry některých patogenních zoonotických agens. Cílem studie bylo detekovat vytvořené protilátky IgM, IgG infekčních agens *Borrelia burgdorferi* s. l., *Coxiella burnetii* a *Francisella tularensis*, *Leptospira interrogans* s.l. v séru a výplachu srdce.

**Metodika:** Na třech lokalitách na Moravě (Moravský kras, Studénka, Mohelno) proběhl v letech 2010-2014 odchyt malých savců. Celkem bylo odchyceno 679 malých savců druhů *Apodemus flavicollis*, *A. agrarius*, *A. sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus*, *Microtus arvalis* a *Sorex araneus* a metodou ELISA a MAL (*Leptospira interrogans* s.l.) byla zjištěna přítomnost protilátek. Výsledky dlouhodobé studie byly zpracovány statisticky.

**Výsledky:** Prevalence jednotlivých patogenních mikroorganismů: kategorie **Pozitivita 1** – zahrnuje vzorky jen pozitivní; **Pozitivita 2** zahrnuje vzorky pozitivní i hraniční.

*Borrelia burgdorferi* sensu lato (N=679)

IgM: Pozitivita 1 N = 66 (9,7%), Pozitivita 2 N = 164 (24,2%)

IgG: Pozitivita 1 N = 31 (4,6%), Pozitivita 2 N = 101 (14,9%)

*Francisella tularensis* (N=568)

IgM: Pozitivita 1 N = 25 (4,4%), Pozitivita 2 N = 44 (7,7%)

IgG: Pozitivita 1 N = 3 (0,5%), Pozitivita 2 N = 29 (5,1%)

*Coxiella burnetii* (N=568)

IgM: Pozitivita 1 N = 48 (8,5%), Pozitivita 2 N = 101 (17,8%)

IgG: Pozitivita 1 N = 9 (1,6%), Pozitivita 2 N = 22 (3,9%)

*Leptospira interrogans* s. l. (N = 568)

Pozitivita 1, N = 44 (7,7%)

CELKEM pozitivita pro všechny patogeny:(2012-14) N = 568, Pozitivita 2 N = 143 (25,2%)

**Závěr:** Nejvíce protilátek bylo vytvořeno proti *Borrelia burgdorferi* s. l. a nejméně proti *F. tularensis*. Všechny vzorky byly charakterizovány nízkým výskytem IgG protilátek. Jediný statistický rozdíl mezi lokalitami byl u *Leptospira interrogans* s. l., kdy vyšší pozitivita jedinců se objevila na zaplavované lokalitě Studénka. U patogenů *F. tularensis* a *C. burnetii* se jevil být rezervoárem *Clethrionomys glareolus*, než zástupci rodu *Apodemus*. Z tohoto výzkumu vyplývá, že populace drobných savců žijících na území ČR jsou významnými rezervoáry některých patogenních zoonotických agens.

Tento výzkum byl podpořen Specifickým výzkumem Masarykovy Univerzity Brno

## **P 07.**

### **Identifikace bakterií v polymikrobiálních vzorcích pomocí analýzy délky terminálních restrikčních fragmentů**

T. Mráčková (1), H. Obručová (1), I. Kotásková (1), V. Holá (2), F. Růžička (2), T. Freiburger (1)

(1) Genetická laboratoř, Centrum kardiiovaskulární a transplantační chirurgie, Brno, CZ

(2) Mikrobiologický ústav, Fakultní nemocnice u Svaté Anny, Brno, CZ

#### Úvod

Polymikrobiální povaha infekce může znamenat diagnostický i terapeutický problém. Klasické kultivační techniky zachytí pouze malou část potenciálních původců polymikrobiálních infekcí. Pro rozšíření pohledu na komplexnost bakteriálních společenstev je možné klasické metody doplnit o metody molekulární biologie. Cílem práce bylo optimalizovat metodu analýzy délky terminálních restrikčních fragmentů (T-RFLP) a použít ji pro identifikaci bakterií v polymikrobiálních klinických vzorcích s detekcí pomocí fluorescenční kapilární elektroforézy.

