

XXIX. konference mladých mikrobiologů

# TOMÁŠKOVY DNY 2020



Masarykova  
univerzita

XXIX. konference mladých mikrobiologů

# TOMÁŠKOVY DNY 2020



Masarykova univerzita  
Brno 2020

**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

© 2020 Masarykova univerzita  
ISBN 978-80-210-9611-0



# Objevte modularitu nového systému BD Phoenix™ M50

Poznejte, jak může být kombinován systém BD Phoenix M50 s dalšími BD řešeními mikrobiologických modulů za účelem zlepšení:

- přesné detekce přirozené a získané rezistence,
- adaptace na různé organizační systémy a na změny v činnosti laboratoře,
- urychlení reportovaných výsledků identifikace / ATB citlivosti,
- zvýšení efektivity laboratoře.



Při zvýšení počtu vyšetřovaných vzorků může být testovací kapacita snadno rozšířena z 50 na 100 panelů.

Systém BD Phoenix M50 v kombinaci s hemokultivačním systémem BD BACTEC FX™ představuje účinné a dostupné řešení pro hemokultury a testování

identifikace / ATB citlivosti pro mikrobiologické laboratoře.

Integrace systému BD Bruker™ MALDI Biotyper™ s přístrojem BD Phoenix M50 pomocí rozhraní BD EpiCenter™ pro rychlou a přesnou identifikaci a detekci rezistence.

Becton Dickinson Czechia, s.r.o.  
Křenova 438/1, 162 00 Praha 6, Česká republika

[bd.com](http://bd.com)

© 2019 BD. BD and the BD Logo are trademarks of Becton, Dickinson and Company.



## Tomáškovy dny 2020 – ústní sdělení

**01. Elektrochemická charakterizace interakce mezi oligonukleotidy specifickými pro DNA viru afrického moru prasat a CdTe kvantovými tečkami**

D. Banáš, S. Salmistraro, M. Krzyžánková, B. Hosnedlová, R. Kizek

**02. Inženýrství *Pseudomonas putida* pro ko-utilizaci a zužitkování celobiózy s glukózou**

D. Bujdoš, P. Dvořák

**03. Potential of technological yeast strains for commercial beta-glucan production using the low-cost medium**

L. Fidrich, M. Němec, M. Brožová D. Matoulková

**04. Metody kultivace striktních anaerobů**

N. Hanišáková, M. Vítězová

**05. Charakterizace nového druhu stafylokokového bakteriofága čeledi *Podoviridae***

J. Havránková, T. Botka, M. Benešik, P. Bárdy, R. Pantůček

**06. Exploration of Low-Temperature Plasma Applications in Reduction of Chemical Fungicide Treatment**

L. Hoppanová, V. Medvecká, J. Dylíková, D. Hudecová, B. Kaliňáková, S. Kryštofová, A. Zahoranová

**07. Changes in germination and metabolome of *Trichoderma* sp. conidia depending on their age**

L. Hoppanová, M. Kaliňák, S. Kryštofová

**08. Optimalizace PCR-DGGE pro analýzu orální mikrobioty**

V. Chuchmová, M. Krsek

**09. Molekulární detekce *Rickettsia* sp. a *Anaplasma* sp. u volně žijících zvířat z pěti provincií v Jihoafrické republice**

N. Kašpárková, E. Bártová, A. Halajian

**10. *Cutibacterium acnes* – běžná flóra nebo oportunní patogen?**

G. Kroneislová, D. Balíková

**11. Výskyt, štúdium a možnosti redukcie vybraných baktérií rezistentných voči antibiotikám v kaloch a vodách z čistiarní odpadových vôd**

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

**12. *Trichostrongylus* sp. jako původce gastrointestinálních obtíží**

J. Peštová, V. Skála

**13. Ekologické podmínky pro aktivitu a pozitivitu klíšťat na patogeny na Uherskobrodsku**

J. Petráš

**14. Regulatory overlap of sigma A and sigma B factors in response to chemostress in *Corynebacterium glutamicum***

A. Rapoport, H. Dostálová, M. Pátek

**15. Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice**

K. Skulinová, J. Novák, M. Kašný, L. Kolářová

**16. Vliv antibiotika ampicilinu na tvorbu biofilmu u rezistentních bakteriálních kmenů z odpadních vod**

T. Stachurová, K. Malachová

**17. Monitoring aktivity a pozitivitu klíšťat *Ixodes ricinus* v lokalitě Brno-Pisárky v roce 2019**

L. Šmídová

**18. Jak se vyrovnat s pandemií COVID-19? Zkušenosti s vyšetřováním detekce SARS-CoV-2 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze.**

J. Závora

## Tomáškovy dny 2020 – postery

**P 01. Gut microbiome of the healthy individual is remarkably stable within nine months**

Ľ. Ambro, R. Link, A. Kamlárová, M. Novotný, G. Beke, A. Bomba

**P 02. Development of inconspicuous motor impairment during murine chronic cerebral toxocariasis**

N. Bernardová, M. Chanová

**P 03. Porovnanie výsledkov stanovenia avidity IgG protilátok a IgM protilátok metódami ECLIA (Cobas) a EIA (TEST-LINE) v diagnostike toxoplazmózy**

K. Bírová, F. Ondriska, V. Boldiš, J. Špajdelová

**P 04. Genomic properties of new transducing phages and mobile genetic elements of *Staphylococcus epidermidis***

T. Botka, L. Fišarová, P. Bárdy, M. Benešík, I. Mašlaňová, R. Pantůček, J. Doškař

**P 05. Neobvyklý prípad kryptokokózy u imunosuprimovaného pacienta**

L. Cibulková, N. Mallátová, A. Kuchařová, H. Prokschová, P. Břicháčková

**P 06. Využitie cobas® Liat® System v diagnostike chrípky**

M. Dubinová, M. Straka, A. Longauerová, A. Krajčíková, J. Predný, V. Cucak, M. Novotný, K. Vlčková, A. Liptáková

**P 07. Phenotypic characterization of new *Staphylococcus epidermidis* phages able to transfer plasmids and genomic islands**

L. Fišarová, T. Botka, P. Bárdy, M. Benešík, I. Mašlaňová, J. Doškař

**P 08. Vliv extraktů *Mellissa officinalis* a *Malaleuca alterfolia* na vybrané bakterie**

T. Gyönyör, L. Černohorská

**P 09. Nekrotizující fasciitida způsobená atypickým mořským patogenem**

M. Hladík, B. Lipový, R. Mager, F. Raška, M. Hanslianová, J. Blažek, H. Křemečková, I. Suchánek

**P 10. Hledání nových repelentů proti klíšťatům**

R. Horáková, H. Nejezchlebová, D. Novák, A. Žákovská, M. Budíková, I. Horová

**P 11. Identifikácia klinických izolátov *Clostridioides difficile* použitím metód molekulárnej biológie**

V. Janošcová (1), J. Kuzma (1)

**P 12. Aminokyselinové substituce v izotypech genu  $\beta$ -tubulinu parazitických helmintů *Fasciola hepatica* a *Haemonchus contortus* vedoucí ke vzniku anthelmintické rezistence**

T. Janošíková, L. Škorpíková, J. Vorel, M. Kašný

**P 13. Characterization of silver nanoparticles synthesized from *Artemisia absinthium***

D. Kabanov, A. Voyshel, K. Sehnal, D. Banáš, B. Ruttikay-Nedecký, B. Hosnedova, P. Králík, R. Kizek

**P 14. Study of the gut microbiota in patients with ulcerative colitis**

A. Kamlárová, Ľ. Ambro, R. Link, A. Bomba

**P 15. Analýza spoločného vplyvu teploty a osmotického stresu na rast potravinársky relevantnej mikroskopickej huby *Geotrichum candidum***

M. Koňuchová, Ľ. Valík

**P 16. The photodynamic inactivation reduces prion infectivity in phthalocyanine treated prions bound to surface or in suspension**

M. Kostelanska, Z. Hanusova, K. Holada

**P 17. Bakterie rodu *Caldimonas* jako termofilní producenti polyhydroxyalkanoátů**

X. Kouřilová, I. Pernicová, I. Nováčková, S. Obruča

**P 18. Approaches of evolutionary engineering for adaptation of *Cupriavidus necator* H16 to biotechnologically relevant stressors**

I. Novackova, V. Chatrna, E. Slaninova, P. Sedlacek, O. Samek, S. Obruca

**P 19. Izolace termofilních bakterií schopných produkce polyhydroxyalkanoátů**

I. Pernicová, X. Kouřilová, I. Nováčková, P. Sedláček, S. Obruča

**P 20. Can we meet *Encephalitozoon* spp. in ZOO Brno?**

P. Pittermannová, V. Trávníčková, A. Žáková, E. Bártová

**P 21. Antibiofilmová aktivita nově připravených gallotaninů**

Š. Pospíšilová, J. Hricovíniová, Z. Hricovíniová, A. Čížek, J. Jampílek

**P 22. Zelenou syntézou připravené superparamagnetické nanočástice pro detekci viru Afrického moru prasat**

O. Rychlý, D. Banáš, S. Salmistraro, M. Kryžánková, B. Hosnedlová, A. Novotná, B. Nedecky, P. Králík, R. Kizek

**P 23. Intravitální diagnostika gastrointestinálních nematodóz a kvantifikácia ich pôvodcov v českých chovoch oviec**

S. Sajdánková, J. Vadlejch, M. Kašný, N. Reslová

**P 24. Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate in Cyanobacteria**

E. Slaninova, D. Cernayova, Z. Sedrlova, P. Sedlacek, J. Nebesarova, V. Krzyzanek, S. Obruca

**P 25. Příprava kalibrátora pre kvantifikáciu pregenomickej RNA vírusu hepatitídy B v sérach pacientov**

M. Straka, M. Dubinová, J. Predný, S. Rybecká, S. Javorníková, P. Kristián, S. Stuchlík, A. Liptáková

**P 26. Cyanobakterie produkující PHA aneb může „zasolení“ zvýšit produkci PHA?**

Z. Šedrlová, E. Slaninová, J. Drinka, I. Fritz, C. Daffert, P. Sedláček, S. Obruča

**P 27. Kvantifikácia rastu baktérií mliečneho kysnutia v prítomnosti *Geotrichum candidum* v mlieku**

P. Šipošová, M. Koňuchová, M. Trebichavská, A. Medved'ová



## 01. Elektrochemická charakterizace interakce mezi oligonukleotidy specifickými pro DNA viru afrického moru prasat a CdTe kvantovými tečkami

D. Banáš (1,2,4), S. Salmistraro (1,3), M. Krzyžánková (4), B. Hosnedlová (4), R. Kizek (1,4,5)

(1) Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o., Studentská 812/6, 625 00 Brno, Česko, EU

(2) Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kamenice 753/5, 625 00 Brno, Česko, EU

(3) University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50 - 40064 – Ozzano dell'Emilia – Bologna, Itálie, EU

(4) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Česko, EU

(5) Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česko, EU

**Úvod.** Výrazná míra globalizace a migrace lidské populace přispěla k zvýšenému riziku rychlejšího přenosu zoonoz a fytopatogenů bakteriálního a virálního původu, které se přenáší v nebo na lidech a produktech lidské výroby (kola automobilů, kamionů, oblečení apod.) Závažným patogenem je virus Afrického moru prasat (ASF), který způsobuje onemocnění projevující se mj. hemoragií a napadá divoká i domácí prasata (čeleď *Suidae*). Onemocnění je velice infekční, zatím neexistuje proti němu vakcína a má vážné socioekonomické důsledky (pokles produkce vepřového masa v Číně o 30 % v roce 2019). To je důvod pro hledání cest k uživatelsky příjemné, rychlé a spolehlivé detekci tohoto viru. Cílem práce bylo navrhnout biosenzor založený na oligonukleotidových (ODN) sondách značených CdTe kvantovými tečkami (CdTe QDs)

**Metodika.** Byla využita technika adsorpční přenosová voltametrie (AdTSV DPV, potenciálové okno 0 V po -1,7 V, modulační amplituda 25 mV, modulační čas 0,05 s, pulzní čas 0,025 s, intervalový čas 1 s) Metoda je založená na časově závislé akumulaci DNA/ODN na elektrodu. Pro ODN byla zkoumána závislost signálu proudu na koncentraci (0,4 až 1,7  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro ODN KING F a 0,1 až 0,6  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  pro ODN KING R), pro ASF PCR produkt (počáteční denaturace: 95 °C, 4 min, charakterizace cyklu: denaturace: 95 °C, 30 sec; annealing: 58 °C, 30 s; elongace: 72 °C, 1 min, počet cyklů: 35) v koncentraci 1 až 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**Výsledky.** V práci byla charakterizována interakce mezi ODN (KING F a KING R), ASF PCR produktem a QDs. Byly získány závislosti na koncentraci ODN ( $y = -1,91 + 40,54x$ ) pro KING F; ( $y = -2,32 + 132,06x$ ) pro KING R a ( $y = -4,79 + 7,13x$ ) pro ASF PCR produkt. Pro verifikaci časově závislé akumulace, byly ODN KING F a KING R akumulovány na elektrodu ( $t_A$  0 až 480 s). Pro interakční experiment byly zvoleny koncentrace ODN pro KING F 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  a pro KING R 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (koncentrace byly zvoleny jako střední koncentrace kalibračních křivek). V rámci interakčního experimentu byla realizována série opakovaných měření ( $n = 10$ ). Elektroda modifikovaná ODN byla následně modifikována podruhé pomocí CdTe QDs ( $t_A$  2 min). Elektrochemicky byl měřen signál  $\text{Cd}^{2+}$  a ODN. Na základě počtu molekul v nanášené kapce (10  $\mu\text{l}$ ) a molární hmotnosti jednotlivých ODN byla vypočítána odezva proudu, vztažená na počet molekul a čas (dále jako senzitivita). Nejlepší senzitivita byla vypočtena pro ASF PCR fragment (50 nA/amol molekul/min), následně KING R (25 nA/amol molekul/min) a KING F (14 nA/amol molekul/min). Při analýze ODN bez kvantových teček ( $t_A$  3 min) byly hodnoty proudu pro koncentrace 1  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  KING F a 0,3  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  KING R stanoveny na  $33 \pm 8$  nA pro KING F a  $22 \pm 3$  nA pro KING R. Při interakci ODN a 6  $\mu\text{M}$  CdTe QDs ( $t_A$  2 min) byly hodnoty proudu pro ODN stanovené na stanovené na  $15 \pm 8$  nA pro KING F a  $16 \pm 5$  nA pro KING R a pro  $\text{Cd}^{2+}$  CdTe QDs byly hodnoty proudu stanovené na  $61 \pm 15$  nA pro QDs navázané na KING F a  $89 \pm 18$  nA pro QDs navázané na KING R. Bylo statisticky prokázáno, že snížení signálu ODN KING F a KING R je způsobeno vazbou CdTe QDs ( $P = 0,00001$  pro KING F a  $P = 0,0066$  pro KING R).

**Závěr.** Interakce ODN a QDs byla potvrzena snížením CA ODN signálu KING F a KING R (změna struktury) a analýzou signálu  $\text{Cd}^{2+}$  QDs.

**Poděkování:** Tato studie byla podpořena Evropským programem Erasmus+ a projektem AMOR QK1920113.

## 02. Inženýrství *Pseudomonas putida* pro ko-utilizaci a zužitkování celobiózy s glukózou

D. Bujdoš (1), P. Dvořák (1)

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

### Úvod

Rekombinantní kmen biotechnologicky atraktivní bakterie *P. putida* KT2440 byl nedávno upraven technikami metabolického inženýrství pro růst na D-celobióze. D-celobióza je vedle D-glukózy jedním z hlavních produktů enzymatické hydrolyzy celulózy a může být bakterií využita pro tvorbu polyhydroxyalkanoátů – biopolymerů s vysokým aplikačním potenciálem. *P. putida* KT2440 však nedokáže oba substráty využít paralelně, což může limitovat jejich efektivní konverzi na polyhydroxyalkanoáty.

Cílem projektu tedy je (i) objasnit původ pozorované sekvenční utilizace, (ii) pomocí inženýrství transportních a metabolických drah navodit utilizaci glukózy a celobiózy, (iii) s využitím *in silico* modelů navrhnout možné strategie pro zvýšení výtěžku polyhydroxyalkanoátů.

