

**XXVII. konference mladých mikrobiologů**

# **TOMÁŠKOVY DNY 2018**



**Masarykova univerzita  
Brno 2018**

**XXVII. konference mladých mikrobiologů**

# **TOMÁŠKOVY DNY 2018**



**Masarykova univerzita**  
Brno 2018

**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).**

© 2018 Masarykova univerzita  
ISBN 978-80-210-8963-1

Sponzoři



labmark

**OLYMPUS**

---



**Abbott**

## Tomáškovy dny 2018 – program

7. 6. 2018

**10:00 – 10:15 Slavnostní zahájení, začátek valné hromady ČSSM (Sál 1)**

**10:15 – 11:45 Nejlepší mladí mikrobiologové (Sál 1)**

**01. Antibiotic resistance beyond the walls of the hospital: the environment and wildlife as reservoirs of bacteria resistant to critically important antibiotics**

I. Jamborová, M. Dolejšká, J. R. Johnson, A. Cizek, I. Literák

**02. Aplikácia kvantitatívnej a prediktívnej mikrobiológie pri zvyšovaní hygienickej bezpečnosti potravín**

A. Medveďová, E. Valík

**03. Making *Pseudomonas putida* like lignocellulose-derived sugars**

P. Dvořák, V. de Lorenzo

**11:45 – 12:00 Valná hromada ČSSM (Sál 1)**

**12:00 – 13:30 Oběd**

**13:30 – 15:00 Klinická mikrobiologie (Sál 1)**

**04. Analýza mykobiomu aneb chybami se člověk učí**

K. Fiedorová, M. Radvanský, E. Němcová, H. Grombířková, M. Vaněrková, T. Freiburger

**05. Racionálna a šetrná terapia onychomykóz cestou podiatrickej ambulancie**

M. Šefranková

**06. *Arcanobacterium haemolyticum* v ranných infekciách**

G. Kroneislová, D. Balíková

**07. *Neisseria gonorrhoeae* jako původce sepse – kazuistika**

A. Studená, V. Adámková, L. Kupidlovská

**08. Asociuje latentná toxoplazmóza s reprodukčnými zmenami v tehotenstve?**

K. Bírová, F. Ondriska, J. Špajdelová, O. Lachký, P. Ščasný, V. Boldiš

**09. Prvý outbreak vankomycín-resistentných enterokokov vo Fakultnej nemocnici v Trnave**

L. Micháliková, J. Brňová, J. Prnová, S. Hnilicová, M. Dzurjaninová

**10. Invazivní pneumokoková onemocnění u dospělých pacientů hospitalizovaných v Nemocnici Na Bulovce**

M. Trojánek, M. F. Kříha, O. Džupová, H. Roháčová, E. Nyčová, J. Kozáková, V. Marešová

## 15:00 – 15:20 Přestávka

### 15:20 – 16:20 Veterinární mikrobiologie (Sál 1)

#### 11. Koaguláza-negativne stafylokoky z rôznych zvierat a produkcia biofilmu

E. Bino, A. Kandričáková, A. Lauková

#### 12. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* a *Encephalitozoon cuniculi* u koček a psů ze Slovinska

N. Kašpárková, E. Bártová, P. Kvapil, Š. Vodlan, K. Sedlák

#### 13. Sledování výše promoření malých savců na vybrané patogenní mikroorganismy, zaměřeno na *Borrelia burgdorferi sensu lato*

M. Nováková, J. Janeček, A. Žáková

#### 14. Využití bakteriofágů pro rychlou detekci životaschopného původce paratuberkulózy metodou phage assay

M. Beinhauerová, I. Slaná

#### 15. Průkaz *Encephalitozoon* spp. u volně žijících drobných savců – srovnání metod single a nested PCR

L. Brlicová, J. Marková, A. Žáková, E. Bártová

### 15:20 – 16:20 Mikrobiologie potravin (Sál 2)

#### 16. Štúdium sekundárných metabolitov *Trichoderma viride* F742 a ich úloha v antibiíze

T. Pagáč, J. Vígl'áš, Z. Ježíková, P. Olejníková

#### 17. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* after Cold Plasma Treatment

J. Šimončicová, B. Kaliňáková, D. Kováčik, V. Medvecká, P. Ďurina, S. Kryštofová, V. Palušková, L. Hoppanová, A. Zahoranová

#### 18. Vliv prebiotických oligosacharidů na střevní mikrobiotu kojenců

R. Švejtil, Š. Musilová, K. Zlomková

#### 19. Pure cultures *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on sensory profile of rosé Cabernet Sauvignon wines

T. Drtilová, K. Bedeová, I. Špánik, K. Ďurčanská, K. Furdíková

#### 20. Sledovanie zmien v tvorbe proteolytických enzýmov u *Trichoderma atroviride* počas konfrotačných kultivácií s fytopatogénmi

H. Galádová, V. Lefkovitšová, Ľ. Varečka, M. Šimkovič

## 19:00 – 23:00 Společenský večer

**8. 6. 2018**

**9:00 – 9:15 Klinická parazitologie (Sál 1)**

**21. Enterobióza a její diagnostika**

J. Peštová, M. Poislová

**9:15 – 10:45 Antimikrobiální rezistence, faktory virulence I (Sál 1)**

**22. Sekvenační analýza *Streptococcus pneumoniae* rezistentního k antibiotikům v České Republice**

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

**23. Rezistence koaguláza negativních stafylokoků v klinické praxi - retrospektivní sledování kmenů z validních materiálů mezi lety 2014 až 2017 ve Všeobecné fakultní nemocnici Praha**

J. Závora, G. Balíková-Novotná, L. Kupidlovská, A. Studená, L. Šemberová, V. Vimberg, L. Zieglerova, V. Adámková

**24. Výskyt vankomycin-rezistentních enterokoků ve FNHK**

K. Vaverková, L. Ryšková

**25. Diverzita beta-laktamových a tetracyklinových genů rezistence v čistírnách odpadních vod**

T. Stachurová, K. Malachová, K. Svobodová

**26. Rezistencia vláknitých hub voči antifungálnym zlúčeninám a nové špecifické miesta zásahu**

Z. Ježíková, L. Jelínková, T. Pagáč, P. Olejníková

**27. Citlivosť kmeňov *Staphylococcus aureus* humánneho pôvodu na komerčné fágové prípravky**

Z. Hubenáková, M. Straka, K.-H. Hsin, L. Slobodníková

**28. Charakterizácia kmeňov *Staphylococcus aureus* obsahujúcich ostrov patogenity s génom pre exfoliatívny toxín D**

D. Kristeková, V. Růžičková, T. Botka, P. Petráš

**10:45 – 11:30 Poster Session (Sál 3)**

**11:30 – 12:35 Antimikrobiální rezistence, faktory virulence II (Sál 1)**

**29. Sledovanie výskytu multirezistentných izolátov gramnegatívnych baktérií z lôžkových zdravotníckych zariadení v SR: štúdia HOSPITAL-ENVIRO-REZ 2015 – 2017**

S. Hnilicová, L. Micháliková, J. Brňová, Z. Sirotná, A. Líšková, V. Krčméry

**30. Charakterizace izolátů *Escherichia coli* a stanovení jejich citlivosti k bakteriocinům**

M. Hrala, J. Bosák, D. Šmajš

**31. Identifikácia a charakterizácia enterokokov rezistentných voči antibiotikám izolovaných z odtokových vôd**

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

**32. Hodnocení vlivu antimikrobiálních látek na mikrobiální biofilm pomocí fluorescenční spektrometrie**

V. Chuchmová, L. Vacek, F. Růžička

**33. Faktory virulence u *Propionibacterium acnes***

P. Muchová, F. Růžička

**34. Antimikrobiální vlastnosti sinic**

A. Siváková, F. Růžička, L. Sehnal, T. Procházková, K. Hilscherová

**12:35 – 13:00 Taxonomie**

**35. Výskyt a charakteristika kmenů *Listeria monocytogenes* izolovaných z přírodního prostředí**

Z. Tomáščíková, L. Pospíšilová, T. Gelbíčová, R. Karpíšková

**36. Nové bakterie rodu *Corynebacterium* izolované na Antarktidě**

L. Křištofová, I. Sedláček, O. Šedo, S. Králová, J. Busse, P. Švec

**13:00 Slavnostní zakončení (Sál 1)**



**8. 6. 2018**

**9:00 – 10:45 Biotechnologie I**

**37. Application of zeolites in fish breeding and their effect on nitrification population development**

K. Skleničková, D. Koloušek, M. Pečenka, D. Vejmelková, I. Růžičková

**38. Development and application of MOL-PCR for the detection of bacterial food-borne infections**

V. Huvarová, N. Reslová, P. Králík

**39. Využití metody Start of Growth Time (SGT) pro high throughput kvantifikaci biofilmu**

L. Vacek, Z. Tučková, F. Růžička, M. Černák

**40. GABA shunt in growth and development of *Neurospora crassa***

K. Ďurišová, M. Oravcová, B. Mosná, Martin Šimkovič, Michal Kaliňák, S. Kryštofová

**41. Využití molekulárně biologické metody LAMP v potravinářství**

K. Loupancová, J. Kyznar, M. Hrubá, E. Šviráková

**42. xMAP technology – detection of pathogenic viruses**

J. Hrdy, P. Vasickova, N. Reslova, V. Michna, P. Kralik

**43. Ověření kvantifikačních standardů využívaných při real-time PCR pomocí droplet digital PCR**

M. Beinhauerová, P. Králík

**44. NSAT (Nucleotide Sequence Analysis Tool) – software pro určení taxonomické příbuznosti bakterií podle podobnosti celogenomových sekvencí**

M. Němec, A. Němec

**10:45 – 11:30 Poster Session (Sál 3)**

## **11:30 – 12:45 Biotechnologie II**

### **45. Biotechnological conversion of waste fat into highly valuable lipid-rich bioproducts using Zygomycetes strains**

O. Slaný, T. Klemková, M. Jašurek, V. Shapaval, I. Márová, M. Čertík

### **46. Bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): combination of biotechnology and nanotechnology**

H. Horváthová, K. Lászlóvá, M. Monoková, K. Dercová

### **47. Analysis of gene cluster required for conidial pigment synthesis in *Trichoderma* spp.**

V. Palušková, L. Hoppanová, M. Kaliňák, S. Kryštofová

### **48. *Serpula lacrymans* a další dřevokazné houby: možnosti ochrany staveb před napadením novými preparáty na bázi nanočástic**

M. Znamínko, F. Zaleš, O. Benada, K. Švec, J. Drbohlavová, E. Polievková,  
A. Nasswetrová, P. Šmíra, J. Gabriel

### **49. Kokultivace treponemálních kmenů DAL-1 a Philadelphia 1 v laboratorních králících**

M. Nováková, M. Strouhal, D. Šmajš

### **50. Effect of waste fat addition on production of $\gamma$ -linolenic acid by fungal solid-state fermentation**

M. Janák, V. Vráblová, I. Márová, V. Shapaval, M. Čertík

## **13:00 Slavnostní zakončení (Sál 1)**

## Postery

**P 01. Plantaricín – like bakteriocín produkovaný kmeňom *Lactobacillus plantarum* LP 13Ba a jeho inhibičná aktivita**

A. Kandričáková, A. Lauková, E. Bino, M. J. Fraqueza

**P 02. Site-directed mutagenesis as a promising tool for modulating the inhibition of chemokines by M3 protein of murine herpesvirus 68 (MHV-68)**

S. Lenhartová, R. Šebová, M. Kúdelová

**P 03. Biosurfactant-enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls**

K. Lászlóvá, P. Olejníková, K. Dercová

**P 04. Možnosť využitia Ramanovej spektroskopie pri identifikácii pôvodcov infekcií močových ciest**

K. Rebrošová, M. Uhlířová, M. Šiler, O. Samek, F. Růžička, V. Holá

**P 05. Závěry z monitoringu osídlenia vodovodných systémov legionelami v zdravotníckych zariadeniach v Slovenskej republike**

D. Šimonyiová, Z. Sirotná, A. Gažiová, E. Pavleová

**P 06. Mikrobiologická kvalita materských mliek.**

A. Gičová, B. Kotvasová, Z. Sirotná

**P 07. Imunologická a molekulárně biologická analýza zoonotických mikroorganizmů ve tkáních malých savců**

A. Žáková, P. Vašková, J. Janeček, E. Bártová, V. Trávníčková, J. Marková

**P 08. Heme arginate as a latency reversing agent for HIV cure**

M. Madleňáková, P. Shankaran, V. Hájková, D. Jilich, L. Machala, P. Martásek, Z. Mělková

**P 09. Diversity and enzymatic activities of soil yeasts associated with fruit trees**

H. Dudášová, M. Balaščíková, R. Vadkertiová,

**P 10. Sekundárna bakteriálna infekcia myší baktériami *Streptococcus pneumoniae* primárne infikovaných vírusom chrípky typu A**

M. Vozárová, K. Tomčíková, J. Hollý, E. Varečková, F. Kostolanský

**P 11. Fragmentácia protilátky izotypu IgG1 špecifickej voči HA2 gp vírusu chrípky**

K. Tomčíková, M. Vozárová, M. Fogelová, F. Kostolanský, E. Varečková

**P 12. Studium adsorpčních vlastností vybraných probiotických bakterií**

E. Fryšová, K. Černá, E. Slaninová, S. Obruča, A. Chytilová

**P 13. Screening produkce biosurfaktantů u vybraných bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty**

I. Pernicová, O. Kratochvílová, D. Kučera, S. Obruča

**P 14. Inhibícia replikácie myšacieho herpetického vírusu 68 (MHV-68) v pľúcach BALB/c myši v dôsledku utlmenia expresie génu IFITM1 prostredníctvom siRNA**  
K. Briestenská, H. A. M. Hussein, S. M. Akula, J. Mistríková

**P 15. The effect of bile on biofilm matrix of *Listeria monocytogenes***  
M. Boháčová, E. Semradová, J. Pazlarová

**P 16. Identifikace bakterií v probiotických kosmetických výrobcích**  
D. Romanovská, Š. Trachtová, A. Hároniková

**P 17. Autochtónne kmene *Saccharomyces cerevisiae* izolované z *Vitis vinifera* v Českej a Slovenskej republike**  
K. Ďurčanská, T. Drtilová, L. Muchová, P. Olejníková, K. Ženišová, K. Furdíková

**P 18. Izolácia a charakterizácia katalytických vlastností tioglukozidázy z vláknitých húb z rodu *Trichoderma***  
H. Galádová, M. Šimkovič

**P 19. Klinické príznaky neuroboreliózy a ich potvrdenie diagnostickými testami**  
M. Scherková, J. Špajdelová, M. Chren

**P 20. Pertussis v rokoch 2011-2015 na Slovensku**  
P. Kondulová, J. Špajdelová

**P 21. Celogenómové sekvenovanie ako metóda na výber štartovacích kultúr na výrobu bryndze**  
B. Szalaiová, V. Kadličeková, A. Lichvariková, T. Szemes, H. Drahovská, T. Kuchta

**P 22. Analýza tvorby biofilmu u klinických izolátov *Cronobacter* spp. a využitie bakteriofágov na jeho elimináciu**  
V. Kadličeková, M. Kajsík, M. Madurkay, H. Drahovská

**P 23. Molekulárno-biologická analýza klinických kmeňov *Streptococcus agalactiae***  
A. Lichvariková, B. Szalaiová, H. Drahovská

**P 24. Sledovanie výskytu antibiotickej rezistencie pre epidemiologické účely vo FN Trnava.**  
J. Prnová, J. Brňová, L. Micháliková, M. Dzurianinová, A. Strehárová, Ľ. Mačeková

**P 25. Zastúpenie mikroorganizmov pri degradácii polymérov PLA/PHB v pôde**  
L. Jeszeová, Z. Kisová, D. Pangallo

7.6.	Sál 1	9:00	10:00	11:00	12:00	13:00	14:00	15:00	16:00
	Sál 2	Z	Nejlepší mladá mikrobiologové	VH	Oběd		Klinická mikrobiologie	P	Veterinární mikrobiologie
8.6.	Sál 1	KP	ATM rezistence, faktory virulence I	P	ATM rezistence, faktory virulence II	Tax	Slavnostní zakončení		
	Sál 2		Biotechnologie I	P	Biotechnologie II				
	Sál 3			Poster session					Mikrobiologie potravin

Z = Slavnostní zahájení, začátek valné hromady ČSSM

VH = Valná hromada ČSSM

P = přestávka

KP = Klinická parazitologie

Tax = Taxonomie

## **01. Antibiotic resistance beyond the walls of the hospital: the environment and wildlife as reservoirs of bacteria resistant to critically important antibiotics**

I. Jamborová (1,2), M. Dolejská (1,2), J. R. Johnson (3), A. Cizek (2, 4), I. Literák (1,2)

(1) Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, CZ;

(2) CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, CZ;

(3) Veterans Affairs Medical Center and University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA;

(4) Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, CZ

The global dissemination of multidrug-resistant bacteria poses a major clinical challenge and serious threat to human health, leaving only a few or no therapeutic options for appropriate treatment of life-threatening diseases. Particular concern has been raised regarding the evidence of increasing incidence of resistant bacteria in wildlife and the environment. However, the reasons behind the presence and success of multidrug-resistant bacteria and their epidemiological plasmids in antibiotic-free environments remain uncovered.

We provide detail genetic analysis of the isolates, particularly clinically important clonal lineages and plasmid groups disseminating emerging resistance mechanisms such as extended-spectrum beta-lactamases, carbapenemases and quinolone-resistance. To clarify the as-yet minimally explored complexity of potential transmission routes of such strains between different ecological niches, comparative genomics of the wide collection of isolates of diverse origin, including humans, animals and the environment, were performed.

We identify plausible sources for the bacteria found in the environment and in wild bird populations, and document an alarming dissemination of emerging clones and epidemic plasmid groups that carry clinically important antibiotic resistance mechanisms. Our data reveal broad genetic commonalities among multidrug-resistant isolates from different source groups, strongly suggesting an exchange of genotypes (i.e., strains, resistance genes or plasmids) between isolates of diverse origin. We demonstrate the existence of environmental reservoirs and potential animal vectors for strains of human health importance such as pandemic *Escherichia coli* ST131.

The data broadens our knowledge regarding the successful spread of particular multidrug-resistant *E. coli* clones between different ecological niches, including the environment and wastewaters. Our results highlights the significant role of migrating wild birds with distinctive dietary habits that live in environments highly influenced by anthropogenic activities in the dissemination of clinically important bacteria.

Financially supported by IGA VFU (215/2018/FVHE), GAČR (18-23532S/P502) and CEITEC 2020 (LQ1601).

## 02. Aplikácia kvantitatívnej a prediktívnej mikrobiológie pri zvyšovaní hygienickej bezpečnosti potravín

A. Medved'ová (1), L. Valík (1)

(1) Oddelenie výživy a hodnotenia kvality potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, SK

Vzhľadom na častý výskyt *Staphylococcus aureus* u ľudí a v potravinách, predovšetkým v mlieku a mliečnych výrobkoch, jeho dobrý rast v potravinových matriciach a následnej možnej produkcii termostabilných enterotoxínov, predstavuje jeho prítomnosť potenciálne riziko ohrozenia zdravia konzumentov. Cieľom tejto práce preto bolo pomocou princípov prediktívnej mikrobiológie popísať vplyv faktorov prostredia (teploty, aktivity vody, prítomnosti baktérií mliečneho kysnutia), ktoré významným spôsobom determinujú dynamiku rastu a metabolickú aktivitu potenciálne patogénneho druhu *S. aureus*.

Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že rast *S. aureus* bol pozitívne determinovaný zvyšujúcou sa inkubačnou teplotou a aktivitou vody a pomocou prediktívnych modelov boli vypočítané kardinálne hodnoty pre jeho rast:  $T_{min} = 7,72$  °C,  $T_{max} = 46,73$  °C a  $T_{opt} = 40,63$  °C, pri ktorej izolát *S. aureus* 2064 dosahuje rýchlosť  $\mu_{opt} = 1,97$  h<sup>-1</sup>. Tiež boli vypočítané kardinálne hodnoty aktivity vody  $a_{v,opt} = 0,994$  a  $a_{v,min} = 0,808$ .

Z hľadiska produkcie SED bol pozorovaný stimulačný účinok prídavku soli na tvorbu SED, nakoľko pri 15 °C nebol SED detegovaný v médiu bez prídavku soli ani pri počtoch 9 log poriadkov, ale pri  $a_v = 0,945$  bol detegovaný už pri denzite 4,40 log KTJ/ml. S ohľadom na kritérium hygienu procesu bol SED produkovaný v 8,7 % prípadov, ak koncentrácia jeho buniek bola nižšia ako 4 log poriadky a v 21,7 % prípadov, pri koncentrácii nižšej ako 5 log poriadkov. Tvorba SED však bola účinne inhibovaná dostatočným prídavkom baktérií mliečneho kysnutia na úrovni minimálne 6 log poriadkov.

Získané výsledky môžu byť efektívnym nástrojom pri zvyšovaní hygienickej bezpečnosti rizikových potravín, ktoré môžu byť faktorom prenosu enterotoxinogénnych kmeňov *S. aureus* a termostabilných enterotoxínov, avšak pri súčasnom prísnom dodržiavaní zásad správnej výrobnjej a hygienickej praxe a používaní kvalitných surovín.

Táto práca bola podporená grantom VEGA č. 1/0532/18 a APVV-15-0006.

### 03. Making *Pseudomonas putida* like lignocellulose-derived sugars

P. Dvořák (1), V. de Lorenzo (1)

(1) Systems and Synthetic Biology Program, Spanish National Centre for Biotechnology (CNB-CSIC), Madrid, Spain.

Sugars and aromatic compounds derived from lignocellulosic waste can serve as cheap substrates for biotechnological production of valued chemicals. However, well-defined microorganisms that could efficiently perform such task are scarce. Established biotechnological workhorses such as *Escherichia coli* or *Saccharomyces cerevisiae* are sensitive to inhibitors in lignocellulose hydrolysates, they cannot efficiently utilise celooligosaccharides, and do not assimilate hexoses and pentoses simultaneously due to the carbon catabolite repression. *Pseudomonas putida* KT2440 is a GRAS-certified, robust soil bacterium with versatile metabolism and high stress tolerance. This strain has been employed for production of fine chemicals from glucose and for processing lignocellulose-derived aromatics. Its potential for valorization of wider spectrum of (hemi)cellulose-derived carbohydrates is nonetheless limited due to the lack of adequate metabolic traits.

The aim of our work was to empower *P. putida* with novel catalytic functions for biotechnological processing of lignocellulose-derived sugars. To meet this goal, we combined a synthetic biology-inspired metabolic engineering approach with an *in-house P. putida* KT2440-derived chassis *P. putida* EM42 - a strain with streamlined genome and superior physiological properties. Endogenous and exogenous pathways for D-xylose metabolism were tested in this platform strain. Major bottlenecks hindering efficient D-xylose utilization were removed and fast growth on the pentose was achieved. Functional screening of cellulases from distinct sources revealed  $\beta$ -glucosidase that enabled rapid growth of EM42 also on D-cellobiose and its conversion into medium chain length polyhydroxyalkanoates, a bacterial bioplastic. *P. putida* strain capable of complete xylose co-utilisation with cellobiose or glucose was obtained when we merged newly introduced metabolic modules in the cells lacking periplasmic glucose dehydrogenase. This work demonstrates that *P. putida* EM42 is a promising bacterial platform for plug-in of new biochemical routes for carbohydrate catabolism and valorization. The study provides a showcase of how rational orchestration of *P. putida* metabolism expands the catalytic scope of environmental bacterium toward industrial applications.



## 04. Analýza mykobiomu aneb chybami se člověk učí

K. Fiedorová (1,2), M. Radvanský (3), E. Němcová (1), H. Grombiříková (1), M. Vaněrková (1), T. Freiburger (1,2)

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

(2) Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno, CZ

(3) Fakulta informatiky, Masarykova univerzita, Brno, CZ

Díky stále dostupnějším moderním technologiím sekvenování nové generace (NGS) přitahuje studium střevního mikrobiomu enormní pozornost. Stovky experimentálních studií prokázaly souvislost mezi střevním mikrobiomem a lidským zdravím. Nicméně většina těchto studií se zabývá pouze jeho bakteriální frakcí. Výzkum střevních hub (mykobiom) za bakteriálním zůstává velmi opožděn. Kromě toho, že houby tvoří pouze 0,1 % z celkového počtu střevních mikrobů, může hrát roli i velká náročnost při zpracování a interpretaci dat, protože ve srovnání s bakteriemi nejsou existující postupy v případě hub standardizovány a dostupné databáze v současnosti neposkytují dostatečně kvalitní informace. Cílem této práce je poukázat na hlavní problémy a zjištění, které provázely zavádění metody analýzy mykobiomu na našem pracovišti.

První úskalí představuje výběr vhodného cílového regionu pro PCR s ohledem na jeho specifitu v materiálu jako je stolice. Byly srovnány dvě sady primerů s unikátními barkody cílící na region ITS1 a ITS2. Zjistili jsme, že nižší specifita ITS2 regionu je v případě použití fekálního materiálu zásadním problémem, proto jsme nadále využívali ITS1 sadu primerů. Další výzvou je bioinformatické zpracování sekvencí pomocí software QIIME, kde je nutné vzít v úvahu variabilní velikost houbových PCR produktů. V post-sekvenční fázi je sice možné použít bioinformatické postupy vycházející z analýzy bakterií, které však musí být doplněny o kroky, které řeší odstranění konečných oblastí sekvencí u hub s krátkými délkami ITS1 fragmentů. Posledním představeným problémem je chybovost houbových databází. Při analýze výsledků uměle vytvořené mock komunity o definovaném složení výstupy ze dvou nejpoužívanějších houbových databází při přiřazení sekvencí na úroveň druhu generovaly až 50 % chyb.