#### Metody

Byla provedena *in silico* analýza genu pro *16S rRNA* a na jejím základě byly vybrány vhodné primery a restrikční endonukleázy. Následně byla optimalizována PCR, restrikční štěpení a podmínky kapilární elektroforézy. Navrženou metodou byly analyzovány sbírkové kmeny bakterií a vytvořena interní knihovna délek fragmentů. Poslední fází experimentu bylo testování polymikrobiálních klinických vzorků moči, sonikátů katétrů a stentů.

#### Výsledky

V práci je prezentována možnost využití metody pro taxonomickou identifikaci původců polymikrobiálních infekcí močových cest. Byla vytvořena interní knihovna, podle které lze odlišit 31 skupin ze 46 druhů bakterií. Celkem bylo analyzováno 52 klinických vzorků, ve kterých byl nejčastěji detekován rod *Staphylococcus*, zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* a *Enterococcus faecalis*. Při srovnání s kultivačními metodami a metodou denaturační gradientové elektroforézy (DGGE) se výsledky více shodovaly s DGGE.

#### Závěr

Analýza délky terminálních restrikčních fragmentů se jeví jako slibný detekční a identifikační postup pro určení bakteriálních původců polymikrobiálních infekcí močových cest. Tato technika může sloužit jako doplňující metoda kultivace, obzvláště pak pro záchyt obtížně kultivovatelných bakterií.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 16-31593A.



## **P 08.**

### **Stanovenie mikroorganizmov čeľade *Enterobacteriaceae* v surovom mlieku na princípe detekcie spotreby kyslíka**

V. Lehotová (1), M. Petruľáková (1), Ľ. Valík (1)

(1) Oddelenie výživy a hodnotenia kvality potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava, SR

S účelom eliminovať časovú náročnosť a prácnosť tradičných platňových metód v mikrobiológii, ktorých využitie je podporené normami ISO, bola vyvinutá pomerne nová, rýchla metóda GreenLight™ (Mocon Inc., MN, USA; Luxcel Biosciences Ltd, Cork, Írsko). Je klasifikovaná ako optická metóda, založená na princípe fotoluminiscencie prostredníctvom využitia optických senzorov citlivých na prítomnosť kyslíka. Technika, ktorú predstavujeme v tejto práci nám umožňuje poskytnúť výsledok do 24 h, v závislosti od počtu a skupiny mikroorganizmov v danej vzorke.

Na základe potenciálneho využitia zariadenia GreenLight™, nielen v potravinárskej praxi, sme v doterajšej práci overovali aplikáciu tejto metódy pre najvýznamnejšie indikátorové a indexové mikroorganizmy, vrátane kvasiniek a vláknitých húb, v rôznych potravinových matriciach. Naším cieľom bolo rozšíriť spektrum stanovení indikátorových skupín mikroorganizmov o čeľad *Enterobacteriaceae* a zhodnotiť vplyv potravinovej matrice, prípadne metabolitov týchto baktérií na samotný priebeh merania.

V rámci kalibrácie metodiky pre čeľad *Enterobacteriaceae* a špecifickejšie aj pre skupinu koliformných baktérií bola ako vzorka zvolené surové mlieko už s natívne vyskytujúcou sa spomínanou mikrobiotou. Ich respirácia bola sledovaná v príslušnej potravinovej matici, riedenej v pomere 1:9 vhodným selektívnym živným médiom vo vialkách APCheck™ so špecifickým fluorescenčným činidlom, inkubovaných pri teplote 30 °C v zariadení GreenLight™.

Zaznamenané odozvy na spotrebu kyslíka boli vyhodnotené ako závislosti času prekročenia prahovej hodnoty spotreby kyslíka od počtov mikroorganizmov stanovených kultivačne platňovou metódou. Negatívne hodnoty smerníc lineárnych závislostí poukazovali predovšetkým na rýchlosť rastu a potrebu kyslíka. Z pohľadu celkovej variability medzi dvoma použitými metódami nás zaujímali hodnoty koeficientov determinácie závislostí. Pre skupinu koliformných baktérií dosiahla korelácia medzi jednotlivými premennými štatistickú významnosť  $R^2 = 0,91$  a pre celkové *Enterobacteriaceae*  $R^2 = 0,93$ . Z doposiaľ získaných výsledkov je možné konštatovať, že metóda GreenLight™ poskytuje priestor pre rýchle rozhodnutia, založených na výsledkoch kultivačného stanovenia, resp. hodnotách KTJ/ml al. g, a to dokonca ešte aj v ten istý deň, kedy sa odobrala vzorka. Po kvalitne vykonanej kalibrácii tejto metódy je vysoko pravdepodobné jej uplatnenie nielen pre rutinné vyšetrenia širokého spektra potravinových matric, ale tiež prípadne pre účely čistiarní odpadových vôd.