Plasmidové vektory se sekvencemi mini-Tn5 transpozonů budou použity pro inženýrství transportních a metabolických drah. S jejich využitím je možné najít mutanta s optimální expresí daného genu.

Celogenomový metabolický model kmene KT2440 byl již vytvořen a nyní je pravidelně rozšiřován. Balíček COBRAPy pro programovací jazyk Python umožňuje tento model analyzovat a s využitím dalších bioinformatických nástrojů také predikovat strategie pro zlepšení vlastností „buněčné továrny“.

### Dosavadní výsledky

Několik mutantních kmenů *P. putida* EM42 (deriváty KT2440) byly kultivovány na celobióze a glukóze. Bylo zjištěno, že jeden konkrétní mutant,  $\Delta gcd$  (gen pro glukózadehydrogenázu), nevykazuje charakteristickou sekvenční utilizaci. Namísto toho využívá oba substráty současně. Tento výhodný znak však komplikuje skutečnost, že u kmene EM42  $\Delta gcd$  byla pozorována delší lag fáze a nižší růstové tempo.

Z následných experimentů vyplynulo, že neschopnost kmene KT2440 (resp. EM42) ko-utilizovat oba cukry je nejspíše dána inhibičními vlastnostmi D-glukono-1,5-laktonu a D-glukonátu. Oba metabolity vznikají pouze v buňkách s Gcd.

Navazující experimenty pak budou zaměřeny na vylepšení vlastností  $\Delta gcd$  mutantu a též na eliminaci pozorované sekvenční utilizace u parentálního kmene EM42.

Projekt je sponzorován Grantovou agenturou MU, ID: MUNI/C/1551/2019

### **03. Potential of technological yeast strains for commercial beta-glucan production using the low-cost medium**

L. Fidrich (1), M. Němec (1), M. Brožová (2) D. Matoulková (2)

(1) Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, CZ

(2) Department of Microbiology, Research Institute of Brewing and Malting, PLC, Lípová 15, 120 44 Prague, CZ

The highly represented polysaccharides in the yeast cell wall are beta-glucans. In comparison to other natural sources of beta-glucans, yeasts contain beta-1,3- and beta-1,6-glucan. Isolated beta-glucan has a wide range of characteristics for which is used in the production of food supplements, medical supplies and drugs. It has also antimicrobial and antitumor effects due to its ability to modulate the immune system and to regulate blood sugar or cholesterol level.

The aim of this study was the selection of technologically used yeast strain of the genus *Saccharomyces* and the optimization of cultivation conditions and beta-glucan production. Selection and optimization were carried out in the condition of submerged cultivation in liquid nutrient broth and were evaluated by the content of beta-glucan in a dry cell mass. Determination of beta-glucan was performed with the commercial enzymatic assay. Emphasis was also to use a low-cost medium for potential commercial production. Pilot cultivations in laboratory bioreactor were also performed. According to the acquired results, no significant impact of cultivation conditions and composition of growth medium for the beta-glucan production was observed. The greatest impact on beta-glucan production had the selection of the yeast strain.

## 04. Metody kultivace striktních anaerobů

N. Hanišáková (1), M. Vítězová (1)

(1) Oddělení mikrobiologie, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, CZ

Metanogenní archea jsou striktně anaerobní mikroorganismy, což komplikuje jejich izolaci, kultivaci a stanovování růstových parametrů. Tyto zajímavé organismy jsou na jednu stranu zodpovědné za přítomnost metanu v atmosféře, čímž přispívají ke globálnímu oteplování; na druhou stranu je třeba akcentovat jejich význam v biotechnologiích, zejména produkcí biometanu využitelného jako obnovitelného zdroje energie. Pro pochopení vazeb a interakcí těchto mikroorganismů v přírodě, stejně tak i pro izolaci a popsání nových druhů, je důležité aplikovat specifické techniky a postupy kultivace těchto unikátních mikroorganismů.

Základem kultivačních technik je redukované médium a bezkyslíkatá plynná fáze ve speciálních silnostěnných vialkách uzavřených butylovými septy nepropustnými pro plyny. Veškerá manipulace je prováděna pomocí jehel a injekčních stříkaček. Nezbytné pro práci jsou technické plyny  $N_2$ ,  $N_2/CO_2$  (4:1 v/v) a především  $H_2/CO_2$  (4:1 v/v). Poslední zmíněná směs plynů totiž slouží jako substrát pro hydrogenotrofní metanogenní archea. Rychlost růstu metanogenních mikroorganismů je v porovnání s bakteriálními zástupci mnohem nižší. Izolace jednotlivých kolonií je také omezena komplikovanou prací v anaerobní atmosféře.

Produkcí metanu těmito organismy lze využít pro stanovení aktivity jejich metabolismu. Dostupné metody využívají následujících principů. Jsou to měření změny tlaku v uzavřené vialce manometrem, měření složení plynné fáze ve vialce plynovým chromatografem nebo nepřímým stanovením produkce vody v průběhu metanogeneze. Měření optické hustoty běžně používané při práci s aerobními mikroorganismy totiž nelze vždy u metanogenů provést z důvodu tvorby agregátů buněk v médiu nebo interference sraženiny sulfidu v médiu.

Metody kultivace anaerobních mikroorganismů jsou odlišné od metod běžně používaných při kultivaci mikroorganismů v aerobním prostředí. Jejich aplikace však umožňuje zachycení mikroorganismů běžnými technikami nekultivovatelných a popis nových zástupců popsaných pouze na základě molekulárně biologických metod.

## 05. Charakterizace nového druhu stafylokokového bakteriofága čeledi *Podoviridae*

J. Havránková (1), T. Botka (1), M. Benešík (1, 2), P. Bárdy (1, 3), R. Pantůček (1)

(1) Laboratoř molekulární diagnostiky mikroorganismů, Ústav experimentální biologie, Masarykova Univerzita, Brno, CZ

(2) MB Pharma, Praha, CZ

(3) Centrum strukturní biologie, CEITEC, Brno, CZ

Rezistence bakterií rodu *Staphylococcus* vůči antibiotikům začíná být vážným celosvětovým problémem. Druh *Staphylococcus sciuri* je spíše komenzálním druhem, avšak jeho výskyt koreluje s výskytem některých onemocnění u člověka i hospodářských zvířat. Stejně jako jiné bakterie, je i tento druh hostitelem bakteriálních virů – bakteriofágů. Bakteriofágy z čeledi *Podoviridae* mají ikozahedrální hlavičku a nekontraktilní bičík. Cílem této práce bylo stanovení růstových vlastností a charakterizace nového podoviru KAC10 na úrovni genomu i proteomu.

Propagační bakteriální kmen byl taxonomicky zařazen pomocí sekvenace genů *16S rRNA* a *rpoB*. Růstové vlastnosti fága byly stanoveny pomocí adsorpční a růstové křivky. Proteom byl charakterizován metodami SDS-PAGE a LC-MS. Genom byl získán sekvenací na platformě Illumina, následně byl anotován a srovnán s fágovými genomy v databázi GenBank.

Genom fága KAC10 je unikátní. Nejvyšší shoda byla nalezena s fágem Pike, který vykazuje 80% identitu, avšak při pouhém 11% pokrytí sekvencí. Strukturní proteiny KAC10 a jejich relativní četnost byly porovnány s podovirem P68. Stejně typy proteinů měly, přes sekvenční odlišnosti, přibližně stejnou molekulovou hmotnost a v obou případech byl nejhojnější hlavní kapsidový protein. Propagační kmen nového bakteriofága byl zařazen ke druhu *S. sciuri*. Fág pomnožený na tomto kmeni dosahuje titru v řádu  $10^{10}$  PFU/ml. Při lyzi kmene na agaru tvoří KAC10 plaky o velikosti až 0,25 cm. Délka životního cyklu KAC10 je 20 min a fágový výnos se pohybuje mezi 122 a 163 PFU na jednu infikovanou buňku. Z 65 testovaných kmenů různých druhů rodu *Staphylococcus* a *Micrococcus* byl citlivý pouze jeden další kmen *S. sciuri* – P723. Tři kmene vykazovaly lyzi z vnějšku (1 kmen *S. sciuri* a 2 kmene *S. vitulinus*). Po opakované pasáži KAC10 na kmeni P723, se na tomto kmeni stonásobně zvýšil titr fága, přičemž na propagačním kmeni se nezměnil. Zároveň se ale po aplikaci na původní propagační kmen objevily i KAC10-rezistentní kolonie, které se původně nevyskytovaly.

Nově popsáný podovirus KAC10 má sice úzké spektrum hostitele, avšak svůj propagační kmen lyzuje velmi efektivně. Jeho lytické proteiny by proto mohly najít uplatnění ve fágové terapii.

Tato práce byla podpořena grantem Grantové agentury ČR (GA18-13064S) a grantem Fondu rozvoje Masarykovy univerzity (MUNI / FR / 1181/2018).

## 06. Exploration of Low-Temperature Plasma Applications in Reduction of Chemical Fungicide Treatment

L. Hoppanová (1), V. Medvecká (2), J. Dylíková (1), D. Hudecová (1), B. Kaliňáková (1), S. Kryštofová (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

In this study, we focused on the reduction of the chemical load in the environment using low-temperature plasma (LTP). Non-equilibrium cold diffuse macroscopically homogeneous LTP was generated by Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge. The LTP was used not only to inactivate seed-borne, phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum* on the surface of wheat but also to preserve the germination of barley seeds. The results showed that LTP treatment in the range of 120 – 300 s significantly inhibited the growth of *F. culmorum* on the surface of the seeds. The efficiency of LTP treatment was compared to traditional seed protection processes that used a sole chemical fungicide as well to plasma pre-treated seeds followed by the application of the chemical fungicide. When a combination of 60 s long LTP and 10% fungicide treatment was applied no growth of *F. culmorum* was observed. Not even after 5-day incubation. Better wettability of seeds with the chemical fungicide was likely related to change in seed surface that becomes hydrophilic after 10 s of LTP application. Short LTP exposure times did not cause germination reduction but improved the growth parameters of cereal seeds. The LTP application in the field is a promising way to stimulate and protect the seeds and simultaneously reduce the unwanted release of xenobiotics into the environment. The data presented in this study provide a good basis for field studies to verify the effect of proposed combinatory treatments.

### Funding

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency grant APVV-16-0216.

## **07. Changes in germination and metabolome of *Trichoderma* sp. conidia depending on their age**

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, Bratislava, SK

(2) Central Laboratories, Faculty of Mathematics, Physics and Informatics, Comenius University, Bratislava, SK

Secondary metabolism in filamentous fungi forms an extensive network of reactions that are constantly subjected to many studies. Although secondary metabolites in fungi are not essential for their survival it is greatly beneficial. The secondary metabolites aid the proper development, ensure communication, provide protection against external factors and to some extent provide a competitive advantage in their environment. A large group of secondary metabolites is represented by pigments that filamentous fungi produce in a wide range of colors. The production of these substances by chemical synthesis is time and money consuming, and several pigments prepared in such a way can demonstrate the toxic effect. Understanding and optimizing the production of pigments by filamentous fungi could, therefore, lead to a reduction in economic costs as well as the chemical burden on the environment.

In this study, we studied the effect of conidial pigment loss on germination and maturation of conidia. We used *Trichoderma atroviride* CCM F534 wild type and  $\Delta dabb$  (brown),  $\Delta mco$  (yellow) and  $\Delta pks4$  (white) strains disrupted in conidial pigment synthesis. We determined that 2-week-old conidia in all strains demonstrated the highest germination rates that gradually decreased as the cultures aged. The germination rates in mutants were dropping much faster than those observed in the wild type. The metabolomic analysis indicated that the osmolytes: trehalose and mannitol were involved in conidia maturation. To determine conidial metabolome, NMR spectroscopy was used. We also monitored the synthesis of trehalose and mannitol at the transcriptional level by determining changes in the expression of the *mpd* (mannitol), *tps1*, *tps2*, and *tre* (trehalose) genes.

### **Funding**

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency grant APVV-16-0216.

## 08. Optimalizace PCR-DGGE pro analýzu orální mikrobioty

V. Chuchmová (1), M. Krsek (1)

(1) Ústav ochrany a podpory zdraví, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Pro kvalitativní analýzu bakterií v dutině ústní se využívá široká škála molekulárních metod. Jednou z dnes již klasických metod využívanou především pro detekci změn ve složení mikrobioty je Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). Cílem této práce bylo optimalizovat postup PCR-DGGE pro bakterie z různých oblastí dutiny ústní člověka.

Pro účely srovnání byly zvoleny čtyři testované lokality v dutině ústní. Vzorky byly odebrány z jazyka, bukální sliznice a povrchu zubů (supragingivální zubní plak). Posledním vzorkem byla nestimulovaná slina. PCR byla provedena pro každý testovaný vzorek v několika variantách, a to pomocí tří komerčních kitů (Top-Bio Combi PPP Master Mix, Top-Bio Q-Taq DNA polymerase, OneTaq<sup>®</sup> Quick-Load<sup>®</sup>) a ručně připravených PCR směsí (master mix), které se lišily koncentracemi jednotlivých složek.

Srovnání získaných PCR-DGGE gelů poukazuje na rozdílnou účinnost PCR při použití komerčních kitů i mezi ručně připravenými master mix. U všech čtyř vzorků bylo dosaženo nejlepšího výsledku pomocí ručně připravených master mix, vhodná koncentrace chemikálií se však pro jednotlivé vzorky lišila. Komerční sady PCR vedly ve většině případů k horším výsledkům PCR-DGGE, výjimkou je pouze vzorek sliny, kde byl výsledek kitu Top-Bio Combi PPP Master Mix srovnatelný s ručně připraveným master mix.

Na základě provedeného výzkumu je možné dospět k závěru, že podmínky pro PCR-DGGE je nutné optimalizovat zvláště pro každou oblast dutiny ústní.

Tato práce byla podpořena projektem MUNI/A/1294/2019.

Korespondenční autor: V. Chuchmová  
Email: 394229@mail.muni.cz



## 09. Molekulární detekce *Rickettsia* sp. a *Anaplasma* sp. u volně žijících zvířat z pěti provincií v Jihoafrické republice

N. Kašpárková (1), E. Bártová (1), A. Halajian (2)

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

(2) Department of Biodiversity (Zoology), University of Limpopo, Sovenga, South Africa (SA)

Bakterie *Rickettsia* sp. a *Anaplasma* sp. způsobují u lidí i zvířat zoonotická onemocnění, která jsou přenášena převážně klíšťaty. Cílem práce byla detekce těchto dvou původců infekčních onemocnění v klíšťatech z Jihoafrické republiky (JAR).

Sběr klíšťat probíhal v letech 2012-2018 v pěti provinciích JAR (Limpopo, Mpumalanga, Free State, Northern Cape a North West). Klíšťata byla odebírána z uhynulých zvířat (nejčastěji následek srážky s autem), jednalo se např. o prase savanové, paviána čakma, hrocha obojživelného nebo zmiji útočnou. Celkem bylo odebráno 179 klíšťat (10 samic, 56 samců, 49 nymf a 64 larev), která byla rozdělena do 88 vzorků. Klíšťata byla druhově určena na Univerzitě Limpopo a následně byla poslána do ČR na Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat k molekulární detekci výše uvedených patogenů. K izolaci DNA z klíšťat byla použita komerční souprava (NucleoSpin™ Tissue). K detekci *Rickettsia* sp. byla použita single PCR k detekci genu *gltA* s použitím primerů CS 78 a CS 323. K detekci *Anaplasma* sp. byla použita nested PCR k detekci genu 16S rRNA s použitím sady čtyř primerů ge3a, ge10r, ge9f a ge2.

DNA bakterie *Rickettsia* sp. byla detekována u 32 vzorků (36%), zatímco *Anaplasma* sp. nebyla potvrzena v žádném vzorku. Prevalence *Rickettsia* sp. byla vyšší u samic (50%) oproti samcům (30%), u nymf to bylo 41% a u larev 63%. Nejvyšší prevalence *Rickettsia* sp. byla v provinciích Free State (50%), Mpumalanga (38%) a Limpopo (36%) a u klíšťat odebraných na podzim (50%) a v zimě (36%). Pozitivní vzorky budou zaslány k sekvenaci k přesné identifikaci.