Z výsledků naší práce vyplývá, že v rámci jedné studie mykobiomu musí být přísně zachovány stejné podmínky zpracování od počátečních kroků experimentů až po nastavení bioinformatické pipeline a použití vhodné databáze. Při srovnávání výsledků z různých studií je nutné vzít v úvahu možnou rozdílnost v použité metodice.

Tento výstup vznikl na Masarykově univerzitě v rámci projektů s č. MUNI/M/1322/2015 a č. MUNI/A/0925/2017 a CKTCH č. IG 201603

## 05. Racionálna a šetrná terapia onychomykózy cestou podiatrickej ambulancie.

M. Šefranková (1)

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

Kľúčové slová: onychomykóza, *Trichophyton rubrum*, dermatofyty, terapia, podiatria

Ochorenie spôsobené mikroskopickými hubami ( nesprávne “plesňami“ ) patrí medzi najčastejšie kožné infekcie a ich výskyt má stúpajúcu tendenciu. Dermatomykózy postihujú kožu, nechty, prípadne vlasy. I keď je najsprávnejšie označovať infekciu podľa identifikovaného vyvolávateľa, častejšie sa používa všeobecné latinské označenie “tinea“ doplnené o určenie lokalizácie postihnutia ( napr. tinea unguium, tinea pedis a pod.) .

Onychomykóza, mykotické ochorenie nechtov, je jedným z najčastejších dermatologických ochorení. Predstavuje 1/3 mykotických kožných infekcií. Najvýznamnejší pôvodcovia dermatomykóz sú *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Microsporum*. Antropofilnému dermatofytu *Trichophyton rubrum* patrí rovnako ako v celej Európe aj v spoločnosti Alpha medical prvá odporúčaná pozícia. Významné zastúpenie má taktiež *Trichophyton interdigitalis*. Napriek tvrdeniam, že mykózy vyvolané zoofilnými dermatofytmi sa častejšie vyskytujú v južných krajinách, v ostatnom čase na našom oddelení zaznamenávame, hlavne u detí nárast zoofilných infekcií vyvolanými *Microsporum canis*. Podobný trend uvádza i Česká republika.

K dosiahnutiu väčšej záchytnosti je potrebný správny odber, pred ktorým nechty nesmú byť najmenej mesiac ničím ošetrované, nalakované ani čerstvo odlakované. Významné zastúpenie má taktiež mikroskopické vyšetrenie, pri ktorom v materiáli macerovanom v KOH pozorujeme mykotické vlákna. Najdôležitejšie je kultivačné vyšetrenie trvajúce 3 - 4 týždne. Následné dourčenie je však časovo náročné. Veľkým prínosom pre identifikáciu je využitie spektrometrie MALDI-TOF, ktorú sme našom oddelení nedávno zaviedli do praxe. Jej výsledky sa s PCR zhodujú takmer v 70 %.

Mikroskopické a kultivačné vyšetrenie je predpokladom pre správnu terapiu. Lokálna antimykotická liečba spočíva v aplikácii pasty, roztokov či sprejov. Používa sa jód a jeho deriváty, organické farbivá, hydroxichinolíny, síra a jej zlúčeniny. V systémovej terapii sa veľmi priaznivo uplatňuje Terbinafin, ktorý je však účinný skôr u dermatofytov ako u kvasiniek. Pri systémovej liečbe je ale najzávažnejším vedľajším účinkom pečenoová toxicita. Neliečená onychomykóza však môže viesť k vzniku erysipelu a rozvoju diabetickej nohy. Šetrnou alternatívou je fotodynamická terapia. Osvecovaním pomocou vysokovýkonnej LED lampy sa naruší géloom sfarbená bunková stena huby, ktorá tak ďalej nemôže rásť. Takúto možnosť poskytujú podiatrické ambulancie, respektíve diabetologické podiatrie. V tomto prípade je vyšetrenie ekonomicky náročnejšie, keďže dané výkony nie sú hrazené zdravotnou poisťovňou. Slovensko je jednou z posledných krajín Únie, kde takéto ambulancie absentujú. Naopak v Českej republike je ich viac než tridsať. Riaditeľ Slovenskej diabetologickej spoločnosti docent Emil Martinka, už oslovil dve predošlé vedenia ministerstva zdravotníctva, žiaľ neúspešne. Ako mykológ aktívne spolupracujem so zatiaľ jedinou podiatriou v našom regióne a spolu s tímom danej spoločnosti sa naďalej chceme angažovať v presadení takýchto ambulancií. Podľa údajov Národného centra zdravotníckych informácií prichádza u nás o končatinu, prípadne jej časť až polovica pacientov so syndrómom diabetickej nohy. V českej republike je to len štvrtina. Uvedomenie si tejto skutočnosti je tak pre nás veľkou motiváciou v boji o realizáciu kvalitnej siete podiatrických ambulancií.

## **06. *Arcanobacterium haemolyticum* v ranných infekcích**

G. Kroneislová (1), D. Balíková (1)

(1) Česká Laboratorní s.r.o., Praha, CZ

### **Úvod:**

*Arcanobacterium haemolyticum* známé především jako vzácný původce tonzilofaryngitidy. Méně známý, ale častější, je jako původce infekcí ran. Záchyt je poměrně obtížný. V literatuře je udávána jeho synergie v ranách s betahemolytickými streptokoky, *Staphylococcus aureus*, anaeroby a *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Metodika:**

V období 1. 4. 2017- 1. 4. 2018 jsme zachytili ve výtěrech z ran a bércových vředů na dolních končetinách (v jednom případě v ráně na hrudníku) u 12 pacientů *Arcanobacterium haemolyticum*. Použita byla aerobní kultivace na krevním agaru s čarou *Staphylococcus aureus* a anaerobní kultivace. Dourčení bakterie bylo provedeno pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

### **Výsledky:**

Záchyt *Arcanobacterium haemolyticum* byl vždy v rámci polymikrobních nálezů, téměř ve všech případech ve směsi s betahemolytickými streptokoky a/nebo *Pseudomonas aeruginosa* a/nebo s anaerobními bakteriemi, ve třech případech se *Staphylococcus aureus*. Většina kmenů *Arcanobacterium haemolyticum* se zachytila až v rámci anaerobní kultivace, kde kolonie *Arcanobacterium haemolyticum* rostly na anaerobní půdě jako drobné kolonie s velmi širokou zónou hemolýzy na rozdíl od aerobní kultivace, kde lze *Arcanobacterium haemolyticum* snadno zaměnit s korynebakteriemi nebo přehlédnout vzhledem ke směsné kultuře s nápadnějšími bakteriemi.

### **Závěr:**

Záchyt *Arcanobacterium haemolyticum* v ranách v rámci aerobní kultivaci se zpravidla nepodaří, vyšší je záchyt až v anaerobní kultivaci. Zpravidla se jedná o směsné kultury.

## 07. *Neisseria gonorrhoeae* jako původce sepse

A. Studená (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

*Neisseria gonorrhoeae* je původcem jedné z nejčastějších pohlavně přenosných chorob na světě a postihuje muže i ženy především ve věkovém rozmezí mezi 15 až 34 lety, ale vyskytovat se může v každém věku. Většinou se projevuje hnisavým zánětem urogenitální traktu, konečníku, očí nebo hrtanu. V 0,5-3% může dojít k diseminaci infekce do celého organismu. Diseminovaná gonokoková infekce se může projevit kromě celkových příznaků sepse také oligoartritidou, typicky kolene, méně často polyartritidou a dermatitidou. Možný je však i výskyt endokarditidy, peritonitidy, meningitidy i osteomyelitidy. Symptomy vyjádřené na sliznicích mohou při gonokokové sepsi chybět nebo jí naopak předcházet. K diseminaci infekce přispívají faktory jako imunokompromitace, těhotenství, menstruace, doba krátce po porodu nebo asplenie. Právě aspleničtí pacienti (hematologická onemocnění, traumata) jsou ve zvýšeném riziku sepse, protože slezina je místem tvorby protilátek proti opouzdřeným bakteriím. Pacienti ve zvýšeném riziku infekce opouzdřenými bakteriemi by měli být náležitě edukováni. K diagnostice se většinou užívá PCR. Při výrazné symptomatologii je však vhodná kultivace, díky které získáme i citlivost k antibiotikům, což je v době vzrůstající rezistence k flurochinolonům, makrolidům, tetracyklinům i cefalosporinům nezastupitelné. Ve své prezentaci popisují kazuistiku muže z revmatologického ústavu, u kterého se nám podařilo kultivačně zachytit *Neisseria gonorrhoeae* v hemokultuře. Další kazuistika se týká muže s rozsáhlou gonokokovou orbitocelulitidou.

Kultivační záchyt gonokoka v hemokulturách není snadný vzhledem k přechodné bakterémii a choulostivosti mikroba k chemickým i fyzikálním zevním vlivům, včetně vzdušného kyslíku. Velmi důležité je proto odebrat sexuální anamnézu u sexuálně aktivních pacientů, protože jen na klinickou symptomatologii se nelze spoléhat. Až 50% žen se může jevit asymptomaticky, navíc nevýrazné příznaky gonokokové infekce mohou být zastřeny příznaky jiného onemocnění. Udává se, že až 50% kapavky se vyskytuje dohromady s chlamydiovou infekcí.

Nejúčinnější prevencí gonokokové infekce je partnerská věrnost a používání bariérové ochrany při sexuálních aktivitách. Důraz by se měl také klást na povinné hlášení hygienické stanici.

## 08. Asociuje latentná toxoplazmóza s reprodukčnými zmenami v tehotenstve?

K. Bírová (1), F. Ondriska (1,2), J. Špajdelová (1), O. Lachký (3), P. Ščasný (4), V. Boldiš (2)

- (1) Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnavská univerzita v Trnave, Trnava, Slovenská republika  
(2) Oddelenie parazitológie, Medirex a.s., Bratislava, Slovenská republika  
(3) Gynekologicko-pôrodná klinika, Fakultná nemocnica Trnava, Trnava, Slovenská republika  
(4) Gynekologicko-pôrodné oddelenie, Nemocnica sv. Lukáša, Galanta, Slovenská republika

*Úvod.* Kolektív vedcov z PŘIF UK v Prahe v štúdiách zameraných na vplyv latentnej toxoplazmózy na reprodukčné funkcie okrem iného zistil že: latentná toxoplazmóza výrazne mení pohlavie plodu v prospech mužského pohlavia, tehotenstvo toxo-pozitívnych žien trvá dlhšie ako toxo-negatívnych, ovplyvnená je aj pôrodná hmotnosť i dĺžka novorodencov. Cieľom našej štúdie je overiť tieto zistenia.

*Materiál a metódy.* Do štúdie sme zahrnuli 1531 žien, ktoré rodili v období od júna 2017 až apríla 2018 a zároveň sme analyzovali parametre u ich novorodencov (598 žien rodilo vo FNŠP Trnava a 933 žien v NsP Galanta). Okrem statusu toxoplazmózy počas tehotenstva sledovaných žien sme zisťovali aj dĺžku ich tehotenstva. U novorodencov sme sa zamerali na pohlavie, pôrodnú hmotnosť a dĺžku tela. U tehotných žien sme sérologicky vyšetrovali protilátky IgG, IgM, RVK protilátky, v indikovaných prípadoch protilátky triedy IgA a aviditu IgG protilátok. Za osoby s latentnou infekciou sme považovali séra s protilátkovými profilmi: IgG pozit, IgM negat, CFT pozit/negat; resp. IgG pozit, IgM pozit, RVK pozit, vysoký index avidity IgG protilátok.

*Výsledky.* Vo FNŠP Trnava sme zistili latentnú infekciu u 106 (12,3 %) tehotných žien, v NsP Galanta u 83 tehotných žien (8,9 %). Vo FNŠP Trnava ženy s latentnou infekciou porodili 55 (51,4 %) chlapcov a 52 (48,6 %) dievčat, v NsP Galanta 45 (54,2 %) chlapcov a 38 (45,8 %) dievčat. Toxo-negatívne ženy vo FNŠP Trnava porodili rovnako 251 chlapcov a 251 dievčat (á 50,0 %), v Galante 449 (52,4 %) chlapcov a 408 (47,6 %) dievčat. V oboch zariadeniach sme nezistili významné štatistické rozdiely medzi pohlavím novorodencov u infikovaných matiek ( $\chi_{(1)}=0,725$ ;  $p=0,394$ ), čím sme nepotvrdili výsledok štúdie Flegra a kol. Nezistili sme ani rozdiely v dĺžke tehotenstva, v pôrodnej hmotnosti i telesnej dĺžke chlapcov i dievčat od infikovaných a neinfikovaných matiek.

*Záver.* Výsledky štúdie Flegra a kol. sme nepotvrdili ani v jednom monitorovanom ukazovateli. Z našich predbežných výsledkov vyplýva, že latentná toxoplazmóza nemení pohlavie v prospech chlapcov a taktiež nemá vplyv na dĺžku tehotnosti ani na hmotnosť a dĺžku novorodencov.

## 09. Prvý outbreak vankomycín-resistentných enterokokov vo Fakultnej nemocnici v Trnava

L. Micháliková (1,2), J. Brňová (1,3), J. Prnová (1,3), S. Hnilicová (1), M. Dzurjaninová (2)

(1) Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce Trnavskej univerzity v Trnave, Trnava, SR

(2) AnalytX s.r.o., Fakultná nemocnica Trnava, SR

(3) Oddelenie nemocničnej hygieny a epidemiológie, Fakultná nemocnica Trnava, SR

**Úvod:** Enterokoky rezistentné voči vankomycínu (VRE) patria medzi multirezistentné mikroorganizmy, spôsobujúce nozokomiálne infekcie. V mnohých európskych krajinách rastie prevalencia VRE, ktorá je spojená s predĺženou hospitalizáciou a zvýšenou úmrtnosťou. Príčinou šírenia VRE je kontaminované prostredie nemocníc a prenos rukami zdravotníckych pracovníkov. Cieľom štúdie bolo analyzovať výskyt VRE vo FN Trnava od záchytu prvého výskytu (v rokoch 2015 až do 2017), vytvoriť epidemickú krivku prípadov a zhodnotiť proporciu VRE zachytených z prostredia nemocnice.

**Metodika:** Prospektívne sledovanie a analýza dát nových prípadov VRE (osoba s izolovaným kmeňom VRE), spolu s monitoringom nemocničného prostredia prostredníctvom sterovej metódy, uskutočneným v rámci Štátneho zdravotného dozoru v rokoch 2015 až 2017. U pozitívnych izolátov mikroorganizmov z prostredia nemocnice bola vykonaná základná analýza ich antibiogramu (EUCAST). U nových prípadov pacientov sa sledoval proporcia výskytu na jednotlivých oddeleniach, vek, pohlavie, obdobie záchytu a rizikové faktory infekcie.

**Výsledky:** V sledovanom období (2015 – 2017) bolo spolu zachytených 30 prípadov VRE. Izoláty najčastejšie pochádzali zo vzoriek moču (67 %), s celkovým výrazným zastúpením druhu *Enterococcus faecium* (80%). K oddeleniam, s najčastejším výskytom nových prípadov VRE patrila Chirurgická klinika (34%), Klinika anesteziológie a intenzívnej medicíny (23%) a Interná klinika (20%). K rizikovým faktorom prítomnosti VRE patrilo ženské pohlavie, vek nad 60 rokov, predchádzajúca hospitalizácia a prítomnosť invazívnej pomôcky. Epidemiologická krivka výskytu VRE pozitívnych prípadov mala počas obdobia signifikantne stúpajúci charakter. V roku 2015 boli zachytené 2 prípady (7%), v roku 2016 stúpol počet pozitívnych izolátov na 6 (20%) a v roku 2017 bol potvrdený prípad VRE u 22 pacientov (73%). V mikrobiologickom monitoringu prostredia nemocnice bol v období od roku 2015 – 2017 najčastejším zachyteným patogénom druh *Enterococcus* spp. (50%). V základnej analýze ich antibiogramu sme zaznamenali u 11,1 % *Enterococcus* spp. rezistenciu voči vankomycínu.

**Záver:** Pri epidemických epizódach prípadov VRE sa odporúča aktívny skríning nemocničného prostredia, spolu so sledovaním zastúpenia enterokokov v klinickom materiáli a zistením proporcie *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*. V rámci klinickej mikrobiológie a mikrobiológie životného prostredia je esenciálne v prevencii šírenia a vzniku VRE zavedenie rýchlych metód detekcie VRE (používanie chromogénnych médií a molekulárnych metód), spolu s dodržiavaním správnej klinickej praxe starostlivosti o pacienta a adekvátnej antibiotickej politiky.

## 10. Invazivní pneumokoková onemocnění u dospělých pacientů hospitalizovaných v Nemocnici Na Bulovce

M. Trojánek (1,2,3), M. F. Kříha (1), O. Džupová (2,4), H. Roháčová (2), E. Nyčová (5), J. Kozáková (6), V. Marešová (1,2,3)

**Prezentující autor:** Michal František Kříha

- (1) Klinika infekčních nemocí, 2. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ;
- (2) Klinika infekčních, parazitárních a tropických nemocí, Nemocnice Na Bulovce, Praha, CZ;
- (3) Katedra infekčního lékařství, Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha, CZ;
- (4) Klinika infekčních, parazitárních a tropických nemocí, 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ;
- (5) Oddělení klinické mikrobiologie, Nemocnice Na Bulovce, Praha, CZ;
- (6) Národní referenční laboratoř pro streptokokové nákazy, Státní zdravotní ústav, Praha, CZ

**Úvod:** *S. pneumoniae* představuje nejen původce častých slizničních respiračních nákaz, ale i závažných invazivních onemocnění (IPO), proto bylo v ČR v roce 2010 zahájeno celoplošné dobrovolné hrazené očkování pneumokokovými konjugovanými vakcínami (PCV) u dětí. Avšak selekční tlak vyvolaný vakcínací a omezené zastoupení sérotypů ve vakcínách vede k nárůstu incidence IPO vyvolaných nevakcinálními sérotypy. Cílem předkládané studie bylo zhodnotit změny v epidemiologii IPO u dospělých pacientů po zavedení plošné vakcinace.

**Metodika:** Retrospektivní klinická studie zařadila všechny pacienty starší 18 let hospitalizované v Nemocnici Na Bulovce (NNB) v letech 2000 až 2016, u kterých byl z primárně sterilního materiálu izolován *S. pneumoniae*. Klinické údaje byly získány z dostupné zdravotnické dokumentace a informačních systémů NNB a SZÚ. Data byla vyhodnocena pomocí standardních statistických postupů.

**Výsledky:** Do studie bylo zařazeno celkem 249 dospělých pacientů s věkovým mediánem 58 let (IQR 45-70) a poměrem mužů a žen 1,49:1. Nejčastějšími klinickými formami byly bakteriemická pneumonie (147 případů; 59,0 %) a purulentní meningitida (77; 30,9 %). V období před zahájením plošné vakcinace (2000-2009) představovaly nejčastější sérotypy 3 (17/138; 12,3 %), 4 (16; 11,6 %), 8 (13; 9,4 %) a 7F (11; 8,0 %), zatímco po jejím zahájení (2010-2016) byly nejčastěji izolovány sérotypy 3 (14/100; 14,0 %), 7F (12; 12,0 %), 1 a 22F (shodně 8; 8,0 %). Zastoupení izolovaných kmenů v PCV13 bylo 98/138 (71,0 %) v letech 2000-2009 a 63/100 (63,0 %) v období 2010-2016. Ve studii byl pozorován nesignifikantní nárůst incidence IPO vyvolaných nízké invazivními sérotypy (44,9 %; 62/138 vs 50,0 % 50/100), přičemž tato onemocnění postihovala starší osoby (věkový medián 60 let; IQR 46-72 vs. 52 let; IQR 37-63;  $p=0,006$ ) a měla vyšší smrtnost (29/96; 30,2 % vs. 17/102; 16,7 %,  $p=0,029$ ).

**Závěr:** Předkládaná studie prokazuje, že i přes užívání PCV v dětském věku a nárůst incidence onemocnění vyvolaných nevakcinálními sérotypy je stále většina IPO preventabilních očkováním. Avšak serotypový replacement představuje potenciální limitaci očkování a závažný by mohl být především nárůst incidence IPO vyvolaných nízké invazivními sérotypy, které postihují starší a polymorbidní pacienty a mají vyšší smrtnost.

## 11. Koaguláza-negatívne stafylokoky z rôznych zvierat a produkcia biofilmu

E. Bino (1), A. Kandričáková (1), A. Lauková (1)

(1) Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovenská republika

Z hľadiska rastu mikroorganizmov v mikroenvironmente rozlišujeme rast v submerznej kultúre kde mikroorganizmy „plávajú“ v tekutine a v emerznej kultúre, keď mikroorganizmy rastú na povrchu a sú k nemu viazané napríklad biofilmom. Vo všeobecnosti, bola tvorba biofilmu preukázaná u viacerých bakteriálnych druhov a teda aj u stafylokokov, avšak doposiaľ známe práce sa týkajú hlavne stafylokokov humánneho pôvodu. Cieľom tejto štúdie bolo testovanie tvorby biofilmu u kmeňov rôznych spécií z rodu *Staphylococcus*, najmä však koaguláza-negatívnych stafylokokov z rozličných druhov zvierat, keďže stafylokoky sú obligátnou súčasťou mikrobioty tráviaceho traktu, a za niektorých podmienok sa stávajú ochorenia vyvolávajúcim činiteľom. Testovaných bolo 66 kmeňov z 255 zvierat. Kmene boli identifikované pomocou identifikačného systému MALDI-Tof a testované tromi metódami na produkciu biofilmu (kultivácia na Kongo agare, skúmavková metóda, mikrotitračná platničková metóda). Kultiváciou na Kongo agare počas 24-48-72 hodín sa potvrdila produkcia biofilmu u 57 kmeňov stafylokokov, pričom len u 9 kmeňov produkcia biofilmu nebola potvrdená (K6PL/1, K15PL/1, Kr 5/b, Kr5/a, P3/Tr2a, SU62, SU63, SU64, SU 65). Výsledky skúmavkovej metódy testovania tvorby biofilmu u stafylokokov vo väčšine prípadov korelovali s výsledkami kultivácie na Kongo agare. Mikrotitračnou platničkovou metódou bola produkcia biofilmu preukázaná u 55 kmeňov stafylokokov zo 66 testovaných. Dva kmene stafylokokov z trusu králikov, testované mikrotitračnou platničkovou metódou (K/caec/b-2017, P2/Tr5) neprodukovali biofilm, avšak u kmeňov stafylokokov získaných z trusu sliepok sa produkcia biofilmu potvrdila všetkými tromi metódami pri všetkých testovaných vzorkách. Najvyššiu nameranú hodnotu produkcie biofilmu sme zaznamenali u kmeňa K6PL/1- *Staphylococcus xylosus* zo vzorky trusu koňa (2, 263). Následne budú tieto kmene testované na prítomnosť či absenciu génov faktorov virulencie a zároveň bude sledovaná ich citlivosť k enterocínom, čo prispeje k rozšíreniu poznatkov o spektre účinku a využití enterocínov. Výsledky vznikli za podpory grantu Vega 2/0006/17.



## 12. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* a *Encephalitozoon cuniculi* u koček a psů ze Slovinska

N. Kašpárková (1), E. Bártová (1), P. Kvapil (1, 2), Š. Vodlan (3), K. Sedlák (4)

(1) Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, CZ

(2) Zoo Ljubljana, Slovinsko

(3) Animalia, veterinarska ambulanta Zagorje, Slovinsko

(4) Státní veterinární ústav Praha, CZ

Séra 118 koček a 38 psů ze Slovinska byla vyšetřena na protilátky proti *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum* metodou ELISA; vzorky s inhibicí  $\geq 50\%$  byly označeny za pozitivní. Stejná séra byla vyšetřena i na přítomnost protilátek proti *Encephalitozoon cuniculi* metodou IFAT; vzorky s titry  $\geq 40$  byl označeny za pozitivní. Protilátky proti *T. gondii* byly detekovány u 19 koček (16 %) a 17 psů (45 %), protilátky proti *N. caninum* u sedmi koček (6 %) a tří psů (8 %) a protilátky proti *E. cuniculi* byly zjištěny u tří koček (3 %), zatímco psi byli negativní. Protilátky současně proti *T. gondii* a *N. caninum* byly detekovány u dvou koček (2 %) a jednoho psa (3 %). Protilátky současně proti *T. gondii* a *E. cuniculi* byly zjištěny u jedné kočky (1 %). Žádný jedinec neměl protilátky současně proti všem třem parazitům. U koček byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ( $p \leq 0,01$ ) v prevalenci protilátek proti *T. gondii* mezi věkovými skupinami  $> 7$  let (0 %) a  $\leq 1 - 7$  let (7 %) a mezi skupinami  $> 7$  let (0 %) a  $< 1$  rok (9 %). U psů byl statistický významný rozdíl ( $p \leq 0,05$ ) zjištěn rovněž pouze v případě infekce *T. gondii* mezi věkovými skupinami  $< 1$  rok (3 %) a skupinou s neurčeným věkem (21 %). Pohlaví u koček i psů nemělo vliv na prevalenci všech tří parazitů. Jedná se o první průkaz protilátek proti *T. gondii*, *N. caninum* a *E. cuniculi* u psů a koček ze Slovinska. Z výsledků je zřejmé, že psi a kočky ze Slovinska přicházejí do kontaktu se všemi třemi parazity. Vzhledem k tomu, že jsou tyto parazity celosvětově rozšířeny, toxoplazmóza je navíc významnou zoonózou, je důležité tyto infekce sledovat i u těchto zájmových zvířat.

### **13. Sledování výše promoření malých savců na vybrané patogenní mikroorganismy, zaměřeno na *Borrelia burgdorferi sensu lato***

M. Nováková (1, 2), J. Janeček (2), A. Žáková (2)

(1) Střední průmyslová škola chemická Brno, Vranovská, příspěvková organizace, Brno, CZ;

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

Tato práce se věnuje monitorováním míry promoření malých savců, především hlodavců, patogenními mikroorganismy, které způsobují zoonotické onemocnění Lymeskou borreliózu. Malí savci zde zastávají roli tzv. rezervoárového živočicha, který původce onemocnění nejen šíří, ale také se v něm množí, takže se stává daleko nebezpečnějším šířitelem infekčních agens, než pouhý vektor. Lymeská borrelióza patří mezi jedno z nejčastějších zoonotických infekčních onemocnění, které může u člověka způsobovat i multiorgánové postižení. Právě z těchto důvodů je důležité vyskyt těchto, ale i dalších agens průběžně sledovat.