**Pod'akovanie:** Autori ďakujú spoločnostiam Biomedica a Mocon Inc. za poskytnutie zariadenia GreenLight™ (model 930) a spotrebného materiálu v podobe APCheck™ vialiek. Zároveň táto práca bola podporovaná grantom MŠ SR VEGA č. 1/0096/17.

## **P 09.**

### **Vliv mléčných oligosacharidů na střevní bakterie**

R. Švejtil (1), K. Sochorová (1), H. Jiroušková (1), V. Rada (1)

(1) Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, CZ

Mléko je zdrojem mnoha cenných živin, jejichž zastoupení se mezidruhově liší, což platí i pro oligosacharidy. Zatímco mateřské mléko obsahuje vysoké množství oligosacharidů, tak u mléka přežvýkavců je jejich množství řádově nižší. Význam mléčných oligosacharidů není zcela objasněn, u oligosacharidů mateřského mléka je však znám příznivý účinek na některé probiotické bakterie, zejména bifidobakterie. Cílem našeho výzkumu bylo porovnat vliv lidských a zvířecích oligosacharidů na bifidobakterie a laktobacily lidské i zvířecí.

Byly izolovány oligosacharidy z mateřského mléka a z kravské syrovátky. Oligosacharidy mateřského mléka byly dále frakcionovány a byl posouzen vliv jednotlivých frakcí na střevní bakterie. Oligosacharidy kravského mléka byly pro růst bakterií využity jako celek. Kromě růstu bakterií byly sledovány i hodnoty pH a produkce kyseliny mléčné.

Zatímco oligosacharidy mateřského mléka byly dobrým zdrojem energie zejména pro *Bifidobacterium bifidum* a částečně i pro *Bifidobacterium breve*, tak oligosacharidy kravského mléka nepodporovaly růst žádných kmenů bifidobakterií, ani laktobacilů.

Naše výsledky naznačují, že oligosacharidy kravského mléka mají jinou funkci, než prebiotickou a i z tohoto důvodu nejsou vhodnou náhradou oligosacharidů mateřského mléka do umělých kojeneckých výživ, které tak i nadále zůstávají nenahraditelnou součástí mateřského mléka.

## **P 10.**

### **Mutagenesis of the immunomodulatory M3 protein of MHV-68 reveals residue essential for interaction with CCL5 and CXCL8 chemokines**

R. Matúšková (1), P. Belvončíková (1), M. Kúdelová (1)

(1) Department of Molecular Pathogenesis of Viruses, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SK

Chemokines are small pro-inflammatory mediators that regulate trafficking and effector functions of leukocytes, thus play an important role in host defense against invading pathogens. Dysregulation of this chemokine signalization is responsible for many autoimmune diseases. After all, chemokines present potential therapeutic targets in autoimmune diseases treatment or anticancer drugs development. Given the central role chemokines play in antiviral defense, it is not surprising that many viruses have evolved strategies to modulate chemokine function to their benefit. Large DNA viruses encode viral chemokine-binding proteins that neutralize host chemokine network. M3 protein encoded by the Murine herpesvirus 68 (MHV-68), firstly discovered in Slovakia, is a unique immunomodulatory protein enable to bind a broad spectrum of chemokines. In this study, we aimed to investigate how selected mutations affect biological properties of M3 protein *in vitro*, namely its affinity to chemokines. We have introduced four point mutations (*mI-mIV*) into *M3* gene and prepared four recombinant M3 proteins in *E. coli*. The specificity and the strength of binding to CCL5 and CXCL8 chemokine of purified recombinant proteins was determined by Western blot analysis and ELISA tests. In conclusion, we have found that *mIII* mutation of Thr272 residue partially impairs the function of M3 protein and reduces chemokine blockade suggesting that 272 residue is involved in M3/CCL5 as well as M3/CXCL8 interaction.