Výsledky této práce přináší nové poznatky o prevalenci těchto dvou patogenů u klíšťat v pěti provinciích JAR. Tato data mohou být základem pro rozsáhlejší výzkum výskytu *Rickettsia* sp. a *Anaplasma* sp. v Jihoafrické republice.

Korespondenční autor: Telefon: +420 608 728 070; E-mail: [kasparkova.nicola@seznam.cz](mailto:kasparkova.nicola@seznam.cz)  
(N. Kašpárková)

## 10. *Cutibacterium acnes* – běžná flóra nebo oportunní patogen?

G. Kroneislová (1), D. Balíková (1)

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

### Úvod:

*Cutibacterium acnes* (dříve *Propionibacterium acnes*) je spolu s hormonálními změnami v pubertě příčinou akné. Ucpávání pórů mazových žlázek vede k tvorbě váčků, kde se množí *Cutibacterium acnes* a dochází přitom k dráždění epitelu a tvorbě zánětu. V literatuře je udávána druhotné infikování těchto lézí především stafylokoky, mikrokoky a kvasinkami. Léčba je možná dlouhodobějším podáváním perorálních antibiotik.

### Metodika:

V období 1. 4. 2019 - 1. 4. 2020 jsme zachytili *Cutibacterium acnes* u 20 pacientů ve stěrech z kůže (15 případů), akné (dva případy) a ran (tři případy). Výtěry byly standartně očkované na krevní agar s čarou (*Staphylococcus aureus* CNCTC 6719), na UriSelect 4, Sabouraudův agar a Schaedler agar s vitamínem K1. Dourčení bakterie bylo provedeno pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker).

### Výsledky:

Záchyt *Cutibacterium acnes* byl možný nejdříve za 48h resp. 72h pouze v anaerobní kultivaci na Schaedler agaru. *Cutibacterium acnes* roste v podobě drobných, bílých, specificky vypouklých kolonií. Nejčastější nález byl v směsi se stafylokoky koaguláza negativními, ve dvou případech byla aerobní kultivace negativní, ve dvou byl nález z primokultury *Staphylococcus aureus* a ve třech případech byl z anaerobní kultivace směsný nález. Citlivost byla stanovena k penicilinu, klindamycinu, tetracyklinu, k metronidazolu je přirozeně rezistentní.

### Závěr:

*Cutibacterium acnes* je oportunním patogenem při *acne vulgaris*, jeho záchyt ve stěrech kůže/akné je časově náročný. Pokud ale máme přílehou diagnózu, vyplatí se kultivaci prodloužit.

## 11. Výskyt, štúdium a možnosti redukcie vybraných baktérií rezistentných voči antibiotikám v kaloch a vodách z čistiarní odpadových vôd

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

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

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

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

K šíreniu baktérií rezistentných voči antibiotikám (ATB) do životného prostredia výrazne prispievajú odpadové vody (OV), obzvlášť tie pochádzajúce z nemocníc a zdravotníckych zariadení.

Cieľom našej práce bol monitoring výskytu rezistentných koliformných baktérií a enterokokov vo vzorkách OV a povrchových vôd, stabilizovaného kalu, kanalizačného biofilmu ako aj nemocničných odtokových vôd. Po izolácii a identifikácii rezistentných baktérií sme sa zamerali na ich charakterizáciu z hľadiska citlivosti na ATB a schopnosti tvorby biofilmu. Mechanizmy rezistencie ako produkcia širokospektrálnych  $\beta$ -laktamáz, karbapenemáz či nadprodukcia efluxných púmp (EP) sme u jednotlivých izolátov detegovali pomocou mikrobiologických a biochemických metód ako aj technikami molekulárnej biológie. Taktiež sme sa zamerali na stanovenie účinnosti vybraných technológií terciárneho čistenia OV z hľadiska eliminácie rezistentných baktérií.

Najvyššie počty baktérií rezistentných voči ATB sme detegovali v kanalizačnom biofilme na odtoku ČOV, v stabilizovanom kale a na odtoku zdravotníckych zariadení. Baktérie vykazujúce multirezistenciu (MDR) sme však zaznamenali aj vo väčšine vzoriek odtokových vôd a recipientov. Následne sme izolovali, identifikovali a charakterizovali rezistentné koliformné baktérie (257 izolátov) a enterokoky (76 izolátov). Najväčší počet izolátov koliformných baktérií sme identifikovali ako *Escherichia coli*. Viac ako polovica izolátov vykazovala MDR a väčšina sa radila medzi silných producentov bakteriálneho biofilmu. U veľkého počtu koliformných baktérií charakterizovaných nadprodukciami EP sme detegovali aj prítomnosť génov *tetA* a *tetE*. Produkcia širokospektrálnych  $\beta$ -laktamáz u izolátov koliformných baktérií bola kódovaná väčšinou génmi zo skupiny *bla<sub>TEM</sub>* a *bla<sub>CTX-M-8/25</sub>*. Najväčší počet enterokokov sme identifikovali ako *Enterococcus faecium*. Väčšina z nich bola schopná tvoriť biofilm so silnou intenzitou, vykazovala MDR charakter a zvýšenú produkciu EP. Rezistenciu voči vankomycínu kódovanú génom *vanA* sme zaznamenali u 77 % izolátov. Na redukcii počtu rezistentných koliformných baktérií v OV sme testovali inovatívne technológie, z ktorých najvyššiu účinnosť eliminácie sme zaznamenali po použití klasickej aj modifikovanej Fentónovej reakcie.

**Kľúčové slová:** odpadové vody; antibiotiká; širokospektrálne  $\beta$ -laktamázy; *E. coli*; biofilm.

## 12. *Trichostrongylus* sp. jako původce gastrointestinálních obtíží

J. Peštová (1), V. Skála (1,2)

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

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

*Trichostrongylus* sp. (Nematoda: Strongylida) patří mezi kosmopolitní parazitické hlístice, přičemž rozličné druhy těchto helmintů se vyskytují v gastrointestinálním traktu přežvýkavců, koní, ptáků, hlodavců, králíků, zajíců a dalších býložravců. Ve vzácných případech může být jejich hostitelem také člověk. Infekce člověka jsou hlášeny z různých částí světa. Nejvyšší pravděpodobnost nákazy je především v oblastech s nízkou úrovní hygieny a v zemědělských oblastech.

Definitivní hostitel se tímto parazitem nakazí požitím vody nebo zeleniny kontaminované filariformními larvami hlístice. Larvy poté migrují do tenkého střeva, kde dospívají a rozmnožují se. Vajíčka jsou z těla hostitele vyloučena ve stolici. Ve vnějším prostředí se z vajíček líhnou rhabditiformní larvy, jež se dvakrát svlékají a dávají tak po pěti až deseti dnech vývoje vzniknout infekčním filariformním larvám.

Infekce člověka parazitem *Trichostrongylus* sp. mívá zpravidla mírný průběh. Mezi běžné klinické příznaky patří bolest břicha, nauzea, průjem, nadýmání a únava. Nezřídka je nákaza provázena eosinofilií.

V prezentované kazuistice se jednalo o pacienta bez cestovatelské anamnézy s bolestmi břicha. Byla provedena hematologická, biochemická i mikrobiologická vyšetření, přičemž v parazitologické laboratoři bylo provedeno standardní parazitologické vyšetření stolice, jež zahrnuje Faustovu flotační metodu, tlustý nátěr dle Kató a zhotovení nativního preparátu. Mikroskopickým vyšetřením byla nalezena vajíčka helminta *Trichostrongylus* sp. V diferenciální diagnostice je nutné jejich odlišení od vajíček hlístic z čeledi Ancylostomatidae, se kterými mohou být vajíčka *Trichostrongylus* sp. pro podobnost zaměněna.

Tato kazuistika potvrzuje výskyt infekce *Trichostrongylus* sp. na území ČR, kde by se nadále měla brát v úvahu jako možný, byť vzácný, původce gastrointestinálních obtíží člověka.

Korespondující autor: Jitka Peštová, jitkapestova@gmail.com

### **13. Ekologické podmínky pro aktivitu a pozitivitu klíšťat na patogeny na Uherskobrodsku**

J. Petráš (1)

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

V rámci mapování výskytu klíšťat *Ixodes ricinus* a jejich promořenosti spirochetami z rodiny Bbsl na různých lokalitách byl vypracován terénní výzkum v chatové oblasti Uherský Brod - "Havřícké vinohrady". Tento výzkum je prováděn pod záštitou Oddělení fyziologie a imunologie živočichů PřF MUNI pod doc. RNDr. Alenou Žákovskou Ph.D. Tato lokalita se nachází u oblasti bývalé bažiny a je zde znám výskyt onemocnění Lymeská borrelióza. Sběr vzorků byl prováděn metodou vlajkování a byly také měřeny meteorologické veličiny pro případné pozorování korelací. Nasbíráno bylo celkem 1368 vzorků, jako kritický měsíc výskytu byl určen květen, kdy bylo při jednom sběru nalezeno 108 klíšťat za hodinu. Byla také nalezena korelace výskytu *Ixodes ricinus* s teplotou (s výjimkou letních měsíců) a promořenost klíšťat spirochetami Bbsl z března roku 2019 činila 5,95 %. Dle nasbíraných údajů a v porovnání s ostatními místy je tato lokalita zcela vhodná pro tento výzkum.

## 14. Regulatory overlap of sigma A and sigma B factors in response to chemostress in *Corynebacterium glutamicum*

A. Rapoport (1, 2), H. Dostálová (1), M. Pátek (1)

(1) Mikrobiologický ústav akademii věd, Praha, CZ;

(2) Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ

Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* is an important industrial producer of amino acids and other metabolites. Its genome encodes 7 sigma ( $\sigma$ ) subunits of RNA polymerase: primary factor  $\sigma$ A, primary-like  $\sigma$ B, and five alternative sigma factors,  $\sigma$ C,  $\sigma$ D,  $\sigma$ E,  $\sigma$ H and  $\sigma$ M (sigma factors with extracytoplasmic function). In response to toxic compounds, such as phenol, complex stress defense mechanisms involving several sigma factors are expected. In this work we attempt to study SigA- and SigB- dependent promoters of genes upregulated in response to chemostress caused by phenol. We hypothesize that sigma factor  $\sigma$ A and  $\sigma$ B are interchangeable in the exponential growth phase and that the genes of each regulon are transcribed from promoters of a single class.

First, phenol-upregulated genes were identified by RNA sequencing (ROSE) method, and the genes having typical *sigA* and *sigB* promoter sequences were chosen. Then, for the purpose of detailed promoter analysis, we developed methods, which can quickly and reliably assign sigma factor to particular promoters and, thus, respective genes. For this purpose, *in vivo* two-plasmid system was developed.

We identified 8 promoters upregulated on phenol which have similar *sigA* and *sigB* promoter region sequences (-35 and -10 regions). Among them,  $\sigma^A/\sigma^B$ - promiscuous promoters P2cg0378 and P2810 had upregulated SigA-dependent activity in exponential phase and increased SigB-dependent activity during the transition to the stationary phase of growth. P2cg1930, P1cg3338 had approximately the same signal in the presence of SigA and SigB in both growth phases. P1cg1930 and Pcg3330 showed mainly SigA-dependent activity in both growth phases. P2cg3338 showed mainly SigB-dependent activity in both growth phases. Pcg0291 did not show any strong signal.

Our results support the hypothesis that promiscuous promoters in *C. glutamicum* represent relatively frequent regulatory strategy enabling the organism to cope effectively with complex environmental stresses.

## 15. Séroprevalence larvální toxokarózy v České republice

K. Skulinová (1), J. Novák (1), M. Kašný (2), L. Kolářová (1,3)

(1) Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze, Praha, CZ

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

(3) Národní referenční laboratoř pro tkáňové helmintózy Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, Praha, CZ

Larvální toxokaróza je celosvětově rozšířené zoonotické onemocnění způsobené škrkavkami *Toxocara canis* a *T. cati*, parazity psů, koček a dalších šelem. Člověk se nejčastěji nakazí požitím infekčních vajíček obsahujících larvu třetího stadia. Parazit v těle člověka svůj vývoj nedokončí, zapouzdří se a perzistuje ve tkáni nebo orgánech až několik let. Onemocnění má širokou škálu klinických manifestací v závislosti na napadeném orgánu a imunologické odezvě organismu.

Séroprevalence larvální toxokarózy se celosvětově liší v závislosti na různých faktorech. V této studii přinášíme data o séroprevalenci larvální toxokarózy v České republice shromážděná Národní referenční laboratoří pro tkáňové helmintózy v letech 2011–2016.

Celkem bylo vyšetřeno 4 428 osob ve věku 4–75 let na přítomnost protilátek IgG proti exkrečně-sekrecnímu antigenu larev *T. canis* pomocí metody ELISA. Séropozitivita byla potvrzena u 160 osob, tj. 3.6 %. Rozdíly v séroprevalenci se lišily v jednotlivých krajích České republiky i v různých věkových kategoriích.

Ze závěrů naší studie lze vyvodit, že v porovnání s předchozími studiemi prováděnými v české populaci séroprevalence larvální toxokarózy na území České republiky výrazně poklesla. Dle dostupných údajů ze sousedních zemí je nízká séroprevalence v České republice nejvíce podobná situaci v Rakousku. Předkládaná data naší studie jsou porovnána, kromě sousedních, také s dalšími evropskými zeměmi.

Tato publikace vznikla za podpory Univerzity Karlovy [GA UK 902217, Progres Q25 and SVV 260369].

## 16. Vliv antibiotika ampicilinu na tvorbu biofilmu u rezistentních bakteriálních kmenů z odpadních vod

T. Stachurová (1), K. Malachová (1)

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

Čistírny odpadních vod (ČOV) patří k významným prostředím podílejícím se na šíření genů antibiotické rezistence (ARGs) a antibiotik do recipientu. Biofilm se řadí mezi významné rezervoáry ARGs. Studium antibioticky rezistentních bakterií (ARB) v odpadních vodách schopných tvořit biofilm přispěje k pochopení perzistence ARGs a následný možný přenos ARGs a ARB do životního prostředí. Naše studie monitorovala vliv antibiotika ampicilinu na rezistenci bakterií v biofilmu. Cílem bylo identifikovat ampicilin-rezistentní kmeny schopné tvořit biofilm a z hlediska kvantity porovnat tvorbu biofilmu rezistentními bakteriálními kmeny izolovanými z nitrifikační a sedimentační nádrže čistírny odpadních vod (ČOV) ústící do řeky Odry. Tato ČOV zahrnuje mechanické, biologické a chemické čištění odpadních vod a přítok sestává zejména z komunálních a průmyslových odpadních vod. Personální ekvivalent (PE) ČOV je 638 850 obyvatel. Kultivovatelné bakteriální kmeny rezistentní na ampicilin byly charakterizovány stanovením titru (CFU/ml), minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC). K hodnocení tvorby biofilmu byla použita metoda barvení krystalovou violetí. Byl také sledován vliv přítomnosti různých koncentrací ampicilinu na tvorbu biofilmu u rezistentních kmenů po 24h kultivaci při 37 °C. Izolované rezistentní bakteriální kmeny byly identifikovány pomocí Sangerovy sekvenace. Výsledky ukazují, že bakteriální kmeny z nitrifikační nádrže produkují biofilm s větší intenzitou, než kmeny ze sedimentační nádrže. U izolátů ze sedimentační nádrže byla ovšem zaznamenána zvýšená produkce biofilmu v přítomnosti ampicilinu v koncentračním rozmezí od 0,0625 až 0,125 mg/ml. Většina bakteriálních kmenů byla identifikována jako *Aeromonas* sp. Výsledky této studie ukázaly, že jedním z faktorů ovlivňujících tvorbu biofilmů v odpadní vodě v ČOV může být přítomnost ampicilinu v odpadní vodě v důsledku jeho nedostatečného odstranění během čistících procesů.

Poděkování: Studie byla podpořena SGS projektem Antibiotická rezistence v biofilmu odpadních vod, výzkum extrémní dlouhověkosti v živočišné říši a analýza syntetické dráhy opioidů u máku setého (ID: SGS01/PřF/2020).



## 17. Monitoring aktivity a pozitivita klíšťat *Ixodes ricinus* v lokalitě Brno-Pisárky v roce 2019

L. Šmídová (1)

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

Mapování výskytu klíšťat *Ixodes ricinus* a jejich promořenost spirochetami *Borrelia burgdorferi* sensu lato na různých lokalitách je již dlouhodobě součástí výzkumu výzkumné skupiny paní doc. RNDr. Aleny Žákové Ph.D. Tento výzkum je prováděn pod záštitou Oddělení fyziologie a imunologie živočichů PřF MUNI pod vedením doc. RNDr. Aleny Žákové Ph.D.