Sledování prevalence malých savců bylo založeno na odebraných vzorcích získaných z námi odchycených 122 malých savců v roce 2017 na dvou lokalitách (CHKO Poodří a Moravský kras). Byly použity 2 metody: 1. nepřímá sendvičová imunochemická metoda ELISA, 2. PCR, již předcházela izolace DNA z tkání malých savců. Úkolem těchto metod bylo detekovat infekční agens v orgánech malých savců nebo proti němu vytvořených protilátek v krevním séru a výpláších srdce.

Výsledky prokázaly výrazné zvýšení míry promoření malých savců oproti výsledkům získaných z roku 2014, a to až 3,4×. Metodou ELISA byly detekovány protilátky IgM a IgG proti danému patogenu celkem u 28 malých savců, což je 15,6 % u IgM a 12,3 % u IgG. Ze získaných dat je patrné, že nejčastějším a zároveň nejvíce promořeným druhem malého savce je Myšice lesní (*Apodemus flavicollis*). Co se týče metody PCR, tak zatím byla ze všech vzorků izolována DNA.

Hlavním přínosem této práce je monitorování výskytu původců Lymeské borreliózy. Právě díky výsledkům této práce bude zřetelnější vývoj promořenosti ve vybraných lokalitách na území ČR a také budeme mít jasnější představu o tom, proč v posledních letech přibývá tolik nakažených klíšťat právě tímto patogenem.

## 14. Využití bakteriofágů pro rychlou detekci životaschopného původce paratuberkulózy metodou phage assay

Monika Beinhauerová (1,2), I. Slaná (1)

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

(2) Masarykova univerzita v Brně, CZ

Paratuberkulóza je celosvětově rozšířeným chronickým střevním onemocněním domácích i volně žijících přežvýkavců, které má za následek významné finanční ztráty projevující se v mlékárenském a masném průmyslu. Původcem onemocnění je pomalu rostoucí a ve vnějším prostředí vysoce odolná bakterie *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). Typické příznaky onemocnění, jakými jsou chronické hubnutí a chřadnutí, snížená doживost a průjmy, se mohou dostavit i dva až čtyři roky po infekci, nicméně MAP je masivně vylučována v trusu do prostředí klinicky i subklinicky nemocnými zvířaty. Ty se následně stávají zdrojem infekce pro další zdravé jedince ve stádě. Nedostatek rychlých a specifických detekčních testů k průkazu životaschopných buněk MAP ztěžuje včasnou diagnostiku, která je pro zamezení šíření a eliminaci paratuberkulózy ve stádě nezbytná. Za definitivní diagnostický test pro MAP je v současnosti považována kultivace, nicméně tato metoda je časově velmi náročná a v důsledku nutnosti aplikace chemické dekontaminace k potlačení růstu kompetitivních organismů i méně citlivá. V poslední době hojně využívané metody založené na polymerázové řetězové reakci (PCR) jsou sice více specifické a rychlejší, nedovedou však rozlišit mezi přítomností živých nebo neživých mykobakterií ve vzorku, což může představovat problém při interpretaci výsledků.

Phage assay je novým přístupem k diagnostice původce paratuberkulózy. Metoda umožňuje detekci a kvantifikaci životaschopných buněk MAP v různých typech matric včetně mléka, sýru, krve a trusu během 48 hodin. Je založena na schopnosti bakteriofága D29 replikovat se pouze uvnitř živé buňky MAP a následně tuto buňku lyzovat. Počáteční koncentrace buněk ve vzorku je odvozena z počtu plaků vytvořených v důsledku lyze buněk MAP napadených fágem v nárůstu rychle rostoucí bakterie *Mycobacterium smegmatis* na agarové plotně. Udávaná citlivost metody je jedna až deset živých buněk MAP v jednom mililitru vzorku. V rámci výzkumu bylo metodami konvenční kultivace, real time PCR a phage assay otestováno na přítomnost MAP 20 vzorků lymfatické tkáně a tenkého střeva skotu. Metoda phage assay představuje vhodnou alternativu ke konvenčním kultivačním technikám.

Práce vznikla za finanční podpory projektu LO1218 MŠMT v rámci programu NPU I.

## 15. Průkaz *Encephalitozoon* spp. u volně žijících drobných savců – srovnání metod single a nested PCR

L. Brlicová (1, 2), J. Marková (1), A. Žáková (3,4), E. Bártová (1)

(1) Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie; Veterinární a Farmaceutická univerzita Brno, Brno, CZ;

(2) Gymnázium Brno – Řečkovice, příspěvková organizace, Brno, CZ;

(3) Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Masarykova univerzita Brno, Brno, CZ;

(4) Ústav experimentální mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno, Brno, CZ

Rod *Encephalitozoon* zahrnuje čtyři druhy intracelulárních parazitů se zoonotickým potenciálem, kteří jsou dle zjištění několika studií rozšířeni i na území ČR. Jedním ze způsobů přímé detekce parazitů je vyšetření živočišných tkání metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Kromě základní single PCR existuje i několik modifikací, např. nested PCR, spočívající ve dvou na sebe navazujících reakcích. Cílem práce bylo porovnat citlivost těchto dvou metod pro detekci parazita *Encephalitozoon* spp. u volně žijících drobných savců ve vybraných lokalitách ČR. K vyšetření bylo použito 100 vzorků jater drobných hlodavců a hmyzožravců odchycených v oblastech CHKO Moravský kras a CHKO Poodří. V případě single PCR byly použity 2 primery (ECUNF a ECUNR) amplifikující malou podjednotku rRNA. V případě nested PCR byly použity dvě sady primerů (MSP1, MSP2A, MSP3 a MSP4A) amplifikující sekvenci ITS (internal transcribed spacer) a umožňující detekci více rodů mikrosporidiálních parazitů. Rozlišení rodů je možné na základě sekvenování výsledného PCR produktu. Parazit *Encephalitozoon* spp. byl pomocí single PCR detekován u jednoho jedince (1 %) a pomocí nested PCR u 10 jedinců (10 %) rodu *Apodemus*, *Sorex*, *Clethrionomys* a *Microtus*. Vyšší pozitivita 15 % byla zjištěna v CHKO Poodří, zatímco v CHKO Moravský kras to bylo jen 6 %. Vzorky pozitivní v nested PCR byly zaslány na sekvenaci. Genotypizace se podařila u tří vzorků, které byly po porovnání získaných sekvencí s údaji z databáze BLAST určeny jako *E. cuniculi*. Dle výsledku lze říci, že nested PCR je oproti single PCR pro detekci parazitů *Encephalitozoon* spp. výrazně citlivější. Vyšetření vzorků pomocí nested PCR také ukázalo poměrně velké rozšíření tohoto parazita u drobných savců žijících v odchyťových lokalitách.

## 16. Štúdium sekundárnych metabolitov *Trichoderma viride* F742 a ich úloha v antibióze

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

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

tomaspagac1@gmail.com

Fytopatogénne vlákňité huby napádajú mnoho poľnohospodársky významných plodín. Použitie antifungálnych zlúčenín na boj proti týmto škodcom sa osvedčilo ako účinný prostriedok ochrany rastlín, avšak dlhodobá expozícia životného prostredia týmto látkam má za následok ich akumuláciu v životnom prostredí ako aj vznik rezistencie fungálnych patogénom voči fungicídum. V súčasnosti sa do popredia dostávajú princípy tzv. eko-poľnohospodárstva, kde je možné ako alternatívu k už zavedeným chemickým prístupom použiť biologickú kontrolu fungálnych patogénov. Vlákňité huby rodu *Trichoderma* dokážu žiť v symbióze s koreňovým systémom rastlín, pričom vďaka svojej výraznej mykoparazitickej aktivite efektívne chrániť rastlinu pred atakom fytopatogénom, a zároveň indukovať obranné mechanizmy rastliny a podporovať jej rast. K antagonistickej interakcii vlákňitých húb s okolitým prostredím prispieva produkcia sekundárnych metabolitov. V tejto práci sme sa zamerali na mykoparazitickú aktivitu *Trichoderma viride* F742 získaného UV mutagenézou ako aj na izoláciu sekundárnych metabolitov s cieľom overiť ich potenciálnu antimikróbnu aktivitu.

Vplyv *Trichoderma viride* F742 na tri vybrané fytopatogény (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* a *Fusarium culmorum*) sa pozoroval počas duálnej konfrontačnej kultivácie, antimikróbna aktivita izolovaných sekundárnych metabolitov sa vyhodnotila mikrodilučnou metódou. Zároveň sa pozoroval expresný profil vybraných ABC transportérov rodiny G a MDR transportérov *Trichoderma viride* s cieľom overiť ich úlohu v transporte sekundárnych metabolitov.

Mutantný kmeň *Trichoderma viride* F742 vykazoval výraznú mykoparazitickú aktivitu voči vybraným fytopatogénnym hubám. Sekundárne metabolity mali bakteriostatický účinok na grampozitívne baktérie. Čiastočná inhibícia rastu sa pozorovala pri rastlinnom fytopatogéne *Fusarium culmorum*. pri kvasinkách *Candida albicans* a *Candida parapsilosis*. Na základe získaných výsledkov expresie usudzujeme, že vybrané MDR transportéry môžu plniť úlohu aj v transporte sekundárnych metabolitov.

Mykoparazitická aktivita v sebe zahŕňa syngiu viacerých mechanizmov. Ich detailné pochopenie a sledovanie jednotlivých faktorov, ktoré čiastočne budujú bojový arzenál mykoparazitických fungálnych kmeňov je kľúčom k ich úspešnej aplikácii v praxi.

Práca vznikla s podporou grantu VEGA1/0870/14, VEGA1/0697/18.

## 17. Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* after Cold Plasma Treatment

J. Šimončicová (1), B. Kaliňáková (1), D. Kováčik (2), V. Medvecká (2), P. Ďurina (2), S. Kryštofová (1), V. Palušková (1), L. Hoppanová (1), A. Zahoranová (2)

(1) Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, SK

(2) Department of Experimental Physics, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University, Bratislava, SK

The filamentous fungus, *Aspergillus parasiticus*, is frequent contaminant of economically important commodities such as cereals, oil seeds and nuts. In addition, food contamination by *A. parasiticus* is a huge problem, mainly due to the production of the most toxic and carcinogenic compounds known as aflatoxins. The low-temperature plasma treatment has been shown to be suitable not only for decontaminate of microorganisms, but also for the degradation of mycotoxins. On the other hand, during generation of plasma ROS are produced and it was found that aflatoxin biosynthesis is activated by high levels of oxidative stress.

In this study, the effect of cold plasma treatment on *A. parasiticus* growth and aflatoxin production was studied. The toxicogenic fungus *A. parasiticus* CCM F550<sup>T</sup> was treated by low-temperature plasma generated by Diffuse Coplanar Dielectric Barrier Discharge in ambient air. The decrease in viability of conidia was evaluated using colony forming units and the decrease in viability of mycelium was determined by dry weight mass. The damage of mycelium was observed using Scanning Electron Microscopy and changes in chemical composition on the hyphal surface was performed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. The semi-quantitative analysis of aflatoxin production by *A. parasiticus* was determined using an enzyme immunoassay (Ridascreen® Aflatoxin Total). The expression of genes for aflatoxin regulation, *aflR*, and aflatoxin biosynthesis *aflQ*, was determined using reverse transcription PCR and visualised on agarose gel.

Based on results, the use of low-temperature plasma is promising method to decontamination this fungus with influence on mycotoxin production depending on plasma treatment time.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-16-0216.

## 18. Vliv prebiotických oligosacharidů na střevní mikrobiotu kojenců

R. Švejtil (1), Š. Musilová (1), K. Zlomková (1)

(1) Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky, Česká zemědělská univerzita, Praha, CZ

Prebiotika jsou složky potravy, které jsou nestravitelné v horní části trávicího traktu. V důsledku toho svou přítomností ovlivňují složení mikrobioty v tenkém a tlustém střevě ve prospěch probiotických bakterií, které jsou schopné využívat prebiotika jako zdroj energie. Jako prebiotikum se používá celá řada sacharidů, zejména inulin, fruktooligosacharidy, galaktooligosacharidy, oligosacharidy rafinosové řady a další přírodní, či uměle získané látky. Přirozeně se pak probiotické oligosacharidy vyskytují v mateřském mléce, kde se tak stávají první potravou pro střevní bakterie novorozence. Děti, které z různých důvodů nemohou být kojeny, dostávají náhražku mateřského mléka, obsahující většinou galakto- a fruktooligosacharidy. Tato prebiotická kombinace však nemusí být plně selektivní, z tohoto důvodu se stále pracuje na nových prebioticích pro výživu kojence.

Cílem našeho výzkumu bylo ověřit prebiotický efekt nově syntetizovaných fukooligosacharidů, jakožto potenciální složky mléčných náhražek.

Získané fukooligosacharidy byly testovány *in vitro* na bifidobakteriích izolovaných z trávicího traktu kojenců. Byly testovány 4 kmeny bifidobakterií (*B. bifidum*, *B. breve* 1 a 2, *B. longum* ssp. *infantis*), jako kontrola bylo použito médium s glukosou jako výhradním zdrojem energie.

Po 24h inkubaci při 37 °C bylo zjištěno, že testované bifidobakterie rostly na fukooligosacharidech ve srovnatelné míře ( $P > 0.05$ ) míře ( $8,70 \pm 0,44$  log KTJ/ml), jako na glukose ( $8,50 \pm 0,11$  log KTJ/ml), ale produkovaly významně méně laktátu, pouze  $146,74 \pm 31,49$  mg/l oproti  $1718,75 \pm 183,27$  mg/l ( $P < 0.05$ ).

Získané výsledky naznačují, že fukooligosacharidy jsou schopné podporovat růst zdraví prospěšných bifidobakterií, jejich fermentace je ale vedena odlišnou metabolickou drahou, než fermentace glukosy. Další výzkum je potřeba k plnému ověření prebiotických vlastností fukooligosacharidů.

Poděkování: Financováno z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21-SVV/2018).

## 19. Pure cultures *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on sensory profile of rosé Cabernet Sauvignon wines

T. Drtilová (1), K. Bedeová (1), I. Špánik (2), K. Ďurčanská (1), K. Furdíková (1)

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

(2) Institute of Analytical chemistry, Faculty of Chemical and Food Technology, STU in Bratislava, SK

Rosé wine is, thanks to its properties, a pleasant drink for the consumer and also a remarkable subject for various oenological studies. The focus of this work was a complex characterization of sensory profile of varietal rosé wines Cabernet Sauvignon in relation to used strain of *Saccharomyces cerevisiae*.

In work we have analyzed samples of grape must and wines from Cabernet Sauvignon variety fermented by different pure autochthonous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. The modified Somers method was used to measure and evaluate the colour properties. Sensory analysis of the resulting wines was carried out using the 10-point segment test. The aromatic profile was analyzed by two-dimensional gas chromatography. Similarity of samples was analyzed by the statistical software Statistica 10 (StatSoft, Inc.).

A total of 104 identified compounds were responsible for resulting wine aroma, which gave to wines fresh, fruity and floral character. The results of the statistical analysis showed that each of used yeast strains was characteristic with its own influence on the wine aroma, while the colour effect was similar for all strains. For wine fermented by yeast strain CS-NDK-V1, a high content of terpenoids such as linalool and  $\beta$ -farnesene but also n-decanoic acid was characteristic. The CS-NDK-V2 strain was characterized by increased production of fruity ethyl decanoate, hexyl acetate, 9-decenoic acid and high amount of nerolidol, however the strain CS-NDK-V3 showed high amounts of methyl octanoate, isoamyl octanoate, isoamyl alcohol, terpinen-4-ol and hexanoic acid. The yeast strains were characterized by formation of various fruity aromas, confirmed also by the sensory analysis of the final rosé wines.

This work was supported by grants from the Slovak Research and Development Agency (APVV-15-0333). We also thank winery Natural Domin & Kušický, s.r.o. for the cooperation and wine samples.



## 20. Sledovanie zmien v tvorbe proteolytických enzýmov u *Trichoderma atroviride* počas konfrontačných kultivácií s fytopatogénmi

H. Galádová (1), V. Lefkovitšová (1), L. Varečka (1), M. Šimkovič (1)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika

Huby z rodu *Trichoderma* patria medzi pôdne vláknité huby bežne koexistujúce s koreňovým systémom rastlín. Záujem vedeckej komunity priťahujú predovšetkým vďaka sekrečnej aktivite a produkčným schopnostiam, ktoré našli využitie v biotechnológiách, v potravinárstve a v poľnohospodárstve v boji proti rozmanitým fytopatogénom. *Trichoderma* spp. sú producentmi rozmanitých intermediátov a bielkovín, vrátane hydrolytických enzýmov akými sú celulózy, glukonázy, chitinázy, xylanázy, proteázy a mnohých iných. V prírodnom prostredí využívajú hydrolázy na utilizáciu komplexných materiálov a zároveň sú dôležitou zložkou ich mykoparazitických aktivít, kde pomáhajú degradovať povrchové štruktúry mikrobiálnych konkurentov (hostiteľov). Počas interakcie *Trichoderma* s hostiteľom dochádza k zvýšenej tvorbe viacerých mykoparazitických enzýmov. Typickým príkladom je nízkomolekulová proteáza Prb1 subtilizínového typu izolovaná z *T. harzianum* a z *T. atroviride*. Jej expresia sa pozorovala už pri kontakte húb s izolovanými bunkovými stenami hostiteľa alebo chitínu. Ďalšími príkladmi mykoparazitických proteáz serínového typu sú Tvsp1 u *T. virens* a PRA1 u *T. harzianum* a aspartátové proteázy, PapA a PapB, identifikované u *T. asperellum*.

Výnimočnosť kmeňov z rodu *Trichoderma* spočíva aj v ich schopnosti reagovať na rôzne podnety z prostredia. Zistilo sa, že konidiácia je u týchto húb spúšťaná a regulovaná rôznymi (a)biogénnymi faktormi, akými sú svetlo, pH prostredia, zastúpenie C a N zdroja, prchavé organické zlúčeniny, extracelulárne Ca<sup>2+</sup> ióny, mechanické poškodenie mycélia a mnohé ďalšie.

Naše doterajšie pozorovania ukazujú, že kmene z rodu *Trichoderma* produkujú viaceré vysokomolekulové proteázy, ktoré zohrávajú úlohu nielen vo vegetatívnom raste a vo vývoji týchto húb, ale ich tvorba je súčasťou odpovedi mycélia na svetlo. Primárnym cieľom tejto práce je rozšíriť túto štúdiu o sledovanie zmien v profile vysoko- a nízkomolekulových proteolytických enzýmov *Trichoderma atroviride* v priebehu konfrontačných kultivácií s fytopatogénnymi hubami. Pri štúdiu proteáz sme vychádzali z myceliálnych bielkovín separovaných 2-rozmernou elektroforézou a detegovaných zymografickou analýzou. Na kvalitatívne stanovenie proteolytických enzýmov sme využili MALDI-TOF/TOF.

*Táto práca vznikla s podporou projektov APVV-0719-12 a ITMS 26240220071. Autori ďakujú STU za finančnú podporu v rámci Grantovej schémy na podporu mladých výskumníkov.*

## 21. Enterobióza a její diagnostika

J. Peštová (1), M. Poislová (1)

(1) Klinická mikrobiologie a ATB centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

*Enterobius vermicularis* (roup dětský) je nejběžnější helmint vyskytující se v lidské populaci. Člověk se jako jediný hostitel tohoto parazita obvykle infikuje pozřením vajíček zachycených na rukou, v potravě či vodě nebo vzácněji jejich vdechnutím. Z vajíček se v tenkém střevě líhnou larvy, které migrují do oblastí ilea, céka a apendixu, kde se pohlavně rozmnožují. Poté se oplozené samičky přemísťují do tlustého střeva a v noci pak vylézají z rekta a na kůži kolem análního otvoru kladou vajíčka. Vajíčka roupů ulpívají na rukou, prádlo či jsou rozprášena do vzduchu a na povrchy a může dojít k infekci dalších hostitelů. Běžně dochází k autoinfekci, kdy infikovaný člověk opětovně pozře vajíčka roupů nebo larvy vylíhlé v okolí análního otvoru migrují zpět do střeva.

Enterobióza se může projevovat svěděním konečníku, perianálními ekzémy, bolestmi žaludku a střev, nechutenstvím či průjmy. Ve výjimečných případech mohou roupí pronikat do urogenitálního traktu, břišní dutiny či parenchymatózních orgánů dutiny břišní.

Vzhledem k tomu, že dospělé samice roupů lze zachytit ve stolici až při velmi silných infekcích, je k včasné diagnostice enterobiózy vhodné parazitologické vyšetření, přičemž je potřeba do laboratoře zaslat stěr Shüffnerovou tyčinkou z perianální oblasti nebo otisk perianálních řas na lepicí pásce dle Grahama. Nezřídka je však do laboratoře k vyšetření enterobiózy zasílána stolice.

Byla proto provedena studie, kdy bylo porovnáno u 93 pacientů s enterobiózou vyšetření lepicí pásky dle Grahama a vyšetření stolice běžnými parazitologickými metodami (nativní preparát a Faustova flotační metoda).

Vajíčka roupů byla zachycena na všech 93 páskách. Ve stolici však byla nalezena pouze v 10 případech. Záchytnost *E. vermicularis* ve stolici byla oproti metodě dle Grahama pouze 10,75 %.

Stolice tedy není vhodným materiálem pro vyšetření enterobiózy. Z důvodu snížení rizika přenosu a zabránění vzniku dalších možných komplikací spojených s enterobiózou je proto vhodné v diferenciální diagnostice včas zvážit možnost nákazy roupou a zároveň zaslat k parazitologickému vyšetření vhodný materiál, tedy lepicí pásku dle Grahama či stěr z perianální oblasti Shüffnerovou tyčinkou.

## 22. Sekvenační analýza *Streptococcus pneumoniae* rezistentního k antibiotikům 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

Původcem vzniku invazivních pneumokokových onemocnění (IPO) je *Streptococcus pneumoniae*. Po zavedení celoplošného očkování, jediné účinné ochrany proti IPO, došlo v České Republice k vzestupu výskytu pneumokoků zejména sérotypu 19A, které se vyznačují rezistencí k makrolidům a tetracyklinu. Cílem této práce bylo proto charakterizovat pneumokoky sérotypu 19A rezistentní k makrolidům v ČR, detekovat determinanty jejich rezistence a faktory virulence.

### Metodika

Soubor pneumokoků (26) byl shromážděn v rámci Respirační studie a EARS-Net surveillance. Citlivost k antibiotikům byla vyšetřena minimální inhibiční koncentrací (MIC), vyhodnocena dle EUCAST 8.0. Rezistence k makrolidům a tetracyklinu byla potvrzena PCR (*ermA*, *ermB*, *mef*, *tetM*). Molekulárně genetická typizace probíhala za použití Multilocus Sequence Typing (MLST). Dva izoláty (ST416) byly analyzovány metodou celogenomového sekvenování (Illumina Mini Seq platform). Genetická příbuznost u sekvenčních typů byla zmapována prostřednictvím algoritmu eBURST (<http://eburst.mlst.net/>). Analýza dat proběhla pomocí softwaru Bionumerics 7.6.2.

### Výsledky

Izoláty byly klasifikovány do celkem 5 klonálních komplexů (CC): CC199 (17), CC230 (4), CC193 (2), CC66 (2) a CC320 (1). Nejvíce zastoupeným sekvenačním typem CC199 byl ST416 (16/17). S výjimkou CC66 byly zbývající čtyři CC identifikovány jako mezinárodní klony Netherlands<sup>15B</sup>-37 (CC199), Denmark<sup>14</sup>-32 (CC230), Greece<sup>21</sup>-30 (ST193) a Taiwan<sup>19F</sup>-14 (CC320). U všech izolátů byly prokázány geny rezistence *ermB* (makrolidy) a *tetM* (tetracyklin), necitlivost k penicilinu byla detekována pouze u CC230. Celogenomová analýza 2 izolátů *S. pneumoniae* prokázala přítomnost 2 významných faktorů virulence: pilus 1 a serinového proteinu PsrP.

### Závěr

Genotypizace prokázala dominantní roli klonu CC199 (ST416) u makrolid-rezistentních izolátů 19A sérotypu. WGS prokázala přítomnost genů pro syntézu povrchových proteinů, které umožňují adhezi k buňkám respiračního epitelu. Nárůst makrolidové rezistence v České Republice může být způsoben expanzí evolučně úspěšného subklonu ST416.

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

### **23. Rezistence koaguláza negativních stafylokoků – retrospektivní hodnocení hemokultur s kultivačním nálezem koaguláza negativních stafylokoků v letech 2014 až 2017 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze.**

J. Závora (1), G. Balíková-Novotná (2), L. Kupidlovská (1), A. Studená (1), L. Šemberová (1), V. Vimberg (2), L. Zieglerova (2), V. Adámková (1)

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

(2) Laboratoř biologie sekundárního metabolismu, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Praha, CZ

Koaguláza negativní stafylokoky je velmi těžké označit jako původce infekcí. Vzhledem k tomu, že se běžně vyskytují jako běžná bakteriální flóra kůže, dýchacích cest i trávicího traktu, není vždy jisté, že jejich nález v hemokultuře není pouhou kontaminací. Pokud se ovšem prokáže jejich vztah k infekci, jsou často multirezistentní, a také z důvodu jejich schopnosti tvořit biofilm je jejich eradikace někdy problematická. Koaguláza negativní stafylokoky mohou způsobovat převážně infekce krevního řečiště (katérové sepse či endokarditidy), dále peritonitidy, osteomyelitidy atd.