This work was supported by grants APVV-0621/12 and VEGA 2/0087/17.

## **P 11.**

### **Infectious dose of Murine gammaherpesvirus 68 in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia**

M. Jánošová (1), M. Vrbová (1), P. Belvončíková (2), M. Slovák (3), M. Kúdelová (2)

(1) Comenius University, Faculty of Natural Sciences, Department of Molecular Biology and Slovak Academy of Sciences; monika.janosov@gmail.com

(2) Biomedical Research Center, Institute of Virology, Department of Molecular Pathogenesis of Viruses

(3) Institute of Ecology, Bratislava, SK

Murid herpesvirus 4 strain 68 (MuHV-4; MHV-68) is recognized as a natural pathogen of small wild murine rodents which serve as hosts to *D. reticulatus* ticks. It has not yet been fully explained how this virus spreads in nature. The most recent molecular studies have indicated that ticks could play a role in transmission of virus from infected to uninfected mice. The aim of this study was to expand previous data describing the occurrence of MHV-68 in *Ixodes ricinus* and *D. reticulatus* ticks collected in Slovakia, supporting the hypothesis that MHV-68 might be a newfound pathogen in ticks. The incidence of MHV-68 was evaluated by nested PCR in out of 48 adults collected from the vegetation in Vojka nad Dunajom, situated in south-western Slovakia in the year 2012. In virus positive ticks the copy number of virus genome was determined by a real-time PCR assay specific for ORF65. We determined an infectious dose of MHV-68 in ticks that varies from  $2.2 \times 10^4$  –  $8.6 \times 10^6$  copies of viral genome. The finding support the idea that ticks which regularly feed on mice living in the same biotope could be infected with murine herpesvirus from their hosts.

This work was supported by grants VEGA 2/0087/17 and APVV-0621/12.

## **P 12.**

### **Heme arginate as a latency reversing agent for HIV cure**

M. Madlenakova (1,2), P. Shankaran (1) , V. Hajkova (1,2), Y. Fujikura (1), D. Jilich (3,4), J. Belacek (5), Z. Melkova (1,2)

(1) Department of Immunology and Microbiology, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ

(2) BIOCEV, Biotechnology and Biomedicine Center of the Academy of Sciences and Charles University, Vestec, CZ

(3) AIDS Center Prague, Na Bulovce Hospital, Prague, CZ

(4) Department of Infectious and Tropical Diseases, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Na Bulovce Hospital, Prague, CZ

(5) Institute of Biophysics and Informatics, 1st Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ

Infection with Human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) cannot be cured as the virus persists in latently infected cells. Consequently, the research focuses on approaches towards HIV-1 cure, namely on the attempts to reactivate and purge HIV-latently infected cells (so called “shock and kill” therapy). New latency reversing agents are being actively developed and tested in clinical studies. We have previously demonstrated that heme arginate (HA; Normosang, Orphan Europe), a drug approved for human use in treatment of hepatic porphyria, can reactivate the latent provirus in synergism with PKC inducers, while inhibiting HIV-1 replication during the acute infection. Further, the research in our lab has revealed that heme- and iron-mediated redox stress can stimulate latent HIV-1 reactivation in latently infected cell lines as well as in HIV+ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cultured *ex vivo*.

In order to assess the feasibility of HA administration to HIV+ patients for establishing its stimulatory effects on reactivation of the latent HIV-1 *in vivo*, we characterized and compared various virological, hematological and biochemical parameters in HIV+ patients with and without combined antiretroviral therapy (cART). Further, we have established the methodology and to determine cell-associated HIV-1 RNA and DNA even in patients with no detectable plasma viremia using 2-step semi-nested (RT)-qPCR that combines the accuracy and precision of real-time PCR and the sensitivity of nested PCR. The correlation of these parameters with hematological and biochemical parameters will be presented.

Differences between HIV+ patients with and without cART were found when comparing different parameters related to the cellular redox state. We found relatively low levels of intracellular GSH in PBMCs, while biochemical parameters characterizing iron and heme-metabolism were found to indicate no risk of iron overload in HIV+ patients. The results of this study served as the basis for designing a new study characterizing the effects of Normosang on reactivation of the latent HIV-1 *in vivo* and its capacity to act as a latency reversing agent.