Lokalita v oblasti Brno - Pisárky je již dlouhodobým místem sběru a monitoringu klíšťat v Brně. Sběr vzorků byl prováděn metodou vlajkování a byly také měřeny některé meteorologické parametry jako je teplota a vlhkost ovzduší pro stanovení závislosti počtu odchycených klíšťat na těchto parametrech.

Nasbíráno bylo celkem 552 jedinců v různých stádiích. Kritickým měsícem byl vyhodnocen červen a to jak z hlediska největšího počtu klíšťat za měsíc, tak z hlediska nejvyššího počtu klíšťat za jeden sběr. Byla prokázána závislost mezi počtem odchycených klíšťat a teplotou v jarních a podzimních měsících. Závislost na vlhkosti se podařit neprokázalo. Zjišťovaná pozitivita klíšťat na promořenost patogenem Bbsl u 295 jedinců činí 6,6%.

## **18. Jak se vyrovnat s pandemií COVID-19? Zkušenosti s vyšetřováním detekce SARS-CoV-2 ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze.**

J. Závora (1) e-mail: jan.zavora@vfn.cz

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

Nová globální hrozba v podobě pandemie koronaviru SARS-CoV-2 se začala šířit v prosinci 2019 z Číny. Náhlá nutnost detekce tohoto viru z biologických materiálů velkého množství pacientů změnila běžnou praxi v mnoha, ne-li všech, laboratořích zabývajících se molekulární biologii. Mnoho laboratoří muselo zavádět úplně nové metody, či přizpůsobit workflow pro zpracování někdy i několika stovek vzorků denně.

Laboratoř pro diagnostiku septických stavů patřící pod Klinickou mikrobiologii ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze nyní zpracovává 100-200 vzorků denně. Ve svém příspěvku bych chtěl zmínit nesnáze týkající se laboratorního procesu, vyhodnocení výsledků či zpracování dat o COVID-19, se kterými jsme se setkali v průběhu několika měsíců testování detekce nového koronaviru.

Dále prezentuji případ 53letého pacienta hospitalizovaného ve Všeobecné fakultní nemocnici pro kritické respirační selhání při COVID-19 infekci s nutností ECMO. Na něm byl pacient umístěn 10 dní, poté pro výrazné zlepšení stavu bylo ECMO explantováno. Jedná se o prvního pacienta v České republice, kterému bylo podáno experimentální antivirotikum remdesivir.

V naší nemocnici byl pacient hospitalizován více jak měsíc, průběh jeho onemocnění byl těžký, ale docházelo k pomalému zlepšování. Nakonec byl pacient propuštěn kardiopulmonálně kompenzován do domácí péče.

## **P 01. Gut microbiome of the healthy individual is remarkably stable within nine months**

L. Ambro (1), R. Link (1), A. Kamlárová (1), M. Novotný (2), G. Beke (3), A. Bomba (1)

lubos.ambro@upjs.sk

(1) Institute of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Košice, SK

(2) Department of Infectiology and Travel Medicine, Louis Pasteur University Hospital, Košice, SK

(3) Institute of Molecular Biology, Slovak academy of Sciences, Bratislava, SK

The human gut microbiome plays an important role in health and various physiological processes of the host. It includes 500 – 1100 bacterial species and changes dynamically during the life. Multiple factors are known to affect composition of microbiome including diet, lifestyle and health status. The aim of this study was to assess the bacterial dynamics of the gut microbiome of a single individual (male, 34 years, non-smoker, w/o chronic or metabolic diseases, w/o specific diet, w/o antibiotics and probiotic supplementation) and thus contribute to a better understanding of its dynamics globally. In total, six stool samples were collected from March to November 2019. Total microbial DNA was extracted using QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) and analyzed using NGS (Illumina MiSeq) and PCR-DGGE. The analysis of NGS data was focused mainly on two dominant bacterial phyla – *Bacteroidetes* and *Firmicutes*. Overall, the structure of the gut microbiome has been shown to be very stable within the monitored period. Anaerobic bacterial species of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* represented 78 – 91 % of the total bacteria. The most stable genera and species composition was observed within the phylum *Bacteroidetes*, where bacterial species of the *Bacteroides*, *Parabacteroides*, *Alistipes* and *Barensiella* genera were most abundant (together they accounted for 53 – 62% of the gut microbiome). The greatest species diversity was, on the other hand, observed within the phylum *Firmicutes* with a clear dominance of polyphyletic group *Clostridiales*. In addition, the greatest dynamics of bacterial species was recorded within the phylum *Firmicutes*. These results suggest that gut microbiome tends to be very stable when no disturbing factors (e.g. changes in diet, acute or chronic disease, use of antibiotics) are present. Furthermore, different patterns in bacterial dynamics between two dominant phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* have been observed. More healthy individuals are scheduled for the study in order to draw significant conclusions.

This research was supported by APVV-16-0176, VEGA 1/0519/18 and MZ SR 2019/35-UPJŠ-6 grants.

## **P 02. Development of inconspicuous motor impairment during murine chronic cerebral toxocariasis**

N. Bernardová (1), M. Chanová (1)

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

Correspondent author: Nicol Bernardová; nicol.bernardova@lf1.cuni.cz

Positive prevalence of specific antibodies against *Toxocara canis*, intestinal parasite of canids, is high in population. Even though the recorded number of acute cases of cerebral toxocariasis (or neurotoxocariasis) - severe illness of human central nervous system (CNS) caused by infectious *T. canis* larvae is relatively low. Therefore, presence of larvae in human body is commonly considered to be asymptomatic. Despite these beliefs, some authors relate the long-term presence of larvae in CNS as agents causing development of chronic neurodegenerative and neuropsychiatric illnesses (*e.g.*: Alzheimer disease). On the other hand, within experimental murine infections by *Toxocara canis* larvae, development of some severe motor and neurological impairments (*e.g.*: loss of balance, stereotypical motion) was detected in the chronic phase of infection. This study aimed to focus on subtle motor changes during period of infection before development of severe motor impairments, its detection and classification.

Three groups of BALB/c mice (n = 55 mice in total) were infected by low (10 larvae *per mouse*), moderate (100 larvae *per mouse*) and high (1000 larvae *per mouse*) dose of *Toxocara canis* larvae from different sources (different cultures of larvae from different adult worms from different dogs). Mice were regularly examined by three motor tests - Turn-back test, Tail suspension test and Beam test. Examination continued until the late chronic phase of infection (week 97 *post infection*) and/or until development of severe changes.

As a result, development of an inconspicuous motor disorders, as turn-back failure, axial rotation, clasping and loss of balance were observed in all groups of mice in the chronic phase of infection. Time of occurrence of these impairments correlated with infection dose – the higher dose, the earlier occurrence (with exceptions). Furthermore, mice infected by different cultures of larvae showed variability in time of onset of motor impairment.

Our work proved that during seemingly asymptomatic phase of *Toxocara canis* infection develops inconspicuous impairment that escalate into severe consequences of infection.

*Acknowledgements: The work was supported by Charles University (SVV 260 369, Progress Q25).*

### **P 03. Porovnanie výsledkov stanovenia avidity IgG protilátok a IgM protilátok metódami ECLIA (Cobas) a EIA (TEST-LINE) v diagnostike toxoplazmózy**

K. Bírová (1), F. Ondriska (1,2), V. Boldiš (2), J. Špajdelová (1)

(1) Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnavská univerzita v Trnave, Trnava, Slovenská republika (2) Oddelenie parazitológie, Medirex a.s., Bratislava, Slovenská republika

Dôkaz IgM protilátok a avidity IgG protilátok sú jedny z kritických testov v diagnostike toxoplazmózy, najmä u rizikových skupín pacientov ako sú tehotné ženy a imunosuprimovaní pacienti, u ktorých falošná pozitivita testu môže viesť k diagnostickým rozpakom a závažným neobjektívnym rozhodnutiam ich ošetrovujúcich lekárov.

Za účelom objektivizácie výsledkov testov avidity IgG a dôkazu IgM protilátok sme porovnávali výsledky týchto testov získané metódou elektrochemiluminiscencie (ECLIA) vykonávanej na polyfunkčnom automate Cobas s výsledkami získanými metódou imunoenzýmového dôkazu (ELISA), ktoré sme testovali komerčnou súpravou TEST-LINE. Na komparáciu výsledkov meraní avidity IgG protilátok sme do porovnania zaradili 76 sér tehotných žien, z ktorých 22 malo akútnu toxoplazmózu a 54 latentnú toxoplazmózu avšak s nízkymi indexami avidity vyhodnotenými v teste ECLIA. Do porovnania výsledkov vyšetrení IgM protilátok sme zaradili séra 273 tehotných žien, z ktorých 9 bolo v štádiu akútnej toxoplazmózy a 264 v štádiu latentnej infekcie.

U akútnej toxoplazmózy sme zistili nízke indexy avidity IgG protilátok s obomi porovnávanými metódami. Diametrálne odlišná situácia bola v súbore 54 tehotných žien s latentnou toxoplazmózou. ECLIA testom boli vyhodnotené IgG protilátky s falošne nízkou aviditou až u 38 tehotných žien (70,3 %), u 7 žien vyhodnotil ECLIA test hranično-avidné IgG protilátky (13,0 %) a iba u 9 žien vysokoavidné IgG (16,7 %), ktoré boli v štádiu latentnej infekcie. Súprava TEST-LINE detegovala IgG protilátky s falošne nízkym indexom avidity iba u 4 žien (7,4 %) a hranično-avidné protilátky taktiež u 4 žien (7,4 %) s latentnou infekciou. Ostatných 46 žien (85,2 %) malo súpravou TEST-LINE vytestovanú vysokú aviditu IgG protilátok. V rámci porovnania IgM protilátok malo všetkých 9 pacientiek s akútnou toxoplazmózou zhodne pozitívne IgM protilátky v oboch testoch. Rozdiel bol opäť v súbore tehotných žien s latentnou infekciou, u ktorých vykázalo pozitivitu IgM protilátok 246 sér súpravou Cobas. Z týchto sér vykázalo falošnú pozitivitu aj 47 sér súpravou TEST-LINE (17,9 %), avšak u 217 (82,1 %) sér vyšetrených súpravou TEST-LINE sme zistili správne negatívny výsledok.

Výsledky porovnania vybraných sér tehotných žien s toxoplazmovou infekciou v rôznom štádiu aktivity jednoznačne potvrdili veľmi nízku špecifickosť súpravy ECLIA ako pri testovaní avidity IgG protilátok (17 %), tak aj pri testovaní IgM protilátok (7 %).

Štúdia bola podporená projektom KEGA č. č. 013TTU-4/2019.

## **P 04. Genomic properties of new transducing phages and mobile genetic elements of *Staphylococcus epidermidis***

T. Botka (1), L. Fišarová (1), P. Bárty (1,2), M. Benešik (1,3), I. Mašlaňová (1), R. Pantůček (1), J. Doškař (1)

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

(2) Centre for Structural Biology, Central European Institute of Technology, Brno, CZ

(3) MB Pharma, Prague, CZ

*Staphylococcus epidermidis* mobile genetic elements (MGE), including temperate phages and phage-inducible chromosomal islands (PICI), are still not well described. However, through the horizontal gene transfer, they determine properties such as antibiotic resistance and/or virulence to their hosts. Our work characterizes new bacteriophages able to transduce *S. epidermidis* PICIs and plasmids. Genomes of four temperate siphoviruses and their propagation strains were obtained using Oxford Nanopore and Illumina sequencing technology. Phage genomes were described and compared in detail. Differences found in otherwise conservative modules of morphogenesis and DNA packaging possibly played a role in frequency of PICI and plasmid transduction. Different PICIs localized in host genomes contain known and/or putative resistance genes as well as genes for helper phage virion assembly alteration. In portion of helper phage particles, noticeable changes in capsid morphology were observed. Our findings confirm the important role of transducing phages in the evolution of *S. epidermidis* strains and outline host mechanisms of phage infection disruption.

This work was supported by Grant of Czech Science Foundation (GA18-13064S) and Development Fund of Masaryk University MUNI/FR/1181/2018.

## P 05. Neobvyklý případ kryptokokózy u imunosuprimovaného pacienta

L. Cibulková (1), N. Mallátová (2), A. Kuchařová (1), H. Prokschová (1), P. Břicháčková (1)

(1) Nemocnice Tábor a.s., Tábor, CZ

(2) Nemocnice České Budějovice, a.s. České Budějovice, CZ

**Úvod:** *Cryptococcus neoformans* je ubiquitární kvasinka, která je nejčastěji izolována z trusu holubů nebo z prostředí kontaminovaného těmito exkremty. U imunokompromitovaných pacientů (nejčastěji při onemocnění AIDS) primárně invaduje plíce, následně může diseminovat do CNS a způsobit závažné systémové onemocnění.

**Kazuistika:** Pacient s progresivní polyartritidou byl dlouhodobě léčen glukokortikoidy a imunosupresivy. K původnímu onemocnění se postupně přidávaly další jako diabetes mellitus, později plicní postižení či neurologické symptomy. Pacient byl hospitalizován i na psychiatrickém oddělení. Bohužel na mykotickou etiologii vznikajících komplikací nebylo pomýšleno. V době izolace *C. neoformans* byl již pacient v dlouhodobě nepříznivém zdravotním stavu, a i přes podání adekvátní léčby nakonec zemřel.

**Metodika:** Kvasinka byla primárně izolována z krve přístrojem BACT/ALERT, následně identifikována hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF a pomocí PCR. Stanovení *in vitro* minimální inhibiční koncentrace k antimykotikům bylo provedeno pomocí komerční soupravy Sensititre YeastOne. K potvrzení onemocnění přispěly také mykoséologické metody detekce antigenu *C. neoformans* v krevním séru a mozkomíšním moku.

**Výsledky:** Použité metody prokázaly přítomnost *C. neoformans* v krvi a moku, jednalo se tedy o prokázanou systémovou kryptokokovou infekci.

**Závěr:** Nelze posoudit, nakolik souvisel celkový klinický stav pacienta a následné úmrtí s prokázanou kryptokokovou infekcí. Chceme však zdůraznit, že je nutné pomýšlet na kryptokokózu u imunosuprimovaných pacientů v ranějších stádiích choroby, a to nejen u HIV pozitivních osob či pacientů s hematologickým onemocněním.

## **P 06. Využitie cobas® Liat® System v diagnostike chrípky**

M. Dubinová (1), M. Straka (1), A. Longauerová (1), A. Krajčíková (1), J. Predný (1), V. Cucak (2), M. Novotný (3), K. Vlčková (4), A. Liptáková (1)

(1) Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK

(2) Roche Slovensko s.r.o, Bratislava, SK

(3) Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura, Košice, SK

(4) I. Interná klinika, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK

Chrípka je vírusové ochorenie dýchacích ciest, na ktoré na Slovensku každoročne ochorie a aj zomrie relatívne veľký počet ľudí. Najviac ohrození sú pritom starí a inak imunitne oslabení pacienti. Preto je veľmi dôležitá jej včasná diagnostika a následný epidemiologický manažment. cobas® Liat® System je prístroj, ktorý je schopný diagnostikovať chrípku spoľahlivo a za krátky čas (~20 minút), aj pri lôžku pacienta.

Diagnostika prebiehala v rámci Univerzitnej nemocnice v Bratislave a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach od októbra 2019 do mája 2020, čiže najmä v období chrípkovej epidémie a pandémie COVID-19. Od 69 pacientov (Bratislava) a 20 pacientov (Košice) podozrivých na chrípku bol odobratý nazofaryngeálny výter, ktorý bol vložený do univerzálneho transportného média. Detekcia chrípky zo vzorky prebiehala prostredníctvom cobas® Influenza A/B Assay v prístroji cobas® Liat® System, a reverznou transkripciou vírusovej RNA a jej následnou amplifikáciou.