Ohlédli jsme se za hemokulturami vyšetřenými v naší laboratoři mezi lety 2014 a 2017 a zaměřili jsme se na ty, ve kterých byly prokázány koaguláza negativní stafylokoky. Poměr jejich průkazu v hemokultuře v porovnání s ostatními bakteriemi se dle různých zdrojů liší, ale většinou je to přes 40 %, v některých případech i mnohem více (VFN: 2014 - 48 %; 2015 – 46 %; 2016 – 45%; 2017 – 40 %). Ovšem je potřeba si uvědomit, že většinu tvoří kontaminace. Odlišení kontaminace od pravé infekce je problematické a zahrnuje například zhodnocení klinického stavu pacienta či opakovaný nález téhož kmene z několika různých odběrů. Ze všech nálezů koaguláza negativních stafylokoků se uvádí poměr kontaminace až 80 %.

Sledovali jsme také rezistenci k antibiotikům – hlavně těm, která jsou léky volby na infekce krevního řečiště způsobené stafylokoky (oxacilin a glykopeptidy). Rezistence k oxacilinu je již delší dobu vysoká, ale nestoupá (STEP VFN: 2014 – 73 %; 2017 – 73 %). Zdá se, že hlavně rezistence k teikoplaninu stoupá (STEP VFN: 2014 – 1 %; 2017 – 10 %) a příslušné kmeny mají i sníženou MIC vankomycinu.

Spolupracujeme také na projektu, který má za cíl popsat genetické změny, které vedou k rezistenci kmenů koaguláza negativních stafylokoků, hlavně ke glykopeptidovým antibiotikům. Projekt se zaměřuje převážně na kmeny *Staphylococcus epidermidis* a *Staphylococcus haemolyticus*.

Koaguláza negativní stafylokoky mají sice nízkou patogenitu, ale závažné infekce způsobovat mohou a jejich narůstající rezistence může být problémem.

## 24. Výskyt vankomycin-rezistentních enterokoků ve FNHK v letech 2015 – 2018.

K. Vaverková (1), L. Ryšková (1)

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

Úvod: Enterokoky se běžně vyskytují jako součást přirozené mikroflóry v gastrointestinálním traktu lidí i zvířat. Obecně nejsou tyto bakterie považovány za vysoce virulentní, avšak mohou se uplatňovat jako etiologická agens především nozokomiálních infekcí. Léčbu enterokokových infekcí komplikuje jejich přirozená rezistence k antibiotikům, ale získaná rezistence ke glykopeptidům, především vankomycinu, tento problém ještě vystupňovala.

Metodika: V této práci hodnotíme retrospektivně výskyt vankomycin-rezistentních enterokoků (VRE) získaných kultivačním vyšetřením vzorků od pacientů FNHK v období 2015-2018. Izolované kmeny byly identifikovány na MALDI-TOF, rezistence k vankomycinu a teikoplaninu byla vyšetřena diskovým difúzním testem a E-testy.

Výsledky: Ve sledovaném období byla zachycena rezistence ke glykopeptidům pouze u druhu *Enterococcus faecium*, přičemž s každým rokem dochází k jejich proporčnímu nárůstu. V roce 2015, z celkového počtu 477 *E. faecium*, byl záchyt 8 VRE (1,7%), v roce 2016 - 469/32 (6,9%), v roce 2017 se záchyt zvýšil - 496/55 (11,1%), za rok 2018 v období od ledna do března - 188/13 (6,9%). Největší zastoupení VRE je u pacientů z hematologických klinik. Časté nálezy VRE byly v rámci screeningových vyšetření a dokumentovaly tak pouze kolonizaci pacientů těmito kmeny, nikoli vzniklé onemocnění.

Závěr: Stoupající tendence výskytu VRE je aktuální problém, se kterým se potýká řada zdravotnických zařízení. Tento nárůst může souviset s nadměrnou aplikací nejen vankomycinu, ale také jiných širokospektrých antibiotik, ke kterým jsou enterokoky přirozeně rezistentní a jež umožňují jejich selekci. Nutno ale také poznamenat, že se o VRE v poslední době zvýšilo povědomí a tím pádem stoupl počet screeningových vyšetření k jejich záchytu, což se také výrazně uplatňuje na jejich vzestupu.

## 25. Diverzita beta-laktamových a tetracyklinových genů rezistence v čistírnách odpadních vod

T. Stachurová (1), K. Malachová (1,2), K. Svobodová (3)

(1) Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, Ostrava, CZ;

(2) Institut environmentálních technologií, Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta Ostravské univerzity, Ostrava, CZ;

(3) Laboratoř environmentální biotechnologie, Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, Praha, CZ

Čistírny odpadních vod (ČOV) patří k významným prostředím podílejícím se na šíření genů antibiotické rezistence (ARGs). Při vypuštění odpadní vody do recipientu ARGs vstupují do životního prostředí, v němž se dále šíří. Naše studie monitorovala relativní abundanci beta-laktamového rezistenčního genu (*blaTEM*) a tetracyklinového rezistenčního genu (*tetW*) v nitrifikačních a sedimentačních nádržích ČOV. Cílem studie bylo porovnat relativní abundance výskytu rezistentních genů u dvou odlišných ČOV ústících do řek Odry a Ostravice v České republice. Ze vzorků byla izolována DNA a pomocí Real-time PCR byly detekovány a kvantifikovány ARGs. Kvantifikace kultivovatelných bakterií byla provedena stanovením titru (CFU/ml). Koncentrace antibiotik v odpadních vodách byla měřena pomocí ultra-vysoceúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem. Výsledky ukázaly, že ve všech vzorcích z obou ČOV se nejčastěji vyskytoval gen *blaTEM*. U genu *blaTEM* pak byly zjištěny jeho nejvyšší hodnoty ve vzorcích ze sedimentačních nádrží, v nichž byl současně zaznamenán výskyt *tetW* genu. Tyto výsledky naznačují, že pro kumulaci bakterií s vysokou rezistencí k beta-laktamu a tetracyklinu je nejkritičtější sedimentační fáze čištění odpadních vod.

Poděkování: Studie byla podpořena SGS projektem Progresivní metody studia biodegradací, antibiotické rezistence a nekanonických DNA struktur (ID: SGS11/PřF/2018).

## 26. Rezistencia vláknitých húb voči antifungálnym zlúčeninám a nové špecifické miesta zásahu

Z. Ježíková (1), L. Jelínková (1), T. Pagáč (1), P. Olejníková (1)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, SK

Vznik a šírenie rezistencie voči antifungálnym zlúčeninám je dôsledkom neuváženého používania antifungálnych liečiv pri terapii fungálnych infekcií u ľudí, zvierat a rastlín. Štúdium podstaty molekulárnych mechanizmov rezistencie voči daným zlúčeninám nám poskytuje teoretický základ pre návrh diagnostických metód na rýchlu a objektívnu detekciu rezistentných kmeňov. To je kľúčové najmä pre vývin nových liečebných stratégií v prevencii vzniku rezistencie voči antifungálnym zlúčeninám a návrh nových špecifických cieľových miest účinku antifungálnych zlúčenín.

Väčšina známych antifungálnych liečiv inhibuje biosyntézu ergosterolu alebo priamo interaguje so sterolmi v bunkovej membráne. Flucytozín (5-fluórcytozín) je jediným inhibítorom syntézy RNA resp. antimetabolitom, zatiaľ čo skupina látok interferujúca s bunkovou stenou zahŕňa najmä nedávno objavené echinokandíny (kaspofungín, anidulafungín a mikafungín). To je práve dôvodom zvýšeného záujmu o mechanizmy dráhy biosyntézy ergosterolu.

Cieľom práce je sledovanie citlivosti vybraných druhov vláknitých húb na antifungálne zlúčeniny, ako aj analýza úlohy efluxných púmp v rezistencii voči týmto liečivám. Snažíme sa aj o návrh nových špecifických miest zásahu v biosyntetickej dráhe ergosterolu. Ako modelový mikroorganizmus na štúdium rezistencie sme vybrali mimoriadne rezistentnú vláknitú hubu *T. atroviride*.

Zistili sme, že dôvodom rezistencie *T. atroviride* voči antifungálnym zlúčeninám je zvýšená expresia génov kódujúcich ABC-B a ABC-G transportéry, ako aj zvýšená expresia génov biosyntetickej dráhy ergosterolu po ovplyvnení vybranými antifungálnymi zlúčeninami. V snahe hľadania nových špecifických miest zásahu pre antifungálne aktívne zlúčeniny sme sledovali rast delečných mutantov *N. crassa*. Na základe našich výsledkov z expresnej analýzy génov *T. atroviride* a hodnotenia rastu delečných mutantov *N. crassa* sa C-24 metyl transferáza (ERG6) a C-24 sterol reduktáza (ERG4) javia ako možné nové miesta zásahu v biosyntetickej dráhe ergosterolu.

Táto práca bola podporená grantom VEGA 1/0697/18.

## 27. Citlivosť kmeňov *Staphylococcus aureus* humánneho pôvodu na komerčné fágové prípravky

Z. Hubenáková (1), M. Straka (1), K.-H. Hsin (1), L. Slobodníková (1)

(1) Mikrobiologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Univerzitnej nemocnice v Bratislave, SR

**Úvod:** Bakteriofágy sú prirodzenými nepriateľmi baktérií a predstavujú tak potenciálnu účinnú zbraň v terapii bakteriálnych infekcií. Keďže je to cieleňá terapia zameraná na určité bakteriálne druhy, je šetrná k fyziologickej mikroflóre. Cieľom práce bolo stanoviť citlivosť kmeňov *Staphylococcus aureus* na komerčné fágové prípravky.

**Materiál a metódy:** 113 nosičských kmeňov *S. aureus* bolo získaných zo sterov nosovej sliznice študentov medicíny; 24 klinických izolátov pochádzalo z infekcií kože, mäkkých tkanív a z hemokultúr. Metódou detekcie plakov sa otestoval účinok štyroch fágových prípravkov: 1. Bakteriofag stafylokokový a 2. Sextafag (Ruská federácia), 3. Staphylococcal bacteriophage a 4. Pyo-bacteriophage (Gruzínsko).

**Výsledky:** Na 1. a 3. prípravok bolo citlivých zhodne 81 nosičských kmeňov (72%), 2. prípravok inaktivoval 80 nosičských kmeňov (71%) a 4. bol účinný na 88 kmeňov (78%). Účinnosť testovaných fágových prípravkov na klinické kmene bola stopercentná. Fágy účinkovali bez ohľadu na prítomnosť alebo neprítomnosť rezistencie voči antibiotikám.

**Záver:** Vysoké percento citlivosti nosičských aj klinických kmeňov *S. aureus* na fágové prípravky podporuje význam medicínskeho využitia fágov pri terapii a prevencii stafylokokových infekcií v humánnej medicíne.

Práca bola podporená grantom APVV-16-0168.



## 28. Charakterizácia kmeňov *Staphylococcus aureus* obsahujúcich ostrov patogenity s génom pre exfoliatívny toxín D

D. Kristeková (1), V. Růžičková (1), T. Botka (1), P. Petráš (2)

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

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

*Staphylococcus aureus* je závažný patogén spôsobujúci široké spektrum ochorení. Jeho významnými faktormi virulencie sú aj exfoliatívne toxíny ETA, ETB a ETD. Kým ETA a ETB sú asociované so stafylokokovým syndrómom oparenej kože, kmene produkujúce ETD boli izolované prevažne z rôznych hnisavých rán. Gén kódujúci ETD sa nachádza v ostrove patogenity SaPIdB spoločne s génom pre enzým EDIN-B a podjednotky reštrikčno-modifikačného systému (R-M).

V práci bolo skúmaných 15 klinických kmeňov a 5 porovnávacích kmeňov pozitívnych pre gény *etd* a *edinB*. Metódami molekulárnej biológie boli určené charakteristiky kmeňov a zloženie vybraných oblastí ostrova SaPIdB.

Vo väčšine charakteristík (*spa* typ, *agr* typ, obsah profágov) bola nájdená väčšia podobnosť medzi desiatimi kmeňmi rezistentnými voči oxacilínu, všetky mali genotyp ST-80, *SCCmec* IV a obsahovali gén pre PVL. Päť non-MRSA kmeňov ukazovalo väčšiu variabilitu v zisťovaných vlastnostiach. U jedného izolátu z *Pemphigus neonatorum* bol popísaný nový *spa* typ a ST typ. Študované kmene boli testované na prítomnosť 16 vybraných génov pre toxíny a faktory virulencie. U všetkých študovaných kmeňov sa vyskytovali gény *hla*, *hld* a *sak*. Žiaden z kmeňov neobsahoval gény *sea*, *etb*, *tst* a *sed*. Po porovnaní makroreštrikčných spektier boli klinické kmene rozdelené do 10 PFGE-typov. Analýzou sekvencií ostrova SaPIdB boli v jednej z vybraných oblastí objavené rozdiely v nukleotidovej štruktúre. Gény *etd* a *edinB* neobsahovali žiadne polymorfizmy. Ostrov patogenity SaPIdB u 13 zo študovaných 15 klinických kmeňov bolo možné zaradiť do už skôr popísaného genotypu 1. U dvoch klinických MRSA-kmeňov boli zistené 2 nové genotypy na základe zmien v koncovej oblasti SaPIdB.

Práca poskytuje ucelený prehľad zaujímavých molekulárne-genetických vlastností skupiny ETD-pozitívnych kmeňov *S. aureus* izolovaných v rôznych zdravotníckych zariadeniach ČR. Jedná sa o kmene s veľkým vybavením faktorov virulencie, ktoré ukazujú na ich vysoký patogénny potenciál.

Práca vznikla s podporou projektu MUNI/A/0824/2017.

## 29. Sledovanie výskytu multirezistentných izolátov gramnegatívnych baktérií z lôžkových zdravotníckych zariadení v SR: štúdia HOSPITAL-ENVIRO-REZ 2015 – 2017

S. Hnilicová (1,2), L. Micháliková (1,2,6), J. Brňová (1,2,3), Z. Sirotná (4), A. Líšková (5), V. Krčméry (7) a kolektív pracovníkov Laboratórií mikrobiológie životného prostredia a Oddelení epidemiológie RÚVZ v SR

(1) Katedra Laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnavská univerzita, Trnava, SR

(2) Centrum mikrobiológie, nemocničnej hygieny a prevencie infekcií, Trnavská univerzita, Trnava, SR

(3) Oddelenie nemocničnej hygieny a epidemiológie, Fakultná nemocnica Trnava, SR

(4) Národné referenčné centrum pre mikrobiológiu životného prostredia, Bratislava, SR

(5) Ústav klinickej mikrobiológie, Fakultná nemocnica Nitra, SR

(6) Oddelenie klinickej mikrobiológie, AnalytX s.r.o, Trnava, SR

(7) Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava, SR

Úvod: Gramnegatívne baktérie, najmä ich multirezistentné formy ako ESBL, CPE a kolistín rezistentné kmene, sú v súčasnosti hlavným etiologickým agens s nozokomiálnych nákaz. Nemocničné prostredie môže predstavovať významný zdroj týchto baktérií.

Materiál a metódy: Celkový súbor analyzovaných kmeňov za roky 2015 – 2017 tvorilo spolu 1044 gramnegatívnych izolátov (2015 – 437; 2016 – 349; 2017 – 258). Zber a základná identifikácia izolátov prebehla v spolupráci s jednotlivými Laboratóriami mikrobiológie životného prostredia RÚVZ. U zozbieraných kmeňov bolo vykonané stanovenie citlivosti na antibiotiká štandardizovanou diskovou difúznou metódou podľa EUCAST a zostavenie antibiogramov.

Výsledky: Z otestovaných izolátov bol fenotyp MDR potvrdený v 158 (36,8 %) prípadoch a to v roku 2015, v 85 (25,9 %) v roku 2016 a v 34 (23,3 %) prípadoch za rok 2017. V roku 2015 sme najviac MDR izolátov zachytili pri rode *Pseudomonas* spp. (n = 56; 35,4 %), *Enterobacter* spp. (43; 37,2 %) a *Klebsiella* spp. (30; 19%). V roku 2016 patrilo najviac MDR opäť do rodov *Pseudomonas* spp. (22; 25,9 %), *Klebsiella* spp. a *Enterobacter* spp. (zhodne: 19; 22,4). V roku 2017 sme takisto najviac MDR izolátov zachytili u rodov *Klebsiella* spp. (14; 41,2 %), *Enterobacter* spp. (10; 29,4 %) a *Pseudomonas* spp. (7; 20,6 %).

Záver: V rámci štúdie HOSPITAL-ENVIRO-REZ bol počas rokov 2015 až 2017 potvrdený výskyt MDR baktérií najčastejšie u rodu *Pseudomonas*, *Enterobacter* a *Klebsiella*. Aplikácia cielených protiepidemických opatrení pri výskyte MDR gramnegatívnych baktérií a kontrola prostredia zohrávajú významnú úlohu pri prevencii vzniku a šírenia nozokomiálnych nákaz.

Kontaktná adresa prvého autora: Soňa Hnilicová, hnilicova.s@gmail.com

### 30. Charakterizace izolátů *Escherichia coli* a stanovení jejich citlivosti k bakteriocinům

M. Hrala (1), J. Bosák (1), D. Šmajš (1)

(1) Biologický ústav, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 5,  
625 00 Brno, Česká Republika  
hrala.matej@gmail.com

*Escherichia coli* je bakterie běžně se vyskytující ve střevě lidí i zvířat, kde žije jako komenzál. Některé kmeny však nesou faktory virulence a mohou způsobovat intestinální i extraintestinální infekce. Mezi nejčastější patotypy patří enterohemorhagická (EHEC), Shiga toxigenní (STEC) a enterotoxigenní *E. coli* (ETEC). Z důvodu zvyšující se antibiotické rezistence je snaha vyvíjet alternativní způsoby léčby bakteriálních infekcí. Stejně tak použití antibiotik v případě intestinálních infekcí není vždy vhodné, kvůli narušení mikrobiální rovnováhy střeva. Bakteriociny jsou antimikrobiální peptidy či proteiny produkované bakteriemi a mají potenciál v léčbě či prevenci bakteriálních infekcí.

Cílem této studie bylo charakterizovat soubor izolátů *E. coli* z veterinárního klinického materiálu a zjistit citlivost těchto izolátů k bakteriocinům.

U 145 izolátů byl detekován gen pro intimin (*eaeA*) a dále gen pro produkci Shiga toxinu 1 (*stx1*), Shiga toxinu 2 (*stx2*) nebo kombinaci obou, což je řadí mezi EHEC. Dalších 84 Shiga toxin-produkujících izolátů bylo zařazeno k patotypu STEC. U 193 izolátů byla potvrzena přítomnost genů pro tvorbu termostabilního toxinu (*st*), termolabilního toxinu (*lt*) či kombinaci obou, čímž se zařadily k patotypu ETEC.

Z 42 testovaných bakteriocinů 40 inhibovalo alespoň jeden z testovaných izolátů. Nejlepší účinek byl zjištěn u dvou mikrocinů, které inhibovaly více než 96 % izolátů.

Na základě zjištěného spektra citlivosti k bakteriocinům byly vybrány 4 potenciálně probiotické kmeny s produkcí vhodné kombinace bakteriocinů a jejich účinek byl otestován v systému *in vitro*.

### 31. Identifikácia a charakterizácia enterokokov rezistentných voči antibiotikám izolovaných z odtokových vôd

K. Lépesová (1), P. Olejníková (2), N. Križanová (1), 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

V poslednej dobe sa neustále objavujú baktérie rodu *Enterococcus* vykazujúce rezistenciu voči antibiotikám, ktoré spôsobujú komplikácie v liečbe enterokokových infekcií. Podľa Európskeho výboru pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (EUCAST) sa medzi najdôležitejšie nozokomiálne baktérie vykazujúce multirezistenciu voči antibiotikám zaraďujú enterokoky rezistentné voči vankomycínu (VRE), ktoré najviac ohrozujú pacientov v nemocničnom prostredí. Fenotyp rezistencie voči vankomycínu u týchto baktérií je najčastejšie viazaný na prítomnosť génov *vanA* a *vanB*, ktoré sú väčšinou umiestnené na plazmidoch. Najdôležitejším rezervoárom VRE sú nemocničné odpadové vody, z ktorých sa môžu dostávať ďalej do čistiarní dopadových vôd (ČOV) a následne do vodných zdrojov.

Prevalenciu enterokokov rezistentných voči antibiotikám sme detegovali a následne izolovali na odtoku membránovej ČOV Slavkov. Po izolácii sme jednotlivé kmene enterokokov podrobili identifikácii pomocou MALDI-TOF a testovali sme ich skríženú rezistenciu na rôzne antibiotiká. V rámci mechanizmov rezistencie sme sa u našich izolátov zamerali na detekciu nadprodukcie efluxných púmp ako aj na genotypizáciu kmeňov vykazujúcich rezistenciu voči vankomycínu. V poslednom kroku sme pozorovali schopnosť našich rezistentných izolátov tvoriť biofilm pomocou kryštálovej violete.

Na odtoku membránovej čistiarne sa nám podarilo vyizolovať 13 rezistentných izolátov, z ktorých 7 bolo identifikovaných ako *Enterococcus faecium* a 5 ako *E. faecalis*. Všetky s výnimkou jedného izolátu získali odolnosť voči ampicilínu, a väčšina aj voči ciprofloxacínu. U jedného kmeňa identifikovaného ako *E. faecalis* a *E. faecium* bola pozorovaná výrazná miera rezistencie voči vankomycínu, ktorá však nebola kódovaná génom *vanA*. Zo všetkých testovaných enterokokov izolovaných na odtoku sme nadprodukciu efluxných púmp zaznamenali u 7 izolátov, z ktorých 3 vykazovali multirezistentný charakter. Izoláty rodu *Enterococcus* sme po charakterizácii zaradili medzi veľmi silných producentov bakteriálneho biofilmu.

**Pod'akovanie:** Autori ďakujú Vedeckej grantovej agentúre VEGA (1/0096/17), Agentúre pre podporu vedy a výskumu APVV-16-0171 a Výskumnej agentúre SR (ITMS 2623012006).

## 32. Hodnocení vlivu antimikrobiálních látek na mikrobiální biofilm pomocí fluorescenční spektrometrie

V. Chuchmová (1), L. Vacek (1), F. Růžička (1)

(1) Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a FN u sv. Anny, Brno, CZ

Biofilm je společenství mikrobiálních buněk adherujících k určitému povrchu a zakomponovaných v mezibuněčné hmotě, kterou si samo aktivně vytváří. Oproti planktonním bakteriím je biofilm odolnější vůči působení faktorů vnějšího prostředí a je obtížnější jej eliminovat.

Základem eradikace mikrobiálního biofilmu v těle člověka je stále použití antimikrobiálních látek. Výběr vhodné antimikrobiální látky či jejich kombinace závisí na mnoha faktorech, stěžejní je citlivost biofilmu k antimikrobiální látce.

V této práci bylo testováno několik fluorescenčních barviv představujících látky, které mají potenciál v diagnostice citlivosti biofilmu k antimikrobiálním látkám. Mezi použitá fluorescenční barviva patří resazurin, calcein AM a dvojice barviv calcein AM/propidium jodid, SYBR Green I/propidium jodid a Syto 9/propidium jodid.

Testování probíhalo na biofilmech druhů *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotická citlivost byla zjišťována k rifampicinu (*S. aureus*) a ciprofloxacinu (*P. aeruginosa*).

Výsledky testování fluorescenčních barviv vedly k určení minimální biofilm inhibující koncentrace (MBIC) a byly porovnány s počtem kolonie tvořících jednotek (CFU). Resazurin, SYBR Green I/propidium jodid a Syto 9/propidium jodid vykazovaly silnou korelaci s počtem kolonie tvořících jednotek a představují tak slibnou alternativu pro testování antibiotické citlivosti biofilmu ve výzkumných i klinických laboratořích.

### 33. Faktory virulence u *Propionibacterium acnes*

P. Muchová (1), F. Růžička (1)

(1) Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a FN u sv. Anny, Brno, CZ

*Propionibacterium acnes* (nově *Cutibacterium acnes*) je grampozitivní fakultativně aerobní tyčinka, která je obvyklou součástí kožního mikrobiomu. Diskutují se různé faktory virulence tohoto agens, mezi nimi tvorba biofilmu, která je zcela zásadní, enzymatická výbava či typický fylotyp. Specifikace těchto faktorů pomáhá pochopit mechanismy, kdy se z bakterie komenzální stává bakterie patogenní.

Bylo testováno 116 kmenů od pacientů s invazivní infekcí *Propionibacterium acnes* a 81 kmenů izolovaných z kožních stěrů zdravých dobrovolníků. Byly stanoveny fenotypové projevy každého kmenu – intenzita tvorby biofilmu, schopnost hemolyzovat erytrocyty, produkce hyaluronidázy a CAMP faktor. Dále byla stanovena genetická skupina vybraných kmenů, a to pomocí multiplex PCR. Vlastnosti bakterií izolovaných od dobrovolníků se od skupiny klinických kmenů statisticky signifikantně liší pouze v případě tvorby biofilmu. Analýza vazby mezi jednotlivými vlastnostmi a genetickou skupinou prokázala vazbu mezi fylotypem a intenzitou hemolýzy. Dalším stupněm studie je rozšíření testovaného souboru o další kmeny i další fenotypové vlastnosti.

### 34. Antimikrobiální vlastnosti sinic

A. Siváková (1), F. Růžička (1), L. Sehnal (2), K. Hilscherová (2), T. Procházková (2)

(1) Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a FN u sv. Anny, Brno, CZ;

(2) Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova univerzita, Brno, CZ

V poslední době narůstá počet multirezistentních bakterií, proti kterým je třeba hledat a aplikovat nové antimikrobiální látky. Sinice jsou bohatým zdrojem různých bioaktivních látek, z nichž mnoho stále čeká na objevení. Spolu s bakteriemi obývají společné prostředí a probíhá mezi nimi kompetice o zdroje, zvláště v extrémním prostředí jako je například Antarktida.