Financial supports: SVV 260374/2017; Progres Q26/LF1

### P 13.

#### Štúdium cytotoxického a antiherpetického účinku prírodných látok

M. Pospíšilová (1), K. Briestenská (1), J. Mistríková (1,2)

(1) Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SK

(2) Virologický ústav, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Bratislava, SK

Onkogénny potenciál vírusov z podčel'ade *Gammapherpesvirinae* a nedostatok účinných antivirov sú podnetom pre vývoj nových antiherpetických látok. Keďže štúdium ľudských gamaherpesvírusov je limitované ich úzkym hositeľským okruhom, myšací herpetický vírus (MHV-68) je významným nástrojom na testovanie nových možností terapie. Potenciálnu možnosť terapie by mohli predstavovať prírodné látky – kurkumín a citronelal (CT). Kurkumín je polyfenolová látka, ktorá patrí medzi hlavné zložky koreňa rastliny *Curcuma longa*. Kurkumín má široké spektrum využitia v tradičnej medicíne, pričom bola dokázaná aj jeho antivírusová aktivita proti vírusom z rôznych čel'adi. CT a ďalšie monoterpény sú hlavnými zložkami esenciálneho oleja rastliny *Melissa officinalis*, vďaka ktorým má olej antivírusový účinok proti vírusom herpes simplex typu 1 a 2. Kurkumín a CT slúžili ako substráty pri syntéze soforolipidov, a to kurkumín-soforolipidu (CSL) a G-citronelalu (G-CT).

V snahe rozšíriť okruh antivirov sme testovali vplyv 4 uvedených látok na replikáciu MHV-68 *in vitro*. Najskôr bolo nutné stanoviť cytotoxicitu látok pomocou MTT testu, pričom Vero bunky boli inkubované v prítomnosti rôznych koncentrácií látok po dobu 72 hodín. Na základe výsledkov testu cytotoxicity sme určili pre testované látky najvyššie netoxické koncentrácie (kurkumín a CT – 400 µg/ml, G-CT – 200 µg/ml, CSL – 100 µg/ml). Potom sme testovali antivírusovú aktivitu netoxických koncentrácií látok pomocou testu zábrany cytopatického efektu (CPE), spôsobeného MHV-68 na Vero bunkách. Na presnejšiu kvantifikáciu a vizualizáciu slúžil test redukcie plakov (PRA).

Na 4. deň po infekcii (dpi) sme odčítali výsledky a vypočítali sme percento zábrany tvorby CPE. Kurkumín v najvyššej netoxickej koncentrácii znižoval tvorbu CPE až o 87 %, CT o 81 % a CSL a G-CT približne o 84 %. So znižovaním koncentrácie látok došlo aj k poklesu ich antivírusovej aktivity. Pri PRA sme výsledky odčítali na 7. dpi. K úplnej zábrane tvorby plakov v prítomnosti testovaných látok nedošlo. Vzniknuté plaky však boli v porovnaní s kontrolou vírusu výrazne menšie.

Dokázali sme, že kurkumín, CT, CSL a G-CT majú *in vitro* antivírusovú aktivitu proti MHV-68. Pomocou PRA sme však nedokázali ich antivírusovú aktivitu presne kvantifikovať.

Práca vznikla s finančnou podporou grantu VEGA 1/0617/15.

## **P 14.**

### **Bronchoskopické obrazy ventilátorové pneumonie pacientů s toxickou epidermální nekrolýzou**

J. Holoubek (1), B. Lipový (1,2), H. Řihová (1), I. Suchánek (1)

(1) Klinika popálenin a rekonstrukční chirurgie FN Brno

(2) Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

Toxická epidermální nekrolýza (TEN) představuje vzácné onemocnění, které způsobuje řada mechanismů vedoucích k indukci apoptózy v oblasti dermo-epidermální junkce. Klinickou manifestací tohoto onemocnění je různě rozsáhlá kožní exfoliace. Velmi často bývá klinický obraz doprovázen také slizničním postižením. Vzhledem k charakteru onemocnění je základním terapeutickým přístupem k těmto pacientům podávání různých imunosupresivních preparátů. Farmakologicky indukovaná imunosuprese spolu s rizikem postižení sliznice zejména v oblasti dolních dýchacích cest způsobuje vysokou pravděpodobnost rozvoje infekčních komplikací právě v tomto kompartmentu.