Chrípka typu A bola diagnostikovaná dokopy u 11 (12 %) pacientov, chrípka typu B u 8 (9%). Celkovo A/B 67 (75 %) vzoriek bolo negatívnych, 3 vzorky sa nepodarilo diagnostikovať. Väčšina testovaných boli muži, a to 53 (60 %). Z toho pozitívnych bolo 13 (8 – typ A, 5 typ B). Z 36 (40 %) testovaných žien bolo pozitívnych 6 (3 – typ A, 3 - typ B). Priemerný vek pacientov, u ktorých bola diagnostikovaná chrípka A/B bol 59 rokov.

Diagnostika chrípky pomocou cobas® Liat® System je rýchla a jednoduchá metóda a bola nápomocná pri nastavovaní liečby a epidemiologickom manažmente počas epidémie chrípky a pandémie COVID-19.



## **P 07. Phenotypic characterization of new *Staphylococcus epidermidis* phages able to transfer plasmids and genomic islands**

L. Fišarová (1,2), T. Botka (1), P. Bárdy (1,3), M. Benešik (1,4), I. Mašlaňová (1), J. Doškař (1)

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

(2) Institute of Botany of the CAS, Prague, CZ

(3) Centre for Structural Biology, Central European Institute of Technology, Brno, CZ

(4) MB Pharma, Prague, CZ

*Staphylococcus epidermidis* is a bacterium capable of causing diseases and a potential source of antimicrobial resistance. This resistance can be transferred horizontally among bacteria, mostly by bacteriophages. Only few phages have been characterized in detail so far, despite their ability to provide bacteria with these interesting properties. Our work characterizes *S. epidermidis* phages that were not described previously and demonstrates their ability to transfer mobile genetic elements including antimicrobial resistance genes carrying plasmids. We selected four *S. epidermidis* phages  $\phi$ 27,  $\phi$ 48,  $\phi$ 456 and  $\phi$ 459 previously used for phage-typing and characterized them in detail. All phages have a narrow host range and according to electron microscopy, they belong to the family *Siphoviridae* and have similar morphology. We performed transduction experiments with plasmids and confirmed the transduction potential of phage  $\phi$ 27, which transferred a streptomycin-resistance plasmid with high efficiency. We also detected transduction potential in phage  $\phi$ 48 which is naturally capable of transferring chromosomal island of its propagation strain. We confirmed the ability of this phage to package the island by PCR, detected small transducing particles by electron microscopy, and transferred this island to recipient strains. The phage was also demonstrated to transfer other chromosomal islands. Our findings support the role of *S. epidermidis* phages in the spread of both antimicrobial resistance and virulence genes.

This work was supported by Grant of Czech Science Foundation (GA18-13064S) and Development Fund of Masaryk University MUNI/FR/1181/2018.

## **P 08. Vliv extraktů *Mellissa officinalis* a *Malaleuca alterfolia* na vybrané bakterie**

T. Gyönyör (1), L. Černohorská (2)

(1) Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

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

Po staletí empiricky získávané znalosti lidové a východní medicíny poskytují výborný substrát k podrobnější analýze. Kajeput i Meduňka jsou byliny známé pro své antiseptické vlastnosti. Hlavní antibakteriální komponenty představují terpeny a jejich deriváty. Z těchto především limonen,  $\beta$ -karyophylen, geranial (Meduňka) a terpinen-4-ol, 1,8-cineol a terpinolen (Kajeput). Tyto látky zvyšují permeabilitu bakteriální membrány, narušují tak energetickou i iontovou bilanci, syntézu makromolekul a quorum sensing systém.

Extrakty Meduňky představoval vodný macerát a tinktura (70% ethanol) o výchozí koncentraci 100 g byliny na litr rozpouštědla. Jako extrakt Kajeputu sloužil komerčně dostupný esenciální olej (10 ml, Saloos). K testování bylo použito celkem 183 bakteriálních kmenů získaných od hospitalizovaných pacientů. Ke zhodnocení účinku byl použit diskový difúzní test. Inokula o denzitě 0,5 až 1,5 McFarlanda byla naočkována na agar Mueller-Hintonové. Následně byly naneseny disky (6 mm) obsahující testované extrakty, antibiotické disky (30  $\mu$ g cefoxitinu (fy. OXOID)), jejich kombinace a disky napuštěné 70% ethanolem a destilovanou vodou pro negativní kontrolu. Inkubace trvala 18-24h při 37 °C, následně proběhlo měření inhibičních zón pomocí digitálního posuvného měřítka.

Disky obsahující pouze rostlinné extrakty i jejich kombinace dosahovaly pouze nízkého efektu, nesrovnatelného s efektem antibiotických disků. Maceráty nevykazovaly antibiotický efekt. Významným se ukázal synergistický vliv antibiotika a extraktu Kajeputu. U kmenů MRSA medián inhibičních zón vzrostl z 14,83 mm (cefoxitin) na 21,79 mm. V případě *E. coli* z 26,82 mm na 34,20 mm. U kmenů *S. aureus* z 30,34 mm na 31,06 mm. V kombinaci s Meduňkou došlo k mírnému snížení inhibičních zón. Negativní kontroly byly vždy negativní.

Výsledky ukazují především synergistickou aktivitu rostlinných extraktů s antibiotiky a poukazují tak na možné využití fytochemikálií s potenciálem k zlepšení situace antibiotické rezistence ve veterinární i humánní medicíně.

## **P 09. Nekrotizující fasciitida způsobená atypickým mořským patogenem**

M. Hladík (1), B. Lipový (1,2), R. Mager (1), F. Raška (1,2), M. Hanslianová (3), J. Blažek (4), H. Křemečková (5), I. Suchánek (1)

(1) Klinika popálenin a plastické chirurgie Fakultní nemocnice Brno a Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity

(2) Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

(3) Oddělení klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Brno

(4) Infekční oddělení, Nemocnice Kyjov

(5) Oddělení klinické mikrobiologie, Nemocnice Kyjov

### **Abstrakt:**

Oblíbenost letecky dostupných prázdninových přímořských destinací u obyvatel České republiky každoročně stoupá. Do samotného Bulharska loni vycestovalo více než 200.000 tisíc spoluobčanů. Vzhledem k cenové dostupnosti se stává cestování k moři stále více dostupné i pro řadu seniorů, kteří častokrát trpí i několika závažnými nemocemi současně. Proto začínáme být konfrontováni, i v českém zdravotnictví, s řadou nově importovaných nákaz způsobených přímořskými nebo mořskými patogeny.

Infekce kůže a měkkých tkání (SSTIs – skin and soft tissue infections) jsou rozsáhlou skupinou onemocnění. Různé projevy klinické manifestace způsobují, že tento typ infekční komplikace způsobuje nekomplikované nebo naopak i život ohrožující stavy (nekrotizující fasciitida). Proto se s problematikou SSTIs může setkat jak lékař v terénu, tak také lékař urgentního příjmu. Výskyt SSTIs je celosvětový, u obou pohlaví a ve všech věkových skupinách. Je popsána celá řada predisponujících faktorů, které usnadňují rozvoj a progresi této infekce, mezi nejdůležitější patří diabetes mellitus, pre-existující postižení kůže, alkoholismus, malnutrice, kontakt se zvířaty, malignita, imunosuprese, užívání intravenózních léků, periferní arteriální či venózní onemocnění a traumatické postižení kůže (popáleniny, decollement) aj.

V kazuistice prezentujeme případ polymorbidního seniora, muže, který se při plavání v moři zranil v oblasti pravé dolní končetiny s následnou rychlou progresí infekce do oblasti celého bérce a rozvojem nekrotizující fasciitidy a sepse.

Jako původce byl identifikován relativně vzácný mořský patogen, který způsobil hlubokou infekci kůže a měkkých tkání s prezentací četných nekróz ohrožující nejen pacientovu končetinu. I přes nepříznivý lokální i systémový obraz jsme se u pacienta pokusili o záchranu končetiny. Díky spolupráci s mikrobiologi se podařilo provést účelnou a efektivní nekrektomii spolu s kompletním uzávěrem vzniklých defektů.

**Klíčová slova:** Infekce kůže a měkkých tkání, nekróza, nekrektomie, mořský patogen

## P 10. Hledání nových repelentů proti klíšťatům

R. Horáková (1), H. Nejezchlebová (1), D. Novák (2), A. Žáková (1), M. Budíková (3), I. Horová (4)

(1) Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ;  
(2) Ústav lékařské chemie a biochemie, Lékařská fakulta Univerzity Palackého, Olomouc, CZ;  
(3) Ústav matematiky a statistiky, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ;  
Korespondující autor: H. Nejezchlebová, helanej@sci.muni.cz

### Úvod

Počet pacientů s infekcemi, jejichž původci jsou klíšťaty přenášeni na člověka a zvířata, je stále vysoký. Např. jen v loňském roce bylo hlášeno 4105 případů lymeské borreliózy - multisystémového onemocnění způsobeného bakteriemi patřícími do komplexu *Borrelia burgdorferi* sensu lato. Zároveň jde o nejčastější zoonózu přenášenou vektory (přenašeči) v naší geografické oblasti. S tím je spojena potřeba se i nadále zamýšlet nad možnostmi ochrany před těmito přenašeči medicínsky závažných patogenů.

### Metodika

*In vitro* testy účinnosti potenciálních repelentů na bázi esenciálních olejů ze dvou vybraných druhů rostliny kurkuma (kurkuma dlouhá, kurkuma žlutokořená, *Zingiberaceae*) byly provedeny na nymfách klíštěte obecného. Testování jedinci byli odchyceni ve volné přírodě metodou vlajkování.

### Výsledky

Pilotní studie ukázala, že repelentní účinnost testovaných druhů při koncentracích 0,005 mg/cm<sup>2</sup> a 0,01 mg/cm<sup>2</sup> není optimální. Při koncentraci 0,005 mg/cm<sup>2</sup> se repelentní účinnost testovaných druhů kurkumy liší (Pearsonův chí-kvadrát test nezávislosti, p-hodnota=0,004). Při koncentraci 0,01 mg/cm<sup>2</sup> se toto nepodařilo prokázat (Pearsonův chí-kvadrát test nezávislosti, p-hodnota=0,817).

### Závěr

Výsledky naší pilotní studie nastiňují další možnou cestu při hledání repelentů proti klíšťatům na přírodní bázi, které jsou částí veřejnosti lépe přijímány než tradiční komerční repelenty na syntetické bázi. Kurkuma a v ní obsažené biologicky aktivní látky jsou dobře známy pro své preventivní či kurativní účinky v souvislosti s řadou chorob. Další výzkum by mohl přispět i k objasnění repelentních vlastností s tím, že tyto poznatky jsou výhledově využitelné v praxi v rámci boje s chorobami, způsobenými patogeny přenášenými klíšťaty.

Podpořeno ze Specifického výzkumu MUNI/A/1397/2019.

## P 11. Identifikácia klinických izolátov *Clostridioides difficile* použitím metód molekulárnej biológie

V. Janošcová (1), J. Kuzma (1)

(1) Katedra biomedicínskych odborov - pracovisko mikrobiológie a imunológie, lekárska fakulta Ostravskej univerzity, Ostrava, CZ

### Úvod

*Clostridium difficile* (CD) je sporulujúca, anaeróbna, grampozitívna baktéria, ktorá je v rozvinutých krajinách najčastejšou diagnostikovanou príčinou infekčných hnačiek získaných v nemocničných zariadeniach, tzv. kolitíd spojených s podávaním antibiotík (AAC - *Antibiotics Associated Colitis*). V roku 2016 došlo k návrhu na reklasifikáciu názvu z *Clostridium difficile* na *Clostridioides difficile* (CD), ktorý lepšie reflektuje odlišnosti taxonomického druhu *Clostridium difficile* v porovnaní s ostatnými taxonomickými členmi taxonomického rodu *Clostridium*. V klinickej i výskumnej praxi sa oba názvy považujú za správne a rovnako sú oba uvedené v nomenklatúre ICNP (*International Code of Nomenclature of Prokaryotes*).

### Patogenéza *Clostridium Difficile Infection* (CDI)

CD sa ako častý pôvodca nozokomiálnych nákaz dostáva do organizmu alimentárne vo forme odolných endospór. Požitie spóry sú stimulované ku germinácii žlčovými soľami, najmä taurocholátom, v tenkom čreve. Kolonizácia závisí na adherencii baktérií k epitelu.

Exotoxíny produkované CD, konkrétne toxín TcdA (toxín A) a TcdB (toxín B), sa tvoria behom vegetatívneho rastu. Toxíny stimulujú zápalovú reakciu výstelky čreva indukciou cytoskeletálnych zmien, ktoré narušujú epitelovú bariéru a vyvolávajú produkciu zápalových cytokínov. Dochádza k disrupcii tight junctions, čo umožňuje prestup toxínov cez epitel, kde sa ďalej šíri zápalová odpoveď pôsobením mediátorov z lymfocytov a mastocytov. Toto vedie k eskalácii zápalovej odpovede influxom neutrofilov a ďalších lymfocytov, čo môže viesť až ku vzniku pseudomembrán. Počas kolonizácie je hositeľ možným zdrojom facilitácie prenosu nákazy.

Toxín A ako typický enterotoxín poškodzuje bunky črevného epitelu, čo spôsobuje kumuláciu tekutín v trubici. Vznikajú tak vodnaté, niekedy až hemoragické hnačky. Poškodzuje taktiež aj bunky imunitného systému a chemotaxiou prispieva k vzniku zápalu. Toxín B ako cytotoxín tieto porušené bunky deštruuje a na sliznici vznikajú nekrózy a ulcerácie pokryté pablami. Objavuje sa obraz klasickej pseudomembranózne enterokolitídy, ku ktorej najčastejšie dochádza súčinnosťou oboch toxínov.

Poškodenie spolu s nekrozou enterocytov má za následok vznik CDI (*Clostridium Difficile Infection*). Pseudomembranózna enterokolitída môže vyústiť k toxickému megakolon, v ileus, prípadne i ruptúru čreva, ktorá môže ohroziť pacienta na živote. CD kolonizuje najmä črevá jedincov, u ktorých je narušený mikrobióm (napríklad ATB liečbou), ale nákaza môže súvisieť taktiež s vekom pacienta, užívaním laxatív, inhibítorov protónovej pumpy, chemoterapeutickými liečivami, no i s renálnou insuficienciou a gastrointestinálnymi zákrokmi.

V posledných rokoch sa frekvencia a závažnosť CDI významne zvýšila kvôli vzniku hypervirulentých druhov, ktoré produkujú cytotoxické toxíny vo zvýšenej miere. K hypervirulencii môže prispievať taktiež tvorba tzv. binárneho toxínu, alebo CDT (*Clostridium difficile transferase*), ktorý zvyšuje adherenciu k epiteliálnym bunkám indukciou mikrotubulárnych výčnelkov.

Typizácia druhov CD sa používa k sledovaniu nákaz, ich lokálnemu i globálnemu šíreniu a identifikácii výskytu nových typov CD s vyššou virulenciou. Presné určenie ribotypu a toxínotypu CD v danej lokalite vytvára údaj v epidemiologických záznamoch danej lokality. Z množstva typizačných metód sa za štandardné v tejto dobe považuje použitie REA, PFGE či PCR metóda. Nové postupy v typizácii CD prispievajú k presnejšej diagnostike, čo zlepšuje samotnú liečbu a použitie antibiotík pri CDI.

## Metodika

Realizovaný projekt bol zameraný na genotypizáciu - určenie ribotypu a toxinotypu 30 klinických izolátov *Clostridioides difficile* z vybraných nemocníc v Českej republike - Pardubice, Náchod, Litomyšl, ktoré postihovala nozokomiálna infekcia CD.

Vzorka vyšetrovaných pacientov bola vo veku od 51-95 rokov a trpeli na rôzne ochorenia, na ktoré sekundárne nadviazala CDI.

**Izolácia, rastové médiá:** Vzorky boli kultivované 48 hodín v anaeróbnej atmosfére pri 37,5 ° C na rastovej pôde s použitím *Clostridium Difficile* Selective Supplement (Oxoid, UK) obsahujúcim D-cycloserín (125,0 mg) a cefoxitín (4,0 mg) na agarovej báze *Clostridium difficile* Agar Base (Oxoid, UK) s obsahom 7% defibrinovanej konskej krvi (SR0050).