Otestovali jsme deset planktonních kmenů sinic ze sbírek českých univerzit (*Planktothrix agardhii* SAG 32.79, *Cylindrospermopsis raciborskii* SAG 1.97, *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, *Limnothrix redekei* SAG 3.89, *Aphanizomenon gracile* RCX 06, *Anabaena flos-aque* UTEX 1444, *Aphanizomenon gracile* CCALA 008, *Dolichospermum planctonicum* JČU Husinec 04, *Planktothrix agardhii* CCALA 159, *Microcystis viridis* JČU II21Lip10/IX), dva nově izolované antarktické kmeny sinic (*Pseudoanabaena* sp. RCX I1, *Microcoleus* sp. RCX I2) a dvě směsi sinic získaných z Antarktidy (ANT-ENV 1, ANT-ENV 2). Ze zmražené biomasy (200 mg) jednotlivých druhů sinic jsme po homogenizaci pomocí ultrazvuku (Bandelin Sonopuls HD 2070, Berlín, Německo) extrahovali testované substance. Jako extrakční činidla jsme použili methanol a ethylacetát. Výsledná koncentrace extraktu byla 400g sušiny (dm).L<sup>-1</sup>. Antimikrobiální aktivitu jsme otestovali difuzní metodou na Mueller-Hinton agaru (Oxoid, Česká republika) s důlky o průměru 7 mm. Do každého důlku bylo aplikováno 50 µL extraktu sinic. Bylo použito šest mikrobiálních kmenů z České sbírky mikroorganismů: *Escherichia coli* CCM 3954, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Staphylococcus aureus* CCM 3953, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Streptococcus mutans* a *Candida albicans* CCM 8261. Při průkazu zóny inhibice růstu jsme kmeny označili jako antimikrobiálně aktivní.

Antimikrobiální a antifungální aktivitu jsme prokázali u tří kmenů sinic: *C. raciborskii* SAG 1.97 – inhibice růstu *C. albicans*, *A. gracile* CCALA 008 – inhibice růstu *S. aureus* a *Microcoleus* sp. RCX I1 – inhibice růstu *S. aureus*, *E. faecalis* a *C. albicans*. Antimikrobiální aktivitu měly především methanолоvé extrakty sinic, proto se methanol jeví jako lepší extrakční činidlo. Tyto kmeny sinic byly vybrány pro další analýzu.

Projekt byl podpořen grantem specifického výzkumu MUNI/A/0874/2017.

### 35. Výskyt a charakteristika kmenů *Listeria monocytogenes* izolovaných z přírodního prostředí

Z. Tomáščíková (1,2), L. Pospíšilová (1,2), T. Gelbíčová (1), R. Karpíšková (1,2)

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

(2) Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno, CZ

*L. monocytogenes* je bakterie vyvolávající onemocnění zvířat i lidí. Tato bakterie je také schopna saprofytického způsobu života v přírodním prostředí, odkud se může dostávat do potravinového řetězce člověka.

Cílem studie byla detekce *L. monocytogenes* ve vzorcích z přírodního prostředí odebraných v České republice a na Slovensku v období 2016 – 2017 a charakterizace získaných izolátů typizačními metodami.

V rámci studie bylo vyšetřeno 175 vzorků přírodních vod (n = 42), bahna (n = 47), půdy (n = 34), vegetace (n = 47) a trusu hospodářských zvířat (n = 5) odebraných v šesti krajích České republiky a v jednom kraji na Slovensku. U získaných izolátů *L. monocytogenes* byl určen sérotyp, klonální typ, makrorestrikční profil (štěpení endonukleázami *AscI/ApaI*) a citlivost k antimikrobiálním látkám.

*L. monocytogenes* byla detekována v 16 (9.14%) ze 175 vyšetřených vzorků. Nejvyšší prevalence byla zaznamenána u vzorků z bahna (10/47, 21.3%) a vegetace (4/47, 8.5%). Byly detekovány sérotypy 1/2a, 1/2b a 4b, s nejčastějším sérotypem 1/2a. Byly zjištěny klonální komplexy CC1 a CC121 a 16 kombinovaných makrorestrikčních profilů *AscI/ApaI*, z toho dva pulzotypy (735/2, 211/37) byly zjištěny ve více lokalitách. Nejčastější pulzotyp 735/2 byl detekován ve čtyřech lokalitách. Všechny izoláty *L. monocytogenes* (n = 20) byly citlivé vůči testovaným antimikrobiálním látkám.

Z výsledků lze usuzovat na možnou selekci specifických klonů *L. monocytogenes* v přírodním prostředí.

Práce vznikla za finanční podpory projektu AZV 16-31488A



### 36. Nové bakterie rodu *Corynebacterium* izolované na Antarktidě

L. Křištofová (1), I. Sedláček (1), O. Šedo (2), S. Králová (1), J. Busse (3), P. Švec (1)

(1) Česká sbírka mikroorganismů, Ústav experimentální biologie, Masarykova univerzita, Brno, CZ;

(2) Mendelovo centrum genomiky a proteomiky rostlin, Středoevropský technologický institut, Masarykova univerzita, Brno, CZ;

(3) Ústav bakteriologie, mykologie a hygieny, Veterinární univerzita, Vídeň, AT

Během let 2010 až 2016 bylo na ostrově Jamese Rosse na Antarktidě izolováno přes 600 grampozitivních bakteriálních kmenů. Po použití rep-PCR a MALDI-TOF MS a následné shlukové analýze získaných profilů bylo k dalšímu studiu vybráno několik skupin kmenů, u kterých byla provedena sekvenace genu pro 16S rRNA. Na základě výsledků sekvenace byly provedeny a stále probíhají další analýzy zahrnující metody ribotypizace, fenotypová charakteristika pomocí konvenčních testů a komerčních identifikačních kitů, stanovení profilu mastných kyselin a chemotaxonomické metody. Fylogenetická analýza založená na sekvenci genu pro 16S rRNA zařadila pět vybraných skupin do rodu *Corynebacterium*. Tyto kmény fenotypově odpovídaly základním charakteristikám rodu *Corynebacterium*, ale jednotlivé shluky byly pomocí výše uvedených metod jasně odděleny od ostatních popsanych druhů tohoto rodu. Využití kombinace metod rep-PCR a MALDI-TOF MS umožnila rychlé rozdělení studovaného souboru kmenů do genotypově a fenotypově homogenních shluků. Tento přístup se tak ukázal být vhodný pro rychlý primární skrínink neznámých izolátů a jejich rozdělení do diskrétních skupin. Na základě dosažených výsledků bude pět výše uvedených skupin izolátů navrženo jako nové druhy rodu *Corynebacterium*.

### 37. Application of zeolites in fish breeding and their effect on nitrifying microorganisms

K. Skleničková (1,2), D. Koloušek (2), M. Pečenka (1), D. Vejmelková (1), I. Růžičková (1)

(1) Department of the Water Technology and Environmental Engineering, Faculty of Environmental Technology, University of Chemistry and Technology Prague, CZ

(2) Department of Solid State Chemistry, Faculty of Chemical Technology, University of Chemistry and Technology Prague, CZ

This research is focused on the sustainability of water in fish breeding, in terms of the content of ammonium ions produced by fish metabolism. The self-production of ammonium ions is unfavourable for the fish stock in the tanks and requires frequent water change in the tanks. The aim of the project is to minimize the concentration of ammonium ions in water by the application of zeolite filters, thereby reducing the operating costs mainly due to lower water consumption.

During the experiments, the interaction between zeolite sorbents and the nitrifying microorganisms was monitored. The purpose of the research is to by using zeolite filters increase the sustainability of water. The water pollution is slowed down by a competition between zeolites and the nitrifying microorganisms for present ammonium cations.

Three zeolite materials (KlinoMn, BBC and geopolymeric zeolite A) were tested in terms of their ammonium cations exchange kinetics. In the next phase of testing, these materials were installed into two-chamber filters which were placed in the aquaria. The results were compared with the other aquaria systems where the same two-chamber filters with foam filling were used which served as a carrier for nitrifying microorganisms. The most effective zeolite material was chosen for operational conditions in culture tank breeding of carp koi (*Cyprinus carpio haematopterus*).

Nitrifying bacteria present in the foam carriers were identified by the molecular biology method FISH (fluorescence *in situ* hybridization). Bacteria of both nitrification stages were determined. Representatives of the AOB (ammonia oxidizing bacteria) – bacteria of the genus *Nitrosomonas* were found in small amounts while the NOB (nitrite oxidizing bacteria) were present in a large quantity, represented by the genus *Nitrospira*.

None of the zeolite materials negatively influenced the fish life. Of all tested materials, the non-synthetic KlinoMn was the most suitable as it maintained the pH value of water in the optimal range of 7.5–7.9. A positive effect of zeolite materials was confirmed in the operating conditions.

This work was supported by project IN60461373 of MEYS of the Czech Republic and by project GA16-13778S.

### **38. Development and application of MOL-PCR for the detection of bacterial food-borne infections**

V. Huvarová (1,2), N. Reslová (1,3), P. Králík (1)

(1) Department of Food and Feed Safety, Veterinary Research Institute, Brno, CZ

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

(3) Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University Brno, CZ

Multiplex oligonucleotide ligation PCR assay (MOL-PCR) is one method that can be used to detect microbial pathogens. It allows analysis of multiple types of markers, such as unique sequences, insertions, deletions, or single nucleotide polymorphisms (SNPs) in one multiplex reaction.

For detecting a specific target sequence, a pair of MOLigo probes is proposed. Each pair of MOLigo probes is specific to a particular target sequence, but all the pairs contain the same sequence for placement of universal primers. MOLigo probes are connected to the target sequence and ligated during a separate ligation step to form a complex ssDNA that serves as a template for subsequent amplification with universal pair of primers (one fluorescently labeled) during PCR. One of the MOLigo probes also contains so-called TAG, it is a unique sequence by which the PCR products hybridize to a bead with a covalently coupled anti-TAG sequence. Each set of beads therefore carries a different anti-TAG sequence complementary to the TAG sequence in the MOLigo probe, while each set of beads has a distinct spectral address given by the combination of red and infrared fluorophores by which the polystyrene beads are filled. The whole reaction and subsequent analysis of the individual sets of beads with the PCR products is carried out in a MAGPix instrument connected to a computer.

MOL-PCR has been optimized for the detection of bacterial pathogens caused alimentary infections as *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* subs. *enterica* and *Campylobacter jejuni*. The versatility of MOL-PCR was used in their simultaneous detection.

This work was created within the project of Security Research of the Ministry of the Interior of the Czech Republic VI 20152020044.

### 39. Využití metody Start of Growth Time (SGT) pro high throughput kvantifikaci biofilmu

L. Vacek (1), Z. Tučková (2), R. Krumpolec (2), J. Kelar (2), F. Růžička (1), M. Černák (2)

(1) Mikrobiologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity a FN u sv. Anny, Brno, CZ

(2) CEPLANT, Ústav fyzikální elektroniky, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Kvantifikace množství bakteriálních buněk je jedním ze základních postupů využívaných v mikrobiologii. Existují různé metody pro kvantifikaci, přičemž každá má své výhody i nevýhody. Jednou z nejběžnějších metod a zároveň zlatý standard mikrobiologie je stanovení počtu životaschopných buněk pomocí počtu kolonie tvořících jednotek (CFU). Její nespornou výhodou je možnost kvantifikovat téměř jakékoli množství bakterií díky předředění stanovované bakteriální suspenze. Její nevýhodou jsou pak nároky na čas, pracnost a vysoké nároky na materiál, zvláště pak v případě, že je nutné zpracovat velké množství vzorků. Jinou metodou, vhodnou zejména pro zpracování velkého množství vzorků najednou, je měření optické denzity v mikrotitračních destičkách. Nevýhodou této metody je zejména limitace pro použití na větší množství bakterií (obvykle mezi  $10^8$  až  $10^{10}$  buněk/ml) a nemožnost odlišit buňky živé a mrtvé.

Metoda Start of Growth Time (SGT) kombinuje pozitiva obou dvou přístupů. Tato metoda je založena na lineárním vztahu mezi lag fází růstu, která trvá do doby, než optická denzita dosáhne hraniční hodnoty a logaritmem počtu buněk v původním inokulu. Metoda tak kombinuje kontinuální měření optické denzity a metodologii kvantifikace neznámého vzorku využívanou v kvantitativní PCR pomocí kalibrátorů.

Techniky SGT a CFU byly použity pro kvantifikaci baktericidního efektu prototypu dekontaminačního přístroje (CEPLANT, Ústav fyzikální elektroniky Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity) na biofilm kmenu *Staphylococcus aureus* CCM 4750. Obě techniky byly schopné kvantifikovat baktericidní efekt dekontaminačního přístroje, přičemž výsledky obou technik se lišily maximálně o 0,4  $\log_{10}$  počtu buněk.

SGT je relativně rychlá a málo pracná metoda, která může dobře sloužit pro kvantifikaci vysokého počtu vzorků najednou a která má srovnatelnou citlivost a přesnost jako metoda CFU.

## 40. GABA shunt in growth and development of *Neurospora crassa*

K. Ďurišová (1), M. Oravcová (1), B. Mosná (1), Martin Šimkovič (1), Michal Kaliňák (1), S. Kryštofová (1)

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

GABA shunt is present in all living organisms including bacteria and humans. The biological function of the GABA shunt in fungi remains poorly understood. This research is focused on the study of biological function of GABA shunt in ascomycete fungus *Neurospora crassa*, which is attached to the TCA cycle. GABA shunt is a metabolic pathway which involves three enzymes, glutamate decarboxylase (GAD), GABA aminotransferase (GABAT) and succinate semialdehyde dehydrogenase (SSADH). These enzymes then together catalyze conversion of glutamate to succinate which is an intermediate of the TCA cycle. In *N. crassa* genome, we identified two genes that code GAD (NCU06803, NCU11190), one gene for GABAT (NCU08998) and SSADH (NCU00936). In this work, we analyzed strains defective in *gabaT* and *ssadh* and identified multiple but not detrimental defects in growth and development. Both strains grew well in agar media and were capable to asexually and sexually reproduce. Delta *gabaT* strain formed wider hyphae and chlamydospores in submerged cultures and had reduced growth on medium supplemented by GABA. Delta *ssadh* strain grew and reproduced well on agar medium which was similar with the parental strain. Major phenotypic changes in *ssadh* knock-outs were observed in submerged cultures such as formation of thinner and often broken hyphae, development of extremely short branch hyphae, high frequency and irregularity in formation of branch hyphae. The work contains measurements of enzymatic activities of GABA shunt enzymes, mitochondrial respiration and metabolomic profile in mutants and parental strains.

### Acknowledgments

This work was supported by the project of young researches and APVV-0719-12, APVV-16-0216.

## 41. Využití molekulárně biologické metody LAMP v potravinářství

K. Loupancová (1), J. Kyznar (1), Hrubá M. (1), E. Šviráková (1)

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

Metoda LAMP („loop-mediated isothermal amplification“ neboli „izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou“) představuje nově vyvinutou, molekulárně biologickou, metodu pro amplifikaci specifických sekvencí DNA a RNA, nejenom pro detekci potravinových patogenních mikroorganismů. Cílem této práce je studium základních principů metody LAMP a jejího využití pro rychlou a spolehlivou detekci potravinových patogenů, doplněné o vstupní experimenty s potravinovými maticemi modelově kontaminovanými vybranými patogeny.

Pro experimenty bylo vybráno 10 potravinových matic. Od každé matrice byly připraveny tři vzorky: jeden vzorek byl kontrolní a dva vzorky byly modelově kontaminovány kmeny *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43888 a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 51741 (inokulum  $10^2$  KTJ  $g^{-1}$  potravinové matrice). Pro zpětnou detekci patogenů byly použity tzv. „potravinářské panely“ (dodavatel: Amplex Biosystems GmbH, DEU; distributor Axon Lab spol. s r.o., CZE) vhodné pro metodu LAMP.

Bylo zjištěno, že u 19 z 20 testovaných vzorků cíleně kontaminovaných *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ATCC 51741 došlo k úspěšné zpětné detekci z 95 %, a že u 15 z 20 vzorků cíleně kontaminovaných *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 4388 došlo k jeho úspěšné zpětné detekci ze 75 %. Při experimentech byl zaznamenán nepatrný, částečně omezující, vliv typu konkrétní potravinové matrice na detekci testovaných patogenů.

Závěrem je možné uvést, že metoda LAMP představuje moderní novou metodu pro rychlou a průkaznou detekci patogenních či indikátorových mikroorganismů v různých potravinových maticích se značným potenciálem do budoucna. Mezi její hlavní výhody se řadí rychlost, robustnost, vysoká specifita a selektivita vlastní reakce; k nevýhodám pak nutnost vývoje sušených reagenčních činidel pro konkrétní detekovaný patogen, včetně potřeby dalšího výzkumu. Výsledky této práce mohou být využitelné při budoucích aplikacích metody LAMP v potravinářství při cíleném jištění zdravotní bezpečnosti potravinových surovin a výrobků.

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.

## 42. xMAP technology – detection of pathogenic viruses

J. Hrdy (1,2), P. Vasickova (1), N. Reslova (1,3), V. Michna (1,2), P. Kralik (1)

(1) Veterinary Research Institute, v.v.i, Brno, CZ

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

(3) Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, CZ

Most of the currently used reliable methods for molecular detection of microbiological agents rely on systems based on real-time polymerase chain reaction (qPCR). This approach offers sufficiently fast, sensitive and specific way to detect potentially present agents in various samples. Nevertheless, the huge disadvantage of qPCR is limitation of its applications for multiplex formats. There is not enough fluorescent dyes to create truly robust systems for detection of larger number of targets.

Based on this disadvantage we utilized the xMAP technology and its open architecture to create high-throughput multiplex systems which could overcome this serious handicap of qPCR.

The first step of analysis is ligation. In the presence of target DNA, two specific DNA probes are linked. These probes contain universal primer sequences and one of them also the specific TAG sequence. Next step is monoplex end-point polymerase chain reaction (PCR) allowing the amplification of ligated probes. One of the two used PCR primers is labelled by fluorescent dye. After the amplification, the detection using magnetic beads can follow. These beads are covered with specific oligonucleotides (anti-TAG) and each set of beads has unique absorption spectrum. Amplified probes are thus bound by their specific TAG sequence to complementary anti-TAG sequence on appropriate beads. Beads with bounded probes are eventually sorted using MAGPIX<sup>®</sup> instrument (Luminex Corporation). By this system it is theoretically possible to detect up to 50 different targets in one reaction.

To meet the ever-increasing needs for rapid and reliable detection of viruses in human, food or environmental samples in our laboratory, the multiplex viral panel based on described technology will be developed. Up to now, this system includes probes for detection of hepatitis A, hepatitis E and norovirus. Validation of this system and addition of other possible targets is currently underway.

The work was supported by Ministry of the Interior of the Czech Republic (VI20152020044).

### **43. Ověření kvantifikačních standardů využívaných při real-time PCR pomocí droplet digital PCR**

M. Beinhauerová (1,2), P. Králík (1)

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

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

V současné době je kvantitativní real-time PCR (qPCR) jedna z nejpoužívanějších molekulárně-biologických metod pro detekci mikrobiálních patogenů. Nevýhodou této metody je však nezbytnost sestavení kalibrační křivky ze standardů, jež musí být přesně kvantifikovány. V tomto ohledu zatím neexistuje metoda pro nezávislé ověření kvantifikačních standardů. Nejčastěji se k tomuto účelu využívá spektrofotometrie, avšak spektrofotometrické měření absorbance nukleové kyseliny je ovlivněno její čistotou, což může vést k nesprávnému nařazení standardu. Slibným nástrojem pro přesnou kvantifikaci těchto standardů se jeví nedávno vyvinutá metoda droplet digital PCR (ddPCR), která poskytuje absolutní kvantifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny bez nutnosti využití kalibrační křivky.

Principem metody ddPCR je nařazení vzorku a rozdělení reakční směsi do emulze o přibližně 20 000 kapének, které obsahují jednu, více než jednu nebo žádnou kopii cílové nukleové kyseliny. Po amplifikaci jsou kapénky obsahující jednu nebo více kopií molekul na základě fluorescence označeny za pozitivní, zatímco kapénky s žádnou molekulou za negativní. Absolutní počet kopií cílové nukleové kyseliny přítomné ve vzorku je následně vypočítán z množství pozitivních kapének s využitím Poissonovy statistiky.

Pomocí ddPCR jsme provedli ověření na čtyřech vybraných kvantifikačních standardech využívaných v našich laboratořích. Předběžné výsledky ukazují, že spektrofotometrické měření absorbance nukleové kyseliny nadhodnocuje o 30–50%. Dále byla porovnána cirkulární a linearizovaná forma těchto standardů. Z výsledků vyplývá, že linearizovaná forma plazmidu je pro standard vhodnější než cirkulární, jelikož je lépe přístupná amplifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny. Jako poslední krok budou testovány různé kity na izolaci plazmidové DNA pro zjištění vlivu případné kontaminace.

Tato práce byla provedena za podpory projektů RO0518 a QK1810212.



#### 44. NSAT (Nucleotide Sequence Analysis Tool) – software pro určení taxonomické příbuznosti bakterií podle podobnosti celogenomových sekvencí

M. Němec (1), A. Němec (1)

(1) Laboratoř bakteriální genetiky, Státní zdravotní ústav, Praha, CZ

Zlatým standardem pro určení taxonomické příbuznosti bakterií na druhové úrovni je porovnání celogenomových sekvencí pomocí parametru ANIb (Average Nucleotidy Identity Based on BLAST). Existující internetové aplikace umožňující výpočet ANIb jsou však omezeny počtem zpracovatelných sekvencí i absencí navazujících taxonomických analýz. Naším záměrem bylo proto vytvořit uživatelsky přívětivý program umožňující porovnání velkého počtu celogenomových sekvencí a provést jejich klasifikaci metodami shlukové analýzy. Pro evaluaci programu jsme použili rod *Acinetobacter*, pro nějž jsou dostupné celogenomové sekvence pro typové kmeny všech známých druhů, s cílem posoudit taxonomickou pozici skupiny kmenů, která na základě předběžných analýz představuje nový druh „*Acinetobacter pseudolwoffii*“.

Program NSAT je implementován v programovacím jazyce C# a pro výpočet ANIb vyžaduje lokální instalaci programu NCBI BLAST. NSAT dále zahrnuje algoritmy pro výpočet doplňujících parametrů (%GC a TETRA), jež jsou implementovány samostatně. Program umožňuje uživateli nastavit proměnné pro algoritmy a výběr libovolně velkých souborů sekvencí s možností následného upřesnění analyzovaných kombinací. Výstupem programu je tabulka s hodnotami všech parametrů ve formátu CSV a grafické zobrazení podobnosti formou dendrogramu založeného na shlukové analýze hodnot ANIb pomocí algoritmu UPGMA.

NSAT byl aplikován na soubor celogenomových sekvencí pro 54 typových kmenů *Acinetobacter*, 9 kmenů *A. lwoffii* a 6 kmenů „*A. pseudolwoffii*“. Vnitrodruhové hodnoty ANIb byly  $\geq 95,4$  % pro *A. lwoffii* a  $\geq 96,5$  % pro „*A. pseudolwoffii*“; hodnoty ANIb mezi *A. lwoffii* a „*A. pseudolwoffii*“ pak 86,7–88,6 %. Hodnoty ANIb mezi „*A. pseudolwoffii*“ a typovými kmeny známých druhů (vyjma *A. lwoffii*) byly 70,3–81,7 %. Shluková analýza potvrdila koherenci sekvencí „*A. pseudolwoffii*“ a jejich odlišnost od známých druhů. S ohledem na doporučenou hraniční hodnotu ANIb  $\approx 95$  % pro mezidruhové rozlišení, lze „*A. pseudolwoffii*“ považovat za nový druh rodu *Acinetobacter* i na úrovni genomu.

Program NSAT umožňuje snadné posouzení druhové příbuznosti celogenomových sekvencí v rámci bakteriálního rodu a je využitelný pro taxonomické studie zaměřené na přesnou identifikaci známých druhů i klasifikaci nových taxonů.

## 45. Biotechnological conversion of waste fat into highly valuable lipid-rich bioproducts using *Zygomycetes* strains

O. Slaný (1), T. Klemková (1), M. Jašurek (1), V. Šapaval (1), I. Márová (1), M. Čertík (1)

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

Increasing production of waste fat from meat processing industry, which may cause a series of environmental problems leading to possible fatal pollution of environment, represents a serious challenge for its effective natural evaluation. Solid state fermentation (SSF) provides an alternative way for manufacturing of waste fats and their possible bioconversion into products applicable to different types of industry. SSF is ecological process requiring low energy and maintaining high product yields, which provides a very favorable economic balance. This research was focused on utilization of waste fat from the poultry industry and production of  $\gamma$ -linolenic acid (GLA), arachidonic acid (ARA) and carotenoid pigment  $\beta$ -carotene using two different *Zygomycetes* strains - *Umbelopsis isabellina* and *Mortierella alpina*.

Strains *U.isabellina* CCF2412 and *M.alpina* CCF2861 were obtained from the Culture Collection of Fungi (Prague). Two cultivation substrates were used - wheat bran (mill Pohronský Ruskov) and cornmeal (Amylum Boleráz). Substrates were inoculated by adding a spore suspension and SSF was performed in HDPE bags for 7 or 10 days, respectively. Analysis of pigments was carried out with HPLC chromatograph (HP 1100, Agilent) equipped with DAD. Fatty acids were analyzed by gas chromatograph (GC-6890 N, Agilent) equipped with FID.