Bronchoskopie představuje u těchto pacientů suverénní nástroj jak pro diagnostiku slizničního postižení a infekčních komplikací, tak také pro terapii, a může tak účinně redukovat dlouhodobé komplikace u přeživších pacientů.

**Klíčová slova:** toxická epidermální nekrolýza, ventilátorová pneumonie, bronchoskopie

## **P 15.**

### **Effect of indole acetic acid derivatives on viability of pancreatic INS-1E cell line injured by methylglyoxal**

S. Micháliková (1), J. Viskupičová (1,2), M. Štefek (1), M. Májeková (1)

(1) Institute of Experimental Pharmacology and Toxicology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SK

(1) Department of Biotechnologies, Faculty of Natural Sciences, University of St. Cyril and Methodius, Trnava, SK

The etiology of diabetic complications involves the polyol pathway which degrades excessive glucose by aldose reductase (ALR2). Implicated in diabetic complications, aldose reductase is a potential target of drug action and the search for aldose reductase inhibitors (ARIs) offers an attractive strategy for preventing the onset or the progression of the complication. Substituted indole-1-acetic acids represent a group of ARIs of high activity and selectivity, being promising candidates for clinical studies. Methylglyoxal (MG) is a glycolytic intermediate produced by cells. It is a spontaneous cytotoxic product of glucose metabolism and plays an important role in the pathogenesis of angiopathies in diabetes, aging and neurodegenerative processes. The present study investigated the protective effect of CMTI [5-carboxymethyl-3-mercapto-1,2,4-triazino-[5,6-b]indole] and DPI [2-(2-(ethoxycarbonyl)-8-methoxy-1,2,3,4-tetrahydropyrido[4,3-b]indol-5-yl) acetic acid] on MG-injured pancreatic INS-1E cells. The protective effects of CMTI and DPI were tested on the pancreatic cells in the presence of MG.

The pancreatic INS-1E cell line was incubated in RPMI-1640 medium and treated by the compounds CMTI (1-200  $\mu$ M) and DPI (0.1-300  $\mu$ M) and +/- MG (1, 2, 3 mM) for 24 h. Viability of INS-1E cells was evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. The free radical scavenging activity was determined by DPPH test.

The compound CMTI (5-100  $\mu$ M) displayed a significant protective effect on the viability of pancreatic INS-1E cell line after MG (2 and 3 mM) induced impairment. The compound DPI showed no significant protective effect on the viability of MGX-injured INS-1E cells. The DPPH test revealed significant antiradical activity of CMTI.

The derivative CMTI may represent a promising agent for multi-target pharmacology of diabetic complications by affecting the polyol pathway, oxidative stress and by protecting pancreatic INS-1E cell viability.

**Key words:** aldose reductase inhibitors, diabetic complications, pancreatic INS-1E cells, methylglyoxal, viability

#### **Acknowledgment**

The work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-15-0455, by VEGA grant 2/0111/16 and by EU COST action CM1407.



## **P 16.**

### **Soil yeasts and their killer activity**

H. Dudášová (1), R. Vadkertiová (1)

(1) Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SK

Microorganisms present in natural environment have to compete for nutrition resources and, therefore, some of them produce killer toxins to eliminate competitors. These killer toxins are low molecular weight extracellular proteins or glycoproteins that were found within species of the genera *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Ustilago*, *Barnettozyma*, *Zygosaccharomyces*, and in *Aureobasidium pullulans*. Yeast strains with killer toxin have a potential use in medicine (against animal and human fungal infections), in biological control of post-harvest diseases, and in brewing/winemaking fermentation process (against spoilage strains).

This study is focused on the yeast strains isolated from soil adjacent to fruit trees and their production of killer toxins against isolates from the same peach tree; from different fruit trees (apple, apricot, pear, and plum); and clinical isolates (pathogenic yeasts).