**Izolácia DNA:** DNA bola izolovaná s použitím Chelex 100 (BioRad, ČR) po 24-hodinovej kultivácii v anaeróbnej boxe. Chelex roztok obsahoval 0,3g Chelex100 a 5 ml PCR vody. Kolónie boli resuspendované v Chelex-e a bakteriálna suspenzia privedená k bodu varu na 100 ° C po dobu 10 minút. Následne bola suspenzia centrifúgovaná 10 minút na 12 000 rpm. Vzniknutý supernatant sa pridal do prázdnych skúmaviek a uskladnený v chladiacom zariadení.

Analýza výsledkov prebehla použitím BioNumerics (Applied Maths Inc., Texas, USA).

**Ribotypizácia:** Princíp PCR ribotypizácie je založený na amplifikácii tzv. *intergenetic spacer region* medzi 16S a 23S rRNA, zobrazení charakteristických bandov pomocou kapilárnej elektroforézy a analýza pomocou vhodného softvéru. Postup ribotypizácie bol prevedený podľa metodiky Janežič a Rupnik, 2010.

Použitý Master Mix obsahoval: PCR voda, PCR Buffer, dNTPs PCR mix (SERVA Electrophoresis), primery 16S Ribo a 23S Ribo (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific), DNA Taq Polymerase (New England Biolabs, ČR).

Mastermix bol rozdelený do PCR skúmaviek v objeme 45 µl a následne bolo pridaných 3µl vzoriek DNA izolátov.

Po amplifikácii a následnom evaporačnom programe v termocykleri sa realizovala elektroforéza na 3% agarózovom géle za súbežného chladenia podobu 4 hodín. Gél bol vložený do roztoku etídium-bromidu (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>BrN<sub>3</sub>) i destilovanej vody po dobu 20 minút.

Analýza výsledkov s určením ribotypu bola vykonaná prostredníctvom programu BioNumerics (Applied Maths Inc., Texas, USA)

## Toxinotypizácia:

Toxinotypizácia je metóda pre diferenciáciu CD podľa zmien v ich tzv. lokuse patogenicity (PaLoc), teda lokusu, ktorý kóduje toxín A (gén *tcdA*) a B (gén *tcdB*). Tento 5 génový lokus okrem toho ešte obsahuje gény *tcdR*, *tcdC* a *tcdE* uplatňujúce sa v regulácii a v transporte toxínu.

Pri zisťovaní toxinotypu CD je zistený PaLoc následne porovnaný s referenčným typom označovaným sa ako toxinotyp 0. Pri odlišnosti v *tcdA* a *tcdB* je typ zaradený do jedného z toxinotypov, ktorému pripadá identická odchýlka. Variabilita môže byť na úrovni i jediného nukleotidu (bodové mutácie, delécie, inzercie).

PCR fragmenty (ktorých je v PaLoc-u celkovo 10 - B1-B3, A1-A3, PL1-4), ktoré sa na amplifikáciu používajú, sú B1, nachádzajúci sa v prvej tretine génu *tcdB* a A3 v repetitívnej oblasti génu *tcdA*. Prítomnosť toxigénnych CD bola overená testom Xpect pre CD toxin A/B (Remel, USA). Následná toxinotypizácia sa skladala sa z troch krokov:

1) PCR amplifikácia B1 (pri pozitívite pre toxín B) a A3 (pri pozitívite toxínu A) fragmentov a pre binárny toxín;

2) Reštrikcia amplifikovaných fragmentov pomocou reštrikčných enzýmov HincII, AccI, EcoRI (New England Biolabs, ČR). Použitý Master Mix (pre BTB, A3, B1) obsahoval: PCR voda, PCR buffer (NEBuffer 2.1, CutSmart Buffer, NEBuffer 3.1; Molecular Biology Grade), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs a príslušné primery (Primer mix BTB, Primer A3C, A4N, B1C, B2N) (New England Biolabs, ČR).

Mastermix bol rozdelený do PCR skúmaviek v objeme 46 $\mu$ l a následne bolo pridaných 3  $\mu$ l vzoriek DNA izolátov (pripravených vhodným spôsobom ako pri ribotypizácii). Po PCR amplifikácii prebehol opäť evaporačný program a analýza bandov z gélovej elektroforézy, na základe čoho boli izoláty rozdelené do príslušných toxínotypov.

3) Determinácia toxínotypov na základe výsledku a prítomnosti kombinácií B1 a A3 reštrikčných typov podľa metodiky Stubbs et al. 2000.

Gény pre binárny toxín (CDT) boli detekované validným PCR protokolom.

## Výsledky

Klinické izoláty pochádzali od 30 pacientov, 11 mužského a 19 ženského pohlavia. Priemerný vek všetkých pacientov bol 76,4 rokov (muži 80,1, ženy 74,3 rokov). V rámci našej štúdie sme diagnostikovali nasledovné ribotypy: 176 (CE), 002, 014, 015, 017, 078, 103, SLO160 a SLO115. Najzastúpanejší bol ribotyp 176 (CE), ktorý sa vo vzorkách vyskytoval až v 70,0 %. Druhým najfrekvencovanejším bol ribotyp SLO160 (6,7 %). Ostatné ribotypy sa vyskytovali v vhodnom počte (po 3,3 % vzoriek).

V toxínotype CD vzoriek prevažoval typ 0 (90,0 %), ktorý je zhodný s druhom VPI 10463. Toxínotypy I, II a V sa vyskytli v malom množstve (po 3,3 % vzoriek).

Prítomnosť binárneho toxínu bola pozitívna v 21 vzorkách (70,0 %), v 9 vzorkách binárny toxín prítomný nebol (30,0 %). Binárny toxín bol detekovaný vo výrazne vyššom zastúpení z izolátov od žien (61,9 %), v porovnaní s mužmi (38,1 %).

## Diskusia

Incidencia nozokomiálnych nákaz CD má v rozvinutých krajinách rastúcu tendenciu. V porovnaní výskytu nákazy na 10 000 pacientov v ČR sa z 1,1 prípadov v roku 2008 zvýšil na 6,2 v rokoch 2012 až 2013. Z dôvodu možných závažných komplikácií tejto nozokomiálnej nákazy je nutný stály monitoring výskytu a šírenia CDI. Riziko CDI sa rapídne zvyšuje u pacientov s vekom vyšším ako 65 rokov, čo je spôsobené komorbiditami, imunokompromitáciou, ale i samotnou hospitalizáciou v nemocničných zariadeniach.

V Českej republike je najfrekvencovanejším ribotypom 176 zo všetkých izolátov, čo potvrdili i naše získané výsledky. Takmer každá antibiotická liečba je asociovaná s prepuknutím CDI, a to i po liečivách podávaných na samotnú CD infekciu: metronidazol a vankomycín. Široké spektrum penicilínov a cefalosporínov, klindamycín, a fluorochinolóny nesú vyššie riziko pre vznik CDI než iné antibiotiká. Liečba vankomycínom taktiež zvyšuje riziko vzniku rezistentných enterokokov. Množstvo CDI je nediodagnostikovaných, čo vytvára medzeru v epidemiologických záznamoch CD nákaz v ČR. Táto medzera spôsobuje neaktuálnosť v povedomí o výskyte špecifických druhov CD (ribotypu, toxínotypu) v danom regióne či krajine, no taktiež spomalenie vývoja laboratórných algoritmov. Nové metódy ribotypizácie a toxínotypizácie použité v našom výskume umožňujú presnejšie určenie druhu CD, následkom čoho je možné zlepšiť antibiotickú liečbu CDI i vývoj nových liečiv v prípade zmien v genóme CD a vzniku rezistencií na používané antibiotiká.

*Výsledky tejto práce boli získané vďaka finančným prostriedkom čerpaných v rámci riešenia projektu SGS/02/LF/2019 študentskej grantovej súťaže špecifického VŠ výskumu Ostravskej univerzity.*

## **P 12. Aminokyselinové substituce v izotypech genu $\beta$ -tubulinu parazitických helmintů *Fasciola hepatica* a *Haemonchus contortus* vedoucí ke vzniku anthelmintické rezistence**

T. Janošíková\* (1), L. Škorpíková (2), J. Vorel (2), M. Kašný (2)

\* tjanostikova@gmail.com

(1) Ústav biochemie, Přf Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(2) Ústav botaniky a zoologie, Přf Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Parazitičtí červi, helminti, jsou různorodou skupinou živočichů, která zahrnuje mnohé původce závažných onemocnění člověka a zvířat. Motolice jaterní *Fasciola hepatica* (Platyhelminthes) a vlasovka slezová *Haemonchus contortus* (Nematoda) představují dva kosmopolitní patogeny přežvýkavců parazitující v játrech (*F. hepatica*) a slezu (*H. contortus*). Masivní infekce v chovech vedou často k úhynu nakažených zvířat a způsobují značné ekonomické ztráty. Terapie helmintóz je založena na aplikaci anthelmintik. Je známo, že v důsledku běžného používání anthelmintik, se v populacích parazitů objevují rezistence, které mohou postupně jejich účinek snížit. Mezi běžně používaná anthelmintika patří i benzimidazol, přičemž rezistenci parazitů k tomuto léčivu lze determinovat s využitím molekulárních metod, kdy je v DNA parazitů stanovována přítomnost jednonukleotidových mutací v genu pro  $\beta$ -tubulin. Jedná se o záměny v kodonech pro aminokyseliny na pozici 167, 198 a 200.

Dospělci obou druhů helmintů *F. hepatica* a *H. contortus* byli odebráni z poražených kusů skotu a ovcí. K izolaci DNA bylo použito celkem 5 jedinců *H. contortus* a 9 jedinců *F. hepatica* a následná PCR reakce byla provedena se specificky navrženými primery za účelem amplifikace vybraných úseků genu  $\beta$ -tubulinu. Získané PCR produkty byly separovány pomocí gelové elektroforézy, přečištěny, sekvenovány a vyhodnoceny s využitím programů BioEdit a SnapGene Viewer.

Výsledky sekvenace nepotvrdily přítomnost mutace v izotypu 1 a 3 genu  $\beta$ -tubulinu v žádném vzorku *F. hepatica*. Naopak v izotypu 1 byly u 4 jedinců *H. contortus* identifikovány záměny v kodonech 198 a 200, které jsou s rezistencí typicky spojovány.

*Výzkum byl podpořen projekty GAČR GA19-17269S a INTER-EXCELLENCE LTC19018*



### **P 13. Characterization of silver nanoparticles synthesized from *Artemisia absinthium***

D. Kabanov (1,3), A. Voyshel (2,3), K. Sehnal (2,3,4), D. Banáš (1,3), B. Ruttkay-Nedecký (2,4), B. Hosnedova (4), P. Králík (1), R. Kizek, R (2,3,4)

(1) Department of Biochemistry, Masaryk University, Brno, CZ

(2) Department of Human Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, CZ

(3) Department of Research and Development, Prevention Medicals s.r.o., Brno, CZ

(4) Department of Viticulture and Enology, Faculty of Horticulture, Mendel University in Brno, Lednice, CZ

**Introduction.** The spread of bacterial strains resistant to antibiotics and disinfectants is a major public health problem. For this reason, new possibilities for the treatment of infections are being sought. Silver nanoparticles (AgNPs) are the prospective antimicrobial agents with wide spectrum of biological targets. Effect of nanoparticles depends on their size, shape and modification. Green synthesis is a method for preparation of AgNPs that can improve their properties by using plant extracts as surface modifiers.

**Material and Methods.** Nanoparticles were obtained by green synthesis using an aqueous plant extract and 0.1 mM silver nitrate. In this study, AgNPs/A from *Artemisia absinthium* were synthesized. Nanoparticles were characterized using Zetasizer Nano ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK). Total phenols were measured using Folin-Ciocalteu reagent. Antioxidant activity was measured by Ferric reducing antioxidant power (FRAP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical (ABTS) methods using BS-300 Chemical analyser from Mindray (Shenzhen, China). Calibration curves were prepared by using different concentrations of gallic acid (GA). Bacterial cultures were cultured on LB medium at 30 °C. Growth curves were measured using Infinite F50 (Tecan, Mannedorf, Switzerland) with at least 5 replicates in 96-well polystyrene plates for OD<sub>600</sub> each 10 min at 30 °C. AgNPs were tested in concentrations range 5-100 µg/ml. Haemolytic activity of AgNPs/A was tested on human red blood cells as haemolysis intensity after 2h of incubation with AgNPs/A with 100 µg/ml concentration.

**Results.** The size of AgNPs/A ranged from 50 to 100 nm and absorbance maximum was at 470 nm with zeta potential -24 mV. Nanoparticles exhibited antioxidant activity (FRAP = 20 µg/ml GA, ABTS = 50 µg/ml GA, DPPH = 50 µg/ml GA) and relatively high abundance of phenolic compounds (~125 µg/ml GA). Antibacterial activity of AgNPs/A was investigated using growth curves (620 nm, 10 min for 24 h, n = 3). Minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined using curve integrals. MICs of AgNPs/A for *E. coli* and *S. aureus* were found to be 23 ± 3 and 12 ± 3 µg/ml, respectively. We also shown that silver nanoparticles from *A. absinthium* has relatively low toxicity to red blood cells - ~20% haemolysis amount for AgNPs.

**Conclusion.** AgNPs/A have a strong antimicrobial effect which makes them prospective agents for medical usage. However, since there is also a risk of bacterial resistance, further attention should be paid to these nanoparticles.

**Acknowledgement.** This work has been funded by the grant H2020 CA COST Action CA15114, INTER-COST LTC18002.

## **P 14. Study of the gut microbiota in patients with ulcerative colitis**

A. Kamlárová (1), Ľ. Ambro (1), R. Link (1), A. Bomba (1)

(1) Institute of Experimental Medicine, Faculty of Medicine, Pavol Jozef Šafárik University in Košice, Košice, SK

anna.kamlarova@upjs.sk

Non-specific inflammatory bowel diseases (IBD) are one of the most common cause of serious and uncomfortable digestive problems and gastrointestinal disorders. Inflammatory bowel diseases are characterized by chronic and recurrent inflammatory condition of the gastrointestinal tract. Crohn's disease and ulcerative colitis (UC) are the principal types of IBD, which are differentiated by the different clinical manifestations of inflammation and intestinal localization. Ulcerative colitis is inflammatory disease of the colonic mucosa manifested by long-lasting inflammation and ulcerative lesions (ulcers) on mucosa leading to bleeding in colon and rectum. Currently, the exact etiology of IBD or UC is unclear, but it is believed that genetic factors, host immune system, environmental factors, lifestyle and eating habits contribute to the pathogenesis of UC. The gut microbiota acts as a metabolic organ and contributes to human health by performing various physiological and immunological functions; deviation in the gut microbial composition (dysbiosis) is believed to play role in pathogenesis of various diseases including IBD.

Our study was aimed to compare and detect differences in composition of the intestinal microbiota of patients with UC (UC group, n= 15, average age = 29 years) and healthy volunteers (K group, n=15, average age 40 years). Total microbial DNA was extracted using QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit kit (QIAGEN) and analyzed using quantitative and qualitative molecular analyses by real-time qPCR, PCR-DGGE and NGS (Illumina MiSeq).

Real-time qPCR results showed significantly lower abundance of total bacteria (Eubacteria) in UC group compared to K. Results of DGGE and NGS analyses showed in most of UC group samples dysbiosis, reduction in diversity and species variability and lower abundance of *Akkermansia* compared to K group. We also observed presence of *Fusobacterium* spp. in many of UC samples but it was totally absent in K samples. Our results confirm major differences in composition of the gut microbiota UC patients compared to healthy individuals and among UC patients alone, which may have potential for future treatment or diagnostics.

This work was supported by grants APVV-16-0176 and VVGS-2019-1226.

## **P 15. Analýza spoločného vplyvu teploty a osmotického stresu na rast potravinársky relevantnej mikroskopickkej huby *Geotrichum candidum***

M. Koňuchová (1), L. Valík (1)

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

**Úvod:** V potravinách môžeme uvažovať o dvoch aspektoch prítomnosti druhu *Geotrichum candidum* (GC). Na jednej strane je prirodzenou súčasťou mykobioty určitých syrov (bryndza, syry kamembertského typu), kde významne ovplyvňuje ich arómu, chuť, farbu, textúru. Na druhej strane, táto mikroskopická huba môže kontaminovať mliečne výrobky (čerstvé syry, maslo, smotana) a v dôsledku fyzikálnych, chemických, senzorických zmien a nepriaznivo ovplyvniť ich výživovú kvalitu. Výrobcovia potravín sa v súčasnosti sústreďujú najmä na to, aby vyrábali kvalitné, bezpečné, mikrobiologicky stabilné a maximálne trvanlivé potraviny. Medzi najdôležitejšie environmentálne faktory, ktoré vedú k spomaleniu až úplnej inhibícii rastu húb, patrí účinok teploty a aktivity vody. Práve z tohto dôvodu, sme v našich experimentoch využili koncept mikrobiologických prekážok, v ktorom boli zahrnuté účinky teplôt a meniacej sa aktivity vody.