*U.isabellina* is described as a good producer of essential fatty acids, particularly GLA, and carotenoid pigments. Addition of waste fat into cultivation substrate led to an increase in the total fatty acids content but suppressed utilization of substrates. The highest amount of GLA and  $\beta$ -carotene in bioproduct (BP) was reached after cultivation on cornmeal with additions of 5% waste fat and 0.5% Tween20 (GLA:  $5.8\pm 0.7$  g/kg BP;  $\beta$ -carotene:  $33.1\pm 4.1$  mg/kg BP). Cultivation of *U.isabellina* on wheat bran mixed with 5% of waste fat and 0.5% Tween20 resulted in lower GLA accumulation ( $3.8\pm 0.6$  g/kg BP) and only trace amount of  $\beta$ -carotene was detected. *M.alpina* is known as a good producer of ARA. Wheat bran as a substrate was much more appropriate for cultivation of this strain. The highest amount of ARA in BP ( $15.2\pm 0.7$  g/kg) was found on the substrate mixture with 30% waste fat and 3% Tween40.

The work was supported by the project LipoFungi No. 268305 (Norwegian Research Council).

## 46. Bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): combination of biotechnology and nanotechnology

H. Horváthová (1), K. Lászlóvá (1), M. Monoková (1), K. Dercová (1)

(1) Department of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology STU, Bratislava, SR

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are a group of hydrophobic and toxic substances with tendency to persist in organic matter of soils and adipose tissues of animals. As their removal from the environment is necessary, many technologies for their elimination have been introduced to practice. Combination of bio- and nanotechnology is based on sequential application of two approaches: addition of reductive nanoscale zerovalent iron (nZVI) and bacterial strains isolated from the PCB-contaminated sediment.

Experiments took place in minimal mineral medium (MM medium). The process started by bioremediation, which was carried out in 500 ml cultivation flasks with the addition of PCBs and bacterial inocula (180 rpm, 28°C). After 14 days, contents of the whole flask were transferred to 100 ml closable glass bottles and nZVI suspension was added. Cultivation with nZVI lasted another 14 days and residual PCBs were extracted with n-hexane and analyzed by GC-ECD afterwards. The opposite order was tested as well. The toxicity of nZVI was tested using bacterial strains and short-term germination test with *Sinapsis alba*.

Sequential application in the order „nZVI → strains“ seems to be more effective. The combination of nZVI with the strain *Stenotrophomonas maltophilia* removed 95 % of the sum of 7 PCB congeners and combination with the strain *Ochrobactrum anthropi* removed almost 99 %. The opposite order also removed PCBs from the MM medium, however not to such extent. The elimination percentage was slightly higher in comparison with biodegradation by respective single strains. To determine the toxicity of nZVI suspension, concentrations 0.5; 1; 5 and 7 g/l were tested. Bacteria are more sensitive in comparison with *S. alba*, the growth of both strains was observed only at concentration 0.5 g/l, while the germination of *S.alba* was 100 % inhibited only at 7 g/l concentration.

This research was supported by projects VEGA (1/0295/15) a APVV (0656-12).

## **47. Analysis of gene cluster required for conidial pigment synthesis in *Trichoderma* spp.**

V. Palušková (1), L. Hoppanová (1), M. Kaliňák (2), S. Kryštofová (1)

(1) Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava

(2) Central Laboratories, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology in Bratislava

Filamentous fungi are prolific producers of secondary metabolites that are natural products exhibiting biological activities and have a tremendous impact on society. Some are of interest to the pharmaceutical industry (antibiotics) while others are involved in biological interactions with plants and animals (disease, mycotoxin production). Secondary metabolites include pigments which play an important role in cell integrity and resistance to harmful environmental factors (UV light, radioactive radiation, oxidative stress and antimicrobial agents). Some fungal species produce green or dark-brown pigments known as melanins by oxidative polymerization of phenolic (1,8-dihydroxynaphthalene (DHN)) or indolic compounds (3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)). Genes required for synthesis of DHN melanin have been discovered in some fungi (*Aspergillus fumigatus*) and are often organized in clusters.

In *Trichoderma* spp. gene cluster required for conidial pigment synthesis is composed of three genes (*pks4*, polyketide synthase (217154), *mco*, multicopper oxidase (217148) and *dabb*, a gene of unknown function with similarity to the DABB protein family (154816)). The *pks4* gene cluster is conserved in *Trichoderma* genus. M14 (white) mutant and HM2 (brown) mutant of *T. atroviride* F534 isolated by UV mutagenesis were phenotypically characterized. The white mutant carried a mutation in the *pks4* gene which led to formation of white conidia. The typical characteristics of the brown mutants consisted of brown colored conidia and secretion of orange and brown pigments. The orange pigment was later identified as rhodolamprometrin by NMR analysis. Sequencing of *pks4* cluster in brown mutant revealed mutation in the *dabb* gene. Transcriptional analysis of genes belonging to *pks4* gene cluster showed different levels of expression in parental strain F534 and in mutant strains. Other phenotypic analysis included the effect of pigment loss on conidial structure, viability, scavenging of free radicals and mycoparasitism.

This work was financially supported by grant of Science and Technology Assistance Agency APVV-16-0216, APVV-0719-12 and Funding Program for Young Scientists at Slovak University of Technology 2018 (Program na podporu mladých výskumníkov STU 2018).

## **48. *Serpula lacrymans* a další dřevokazné houby: možnosti ochrany staveb před napadením novými preparáty na bázi nanočástic**

M. Znamínko (1), F. Zaleš (1), O. Benada (1), K. Švec (1), J. Drbohlavová (2), E. Polievková (2), A. Nasswettrová (3), P. Šmíra (3) a J. Gabriel (1)\*

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

(2) Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ

(3) Thermo Sanace s.r.o., Ostrava, CZ

[gabriel@biomed.cas.cz](mailto:gabriel@biomed.cas.cz)

Práce se zabývá novými možnostmi ochrany dřeva před napadením dřevomorkou domácí (*Serpula lacrymans*) a dalšími houbami, které se usídlují v budovách či domácnostech napříč celou Evropou. Dosavadní ochrana je pasivní, založená na impregnaci dřevěných konstrukcí solemi zinku, mědi, chromu (dříve i solemi rtuti či dokonce volskou krví), nyní i boru, popř. na impregnaci organickými či organokovovými sloučeninami (např. cínu). Nanočástice různých bivalentních kovů, o kterých jsou známy (nebo neznámy) antimikrobiální účinky, mohou být vhodnými novými agens, působícími preventivně proti prvotnímu napadení dřevěných konstrukcí houbami hnědé hniloby; tyto houby rozkládají dřevní hmotu na jemný prášek (lignin) a dovedou v krátké době rozložit nosný trám na mechanicky nefunkční rozpadenou strukturu. V této práci jsme sledovali vliv nátěru smrkových standardizovaných kostek na váhový úbytek po dvouměsíční kolonizaci dřevomorkou domácí (*Serpula lacrymans*). Látky, použité v této studii byly Ag a Se nanočástice, samostatně či v kombinaci s profesionálně používaným preparátem Bochemit QB Profi a několik dalších preparátů, vyvinutých speciálně k této studii, založených na bázi organických kyselin. Celkem bylo studováno více než 550 vzorků; ze všech výsledků nejlépe vycházejí kombinace dosavadně běžně komerčně užívaného preparátu Bochemit s nově vyvinutými částicemi na bázi stříbra a selenu.

Elektronmikroskopické studie ukázaly, že zatímco neošetřené špalíčky byly v průběhu dvou či tří měsíců kompletně rozloženy a na řezech vykazovaly průnik mycelia dřevokazných hub i do hlubších struktur, tak nanočásticemi selenu ošetřené špalíčky napadeny nebyly a ani hyfy hub nepronikly do hlubších struktur.

Preparáty, obsahující vhodné koncentrace nanočástic stříbra či selenu se tak mohou stát užitečnou součástí preventivních nátěrů vnitřních částí budov (krovy, půdy, schodiště, popř. mobiliář) či dále vyvíjených preparátů, určených k prevenci vůči napadení vnějších konstrukcí, vystavených na rozdíl od vnitřních prostor kolísavé vlhkosti či proměnlivému chladu, jako jsou ploty, lávky, zábradlí, pergoly, mostky či ohrady.

Práce byla podpořena grantem GAČR 17-05497S a Mikrobiologickým ústavem AV ČR (61388971).

## 49. Kokultivace treponemálních kmenů DAL-1 a Philadelphia 1 v laboratorních králících.

Markéta Nováková (1), Michal Strouhal (1), David Šmajš (1)

(1) Biologický ústav, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Bakterie rodu *Treponema* způsobují onemocnění člověka i zvířat. Kmeny *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPA) lze rozdělit na skupiny Nichols-like a SS14-like. Většina klinických izolátů patří do SS14-like skupiny a pouze 6 % do skupiny Nichols-like. Naopak většina kmenů úspěšně pasážovaných v králících patří do Nichols-like skupiny. Existuje mnoho prací zaměřených na dynamiku experimentální infekce způsobené TPA, u většiny z nich byl však používán pouze kmen Nichols, protože je dobře zavedený v několika laboratořích a protože vnitrodruhová variabilita TPA byla zjištěna teprve v posledních letech.

Pro zjištění rozdílného růstového potenciálu mezi Nichols-like a SS14-like kmeny byli použiti zástupci DAL-1 a Philadelphia 1. Kmeny byly před experimentem pasážovány v králících ve 13-ti (DAL-1) a 10-ti (Philadelphia 1) pasážích. Živé treponemy byly z varlat utracených králíků získány vytřepáváním 25 minut do PBS. Počet treponem byl určen pomocí mikroskopie v zástínu. Šest laboratorních králíků bylo inokulováno  $10^7$  buněk kmene DAL-1 a Philadelphia 1 v poměrech 1:0; 1:0,1; 1:1; 0,1:1; 0,01:1 a 0:1. Po 14-ti dnech kokultivace byli králíci utraceni a orgány zvířat (mozek, plíce, játra, ledviny, slezina, varlata) byly odebrány a uchovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z orgánů byla izolována DNA. Kvantifikace treponem v orgánech byla provedena pomocí real-time PCR za použití specifických sond.

Pokud byly oba kmeny kultivovány zvlášť, počty bakterií ve varlatech byly u DAL-1  $10^7$  (v den 0) a  $2,5 \cdot 10^9$  (v den 14), u Philadelphia 1  $10^7$  v den 0,  $2,5 \cdot 10^7$  v den 14. Bakterie kmene Philadelphia 1 však byly detegovány v plicích, ledvinách, játrech a slezině, zatímco kmen DAL-1 byl detegován pouze v játrech v případě DAL-1:Philadelphia 1 1:0,1. Pokud byly kokultivovány, růst kmene Philadelphia 1 byl signifikantně limitován kmenem DAL-1, dokonce i v případě, kdy byl poměr DAL-1:Philadelphia 1 0,01:1. S rostoucím množstvím kmene DAL-1 proporcionalně klesal počet buněk Philadelphia 1.

U kmene DAL-1 byl pozorován nárůst v místě inokulace (tj. varlata), zatímco kmen Philadelphia 1 diseminoval do všech sledovaných orgánů kromě mozku. Tento rozdíl by mohl vysvětlovat, proč kmeny úspěšně pasážované v králících většinou patří do skupiny Nichols-like. Další možnou interpretací je fakt, že kmen DAL-1 je lépe přizpůsoben laboratorním králíkům.

## 50. Effect of waste fat addition on production of $\gamma$ -linolenic acid by fungal solid-state fermentation

M. Janák (1), V. Vráblová (1), I. Márová (2), V. Shapaval (3), M. Čertík (1)

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

(2) Institute of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, Czech Republic

(3) Faculty of Science and Technology, Norwegian University of Life Sciences, As, Norway

Waste animal fats as environmental burden are rich in saturated fatty acids and they might be biotechnologically evaluated by microorganisms to bioactive compounds. Lower filamentous fungi belonging to *Cunninghamella* genus are able utilize waste oils and fats and convert them into  $\gamma$ -linolenic acid (GLA). GLA is important in human body as it is an intermediate for the biosynthesis of compounds such as prostaglandins, prostacyclins, and tromboxanes. Fungal solid state fermentation (SSF) has been developed as an effective tool for valorization of various waste agro-industrial byproducts (cereals, legumes, oils and fats). SSF is a fermentation technique that is executed on solid substrate in absence of free water.

Solid-state fermentations with *Cunninghamella echinulata* ATHUM 4411 were performed in HDPE bags with wheat bran (WB). Waste fat (WF) was added to WB up to 50% as pure fat or as emulsion with detergent Tween 20 (ratio fat/detergent was 10:1). The substrate was inoculated by the spore suspension and fermentation was carried out for 5 days at 25°C. Fatty acids in the fermented bioproduct (BP) were analyzed by gas chromatograph GC 6890 N (Agilent) equipped with the flame ionization detector. The amount of fungal biomass in BP was analyzed indirectly by determination of glucosamine in BP.

The fungus *C. echinulata* showed good growth on WB with additions of either pure WF or WF/detergent emulsion. The substrate utilization was gradually reduced with increasing WF content in the substrate. Although total amount of fatty acids in BP was elevated due to WF addition, GLA levels in total fatty acids subsequently decreased. The highest yields of almost 13 mg GLA / g BP were obtained with 5% addition of WF (without and with detergent) that represent nearly 20% increase of the GLA yield compared to the fermentation on WB only. Under these conditions 35 – 40 mg GLA were accumulated in fungal biomass. Solo addition of detergent to WB has no effect on GLA amount in BP.

The work was supported by the grant „Lipofungi“ No. 268305 (Research Council of Norway).

## **P 01.**

### **Plantaricín – like bakteriocín produkovaný kmeňom *Lactobacillus plantarum* LP 13Ba a jeho inhibičná aktivita**

A. Kandričáková (1), A. Lauková (1), E. Bino (1), M. J. Fraqueza (2)

(1) Ústav fyziológie hospodárskych zvierat, Centrum Biovied SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovenská republika

(2) Univerzita Lisabon, Fakulta veterinárskeho lekárstva, Avenida da Universidade Tecnica, 1300-477, Lisabon, Portugalsko

Laktobacily zohrávajú dôležitú úlohu v rozvoji imunitného systému. Kolonizujú tráviaci trakt živočíchov a tvoria ochrannú bariéru črevného traktu. Niektoré druhy laktobacilov napr. *Lactobacillus plantarum* môžu produkovať ribozomálne syntetizované proteíny – bakteriocíny s antimikrobiálnou aktivitou voči širokému spektru baktérií. Bakteriocín – produkujúce kmene a ich bakteriocíny môžu byť využívané v prevencii rôznych ochorení. *L. plantarum* LP 13Ba izolovaný z trusu bažanta obsahuje gén pre produkciu plantaricínu A a iných plantaricínov. Cieľom tejto štúdie bola čiastočná purifikácia plantaricínu A a testovanie jeho antibakteriálnej aktivity proti Gram – pozitívnym a Gram – negatívnym baktériám rôzneho pôvodu. Plantaricín A – like substancia bola semipurifikovaná z bujónovej kultúry *L. plantarum* LP 13Ba v skorej stacionárnej fáze rastu. Kmeň (0, 1 % inokulum, 500 µl) *L. plantarum* LP 13Ba bol inokulovaný do 500 ml MRS bujónu a inkubovaný 16 hod. pri 37°C. Bunky boli odstránené centrifugáciou pri otáčkach 10 000 x g po dobu 30 min. a pri 4°C. Hodnota pH získaného supernatantu bola upravená na 6, 5 a zároveň bol supernatant ošetrený roztokom EDTA. Takto upravený supernatant bol následne inkubovaný pri 80°C, po dobu 10 min. a prefiltrovaný cez 0, 22 µm filter. Precipitácia síranom amónnym prebiehala pri 70% saturácii a 4°C. Precipitát bol centrifugovaný (10 000 x g, 30 min.) a resuspendovaný v 5 ml fosfátového pufru. Aktivita precipitátu (51 200 AU/ml) bola testovaná voči hlavnému (citlivému) indikátorovému kmeňu *Listeria monocytogenes* VE 405. Inhibičná aktivita precipitátu bola ďalej testovaná proti Gram – pozitívnym (enterokoky, stafylokoky izolované z bažantov a pštrosov, *Staphylococcus aureus* z rýb, králikov, ovčieho syra, kmene *Listeria monocytogenes* z mäsa) a Gram – negatívnym baktériam (*E. coli*, *Buttiauxella* z koní a *Cronobacter* spp. z rôznych zdrojov) kvantitatívnym agar spot testom. Precipitát LP 13Ba inhiboval rast enterokokov a stafylokokov s aktivitou od 100 do 51 200 AU/ml a mal silný antilisteriálny účinok (409 600 AU/ml). *Výsledky tejto štúdie boli podporené projektom VEGA No. 2/0006/17.*



## **P 02.**

### **Site-directed mutagenesis as a promising tool for modulating the inhibition of chemokines by M3 protein of murine herpesvirus 68 (MHV-68)**

S. Lenhartová (1), R. Šebová (2), M. Kúdelová (2)

(1) Department of Biochemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, Bratislava, Slovak Republic;

(2) Department of Viral Immunology, Institute of Virology, Biomedical Research Center, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovak Republic  
simonnalenhartova@gmail.com

Murine herpesvirus 68 (MHV-68), a natural pathogen of murid rodents, first discovered in Slovakia, was convicted of being close to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) and *Epstein-Barr virus* (EBV). The M3 protein encoded by MHV-68 is a focus of much attention because it is the only decoy receptor discovered so far that binds a broad spectrum of members of all four chemokine classes. In this study, using insect cells we have prepared recombinant M3 protein of MHV-68 deleted in signal peptide ( $\Delta$ ssM3/68) and  $\Delta$ ssM3/68 proteins mutated in a single amino acid (*mI* or *mIV*) localized near binding site for chemokines. The evaluation of the effect of mutation on protein affinity to four selected human chemokines revealed that compared to the  $\Delta$ ssM3/68 protein:  $\Delta$ ssM3/68 *mI* protein binds two times more CXCL8 chemokine and about one third more CCL5 chemokine but about one third less chemokines CCL11 and CCL2;  $\Delta$ ssM3/68 *mIV* protein binds as much as 4 times more chemokine CXCL8 and about a third less CCL2 chemokine, but the mutation *mIV* has almost no effect on binding to chemokines CCL5 and CCL11. Our study has revealed new important data on the ability to modulate inhibition of chemokines by binding of MHV-68 M3 protein suggested to have a great potential to be useful in future therapeutic strategies to control an immune response accompanied by extreme production of chemokines occurring in some severe human illnesses.

This work was supported by grants APVV-15-0474, 0621/12 and VEGA 2/0087/17.

### **P 03.**

#### **Biosurfactant-enhanced biodegradation of polychlorinated biphenyls**

K. Lászlóvá (1), P. Olejníková (2), K. Dercová (1)

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

(2) Institute of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Chemical and Food Technology STU, Bratislava, SR

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are dangerous and stable hydrophobic compounds widely dispersed in the environment due to their low degradability, high toxicity, and strong bioaccumulation. The former producer (Chemko Strážske) of the commercial PCBs mixture DELOR 103 in Slovakia, manufactured altogether approximately 21,500 tons of this product. Bioremediation is considered as an efficient and cost-effective process for the elimination of PCBs using microorganisms with PCB degradation ability.

The subject of submitted work is focused on the study of enhanced PCB bioremediation using bacterial strains isolated from the historically PCB-contaminated sediments of the Strážsky canal. The bacterial isolates used in this work were identified with MALDI-TOF MS.

Bioremediation of contaminated sediments was performed as follows: twenty g of dried sediment was mixed with 100 ml mineral medium and were inoculated with bacterial strains with addition of biosurfactans. The flasks were incubated at 28 °C in stationary position for 21 days in the dark. After experiment the residual PCBs were extracted with n-hexane with Soxhlet extractor. The samples were analyzed by gas chromatography GC (Agilent 5890A) with an electron capture detector (ECD).

The 8 isolated bacterial strains were identified with MALDI TOF MS as *Brevibacterium casei*, *Achromobacter piechaudii*, *Pseudomonas frederiksbergensis*, *Rhodococcus ruber*, *Ochrobactrum anthropi*, *Achromobacter piechaudii*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*. The prospects of bioaugmentation treatment using bacterial isolates for the removal of the PCBs from contaminated sediment was confirmed. Bioaugmentation treatment using the addition of single bacterial strains *A. xylosoxidans* and biosurfactant rhamnolipid increased the PCB degradation (55%) in PCB-contaminated sediments as well.

This work was supported by VEGA grant No. 1/0295/15 and APVV-0656-12.

## **P 04.**

### **Možnosť využitia Ramanovej spektroskopie pri identifikácii pôvodcov infekcií močových ciest**

K. Rebrošová (1), M. Uhlířová, M. Šiler (2), O. Samek (2), F. Růžička (1), V. Holá (1)

(1) Mikrobiologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity a Fakultní nemocnice u sv. Anny, Pekařská 53, Brno 65691, ČR;

(2) Ústav přístrojové techniky, Akademie věd České republiky, Královopolská 147, Brno 61264, Czech Republic;

Ramanova spektroskopie je optická metoda založená na jeve neelastického optického rozptylu, ku kterému dochází při interakci monochromatického světelného lúča s molekulovými vibráciami vo vzorke, vďaka čomu získavame obraz o chemických väzbách vo vzorke. V tejto práci sme sa zaoberali využitím Ramanovej spektroskopie pri rozlíšení rôznych pôvodcov infekcií močových ciest z kolónií vykultivovaných na Mueller-Hintonovom agare.

Testovali sme 111 kmeňov mikroorganizmov prislúchajúcich do 12 rodov (11 bakteriálnych a 1 kvasinkový), ktoré sa podieľajú na vzniku infekcií močových ciest u človeka. Vzorky boli kultivované 24 hodín pri 37 °C na Mueller-Hintonovom agare. Samotné meranie spektier sme vykonávali pomocou komerčného spektrometra inVia Raman Spectrometer (Renishaw plc., Wotton-under-Edge, Spojené kráľovstvo) s použitím diódového lasera s vlnovou dĺžkou 785 nm ako excitačného zdroja a mikroskopického objektívu Leica (Wetzlar, Nemecko, 50 x). Z každého kmeňa bolo získaných minimálne 10 spektier (s akvizíciou 15 sekúnd). Výsledky boli spracované metódami strojového učenia (machine learning), konkrétne 1NN.

Ramanova spektroskopie dokázala správne priradiť získané spektrá k príslušným druhom s celkovou úspešnosťou 98,56 %. Najproblematickejším bol druh *Pseudomonas aeruginosa*, u ktorého často dochádza k tvorbe pigmentov. Tieto pigmenty znižovali kvalitu získaných spektier kvôli výskytu fluorescencie. Celkovo ale možno povedať, že Ramanova spektroskopie má pre identifikáciu mikroorganizmov spôsobujúcich infekcie močových ciest veľký potenciál.

Práca bola podporená grantmi 16-29916A (Ministerstvo zdravotníctví České republiky), MUNI/A/0874/2017, 16-31593A, ALISI č. CZ.1.05/2.1.00/01.0017 (Európska komisia) a GAČR GP15-20645S (Grantová agentúra Českej republiky).

## P 05.

### Závery z monitoringu osídlenia vodovodných systémov legionelami v zdravotníckych zariadeniach v Slovenskej republike

D. Šimonyiová (1), Z. Sirotná (1), A. Gažiová (1), E. Pavleová (1)

(1) Národné referenčné centrum pre legionely v životnom prostredí, Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, Bratislava, SK

Legionely sú potenciálne patogénne baktérie, ktoré môžu predstavovať zdravotné riziko pre osoby, ktoré sú vystavené pôsobeniu kontaminovanej vody alebo aerosólu z nej vytvoreného.

Úrad verejného zdravotníctva SR vykonal v rokoch 2015 - 2017 v rámci svojich projektov a programov monitoring, cieľom ktorého bolo zistiť aktuálnu situáciu v osídlení rozvodných vodovodných sietí teplej úžitkovej vody (TÚV) legionelami v 9 fakultných, 14 okresných nemocniciach a v 6 kúpeľných zariadeniach v SR. Súčasne sa sledovalo celkové oživenie vôd vrátane kontaminujúcej mikroflóry a kontrolovalo sa dodržiavanie teploty teplej úžitkovej vody v zmysle platných technických požiadaviek.

Kultivačné vyšetrenie legionel sa vykonávalo akreditovanou metódou v súlade s STN ISO 11731. Vykultivované izoláty legionel sa konfirmovali vo viacerých krokoch a určovalo sa druhotné zatriedenie a sérotypy *Legionella pneumophila*.

Výsledky monitoringu preukázali významnú kontamináciu TÚV v sledovaných zdravotníckych objektoch legionelami, napriek hygienickému zabezpečeniu pitnej vody, z ktorej je TÚV vyrábaná. V krajských fakultných nemocniciach bolo odobratých a vyšetrených 53 vzoriek. Legionely boli stanovené až v 70% odobratých vzoriek TÚV, s najvyššou koncentráciou  $4,8 \cdot 10^4$  KTJ/100 ml. Najčastejšie stanoveným sérotypom bola *Legionella pneumophila* sérotyp 1 a sérotyp 3. V okresných nemocniciach bolo vyšetrených 48 vzoriek. V 81% vzoriek bola stanovená *Legionella pneumophila* s najvyššou koncentráciou  $1,4 \cdot 10^4$  KTJ/100. V pozitívnych vzorkách bola potvrdená *Legionella pneumophila* sérotyp 3 (85,3%) a *Legionella pneumophila* sérotyp 1 (8,8 %). Najčastejšou sprievodnou mikroflórou bol podmienený patogén *Pseudomonas aeruginosa*.

Dokázaná prítomnosť uvedených patogénnych baktérií v nemocničnom prostredí poukazuje na zdravotné riziko pre hospitalizovaných pacientov. Zistená nízka teplota TÚV v rozvodoch nezabezpečuje tepelnú dezinfekciu rozvodných systémov ale naopak, spolu s neriešenými problémami spojenými s inkrustami a biofilmom, pravdepodobne umožňuje rozvoj legionel a ďalšej nežiaducej mikroflóry.