The killer activity of the yeasts originated from the soil adjacent to the same fruit tree was only insignificant. *Trichosporon dulcitum* was sensitive to *Trichosporon porosum* killer toxin, despite of the same origin. *Aureobasidium pullulans* exhibited killer activity against *Schwanniomyces capriotti* (peach), *Trichosporon dulcitum* (peach), and *Cyberlindnera misumaiensis* (pear), whereas *Cystofilobasidium macerans* (peach) showed activity against *Goffeauzyma gastricus* (peach). However, *Barnettozyma californica* (apple), *Cyberlindnera saturnus* (pear), and *Metschnikowia pulcherrima* (plum) showed the killer activity against the majority of the strains isolated from the soil adjacent to peach and pear trees. The majority of the soil yeasts demonstrated killer activity against all strains of the genus *Candida* (clinical isolates). *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Debaryomyces fabryi/vindobonensis*, *Candida oleophila*, *Barnettozyma californica*, *Schwanniomyces capriotti*, and *Cyberlindnera saturnus* showed killer activity against *Malassezia sympodialis*.

The killer strains isolated from different natural environments are important due to their future potential use in medicine, industry, and plant protection.

### **Acknowledgment**

This work was supported by the Slovak Grant Agency of Science (VEGA 2/0023/14).

## **P 17.**

### **Vplyv myšieho gamaherpesvírusu 68 ožiareného ultrafialovým svetlom na normálne a transformované bunky**

V. Mrázová (1), M. Mikušová (1), M. Vrbová (1), E. Nováková (1), M. Šupolíková (1), F. Golais (1)

(1) Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, SK

Niektoré herpetické vírusy po ožiarení ultrafialovým (UV) svetlom sú schopné transformovať bunky *in vitro*. V transformovaných bunkách bola dokázaná nová skupina látok pripomínajúcich rastové faktory. Tieto látky majú schopnosť navodiť v normálnych, netransformovaných bunkách transformovaný fenotyp, kým v transformovaných bunkách menia ich transformovaný fenotyp na normálny. Obidve tieto aktivity je možné neutralizovať antisérom voči danému vírusu, alebo niektorými monoklonálnymi protilátkami proti vírusovému glykoproteínu gB. V našej práci sme infikovali ožiareným myším gamaherpetickým vírusom (MHV-68) netransformované myšie NIH/3T3 bunky a ľudské embryonálne pľúcne bunky MRC-5. Vírus s  $5 \times 10^5$  PFU/ml bol v Petriho miskách vystavený UV žiareniu vo vzdialenosti 20 cm (germicídna lampa). Vzorky odoberané v 30 sekundových intervaloch boli plakovo titrované v bunkách BHK-21. Titer vírusu bol po 150-180 sekundách redukovaný na  $1-5 \times 10^1$  PFU/ml. Transformačná schopnosť vírusu však ostala zachovaná. Vzorky po 150 a 180 minútovom ožiarení boli 10x nariedené a v množstve 10  $\mu$ l nainfikované na vyššie uvedené bunky vyrastené v 24 jamkových kultivačných platničkách. V oboch typoch buniek došlo po infekcii k transformácii a transformovaný fenotyp ostal počas pasážovania buniek zachovaný. V bunkách bol dokázaný vírusový antigén metódou imunofluorescencie a vírusová DNA metódou PCR. Na imunofluorescenciu sme používali hyperimúnne králičie sérom proti MHV-68 a Protein G Alexa Fluor 488 (Invitrogen). V reakcii PCR bol použitý gén ORF50 kódujúci R transaktivátor MHV-68. Ak sme ožiareným MHV-68 infikovali bunky ľudského karcinómu pľúc (A549) a bunky transformovaných ľudských keratinocytov (HaCat) došlo u nich k stabilnej zmene transformovaného fenotypu na normálny, pričom bol v bunkách opäť dokázaný vírusový antigén a vírusová DNA. Vo všetkých infikovaných bunkách bol dokázaný vírusový rastový faktor asociovaný s MHV-68 (MHGF). Jeho aktivitu bolo možné neutralizovať hyperimúnnym králičím sérom proti MHV-68, ako aj dvoma monoklonálnymi protilátkami proti glykoproteínu gB MHV-68.