**Metodika:** V práci boli použité izoláty druhu GC, ktoré pochádzali z cottage cheesu (izolát G), hrudkového syra (izolát I) a zbierkový kmeň CBS 557.83. Sledovali sme vplyv teploty (6 – 37 °C) a aktivity vody (1, 3, 5 a 7 % (w/v) prídavok NaCl) na radiálny rast na agare s obsahom odstredeného sušeného mlieka (SMA). Všetky rastové odozvy boli z prediktívno-mikrobiologického hľadiska vyhodnotené pomocou primárneho Baranyiho modelu a sekundárneho CTMI modelu.

**Výsledky:** Zo získaných rastových parametrov môžeme konštatovať, že 1 %-ný prídavok NaCl nemal negatívny dopad na pokles rastovej rýchlosti kolónií GC. Práve naopak, rast všetkých sledovaných zástupcov, v porovnaní s dynamikou rastu na médiu s prirodzenou  $a_v$ -hodnotou bol touto koncentráciou soli stimulovaný. Následné zvýšenie prídavku NaCl už spôsobilo spomalenie rastu. Pomocou CTMI modelu boli stanovené optimálne teploty rastu (25,9; 25,4 a 28 °C, v poradí pre G, I a CBS 557.83) a minimálne  $a_v$ -hodnoty ( 0,948; 0,956 a 0,959; v poradí pre G, I a CBS 557.83).

**Záver:** Získaný kvantitatívny opis rastu a rozmnožovania GC môže mliekarenským technologom pomôcť pri zabezpečení a štandardizácii kvalitatívnych vlastností niektorých mliečnych výrobkov, ako aj mikrobiologických a senzorických aspektov kvality výroby.

**Pod'akovanie:** Práca bola podporená grantom VEGA 1/0532/18 a APVV-19-0031.

## **P 16. The photodynamic inactivation reduces prion infectivity in phthalocyanine treated prions bound to surface or in suspension**

M. Kostelanska (1), Z. Hanusova (1), K. Holada (1)

(1) Institute of immunology and microbiology, First Faculty of Medicine, Charles University, Prague, CZ

**Background:** Prions are resistant to conventional sterilization techniques. They possess high affinity to surfaces of various origin raising the risk of nosocomial transmission by contaminated medical tools. Previously, we have described the photodynamic inactivation (PDI) of prions by disulfonated hydroxyaluminum phthalocyanine (AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) on western blots. The aim of this study was to demonstrate the effectiveness of PDI of prions bound to surfaces by cell infectivity assay and prions in suspension by mouse bioassay.

**Methods:** Dilutions of 0.5% RML brain homogenate (BH) was adsorbed on plastic bottom of microplate wells. Wells were washed and filled with 10 µg/ml AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> and exposed to red light for 90 min. CAD5 cell line was cultured in wells and immunodetected with antibodies AH6 and 6D11. For mouse bioassay, RML BH in suspension was treated with 25 µg/ml AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, exposed to stronger light source for 5 min. Mice were inoculated intracranially with 25 µL of sample.

**Results:** PDI of prions bound to surface decreased prion infectivity by 3 log<sub>10</sub> for 0.5% RML. Mice inoculated with PDI-treated RML suspension (10<sup>-2</sup> dilution) survived significantly longer (204±23 days) than mice inoculated with 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> and 10<sup>-4</sup> dilutions of the RML BH, who survived 169 ± 11, 165±12 and 176±15 days, respectively. The bioassay demonstrated 4 log<sub>10</sub> decrease of prion infectivity.

**Conclusions:** Our results demonstrate the AlPcOH(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mediated PDI as a promising way for decontamination of medical instruments.

Supported by AZV NV18-04-00179 and GAUK No. 140215.

## **P 17. Bakterie rodu *Caldimonas* jako termofilní producenti polyhydroxyalkanoátů**

X. Kouřilová\* (1,2), I. Pernicová (1,2), I. Nováčková (1,2), S. Obruča (1,2)

(1) Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně, CZ;

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

\*xckourilovax@fch.vutbr.cz

V současné době jsou plasty z petrochemického průmyslu široce používaným materiálem, nejen díky dobrým chemickým a fyzikálním vlastnostem, ale také kvůli nízkým výrobním nákladům. V přírodě ovšem představují značené riziko, jelikož jsou velice špatně rozložitelné. Vhodnou alternativou jsou biologicky rozložitelné a biokompatibilní polymery mikrobiálního původu, polyhydroxyalkanoáty (PHA). Jejich nevýhodou jsou vysoké výrobní náklady. Z tohoto důvodu je neustálá snaha nalézt způsoby, jak tyto náklady snížit.

Jednou z těchto možností je použití extremofilních mikroorganismů, konkrétně termofilů. Jedním ze zástupců termofilních organismů produkujících PHA jsou bakterie rodu *Caldimonas*. Jedná se o gramnegativní, tyčinkovité buňky s optimální teplotou růstu okolo 50 °C. Rod *Caldimonas* zahrnuje čtyři kmeny, jmenovitě *C. hydrothermale*, *C. manganoxidans*, *C. meghalayensis* a *C. taiwanensis*, přičemž produkce PHA byla zkoumána pouze u *C. manganoxidans* a *C. taiwanensis*. Z tohoto důvodu bylo cílem práce prozkoumat biotechnologický potenciál a porovnat vlastnosti jednotlivých kmenů za různých podmínek.

Kultivace byly prováděny za různých podmínek, konkrétně na různých minerálních médiích, za různých teplot, uhlíkatých substrátech a prekurzorech vhodných pro syntézu kopolymerů s dobrými materiálovými vlastnostmi. Na základě našich výsledků lze považovat bakterie rodu *Caldimonas* za slibné kandidáty produkující PHA při vyšších teplotách.

## **P 18. Approaches of evolutionary engineering for adaptation of *Cupriavidus necator* H16 to biotechnologically relevant stressors**

I. Novackova (1), V. Chatrna (1), E. Slaninova (1), P. Sedlacek (1), O. Samek (2), S. Obruca (1)

(1) Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, CZ

(2) Institute of Scientific Instruments, Czech Academy of Science, Brno, CZ

Approaches of evolutionary engineering serve as useful tools for obtaining of microorganisms with suitable characteristics on phenotype level (e.g. more effective growth, ability of utilization of different carbon sources, better productivity, etc.) without requirement for knowledge of genetic characteristics of microorganisms. Material characteristics of polyhydroxyalkanoates (PHAs), microbial biodegradable and biocompatible polymers, strongly depend on monomer composition. These materials could be advantageously used as an alternative of traditional plastics from oil. Evolved microbial strains obtained during evolutionary engineering experiments could be used for production of PHA with required properties for selected purposes. Model PHA producer *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) was exposed to presence of NaCl causing osmotic stress which represented environmental stress factor, to copper ions representing anthropogenic pollutant and levulinic acid, microbial inhibitor commonly presented in hydrolysates of lignocellulosic biomass. Multiple serial transfers of cell cultures in Erlenmeyer flasks after 48 hours were provided within adaptation experiments for more than 80 passages. Passages have been basically characterized (growth potential, analysis of PHAs) and selected preserved ones were also compared with wild-type strain considering potential of PHAs accumulation (GC-FID), testing of robustness, “fingerprint” of cells using Raman spectroscopy and others.

This work was supported by project GA 19-20697S of Czech Science Foundation (GAČR) and also by Brno Ph.D. Talent – Funded by the Brno City Municipality.

## **P 19. Izolace termofilních bakterií schopných produkce polyhydroxyalkanoátů**

I. Pernicová (1, 2), X. Kouřilová (1, 2), I. Nováčková (1, 2), P. Sedláček (1, 2), S. Obruča (1, 2)

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

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

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery produkované širokou škálou bakterií. PHA jsou plně biodegradabilní a biokompatibilní, a proto jsou dobrou alternativou k polymerům vyráběných z ropy. Navíc jejich výroba vychází z obnovitelných zdrojů. Bohužel, jejich výrobní náklady jsou vyšší, ale cenu lze snížit například použitím extrémofilních producentů.

Extrémofilní mikroorganismy jsou organismy, které žijí a prosperují za extrémních podmínek. Extrémofily mohou žít při vysokých teplotách, nízkém či vysokém pH, vyšší salinitě nebo také v kombinaci těchto podmínek. Díky tomu, lze jejich kultivace provádět v semi-sterilním či dokonce nesterilním módu, což snižuje finanční náklady biotechnologických procesů.

Práce se věnuje termofilním bakteriím schopných produkci PHA izolovaných z kompostu a aktivovaného kalu. Byl navržen originální izolační postup právě pro izolaci PHA produkujících bakterií. Izolační postup je založen na protektivním účinku PHA vůči osmotickému šoku. U slibných izolátů schopných produkce PHA byla poté optimalizována produkce PHA a jednotlivé izoláty byly taxonomicky a biochemicky charakterizovány. Někteří termofilní producenti byly schopni akumulace PHA až okolo 60 % suché biomasy a produkce zajímavých kopolymerů vykazujících unikátní materiálové vlastnosti.

## **P 20. Can we meet *Encephalitozoon* spp. in ZOO Brno?**

P. Pittermannová (1), V. Trávníčková (1), A. Žáková (2, 3), E. Bártová (1)

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

(2) Department of Comparative Animal Physiology and General Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, CZ;

(3) Department of Biology, Faculty of Education, Masaryk University, Brno, CZ

*Encephalitozoon* spp. belongs to obligatory intracellular microsporidia, which is responsible for systematic disease in mammals. Encephalitozoonosis is important in human and veterinary medicine but we know little about its occurrence in wild rodents. The aim of this study was to detect *Encephalitozoon* spp. in wild rodents in ZOO Brno.

Trapping of rodents was done by using spring traps and life-hunt traps in years 2016 – 2017. In total, 49 rodents were trapped including 27 Yellow-necked Field Mouse (*Apodemus flavicollis*), 19 Long-tailed Field Mouse (*A. sylvaticus*) and three Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*). The samples of DNA, isolated from liver, were examined by nested PCR using two primer pairs amplifying ITS region.

*Encephalitozoon* spp. was detected in 13 (27 %) rodents including nine Yellow-necked Field Mouse, three Long-tailed Field Mouse and one Bank Vole.

Our results demonstrate that wild rodents in ZOO Brno are coming into contact with *Encephalitozoon* spp., and they can serve as source of infection for zoo animals but also for humans (zoo personnel and visitors).



## P 21. Antibiofilmová aktivita nově připravených gallotaninů

Š. Pospíšilová (1), J. Hricovíniová (2), Z. Hricovíniová (2), A. Čížek (3), J. Jampílek (1,4)

(1) Biologicky aktivní komplexy a magnety, Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, ČR

(2) Biomedicínske centrum Slovenskej akadémie vied, Karlova Ves, SR

(3) Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ČR

(4) Katedra analytické chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, SR

Gallotaniny jsou polyfenolické sloučeniny skládající se z centrální molekuly cukru, na kterou jsou esterovou vazbou navázány zbytky kyseliny gallové. Vyznačující se řadou farmakologických aktivit jako je cytostatická, antioxidační, antibakteriální, protizánětlivá, anobezická nebo antivirová.

Bylo připraveno 8 nových gallotaninů odvozených od 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- $\beta$ -D-glukosy (PGG) lišících se typem cukru a počtem zbytků kyseliny gallové. U sloučenin byla mikrodiluční metodou hodnocena antibakteriální aktivita proti *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* a vybraným kmenům mykobakterií. Dále byla studována inhibiční a eradikační aktivita proti biofilmu *S. aureus* a efekt na systém *quorum sensing* u *Chromobacterium violaceum*.

V porovnání s PGG měly látky nižší aktivitu proti planktonickým formám *S. aureus* a prakticky nebyly aktivní proti enterokokům a mykobakteriím, ale hodnoty inhibující formaci biofilmu byly až 32–256× nižší než hodnoty MIC. U sloučenin byla dále pozorována interakce se systémem *quorum sensing*. Na základě těchto výsledků byl dále hodnocen vztah struktury a aktivity.

Nové deriváty gallotaninů prokázaly vynikající efekt jako inhibitory a disruptory stafylokokového biofilmu v sub-MIC koncentracích. Tento efekt lze vysvětlit jejich interakcí se systémem *quorum sensing*. Protože tyto látky jsou zároveň netoxické vůči eukaryotickým buňkám, jsou vhodnými kandidáty pro hlubší výzkum v oblasti antibakteriálně aktivních sloučenin.

*Tato práce byla podpořena MŠMT ČR (LO1305), Univerzitou Palackého v Olomouci (IGA\_PrF\_2020\_023) a Agentúrou na podporu výskumu a vývoja (APVV-17-0373).*

## P 22. Zelenou syntézou připravené superparamagnetické nanočástice pro detekci viru Afrického moru prasat

O. Rychlý (1), D. Banáš (1,2,4), S. Salmistraro (1,3), M. Kryžánková (4), B. Hosnedlová (1,4), A. Novotná (5), B. Nedecky (1,6), P. Králík (7), R. Kizek (1,4,6)

(1) Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o., Brno, Česko, EU

(2) Ústav biochemie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česko, EU

(3) University of Bologna, Via Tolara di Sopra, 50–40064 – Ozzano dell'Emilia – Bologna, Italy, EU

(4) Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Česko, EU

(5) Centrum léčivých rostlin, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta, Brno, Česko, EU

(6) Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, VFU Brno, Česko, EU

(7) Elisabeth Pharmacon, spol. s r.o., Česko, EU

**Úvod.** Viry představují hrozbu v podobě nebezpečných onemocnění, ať už u člověka nebo i živočichů (Ebola, chřipka). Nejnověji probíhající pandemie SARS-CoV19 je toho zřejmým důkazem<sup>1</sup>. Vhodné experimentální modely jsou intenzivně hledány za účelem vývoje vhodných léčebných a diagnostických přístupů. Africký mor prasat (ASF) je známý jako agresivní onemocnění prasat vyskytující se v ohniscích na různých kontinentech<sup>2</sup>. Virus je známý především kvůli vysoké letalitě, která dosahuje téměř 100 %. Pandemie ASF probíhá již několik let. Protiepidemická opatření mohou být různá (od dezinfekčních režimů, přes mírnou či úplnou karanténu oblastí až po důslednou eradikaci nemocných). Cílem práce je vytvoření laboratoře na čipu za využití SPION částic.

**Metodika.** Superparamagnetické železné nanočástice (SPION) modifikované zlatem (Au-SPION) byly připravené chemickou cestou redukcí  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  pomocí  $\text{NaBH}_4$  s následnou modifikací zlatem  $\text{AuCl}_4$  redukovanou a stabilizovanou  $\text{Na}_3\text{CA}$ . DNA byla analyzována před interakcí s Au-SPION a následně po modifikaci byla DNA uvolněna z Au-SPION zahříváním 15 min při teplotě 100 °C. Detekce DNA na analyzátoru AUTOLAB (pracovní elektroda – HMDE; referenční elektroda – Ag/AgCl/3M KCl; pomocná elektroda – uhlíková) v základním elektrolytu 0,2 M acetátového pufru (pH 5).

**Výsledky.** Byla testována schopnost SPION zachytit DNA (DPV AdTSV scan rate 25 mV/s, kapka 10  $\mu\text{l}$ , 120 s). Detekovány byly dva signály, první v oblasti  $-1,31 \pm 0,001$  V a druhý v oblasti  $-1,53 \pm 0,005$  V. Průměrný signál 1 byl  $120,9 \pm 6,2$  nA a průměrný signál 2 byl  $3112 \pm 185$  nA. DNA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) byla přidána k Au-SPION (1 mg/ml). Interakce po dobu 30 min, 300 rpm, 25 °C, fosfátový pufr pH 7. Nespecificky zachycená DNA byla odmyta (3krát 500  $\mu\text{l}$ , fosfátový pufr pH 7, 300 rpm, 25 °C, variabilní čas od 15 s po 90 s). Zachycená DNA byla ze SPION uvolněna (50  $\mu\text{l}$ , fosfátový pufr pH 7, 350 rpm, 99 °C, 15 min). Množství vázané DNA bylo kvantifikováno na základě signálu 2 ( $-1,53 \pm 0,005$  V). Byl spočítán integrál z různých časů promývání (15 až 90 sekund), který byl stanoven na  $4155 \pm 646$  nA. Účinnost interakce DNA s SPION byla kolem 13 %.