## **P 06.**

### **Mikrobiologická kvalita materských mliek.**

A. Gičová (1), B. Kotvasová (1), Z. Sirotná (1)

(1) Národné referenčné centrum pre mikrobiológiu životného prostredia, Úrad verejného zdravotníctva Slovenskej republiky, Bratislava, SK

Úrad verejného zdravotníctva SR v rámci svojich programov a projektov dlhodobo kontroluje kvalitu materských mliek odovzdávaných do banky ženského mlieka pri Detskej fakultnej nemocnici v Bratislave. Cieľom úlohy, okrem sledovania nutričnej hodnoty a chemických kontaminantov, je aj sledovanie kvality nepasterizovaného mlieka ako odozvu na zdravotný stav matky a spôsob manipulácie s mliekom, sledovanie účinnosti pasterizácie materského mlieka porovnávaním mikrobiologickej kvality pred a po jeho pasterizácii, monitorovanie prítomnosti patogénnych mikroorganizmov a stafylokokového enterotoxínu v pasterizovanom mlieku.

Požiadavky na mikrobiologickú kvalitu pasterizovaného materského mlieka upravuje Výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR (MZ SR) z roku 2006 č. 06267/2006-SL, ktorým sa vydáva hlava Potravinového kódexu SR upravujúca mikrobiologické požiadavky na potraviny a na obaly na ich balenie v komodite „potraviny na výživu dojčiat a malých detí“. Materské mlieko je analyzované akreditovanými metódami celkový počet mikroorganizmov podľa STN EN ISO 4833, koliformné baktérie podľa STN ISO 4832, *Staphylococcus aureus* a koagulázapozitívne stafylokoky podľa STN EN ISO 6888-1, prítomnosť stafylokokového enterotoxínu podľa Európskej skriningovej metódy (EU-RL for Coagulase Positive Staphylococci, ver. 5, 2010). Zároveň je identifikovaná prítomnosť sprievodnej mikroflóry s dôrazom na sledovanie prítomnosti patogénnych a podmienených patogénnych mikroorganizmov.

Počas vybraných piatich rokov 2013 až 2017 bolo v Národnom referenčnom centre vyšetrených 824 vzoriek materského mlieka, z toho 413 pasterizovaných a 411 nepasterizovaných mliek.

Na základe dosiahnutých výsledkov kontroly materského mlieka, ktoré sa cielene sleduje od roku 2000, bolo vydané odborné usmernenie MZ SR pre činnosť banky ženského – materského mlieka a zdravotné indikácie pre podávanie ženského – materského mlieka ako prevencia proti ohrozeniu zdravia novorodencov podávaním kontaminovaného mlieka.

## **P 07.**

### **Imunologická a molekulárně biologická analýza zoonotických mikroorganismů ve tkáních malých savců**

A. Žáková (1,2), P. Vašková (1), J. Janeček (1), E. Bártová (3), V. Trávníčková (3), J. Marková (3)

(1) Katedra biologie, Pedagogická fakulta Masarykovy Univerzity, Poříčí Brno

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

(3) Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno

V České republice se často neprovádí PCR analýzy orgánů malých savců na přítomnost *Borrelia burgdorferi* sensu lato, proto bylo cílem této práce detekovat zoonotický mikroorganismus *B. burgdorferi* s.l. ve tkáních malých savců a zároveň u nich zjistit prevalenci protilátek proti *B. burgdorferi* s.l. a *Leptospira interrogans* s.l.. V roce 2016 bylo odchyceno v různých lokalitách České republiky celkem 223 malých savců, z toho 218 hlodavců a 5 hmyzožravců patřících do 7 druhů. K detekci protilátek proti *B. burgdorferi* s.l. v séru nebo výplachu srdce byla použita enzymová imunoanalýza a k detekci protilátek proti *L. interrogans* byl použit modifikovaný aglutinační test. K přímému průkazu *B. burgdorferi* s.l. ve vybraných tkáních zvířat byla použita PCR. Protilátky IgM proti *B. burgdorferi* s.l. byly zjištěny u 23 % sér a 31 % výplachů srdcí a protilátky IgG u 3 % sér a 9 % výplachů srdcí. Protilátky proti *L. interrogans* byly zjištěny u 8 % výplachů srdcí. *B. burgdorferi* s.l. byla pomocí PCR detekována u 35 % vzorků. Zjištěná prevalence protilátek proti *B. burgdorferi* s.l. je statisticky vyšší, než v r. 2014, ale neliší se od roku 2017, avšak alarmující je vysoké procento pozitivních vzorků na PCR. Zároveň se jedná o první kompletní PCR analýzu vzorků malých savců odchycených během celého roku. I když byla prevalence protilátek proti *L. interrogans* s.l. mnohem nižší, než u *Borrelia burgdorferi* s.l. , neměla by se tato problematika opomíjet, neboť je evidentní, že *L. interrogans* s.l. v daných lokalitách prostřednictvím malých savců koluje.

## **P 08.**

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

M. Madleňáková (1,2), P. Shankaran (1), V. Hájková (1,2), D. Jilich (3), L. Machala (3), P. Martásek (2), Z. Mělková (1,2)

(1) Department of Immunology and Microbiology, 1<sup>st</sup> 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

Current antiretroviral therapy can suppress HIV-1 infection to undetectable levels of plasma viremia, but integrated HIV-1 genomes that encode replication competent virus persist in highly stable reservoir of latently infected cells. This latent HIV-1 reservoir represents a major barrier to HIV-1 cure. Currently, there are substantial ongoing efforts to identify therapeutic approaches that would eliminate or reduce the size of latent HIV-1 reservoir. Current strategies towards HIV-1 cure involve namely attempts to reactivate and purge HIV-1 latently infected cells.

Our laboratory has demonstrated that Normosang (Heme arginate, Orphan Europe), a human heme containing compound used to treat acute porphyria, could strongly potentiate reactivation of latent HIV-1 induced by PKC inducers in cell lines, while it inhibited HIV-1 replication in acute infection through its effect on reverse transcription. The stimulatory effects of Normosang involve a heme/iron-mediated Fenton reaction resulting in the increased redox stress which leads to latent HIV-1 reactivation.

To confirm our original hypothesis that Normosang could be used as a latency reversing agent (LRA) in human, we have administered Normosang to HIV+ subjects on cART including integrase inhibitor. Here we describe in vivo effects of Normosang on reactivation of the latent HIV-1 at specific time-points after its administration, using quantitation of cell-associated HIV-1 RNA in PBMCs of HIV+ subjects by means of 2-step semi-nested RT-qPCR. To characterize the effects of Normosang on the size of HIV-1 latent reservoir, we determined the percentage of CD32+ T-cells by flow cytometry since CD32a was described as a marker of cells harboring latent HIV-1.

Since the current strategies for latent HIV-1 reactivation do not seem to affect the size of the latent pool, it is important to search for new latency reversing agents and their combinations. Our work defines a new redox-based approach towards HIV-1 latency reversal in vivo and could provide a basis for new therapeutic approaches to HIV cure.

## **P 09.**

### **Diversity and enzymatic activities of soil yeasts associated with fruit trees**

H. Dudášová (1), M. Balaščáková (1), R. Vadkertiová (1)

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

Diversity of yeasts present in soil differ according to the flora and fauna above ground as well as to the climate and type of soil. Determination of enzymatic activities and the relation with diversity among soil adjacent to five different fruit trees can provide an important information about the most enzymatically active yeasts and yeasts consortia in soil, maintaining ecology, properties, fertility, and health of the soil.

The main objective of this study was to determine extracellular enzymatic activities among yeasts isolated from soil adjacent to fruit trees and to find the relation to the local diversity. Enzymatic activities ( $\beta$ -glucosidase, carboxymethylcellulase, proteolytic, and lipolytic) were tested by screening methods on plates.

Ascomycetous and basidiomycetous yeasts were equally responsible for the  $\beta$ -glucosidase and amylolytic activities. Basidiomycetous yeasts were in charge concerning carboxymethylcellulase, proteolytic, and lipolytic activities.

#### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from the Slovak Research and Developmental Agency (APVV-0744-15).



## **P 10.**

### **Sekundárna bakteriálna infekcia myší baktériami *Streptococcus pneumoniae* primárne infikovaných vírusom chrípky typu A**

M. Vozárová (1), K. Tomčíková (1), J. Hollý (1), E. Varečková (1), F. Kostolanský (1)

(1) Virologický ústav, Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava, SK

Bakteriálne koinfekcie sú zodpovedné za vyššiu mieru morbidít a mortality počas šírenia chrípky. Chrípková infekcia narúša funkciu imunitného systému hostiteľa, čo dáva priestor rozvoju bakteriálnych koinfekcií. Baktérie kolonizujúce sliznicu hornej časti dýchacích ciest sa šíria do nižších častí respiračného traktu a do pľúc. Závažnosť infekcie a pravdepodobnosť rozvinutia pneumónie zahŕňa niekoľko vlastností hostiteľa a patogénov (vírusový a bakteriálny kmeň, veľkosť inokula, imunitný systém hostiteľa, čas medzi expozíciou vírusom a baktériami). V našej práci sme sledovali rozvoj sekundárnych infekcií baktériami rodu *Streptococcus pneumoniae* u primárne infikovaných myší vírusom chrípky typu A vzhľadom na rôzne infekčné dávky vírusu a baktérií a rôzne časové rozpätie medzi primárnou a sekundárnou infekciou.

Laboratórne zvieratá okrem kontrolných skupín S2 až S6 infikovaných len streptokokmi, boli infikované vírusom chrípky typu A, A/Mississippi/1/1985(H3N2). Skupinám V1, A1 až A6 bola podaná vírusová infekčná dávka 0,1 LD<sub>50</sub> a skupinám V2, B1 až B6 vírusová infekčná dávka 0,5 LD<sub>50</sub>. Skupinám A1 až A3 a B1 až B3 na tretí deň a skupinám A4 až A6 na siedmy deň po infekcii vírusom chrípky bola podaná bakteriálna suspenzia *Streptococcus pneumoniae*. Skupiny B4 až B6 nemohli byť sekundárne infikované vzhľadom na zlý zdravotný stav myší.

U jednotlivých skupín myší bol sledovaný rozvoj sekundárnej bakteriálnej infekcie v dvadsaťštyri hodinových časových intervaloch prostredníctvom metódy *in vivo bioimaging*. Metódou *in vivo bioimaging* môžeme u zvierat s rozvinutou bakteriálnou infekciou nami používaným kmeňom *Streptococcus pneumoniae* A66.1, serotype 3, Tn4001 luxABCDE(Km<sup>r</sup>), pozorovať a merať hladiny bioluminiscencie tohto bakteriálneho kmeňa bez usmrtenia zvierat. Po sekundárnej infekcii sa u myší začal rýchly rozvoj ochorenia. Väčšina myší od rozvoja bioluminiscenčného signálu uhynula do 24 až 48 hodín. Skupiny sekundárne infikované na siedmy deň po infekcii vírusom chrípky vykazovali kratšiu dobu prežívania v porovnaní so skupinami infikovanými na tretí deň, čo môže súvisieť s väčším rozsahom poškodenia pľúc vírusom chrípky u týchto zvierat.

Bakteriálny kmeň bol poskytnutý darom od Dr. McCullers. Táto práca bola podporená grantmi: VEGA 2/0106/17, VEGA 2/0146/15, VEGA 2/055/18.

## **P 11.**

### **Fragmentácia protilátky izotypu IgG1 špecifickej voči HA2 gp vírusu chrípky**

K.Tomčíková (1), M. Vozárová (1), M. Fogelová (1), F. Kostolanský (1), E. Varečková (1)

(1) Virologický ústav, Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, SK

Vírusy chrípky typu A (IAV) patria medzi najlepšie preštudované vírusy, avšak i napriek tomu doteraz neexistuje efektívna ochrana voči tomuto ochoreniu. Profylaxiu predstavuje očkovanie, ktorého cieľom je indukovať tvorbu protektívnych protilátok namierených voči povrchovým proteínom IAV. My sme ukázali, že 3 zo štyroch monoklonových protilátok (MAb) rozpoznávajúcích 4 rôzne antigénne miesta na HA2 glykoproteíne majú protektívny účinok voči letálnej IAV infekcii myší. Avšak po podaní jednej zo študovaných MAbs, bolo opakovane zaznamenané zhoršenie IAV infekcie. Preto nás zaujímal mechanizmus účinku týchto anti-HA2 MAbs na chrípkovú infekciu. Z MAb IgG1 sme enzymatickým štiepením pomocou ficínu odstránili Fc fragment, aby sme mohli diferencovať príspevok Ag väzbovej aktivity Ab od efektorovej funkcie Fc fragmentu. Ficín sa ukázal ako najefektívnejšia proteáza na štiepenie myšacích protilátok IgG1 izotypu.

10mg IgG1 v PBS bolo dialyzovaných oproti 50mM Tris/2mM EDTA (pH7) 6hod. pri 4°C. Po dialýze bol pridaný ficín v pomere k MAb 1:30 (mg) a cysteín s výslednou koncentráciou 1mM. Štiepenie prebiehalo 4-5hod. pri 37°C a bolo zastavené pridaním N-etylmaleimidu. Vzorka bola dialyzovaná oproti glycínovému pufru (pH8,9). Na separáciu fragmentov bola použitá proteín A Sepharóza, ktorá viaže Fc oblasť Ab, takže je možné oddeliť F(ab)<sub>2</sub> fragmenty od celej IgG alebo Fc fragmentov.

V pilotnom experimente sme úspešne naštiepili HA2-špecifickú protilátku podtriedy IgG1 pomocou ficínu, čo bolo potvrdené PAGE analýzou. Antigén-väzbová aktivita bola preverovaná paralelne s purifikovaným antigénom metódou ELISA. Naše výsledky po matematickom vyhodnotení potvrdzujú zachovanie antigén väzbovej aktivity (Fab)<sub>2</sub> fragmentu protilátky.

Ukázali sme, že štiepením MAb IgG1 vzniká bivalentný fragment F(ab)<sub>2</sub> zachovávajúci si svoju antigén väzobnú aktivitu a Fc fragment zodpovedný za efektorovú funkciu protilátky. Získané (Fab)<sub>2</sub> fragmenty budú využité na štúdium úlohy paratop viažucej časti F(ab)<sub>2</sub> a Fc fragmentu HA2-špecifických protilátok počas vyriešenia infekcie IAV, resp. eliminácie IAV z pľúc infikovaných myší.

Podporené VEGA grantmi: 2/0146/15, 2/0106/17, 2/0055/18.

## P 12.

### Studium adsorpčních vlastností vybraných probiotických bakterií

E. Fryšová (1), K. Černá (1), E. Slaninová (1), S. Obruča (1), A. Chytilová (1)

(1) Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické, Brno, CZ

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podání v dostatečném množství přinášejí zdravotní výhody svému hostiteli. Jedním z hlavních kritérií účinného probiotického kmene je schopnost adsorpce na sliznici střev. Proto bylo hlavním cílem této práce optimalizovat metodu pro charakterizaci adsorpce na mucin u vybraných probiotických kmenů. Dále byly sledovány vlivy na tu adsorpci a také byly pomocí BATH testů a měření  $\zeta$ -potenciálu charakterizovány interakce podílející se na adsorpci. Vybranými probiotickými bakteriemi byly zástupci rodů *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Bacillus*. Tyto mikroorganismy byly kultivovány v MRS médiu a odebírány ve stacionární fázi růstu. Jako adsorbent byl použit roztok mucinu (z prasečího žaludku Typ II) a hexadekan (pro BATH testy). Adsorpce na mucin byla stanovena spektrofotometricky porovnáním absorbancí roztoku mucinu před a po inkubaci s probiotickými bakteriemi. Hydrofobicita bakterií byla určena porovnáním absorbancí buněčné suspenze před a po mísení s hexadekánem.

Po rozsáhlé optimalizaci byly stanoveny optimální podmínky, při kterých byla adsorpce na mucin u modelové bakterie *L. rhamnosus* CCM 1825 nejvýznamnější. Tyto podmínky byly poté aplikovány na ostatní vybrané probiotické kmeny. Výsledky ukázaly kmenovou specifitu adsorpce na mucin. Dále bylo prokázáno, že přítomnost mucinu při kultivaci mírně zvýšila procentuální adsorpci a ideální inkubační teplota byla 37 °C. BATH testy a měření  $\zeta$ -potenciálu potvrdily příspěvek hydrofobního efektu a elektrostatických sil při adsorpci. Čím větší byla hydrofobicita vybrané bakterie, tím nižší byl  $\zeta$ -potenciál. Získané výsledky představují kvalitní základ pro navazující studium adsorpčních vlastností probiotických bakterií.

### **P 13.**

## **Screening produkce biosurfaktantů u vybraných bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty**

I. Pernicová (1,2), O. Kratochvílová (1), D. Kučera (1,2), S. Obruča (1,2)

(1) Potravinářská chemie a biotechnologie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, CZ;

(2) Centrum materiálového výzkumu, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, CZ

Biosurfaktanty jsou povrchově aktivní látky produkované mikroorganismy. Oproti surfaktantům vyráběných z ropy jsou netoxické a hlavně biodegradabilní. K jejich produkci lze využít obnovitelné zdroje a potravinářské odpady. Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery, které jsou vhodnou náhradou petrochemických polymerů, jsou totiž plně biodegradabilní a biokompatibilní. Velkou výhodou spojení těchto dvou biotechnologických procesů je snížení nákladů kvůli dvěma produktům v rámci jedné produkce.

V rámci práce byly otestovány různé metody umožňující identifikovat bakteriální kmeny schopné produkce biosurfaktantů. Poté byla porovnána produkce biosurfaktantů v komplexním a minerálním médiu. Jako nejslibnější producenti byly vybrány bakterie *Pseudomonas putida* a přírodní izolát *Pseudomonas fulva*, u kterých bylo optimalizováno produkční médium přidávkem kvasničného autolyzátu a oleje. Pro extrakci biosurfaktantů bylo neprve vybráno vhodné rozpouštědlo a po jejich extrakci byly charakterizovány pomocí infračervené spektrometrie a tenkovrstvé chromatografie.

## P 14.

### **Inhibícia replikácie myšacieho herpetického vírusu 68 (MHV-68) v pľúcach BALB/c myši v dôsledku utlmenia expresie génu IFITM1 prostredníctvom siRNA**

K. Briestenská (1), H. A. M. Hussein (2), S. M. Akula (2), J. Mistríková (1, 3)

(1) Katedra mikrobiológie a virológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SK

(2) Department of Microbiology & Immunology, Brody School of Medicine at East Carolina University, Greenville, USA

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

Interferénom indukované transmembránové (IFITM) proteíny inhibujú vstup rôznych RNA vírusov do hostiteľskej bunky. Naproti tomu niektoré DNA vírusy sú odolné voči takejto inhibícii, pričom IFITM proteíny môžu dokonca zintenzívniť vírusovú infekciu. Najnovšie štúdie ukazujú, že zníženie expresie proteínu IFITM1 vedie k potlačeniu infekcie *in vitro* v prípade ľudských gamaherpesvírusov, ktoré sa vyznačujú onkogénnym potenciálom. Myšací herpetický vírus 68 (MHV-68), ktorý je prirodzeným patogénom drobných hlodavcov, je biologicky a geneticky príbuzný s ľudskými gamaherpesvírusmi. MHV-68 preto predstavuje celosvetovo uznávaný model pre štúdium imunologických, patogenetických a molekulárno-biologických aspektov gamaherpetickej infekcie v prirodzenom hostiteľovi.

Cieľom našej práce bolo otestovať vplyv utlmenia expresie génu IFITM1 na infekciu MHV-68 *in vivo*. BALB/c myšiam sme intravenózne aplikovali siRNA v 3 dávkach – 2 dni pred infikovaním, v deň infikovania a 2 dni po infikovaní myši. Myši sme infikovali MHV-68 intranazálne dávkou 20  $\mu$ l ( $2 \times 10^4$  PFU na myš). Myši sme humánne usmrtili 96 hodín po infekcii a odobrali sme im pľúca. Hladinu expresie génu IFITM1 a vírusových génov (ORF50 a ORF73) sme stanovili pomocou RT-qPCR. Na určenie výšky infekčného titra vírusu v homogenátoch pľúcneho tkaniva sme použili plakovú titráciu.

U myši, infikovaných MHV-68, ktorým bol aplikovaný fyziologický roztok (MHV-68 + PBS), bola expresia génu IFITM1 v pľúcach vyššia v porovnaní s neinfikovanými myšami. V dôsledku aplikácie siRNA u infikovaných myši došlo k poklesu expresie génu IFITM1, pričom hladina expresie bola takmer identická ako u neinfikovaných myši. V prípade infikovaných myši, ktorým bola aplikovaná siRNA (MHV-68 + siRNA), titer vírusu v pľúcach klesol na približne 21 % v porovnaní so skupinou myši MHV-68 + PBS (100 %). V skupine myši MHV-68 + siRNA došlo tiež k významnému poklesu expresie vírusových génov.

Podarilo sa nám dosiahnuť zníženie expresie génu IFITM1 *in vivo* prostredníctvom siRNA. Znížená expresia génu IFITM1 viedla k inhibícii replikácie MHV-68 v pľúcach BALB/c myši. Tieto výsledky naznačujú, že proteín IFITM1 by mohol byť zahrnutý v špecifickej dráhe, esenciálnej pre replikáciu gamaherpesvírusov.

Práca vznikla s finančnou podporou grantu VEGA 1/0617/15 a grantu UK/224/2018.

## **P 15.**

### **The effect of bile on biofilm matrix of *Listeria monocytogenes***

M. Boháčová (1), E. Semradová (1), J. Pazlarová (1)

(1) Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology Prague, Prague, CZ

*Listeria monocytogenes* is biofilm forming microorganism capable of survival in the wide range of conditions. Even a high bile salt concentration with antimicrobial activity did not prevent its biofilm growth in the gallbladder. The biofilm formation and the ability to attach to abiotic surfaces or biotic surfaces is facilitated by extracellular polymeric substances, the biofilm matrix. The matrix contributes to the resilience of the microorganism to stress conditions, potentially including bile. Therefore, we aimed to assess the effect of bile on biofilm formation and each matrix component. The biofilm formation of 10 strains was evaluated with and without the presence of bile. The abundance of the matrix components was evaluated with and without the application of bile using spectrophotometry. All experiments were performed at least in three independent replicates and evaluated statistically. The biofilm treated with bile was visualized by confocal laser scanning microscopy. The ability of strains to form a biofilm increased in the presence of bile ( $p < 0.001$ ). The preliminary tests revealed that the amount of proteins was similar in both treatments. Surprisingly, the overall eDNA content was higher after the application of bile. The information about the proportion of biofilm matrix components could expand the understanding matrix functions in the presence of bile.

Acknowledgements: Financial support from the Czech Science foundation GAČR 17-15936S is gratefully acknowledged.

## **P 16.**

### **Identifikace bakterií v probiotických kosmetických výrobcích**

D. Romanovská (1), Š. Trachtová (1), A. Hároniková, (1)

(1) Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické, Brno, CZ

V poslední době jsme svědky stále narůstajícího zájmu o kvalitní kosmetické výrobky, mezi něž se řadí také speciální kosmetické výrobky s obsahem probiotik. Rozličné rostlinné matrice a probiotické bakterie jsou přidávány do kosmetických výrobků především za účelem zlepšení jejich účinku na pokožku. Nicméně neexistuje legislativní regulace limitující množství a formu přidaných probiotických bakterií, které by mělo mít benefiční účinky pro spotřebitele. Genetický materiál (DNA) těchto přidaných bakterií by měl být detekovatelný sensitivními molekulárně-diagnostickými metodami a samotné bakterie by měly být přítomny ve vitální formě.

V této práci byla provedena optimalizace kultivační metody probiotických bakterií obsažených ve vybraných kosmetických výrobcích s obsahem probiotik. Z takto získaných bakterií a přímo z výrobků byla následně izolována DNA (fenolová extrakce, magnetické nosiče) a analyzována pomocí PCR. Dále byly provedeny kultivační testy pro ověření schopnosti přežití vybraných bakterií rodu *Lactobacillus* v přítomnosti konzervačních látek.

Izolovaná DNA byla ve vhodné kvalitě pro amplifikaci v PCR specifické pro rod *Lactobacillus* a pro probiotické druhy. Kultivační testy na modelových organismech prokázaly odolnost těchto bakterií vůči konzervačním látkám obsaženým v kosmetických výrobcích.

Práce byla zaměřena na analýzu bakterií a bakteriální DNA v probiotických kosmetických výrobcích. Mikrobiologickými metodami bylo prokázáno, že živé bakterie rodu *Lactobacillus* jsou přítomny ve všech výrobcích, a že jsou schopny přežít v přítomnosti konzervačních látek.

Tato práce byla podpořena projektem specifického výzkumu MŠMT ČR, FCH-S-17-4695.

## P 17.

### **Autochtónne kmene *Saccharomyces cerevisiae* izolované z *Vitis vinifera* v Českej a Slovenskej republike**

K. Ďurčanská (1), T. Drtilová, (1), L. Muchová (1), P. Olejníková (2), K. Ženišová (3), K. Furdíková (1)

(1) Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Bratislava, SK

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

(3) Odbor mikrobiológie, molekulárnej biológie a biotechnológií, Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, SK

Z enologického hľadiska sú kvasinky dôležitým faktorom, ktorý ovplyvňuje výslednú kvalitu vína. Zachovať autenticitu a originálny pôvod vína možno využitím riadenej fermentácie pomocou autochtónnych čistých kultúr *Saccharomyces cerevisiae*. V našej práci sme sa zamerali na kvasinky izolované v 7 vinohradníckych oblastiach Českej a Slovenskej republiky. Ako zdroj pre izoláciu boli použité plody *Vitis vinifera* 12 odrôd. Prvý krát boli pre izoláciu použité novovyšľachtené odrody – Devín, Pálava, Muškát moravský a Dunaj. Kmene boli izolované pomocou mikromanipulátora s pneumatickým mikroinjektorom. Izolované kvasinky boli identifikované pomocou konvenčných taxonomických metód, ktoré sme porovnali s dvomi modernými metódami – sekvenácia ITS regiónov a MALDI-TOF MS. Všetky kmene sú súčasťou zbierky mikroorganizmov na Fakulte chemickej a potravinárskej technológie STU v Bratislave. Jednotlivé kmene boli selektované na základe ich enologických vlastností. Všetky kmene vykazovali nízku tendenciu produkcie sulfánu, uspokojujivý spôsob rastu v kvapalnom médiu a fermentačnú silu. Selekcia prebehla na základe vhodnej  $\beta$ -glukozidázovej aktivity, vyššej osmo- a etanolotolerancie a nízkej produkcie prchavých kyselín. Na základe tejto selekcie bolo zvolených 17 kmeňov, z toho 6 (konkrétne kmene PAC34, PAE58, PAG63, DUH135, PAH48 a DEH53) bolo izolovaných z novovyšľachtených odrôd. Autochtónne kmene kvasiniek v podobe čistej kultúry sú pre moderné vinárstvo cestou, ktorá dokáže zabezpečiť apelačnú originalitu vína a zároveň zachová jeho vysokú kvalitu.