## **P 18.**

### **Use of Raman spectroscopy for identification of staphylococci**

K. Rebrošová (1), F. Růžička (1), O. Samek (2), M. Šiler (2), P. Petráš (3), J. Sokolová (3), V. Holá (1)

(1) Department of Microbiology, Faculty of Medicine and St. Anne's Faculty Hospital, Pekařská 53, Brno 65691, Czech Republic;

(2) Institute of Scientific Instruments, The Czech Academy of Sciences, Královopolská 147, Brno 61264, Czech Republic;

(3) National Reference Laboratory for Staphylococci, The National Institute of Public Health, Šrobárova 48, Prague 100 42, Czech Republic

Raman spectroscopy is an optical method based on the non-destructive measurement of inelastic scattering of light (Raman scattering). This allows for an identification of a broad spectrum of molecules as well as characterization of molecular composition of a biological/non-biological sample by providing its spectroscopic fingerprint.

The aim of this study was to investigate the use of Raman spectroscopy for the identification and characterization of staphylococci. Characteristic spectra were obtained from a 24-hour culture of each strain grown on the Mueller-Hinton agar plate using the Raman spectrophotometer (Renishaw Invia Raman Spectrometer Renishaw plc., Wotton-under-Edge, United Kingdom). The laser wavelength was set to 785 nm, exposure time to 15 seconds.

Based on the analysis of acquired spectra we were able to differentiate among *Staphylococcus aureus* (n = 57), *Staphylococcus epidermidis* (n = 62) and other species of staphylococci including *Staphylococcus hominis* (n = 7), *Staphylococcus haemolyticus* (n = 6) and *Staphylococcus capitis* (n = 7). Although there might be some problematic strains, namely *S. epidermidis* strains with excess or *S. aureus* strains with deficiency of carotenoid pigments, there is a clear ability of Raman spectroscopy to distinguish between *S. aureus* and *S. epidermidis*. Differences were also found among spectra obtained from other staphylococcal species included in the study. Therefore, Raman spectroscopy can provide a reliable tool for identification of staphylococci.

The work was supported by grants 16-29916A and 16-31593A (Ministry of Health of the Czech Republic).

**Poznámky:**

**Poznámky:**

**Poznámky:**

**Poznámky:**

## Seznam hlavních autorů:

<b>Prezentující autor</b>	<b>Číslo stránky</b>	<b>Prezentující autor</b>	<b>Číslo stránky</b>
Belanová V.	15	Marosevic D.	51
Bena M.	34	Marosevic D.	52
Botka T.	49	Matúšková R.	57
Csank T.	13	Micháliková S.	62
Cvrček A.	53	Michná V.	38
Dudášová H.	63	Mráčková T.	54
Gabriel J.	50	Mrázová V.	64
Gelbíčová T.	11	Muchová P.	22
Habalová K.	17	Pagáč T.	41
Hanusová Z.	32	Pfeiferová B.	30
Holoubek J.	28	Poláková K.	23
Holoubek J.	61	Pospíšilová M.	60
Hoppanová L.	42	Rebrošová K.	65
Hrdý J.	43	Reslová N.	27
Husakova M.	36	Sedláčková K.	47
Janák M.	45	Skleničková K.	48
Jánošová M.	58	Slaný O.	46
Ježíková Z.	29	Straková P.	35
Kostelanská M.	31	Šefranková M.	18
Kučerová S.	26	Šilha D.	12
Kukla R.	16	Škorpíková L.	37
Kumherová M.	19	Švejstil R.	56
Kyznar J.	39	Tkáčová J.	44
Lehotová V.	55	Tomáščíková Z.	33
Lépesová K.	24	Uhlířová Z.	21
Lichvariková A.	40	Vaňková A.	20
Madlenakova M.	59	Závora J.	14
Mališová L.	25		



**Tomáškovy dny 2017**  
**XXVI. konference mladých mikrobiologů**

Mgr. Lukáš Vacek (ed.)

Vydala Masarykova univerzita v roce 2017

1. vydání

Tisk: Tiskárna Knopp s.r.o., U Lípy 926, 549 01, Nové Město nad Metují

ISBN 978-80-210-8585-5

**muni**  
**PRESS**

ISBN 978-80-210-8585-5