**Závěr.** Izolace DNA z biologického materiálu je nezbytná pro její následnou detekci. Včasná diagnostika vysoce infekčních patogenů je klíčová pro provedení protiepidemických opatření. Modifikované SPION částice jsou vhodným separačním a detekčním povrchem.

**Poděkování:** Tato studie byla podpořena Evropským programem Erasmus+, projektem AMOR QK1920113 a JCOMM 277/2020 NANOVIR.

York, A. Nat. Rev. Microbiol., 1, doi:10.1038/s41579-020-0336-9.

Wang, N. et al.. Science 366, 640–+, doi:10.1126/science.aaz1439 (2019).

Lin, M. H. et al.. Nat. Protoc. 11, 1244–1263, doi:10.1038/nprot.2016.071 (2016).

## **P 23. Intravitálna diagnostika gastrointestinálnych nematodóz a kvantifikácia ich pôvodcov v českých chovoch oviec**

S. Sajdáková (1), J. Vadlejch (2), M. Kašný (1), N. Reslová (1)

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

(2) Katedra zoologie a rybářství, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů Česká zemědělské univerzity v Praze, CZ

Vysoké prevalence gastrointestinálnych hlístic u hospodársky využívaných prežúvavcov predstavujú v súčasnosti veľký problém pre farmárov okolo celého sveta. Najvýznamnejšími pôvodcami helmintóz u oviec sú zástupcovia strongylidných hlístic, ktorí pri silnejších infekciách vyvolávajú ťažkosti u zvierat, vedúce k znižovaniu úžitkovosti a významným ekonomickým stratám. Rôzne druhy týchto hlístic sa, ale prejavujú v rozdielnej miere, čo sa týka ich patologického efektu na hostiteľa. Preto je veľmi dôležité ich vedieť rozlíšiť a determinovať aspoň na úrovni rodu. Pretože sú vajčička väčšiny druhov strongylidných hlístic, na základe ich morfológie, prakticky nerozlišiteľné, používa sa k tomuto účelu koprokultúra – kultivácia výkalov s vajčičkami hlístic, z ktorých sa postupne vyvinú infekčné larvy L3. Táto metóda je, ale časovo náročná a determinácia L3 vyžaduje skúseného pozorovateľa. Efektívnejším postupom sa javí špecifická detekcia DNA izolovanej zo vzorky výkalu a rodová determinácia na základe molekulárnych analýz ako napríklad real-time PCR (qPCR). Cieľom našej práce je zistiť situáciu výskytu a intenzity infekcií strongylidnými hlísticami v chovoch oviec v Českej republike a navrhnúť metodiku qPCR pre zistenie ich druhového spektra z výkalov týchto zvierat.

Materiál k nášmu výskumu bol zbieraný v roku 2019 celkom na 12 ovčích farmách v oblasti Moravy (kraj Vysočina, Juhomoravský, Zlínsky a Olomoucký). Z každého chovu bola odobraná jedna zmesná vzorka výkalu pre založenie koprokultúry a individuálne vzorky výkalu z minimálne 10 % zvierat v chove. Individuálne vzorky boli podrobené koprologickému kvantitatívnemu vyšetreniu podľa McMastera. Pre molekulárne analýzy bol navrhnutý postup spracovania vzorky výkalu s následnou izoláciou DNA pomocou kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep a aplikáciou špecifických detekčných primerov pre *Haemonchus* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus battus* a *Chabertia ovina*. Optimalizácia qPCR je predmetom aktuálnych testov, avšak preliminárne dáta naznačujú, že metóda má potenciál aplikácie v praxi a je tak pozitívnym prísľubom pre rýchlejšiu a presnejšiu diagnostiku infekcií vyvolaných strongylidnými hlísticami, efektívnejší monitoring parazitóz a zlepšenie celkovej kvality života chovných zvierat.

Výskum bol podporený z projektu Ministerstva školstva, mládeže a telovýchovy INTER-COST LTC19018.

## **P 24. Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate in Cyanobacteria**

E. Slaninova (1), D. Cernayova (1), Z. Sedrlova (1), P. Sedlacek (1), J. Nebesarova (2), V. Krzyzanek (3), S. Obruca (1)

(1) Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, Brno, CZ

(2) Biology Centre, The Czech Academy of Sciences, v.v.i., Branisovska 31, 37005 Ceske Budejovice, CZ

(3) Institute of Scientific Instruments, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Kralovopolska 147, 612 64 Brno, CZ

Cyanobacteria are Gram-negative prokaryotes performing oxygenic photosynthesis. In comparison with heterotrophic microbes, these microorganisms utilize N<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> without need of adding substrates. These microorganisms can be employed in biotechnology for production of bioplastics polyhydroxyalkanoates (PHAs) which are accumulated as storage materials in cells.

In this study, we used several groups of instruments, firstly microscopic techniques such as Cryo-SEM, TEM and FLIM for characterization of morphology of intracellular space and surface of cells. Next techniques which we employed are spectroscopic techniques such as UV-Vis spectroscopy with two modes (turbidimetry and integral sphere) and FTIR. These techniques were used for detection and quantification of pigments (chlorophylls, carotenoids, phycocyanin) and PHA. To unify results, we also employed gas chromatography for determination of amount of PHB in cells and flow cytometer for counting of cells in cultures.

This work was supported by project GA 19-29651L of Czech Science Foundation (GAČR).

## **P 25. Príprava kalibrátora pre kvantifikáciu pregenomickej RNA vírusu hepatitídy B v sérach pacientov**

M. Straka (1), M. Dubinová (1), J. Predný (1), S. Rybecká (2), S. Javorníková (2), P. Kristián (3), S. Stuchlík (2), A. Liptáková (1)

(1) Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta, Univerzita Komenského a Univerzitná nemocnica, Bratislava, SK

(2) Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SK

(3) Klinika infektológie a cestovnej medicíny, Lekárska fakulta Univerzity Pavla Jozefa Šafárika a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura, Košice, SK

Vírusová hepatitída B je závažné ochorenie, spojené s rizikom zlyhania pečene, prechodu do chronicity a následnej progresie do cirhózy pečene, resp. vzniku hepatocelulárneho karcinómu. Indikácie na liečbu chronickej hepatitídy B antivirotikami, ako aj na jej prerušenie, sa opierajú predovšetkým o sérologické markery infekcie a kvantitatívne stanovenie HBV DNA. Tieto markery sa už v súčasnosti javia ako nedostatočné. Klinicky užitočná by mohla byť kvantifikácia pregenomickej (pg) HBV RNA v sére HBV infikovaných. Doposiaľ však nie je dostupný komerčný kit, alebo HBV RNA kalibrátor pre jej rutinné stanovenie pomocou reverznej real time PCR a digitálna PCR ktorá nevyžaduje kalibráciu, nie je vhodnou metódou rutinnej diagnostiky. Cieľom práce bolo pripraviť kalibrátor pre real time PCR.

Zo séra pacienta s vysokou virémiou bola izolovaná RNA, ktorá bola prepísaná do cDNA. Následne bola amplifikovaná hyperkonzervovaná sekvencia X génu vírusu hepatitídy B. Produkt bol separovaný pomocou gélovej elektroforézy, extrahovaný a potom klonovaný do plazmidu a transformovaný do buniek *E. coli* JM109. Transformanty boli rozlíšené pomocou modro-bielej selekcie.

Bolo potvrdené, že plazmid izolovaný z transformovaných buniek *E. coli* JM109 obsahuje hyperkonzervovanú sekvenciu X génu vírusu hepatitídy B. V riedeniach plazmidu bude spektrofotometricky a následným matematickým prepočtom určený počet kópií HBV RNA. Riedenia plazmidu s určeným počtom jeho kópií budú vhodné kalibrátory na stanovovanie kvantity HBV RNA vo vzorkách sér pacientov.

Táto práca bola podporená grantom APVV-18-0171

## **P 26. Cyanobakterie produkující PHA aneb může „zasolení“ zvýšit produkci PHA?**

Z. Šedrlová (1), E. Slaninová (1), J. Drinka (1), I. Fritz (2), C. Daffert (2), P. Sedláček (1), S. Obruča (1)

(1) Fakulta chemická, Vysoké učení technické, Brno Purkyňova 464/118, 612 00 Brno, CZ  
(2) University for Natural Resources and Life Sciences, IFA-Tulln, Konrad Lorenz Str. 20, 3430 Tulln, A

Cyanobakterie jsou prokaryotické organismy schopné oxygenní fotosyntézy. Produkují širokou škálu zajímavých sekundárních metabolitů, např. lipidy, proteiny, glykogen, pro nás jsou nejzajímavějším metabolitem polyhydroxyalkanoáty (PHA), které se vyskytují v podobě intracelulárních granulí. PHA vykazují podobné chemicko-technologické vlastnosti jako ropné plasty, ale mají velkou výhodu, jsou plně biodegradabilní. PHA mohou být produkovány také heterotrofními bakteriemi, např. *Cupriavidus necator* H16, *Pseudomonas putida* nebo *Halomonas halophila*. Výhodou sinic oproti heterotrofním bakteriím je, že pro syntézu PHB nevyžadují zdroj uhlíku a potřebují pouze oxid uhličitý a světlo. Kromě primární zásobní funkce je pravděpodobné, že PHB pomáhá bakteriím a sinicím přežít stresové podmínky, a to v případě akutního i dlouhodobého stresu. Technologicky nejvyužívanější strategií ke zvýšené produkci PHB je limitace kultury dusíkem. V rámci této práce jsme testovali využití dalšího stresového faktoru – aplikace zvýšené osmotické síly prostředí – tzv. zasolení. Výsledky ukazují, že v případě *Synechocystis salina* CCALA 192 aplikace zvýšené osmotické síly kultivačního média (4 hm. % NaCl) významně zvyšuje výtěžek PHB. V případě dalšího testovaného kmene *Synechocystis sp.* PCC 6803 pomáhá přítomnost PHB granulí zasolení přežít a taktéž vede ke zvýšené produkci PHB nicméně zároveň částečně inhibuje růst kultury, což snižuje výslednou koncentraci produktu.

Tato práce byla finančně podpořena projekty GA19- 19-29651L České grantové agentury (GAČR) a Austrian Science Fund (FWF), project I 4082-B25. Zuzana Šedrlová je Stipendista programu Brno Ph.D. Talent – financuje statutární město Brno.

## **P 27. Kvantifikácia rastu baktérií mliečného kysnutia v prítomnosti *Geotrichum candidum* v mlieku**

P. Šipošová (1), M. Koňuchová (1), M. Trebichavská (1), A. Medved'ová (1)

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

**Úvod:** Kvantitatívny prístup k ekológii mikroorganizmov vyskytujúcich sa v potravinách a jeho aplikácia prostredníctvom prediktívnej mikrobiológie sa stáva nevyhnutnou súčasťou systému zabezpečenia kvality a mikrobiologickej bezpečnosti potravín. Preto cieľom našej práce bolo kvantitatívne charakterizovať rastový potenciál baktérií mliečného kysnutia (BMK) v mlieku, vzhľadom na ich významné postavenie v potravinárskej praxi. Nakoľko počas výroby mliečnych výrobkov sa využívajú aj mnohé ďalšie mikrobiálne kultúry, rast BMK sme sledovali v prítomnosti mikroskopickej huby *Geotrichum candidum* (GC), ktorá v niektorých mliečnych výrobkoch (napr. cottage cheese) vystupuje ako kontaminant, no zároveň pri výrobe iných typov produktov (napr. camembert, bryndza) má svoje nezastupiteľné miesto.

**Metodika:** Pomocou zried'ovacej kultivačnej metódy sme sledovali rast komerčnej zákysovej kultúry Fresco DVS 1010 (Christian Hansen, Dánsko) v UHT mlieku, ktorá bola súčasne inokulovaná s izolátom GC J, izolovaným z bryndze. Paralelné vzorky mlieka sme staticky aeróbne kultivovali pri teplotách od 6 do 37 °C. V ďalšej sérii experimentov sme upravili hodnotu aktivity vody ( $a_w$ ) mliečného média prídavkom 1 % NaCl a sledovali sme rast mikroorganizmov v rovnakom teplotnom rozmedzí. Densitu BMK v závislosti od času sme stanovovali na M17 agare (Biolife, Taliansko) a GC na GKCH agare (Biokar Diagnostics, Francúzsko). Získané údaje sme podrobili primárnemu matematickému modelovaniu podľa Baranyiho a Roberts'a a následne sme využili dva sekundárne prediktívne modely: CTMI a Ratkowskeho model.

**Výsledky:** Kultúra Fresco dokázala rásť v mlieku v celom teplotnom spektre, aj napriek prítomnosti GC. Rýchlosť rastu BMK sa vplyvom prídavku 1 % NaCl do mliečného média štatisticky významne neodlišovala ( $p < 0,05$ ) v porovnaní s jej rastom v mlieku s prirodzenou hodnotou  $a_w$ . Na základe CTMI modelu boli vypočítané  $T_{min} = 4,4$  °C a  $T_{max} = 54,2$  °C pre rast kultúry Fresco v mlieku a  $T_{min} = 4,8$  °C a  $T_{max} = 42,5$  °C v mlieku s prídavkom 1 % NaCl. Pomocou Ratkowskeho modelu boli vypočítané kardinálne teploty rastu BMK v mlieku  $T_{min} = 4,0$  °C a  $T_{max} = 51,5$  °C a v mlieku s prídavkom NaCl  $T_{min} = 4,6$  °C a  $T_{max} = 42,8$  °C. Na základe hodnôt validačných koeficientov CTMI modelu ( $R^2 = 0,987 - 0,992$ ;  $RMSE = 0,017 - 0,019$ ) a Ratkowskeho modelu ( $R^2 = 0,987 - 0,994$ ;  $RMSE = 0,015 - 0,019$ ) možno konštatovať vysokú spoľahlivosť predikcie modelov.

**Záver:** Získané výsledky možno využiť na reguláciu rastu mikroorganizmov počas výroby hygienicky bezpečných a zdravotne neškodných fermentovaných mliečnych výrobkov.

**Pod'akovanie:** Práca bola podporená grantom VEGA 1/0532/18 a APVV-19-0031.

## Seznam prvních autorů:

<b>Prezentující autor</b>	<b>Číslo stránky</b>	<b>Prezentující autor</b>	<b>Číslo stránky</b>
Ambro L.	26	Koňuchová M.	42
Banáš D.	8	Kostelanska M.	43
Bernardová N.	27	Kouřilová X.	44
Bírová K.	28	Kroneislová G.	17
Botka T.	29	Lépesová K.	18
Bujdoš D.	9	Novackova I.	45
Cibulková L.	30	Pernicová I.	46
Dubinová M.	31	Peštová J.	19
Fidrich L.	10	Petráš J.	20
Fišarová L.	32	Pittermannová P.	47
Gyönyör T.	33	Pospíšilová Š.	48
Hanišáková N.	11	Rapoport A.	21
Havránková J.	12	Rychlý O.	49
Hladík M.	34	Sajdáková S.	50
Hoppanová L.	13–14	Skulinová K.	22
Horáková R.	35	Slaninova E.	51
Chuchmová V.	15	Stachurová T.	23
Janošcová V.	36	Straka M.	52
Janošítková T.	39	Šerdlová Z.	53
Kabanov D.	40	Šipošová P.	54
Kamlárová A.	41	Šmídová L.	24
Kašpárková N.	16	Závora J.	25



**Tomáškovy dny 2020**  
**XXIX. konference mladých mikrobiologů**

Mgr. Lukáš Vacek (ed.)

Vydala Masarykova univerzita,  
Žerotínovo nám. 617/9, 601 77 Brno  
1. elektronické vydání, 2020

ISBN 978-80-210-9611-0

**MUNI**  
PRESS

**MUNI**  
MED