Práca bola podporená grantami APVV-15-0333, VEGA 1/0063/18 a ITMS 26230120006.



## **P 18.**

### **Izolácia a charakterizácia katalytických vlastností tioglukozidázy z vláknitých húb z rodu *Trichoderma***

H. Galádová (1), M. Šimkovič (1)

(1) Ústav biochémie a mikrobiológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského 9, 81237 Bratislava, Slovenská republika.

$\beta$ -tioglukozid glukohydroláza (myrozináza) katalyzuje štiepenie tioéterovej väzby v glukozinolátoch. V závislosti od reakčných podmienok výsledkom štiepenia glukozinolátov je D-glukóza a celý rad degradačných produktov (tiokyanáty, izotiokyanáty, epitionitrily atď.). Rastliny z čeľade kapustovitých (*Brassica oleracea* var. *italica*, *Brassica napus*, *Brassica juncea* a iné), ktoré sú majoritným zdrojom myrozináz a glukozinolátov, ich využívajú ako ochranný štít pred inváziou rôznych patogénov. Tieto látky majú antimikrobiálne účinky, pôsobia odpudzujúco na hmyz a mnohé slúžia ako allelochemikálie. Navyše, medicínsky výskum odhalil, že izotiokyanáty inhibujú proliferáciu a indukujú apoptózu nádorových buniek. Existencia tioglukozidáz sa potvrdila aj v rôznych mikroorganizmoch, vrátane húb z rodu *Aspergillus* a *Fusarium*. Hoci úloha myrozináz u húb nie je uspokojivo vysvetlená, predstavujú zaujímavý alternatívny zdroj týchto enzýmov.

Predbežné pokusy s homogenátmi vegetatívneho mycélia *Trichoderma reesei* a *Trichoderma atroviride* naznačili, na základe stanovenia enzýmovej aktivity so sinigrínom, prítomnosť tioglukozidázovej aktivity. Hlavným cieľom predloženej štúdie je návrh postupu izolácie enzýmu s tioglukozidázovou aktivitou, založený na využití viacerých chromatografických princípov. Súčasťou štúdie je aj charakterizácia katalytických vlastností izolovaného enzýmu.

*Táto práca vznikla s podporou projektov APVV-16-0439 a ITMS 26240220071.*

## **P 19.**

### **Klinické príznaky neuroboreliózy a ich potvrdenie diagnostickými testami**

M. Scherková (1), J. Špajdelová (1), M. Chren (2)

(1) Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce Trnavská univerzita v Trnave, Trnava, SK

(2) Fakultná nemocnica Trenčín, Trenčín, SK

Úvod: Lymfská neuroborelióza je najčastejším prejavom neskorého diseminovaného štádia Lymfkej boreliózy v Európe. Prejavuje sa postihnutím centrálného a/alebo periférneho nervového systému. Patologický proces môže byť lokalizovaný kdekoľvek, čo predstavuje rozsiahlu a komplexnú symptomatológiu tejto choroby. Pravdepodobnosť, že sa vyvinie i samotné klinické prejavy závisia od typu borelie, ktorým bol jedinec infikovaný, od zemepisnej polohy či ročného obdobia.

Metodika: Sledovaná skupina bola tvorená 10 pacientami, ktorí boli hospitalizovaní pre podozrenie z infekcie nervového systému. Na základe vyšetrení sa zistili klinické symptómy nasvedčujúce na štádium včasnej diseminovanej infekcie, akútnu neuroboreliózu.

Výsledky: Neuroborelióza bola potvrdená jednoznačne iba u štyroch pacientov a to na základe klinických príznakov a zároveň aj diagnostickými testami analýzou séra a likvoru aj u pacientov s negatívnou epidemiologickou anamnézou. Z diagnostických testov bola u každého vykonaná súčasná analýza séra a likvoru, s výpočtom pre určenie intratekálnej syntézy protilátok, taktiež cytológia likvoru. V dvoch prípadoch bolo vykonané aj sérologické vyšetrenie metódou ELISA s pozitívnym výsledkom na anti *Borrelia burgdorferi* protilátky typu IgM a IgG. Kultivačné ani mikroskopické vyšetrenie sa u vybranej skupiny nevykonávalo.

Záver: V prípade podozrenia na neuroboreliózu na základe klinických príznakov, volíme vyšetrenie cerebrospinálnej tekutiny, séra, syntézu intratekálnych protilátok a zápalových parametrov likvoru. PCR a kultivácia patria k hlavným vyšetrovacím metódam a volíme ich v skorých štádiách ochorenia. Avšak kultivácia nepatrí k rutinným diagnostickým metódam pre určovanie diagnózy Lymfkej neuroboreliózy, vzhľadom na dlhú inkubačnú dobu, relatívne nízku citlivosť a náročnosť borelií na kultivačné médiá. Do budúcnosti sa uvažuje vyšetrenie i koncentrácie chemokínov CXCL13 v likvore, ktoré sú výrazne zvýšené u pacientov s Lymfskou neuroboreliózou na rozdiel od zdravých kontrol či pacientov s iným ochorením nervového systému.

## P 20.

### Pertussis v rokoch 2011-2015 na Slovensku

P. Kondulová (1), J. Špajdelová (1)

(1) Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnavská univerzita v Trnave, Trnava, SK

**Úvod:** Čierny kašeľ je celosvetové infekčné ochorenie zapríčinené baktériami *Bordetella pertussis* a *Bordetella parapertussis*. Čierny kašeľ nepatrí výlučne medzi detské ochorenia. U novorodencov a dojčiat má dramatický priebeh, ale ten môže byť veľmi závažný aj u starších detí, dospievajúcich a starých ľudí. Prejavuje sa typickým záchvatovitým kašľom trvajúcim aj niekoľko týždňov a dlhodobou rekonvalescenciou. Ochorenie býva sprevádzané mnohými komplikáciami, ako krvácaním do viečok, pneumóniou, otitis media acuta ale aj encefalitídou.

**Metodika:** K vyhodnoteniu epidemiologickej situácie na Slovensku sme využili Epidemiologický informačný systém (EPIS), ktorý je súčasťou Úradu verejného zdravotníctva Slovenskej republiky (ÚVZ SR).

**Výsledky:** V sledovanom období sme sa zamerali na 6 oblastí, ktoré sme si jednotlivo charakterizovali. V rokoch 2011 - 2015 bolo ochorením čierneho kašľa nakazených 4497 pacientov. Najvyšší výskyt ochorenia bol v roku 2014 a najnižší výskyt v roku 2015. Ochorením čierneho kašľa bolo viac postihnutých žien ako mužov. Baktéria, ktorá spôsobila viac prípadov ochorenia bola práve *Bordetella pertussis* (94,51%) a menšej miere *Bordetella parapertussis* (5,23%) alebo iné druhy bordetiel (0,27%). Zamerali sme sa aj na výskyt ochorenia v 11 skupinách vekových kategórií, kde sme potvrdili, že v posledných rokoch sa infekcia posúva zo skupiny dojčiat a kojencov do skupiny 15- až 19-ročných. Zamerali sme sa aj na analýzu pacientov z hľadiska očkovanosti, kde väčší podiel nakazených *Bordetella pertussis* boli práve očkovaní pacienti, neočkovaní boli v zastúpení 11,19%. Exitus bol zaznamenaný v rokoch 2011-2015 u 2 osôb (0,04%).

**Záver:** Čierny kašeľ sa v súčasnosti opäť dostáva do popredia záujmu lekárov vzhľadom na jeho celosvetovo stúpajúcu incidenciu. V posledných rokoch sa najvyšší výskyt ochorenia zaznamenáva vo vekovej skupine 15 – 19 rokov. To kladie dôraz na ďalšie analýzy epidemiologických údajov a z toho vyplývajúce nastavenie nárokov na rutinnú diagnostiku pri výskyte klinických symptómov pripomínajúcich pertussis aj do vekových skupín, kde nebyvalo toto ochorenie typické, resp. aj u očkovaných pacientov proti tomuto ochoreniu.

## **P 21.**

### **Celogenómové sekvenovanie ako metóda na výber štartovacích kultúr na výrobu bryndze**

B. Szalaiová (1), V. Kadličeková (1), A. Lichvariková (1), T. Szemes (2), H. Drahovská (1), T. Kuchta (3)

(1) Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, SK,

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

(3) Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, SK

Slovenská bryndza je tradičný slovenský syr vyrábaný zo surového ovčieho mlieka. K typickým organoleptickým vlastnostiam bryndze prispieva mikroflóra mliečneho kysnutia, pozostávajúcej najmä z baktérií *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp. a kvasiniek *Galactomyces* spp., *Kluyveromyces* spp., *Debaryomyces* spp. a iných. Nepasterizované ovčie mlieko však predstavuje ideálne prostredie pre množenie patogénnych kmeňov baktérií. Z hľadiska bezpečnosti potravín je potrebné ovčie mlieko najprv pasterizovať a následne pridať vybranú štartovaciu kultúru. V práci sa venujeme analýze genómov dvadsaťjeden kmeňov baktérií mliečneho kvasenia pochádzajúcich z bryndze vyrobenej zo surového ovčieho mlieka. Získané sekvencie sme anotovali v programe Rast. Využitím programu K-mer finder sme určili druhové zaradenie a potvrdili prítomnosť druhov *Leuconostoc mesenteroides* (n=3), *Leu. pseudomesenteroides* (n=1), *Lactobacillus fermentum* (n=2), *Lac. plantarum* (n=5), *Lac. paraplantarum* (n=1), *Lac. brevis* (n=2), *Lac. casei* (n=1), *Lac. paracasei* (n=3), *Lactococcus lactis* (n=1) a *Enterococcus faecium* (n=2). V práci sme sa ďalej zamerali na prítomnosť profágov a génov bakteriocínov. V genóme kmeňov sa nachádzalo jeden až šesť profágových oblastí, väčšinou identifikovaných ako nefunkčné a nekompletné profágy. Potvrdili sme, že kmene sú citlivé na antibiotiká a nekódujú faktory virulencie. Komparatívnou analýzou genómov skúmaných kmeňov, ktoré sú potenciálne aplikovateľné ako štartovacie kultúry pri výrobe bryndze sme prispeli k ich podrobnej charakterizácii aj z hľadiska bezpečnosti potravín.

#### **Pod'akovanie**

Príspevok je výsledkom realizácie projektu APVV-14-0025

## **P 22.**

### **Analýza tvorby biofilmu u klinických izolátov *Cronobacter* spp. a využitie bakteriofágov na jeho elimináciu**

V. Kadličeková (1), M. Kajsík (2), M. Madurkay (1), H. Drahovská (1)

(1) Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra molekulárnej biológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, nikabel23@gmail.com

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

Rod *Cronobacter* zahŕňa Gram-negatívne, fakultatívne anaeróbne oportunistické patogény čeľade *Enterobacteriaceae*, ktoré môžu vyvolať závažné infekcie u novorodencov. Vyznačujú sa odolnosťou voči rôznym stresovým faktorom vonkajšieho prostredia, pričom u izolátov sa pomerne často objavuje produkcia polysacharidovej kapsuly, ktorá je asociovaná so schopnosťou tvorby biofilmu. Eliminácia rozvinutého biofilmu je následne veľmi problematická vzhľadom k vysokej tolerancii na teplotu, čistiace prostriedky a dezinfekčné činidlá. Baktérie sú tak schopné perzistovať na rôznych povrchoch, kde tvoria rezervoáry novej kontaminácie prostredia a potravín s následným zvýšeným rizikom infekcie u ľudí.

Cieľom predkladanej práce bolo stanoviť schopnosť tvorby biofilmu u klinických izolátov *Cronobacter* spp., ktoré perzistujú v Univerzitnej nemocnici v Bratislave a otestovať antibakteriálny a antibiofilmový potenciál *Cronobacter*- špecifických bakteriofágov. Tvorbu biofilmu sme testovali u troch vybraných klinických izolátov: *C. sakazakii* KMB-203 (CS O:1; ST8), KMB-204 (CS O:2; ST4) a *C. malonicus* KMB-211 (CMA O:2; ST7). Zistili sme, že kmene KMB-204 a KMB-211 sú silní producenti biofilmu, zatiaľ čo kmeň KMB-203 biofilm produkuje slabšie. Následne sme analyzovali antibakteriálny a antibiofilmový potenciál štyroch bakteriofágov: Pet-CM3-4, Dev-CS-701, Dev-CT-57, Dev-CD-23 a koktailu pozostávajúceho z týchto fágov. Pri počiatkovej koncentrácii fágov  $10^6$  PFU/ml sme zaznamenali čiastočné potlačenie rastu a tvorby biofilmu v prípade fága Pet-CM3-4 a Dev-CS-701, zatiaľ čo pri použití koktailu sme sledovali u všetkých analyzovaných kmeňov pokles rastu o 50-70% a tvorba biofilmu klesla v rovnakej miere u izolátov KMB-204 a KMB-211. U kmeňa KMB-203 sme vzhľadom k jeho nízkej schopnosti tvoriť biofilm nezaznamenali výrazné zmeny po pridaní fágových preparátov. Po zvýšení koncentrácie fágov na  $10^8$  PFU/ml sme sledovali výrazný pokles rastu a tvorby biofilmu v prípade fága Pet-CM3-4 a Dev-CS-701, zatiaľ čo použitím koktailu sme zaznamenali u všetkých kmeňov pokles rastu na úroveň kontroly a rovnako tak biofilm bol u všetkých izolátov eradikovaný na úroveň kontroly.

Získané poznatky naznačujú veľký potenciál budúceho využitia bakteriofágov pri eliminácii baktérií produkujúcich biofilm.

#### **Pod'akovanie**

Príspevok je výsledkom realizácie projektu APVV-16-0168.

## P 23.

### Molekulárno-biologická analýza klinických kmeňov *Streptococcus agalactiae*

A. Lichvariková (1), B. Szalaiová (1), H. Drahovská (1)

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

*Streptococcus agalactiae* (streptokok skupiny B, GBS) je oportunistický patogén, ktorý kolonizuje gastrointestinálny a urogenitálny trakt zdravých jedincov. Táto gram-pozitívna,  $\beta$ -hemolytická baktéria je hlavnou príčinou život ohrozujúcich infekcií novorodencov, pričom medzi klinické prejavy patrí zápal pľúc, sepsa ako aj meningitída. GBS infikuje aj dospelých, ohrození sú predovšetkým starší a imunodeficientní jedinci. *S. agalactiae* vo svojom genóme kóduje mnoho virulencných faktorov, ktoré sú rozhodujúce pre vznik infekcie. Medzi najvýznamnejšie patrí polysacharidová kapsula, na základe ktorej je možné baktérie *S. agalactiae* rozdeliť do desiatich sérotypov. Ich zastúpenie v populácii je v rámci geografickej polohy odlišné. V tejto práci sme sa zamerali na molekulárnu charakterizáciu klinických kmeňov *S. agalactiae*. Pripravili sme zbierku obsahujúcu 62 kmeňov GBS izolovaných z biologických vzoriek moču, výteru z pošvy alebo uretry. Molekulárna identifikácia sérotypov preukázala, že najčastejším bol sérotyp V (52 %), nasledoval sérotyp III (19 %), sérotyp Ia (18 %), sérotyp Ib (4 %) a najmenej zastúpenými boli sérotypy IV (2 %) a VII (2 %). Na stanovenie klonálnej príbuznosti kmeňov sme použili metódu MLST, ktorá na základe sekvencie lokusov *adhP*, *pheS*, a *atr* preukázala vysokú klonalitu kmeňov zaradených do sérotypu V. V rámci práce sme identifikovali povrchové proteíny, ktoré prispievajú k virulencii kmeňov. Najviac zastúpeným bol Alp 2/3 proteín (58 %), Rib proteín (21 %), Epsilon proteín (13 %) a najmenej zastúpený bol Alpha C proteín (8 %). K patogenite jednolivých kmeňov prispievajú aj profágy inkorporované v genóme *S. agalactiae*. Na identifikáciu profágov sme využili *in silico* analýzu celogenómových sekvencií piatich vybraných izolátov. Celogenómové skevenovanie sme uskutočnili využitím Nextera knižníc na sekvenátore MiSeq (Illumina). Využitím viacerých bioinformatických nástrojov sme identifikovali 16 profágov s dĺžkou pohybujúcou sa v rozsahu 9-41 kbp. Na základe komparatívnej analýzy sme získané profágy rozdelili do deviatich skupín. Molekulárna charakterizácia kmeňov *S. agalactiae* je dôležitá, nakoľko genetické vlastnosti kmeňov závisia od geografickej polohy a umožňujú študovať gény virulencie ako aj demonštrovať evolučné vzťahy.

#### Pod'akovanie

Príspevok je výsledkom realizácie projektu (ITMS 26240120027) podporeného OPVaV financovaného ERDF a projektu APVV-16-0168.

## P 24.

### Sledovanie výskytu antibiotickej rezistencie pre epidemiologické účely vo FN Trnava.

J.Prnová (1,2,3), J. Brňová (2,3,4), L. Micháliková (3,4,5), M. Dzurianinová (5), A. Strehárová (1), L. Mačeková (5)

- (1) Katedra verejného zdravotníctva, FZaSP TU, SK
- (2) Oddelenie nemocničnej hygieny a epidemiológie, FN Trnava,SK
- (3) Centrum mikrobiológie, nemocničnej hygieny a prevencie infekcií, FZaSP TU, SK
- (4) Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve, FZaSP TU, SK
- (5) AnalytX, spol. s.r.o., Oddelenie laboratórnej medicíny, SK

Úvod: Dostupnosť informácií o miestnom stave rezistencie je v súčasnosti nevyhnutným predpokladom pre efektívne používanie antibiotík tzv. antibiotic stewardship, ale aj pre potreby aplikácie účinných protiepidemických opatrení. Veľká časť zdravotníckych zariadení nemá vlastné mikrobiologické pracovisko a spolupráca nemocnice s externým mikrobiologickým pracoviskom nie je vždy optimálna. Pre epidemiologické účely je dôležité poznať výskyt rezistencie u konkrétnej populácie pacientov a vedieť identifikovať incidenciu a prevalenciu epidemiologicky rizikových kmeňov.

Metodika: V spolupráci s laboratóriom AnalytX, spol. s.r.o. sme analyzovali výskyt antimikrobiálnej rezistencie u baktérií s klinicky a epidemiologicky významnými mechanizmami rezistencie, vo Fakultnej nemocnici Trnava za rok 2017, využitím dát a záznamov z mikrobiologického informačného systému. Za sledované patogény sme si zvolili *Stafylococcus aureus* rezistentný na meticilín, resp. oxacilín, *Stafylococcus aureus* rezistentný na vankomycín, *Enterococcus spp.* rezistentný na vankomycín, *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.* a *Pseudomonas aeruginosa* rezistentné na meropeném. Ako denominátor sme si zvolili počet pacientov. Dáta boli analyzované podľa typu odberu, pričom zaradené boli vzorky moču, spúta/BAL, rán, hemokultúr.

Výsledky: Celkovo sme identifikovali 18,7% pacientov s MRSA. Len u 19 pacientov (2%) bol prítomný kmeň VRE. *Acinetobacter spp.* rezistentných na meropeném sa vyskytol u 25,2% pacientov a *Pseudomonas spp.* bolo meropeném rezistentných 25,3%. Meropeném rezistentná *Klebsiella spp.* bola detekovaná len u 12 pacientoch (1%). Vancomycín rezistentný *Stafylococcus aureus* a meropeném rezistentná *Escherichia coli* predstavovali nulový výskyt.

Záver: Systematické zhromažďovanie údajov o vývoji antibiotickej rezistencie je kľúčovým prvkom kontroly jej vzniku a šírenia. V špecifickom kontexte monitorovania rezistencie pre epidemiologické účely je dôležité sledovať antibiotickú rezistenciu nie len tradičným hodnotením rezistencie v populácii baktérií, ale aj v populácii pacientov.

## P 25.

### Zastúpenie mikroorganizmov pri degradácii polymérov PLA/PHB v pôde

L. Jeszeová (1), Z. Kisová (1), D. Pangallo (1)

(1) Ústav molekulárnej biológie, Slovenská Akadémia Vied, Slovensko

Analyzované boli mikrobiálne spoločenstvá, ktoré sú zodpovedné za biodegradáciu polymérov v simulovaných pôdnych podmienkach. Použité boli rôzne fólie zložené z kyseliny polymliečnej (PLA) a polyhydroxybutyrátu (PHB). Pred vložением fólie na jeden rok do pôdy/perlitu boli: a.) vystavené 90 dní UV žiareniu, b.) vystavené 90 dní slnečnému žiareniu, c.) neošetrené. Mikrobióm týchto fólií bol porovnaný s celulóзовou fóliou, ktorá bola uchovaná v rovnakých podmienkach v pôde.

Na analýzu a identifikáciu zastúpenia mikroorganizmov v pôde na začiatku (v čase 0) a na konci experimentu (po vybrání troch fólií zložených z PLA/PHB a jednej celulóзовej fólie) boli použité kultivačne-závislé a kultivačne-nezávislé (DGGE) prístupy. Taktiež boli testované biodegradačné schopnosti izolovaných mikroorganizmov na agarových pôdach obsahujúcich polyméry PLA, PHB, PLA/PHB a celulózu.

Baktérie izolované v čase 0 boli zastúpené hlavne rodmi *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter* a *Pseudomonas*, kým z húb prevládali izoláty z rodov *Phialophora*, *Penicillium* a *Cladosporium*. DGGE klonovanie v čase 0 detegovalo mikrobiálne spoločenstvá úplne odlišné od kultivačnej stratégie. Medzi najviac izolované mikroorganizmy patrí *Fusarium* zo všetkých troch fólií vykazujúci vysokú degradačnú aktivitu polymérov.

V porovnaní s ostatnými fóliami bolo pri celulóзовej fólii detegované odlišné bakteriálne zastúpenie. Najviac sa vyskytujúce izoláty patrili do rodov *Bacillus*, *Streptomyces*, *Arthrobacter* a *Rhodococcus*, vykazujúce zaujímavé degradačné schopnosti.

Kultivačne-nezávislá analýza vykazovala výrazné rozdiely medzi mikroorganizmami identifikovanými v čase 0 a po jednom roku. Najväčšia variabilita medzi vzorkami bola v bakteriálnej komunite. Tento experiment umožnil dokázať rozdiely v mikrobióме fólií a tiež boli identifikované viaceré druhy mikroorganizmov schopné degradácie testovanej polymérnej fólie.

#### Podakovanie

Táto štúdia bola podporená projektom Agentúry pre výskum a vývoj APVV-15-0528 „Modifikované polyméry z obnoviteľných zdrojov a ich degradácia“.



## Seznam prvních autorů:

Prezentující autor	Číslo stránky	Prezentující autor	Číslo stránky
Beinhauerová Monika	26	Lichvariková A.	85
Beinhauerová Martina	55	Loupancová K.	53
Bino E.	23	Madleňáková M.	70
Bírová K.	20	Mališová L.	34
Boháčová M.	77	Medved'ová A.	14
Briestenská K.	76	Micháliková L.	21
Brlicová L.	27	Muchová P.	45
Drtilová T.	31	Němec M.	56
Dudášová H.	71	Nováková Michaela	25
Dvořák P.	15	Nováková Markéta	61
Ďurčanská K.	79	Pagáč T.	28
Ďurišová K.	52	Palušková V.	59
Fiedorová	16	Pernicová I.	75
Fryšová E.	74	Peštová J.	33
Galádová H.	32	Prnová J.	86
Galádová H.	80	Rebrošová K.	66
Gičová A.	68	Romanovská D.	78
Hnilicová S.	41	Scherková M.	81
Horváthová H.	58	Siváková A.	46
Hrala M.	42	Skleničková K.	49
Hrdý J.	54	Slaný O.	57
Hubenáková Z.	39	Stachurová T.	37
Huvarová V.	50	Studená A.	19
Chuchmová V.	44	Szalaiová B.	83
Jamborová I.	13	Šefranková M.	17
Janák M.	62	Šimončicová j.	29
Jeszeová L.	87	Šimonyiová D.	67
Ježíková Z.	38	Švejstil R.	30
Kadličeková V.	84	Tomáščíková Z.	47
Kandričáková A.	63	Tomčíková K.	73
Kašpárková N.	24	Trojánek M.	22
Kondulová P.	82	Vacek L.	51
Kristeková D.	40	Vaverková K.	36
Krištofová L.	48	Vozárová M.	72
Kroneislová G.	18	Závora J.	35
Lászlová K.	65	Znamínko M.	60
Lenhartová S.	64	Žákovská A.	69
Lépesová K.	43		

**Poznámky:**

**Poznámky:**

**Poznámky:**

**Tomáškovy dny 2018**  
**XXVII. konference mladých mikrobiologů**

Mgr. Lukáš Vacek (ed.)

Vydala Masarykova univerzita,  
Žerotínovo nám. 617/9, 601 77 Brno  
1. vydání, 2018  
Tisk: Tribun EU s.r.o., Cejl 892/32, 602 00 Brno

ISBN 978-80-210-8963-1

**muni**  
**PRESS**

ISBN 978-80-210-8963-1



9 788021 089631