

XXVIII. konference mladých mikrobiologů

TOMÁŠKOVY DNY 2019



**MASARYKOVA
UNIVERZITA**

XXVIII. konference mladých mikrobiologů

TOMÁŠKOVY DNY 2019



Masarykova univerzita
Brno 2019

**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

© 2019 Masarykova univerzita
ISBN 978-80-210-9296-9

Sponzoři



Tomáškovy dny 2019 – program

6. 6. 2019

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

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

01. Mapovanie úlohy povrchového antigénu CR3-RP kvasiniek rodu *Candida* participujúceho v adherencii a tvorbe biofilmu

J. Dekkerová, J. L. Lopez-Ribot, E. Borghi, G. Morace, H. Bujdáková

02. Directly sequenced genomes of contemporary strains of syphilis revealed recombination-driven diversity in genes encoding predicted surface-exposed antigens

L. Grillová, D. Šmajš

11:15 – 11:30 Valná hromada ČSSM (Sál 1)

11:30 – 13:00 Oběd

13:00 – 13:30 Poster session I (Sál 3)

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

03. Přímá detekce *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Escherichia coli* ze vzorků plné krve na principu PCR a T2 vážené magnetické rezonance

J. Hurych, M. Antušková, E. Běbrová, J. Tkadlec, J. Beroušek, M. Souček, V. Martínková, V. Hyšperská, P. Dřevínek

04. Zlepšení diagnostiky *Streptococcus pneumoniae* ve vzorcích z respiračního traktu metodou real-time PCR

R. Kukla, R. Bolehovská, J. Radocha, K. Neradová, L. Plíšková, P. Žák, H. Žemličková

05. Využití metody celogenomové sekvenace v surveillance invazivního meningokokového onemocnění v ČR

M. Honskus, Z. Okonji, M. Musílek, J. Kozáková, P. Křížová

06. Kazuistika. Závažná alimentární infekce s překvapivým zdrojem.

J. Závora, V. Adámková, L. Kupidlovská

07. Kazuistika – nález neobvyklého původce otitis externa

G. Kroneislová, D. Balíková

08. Očná toxoplazmóza u HIV pozitivního pacienta

K. Bírová, F. Ondriska, V. Boldiš, L. Soják, P. Bukovinová, J. Burdová, P. Mikula

15:00 – 15:20 Přestávka

15:20 – 16:10 Klinická mikrobiologie II (Sál 1)

09. Role enterovirových a adenovirových infekcí v patogenezi celiakie

K. Chudá, C. R. Kahrs, G. Tapia, L. C. Stene, K. Mårild, T. Rasmussen, S. Kjersti, K. S. Rønningen, K. E. A. Lundin, L. Kramna, O. Cinek, K. Størdal

10. Adenovirus 31 u imunosuprimovaných pediatrických pacientů FN Motol: dá se nosokomiální přenos odhalit pomocí sekvenování nové generace?

L. Kramná, A. Briksí, P. Hubáček, O. Cinek

11. Extraintestinální améboza po návratu ze Sierra Leone

J. Peštová, V. Skála, J. Ulrych, E. Nohýnková

12. Fluorochinolóny – výhody verus riziká.

M. Šefranková

16:10 – 16:30 Veterinární mikrobiologie (Sál 1)

13. Sledování výše aktivity a promoření klíšťat na vybrané spirochetální mikroorganismy, zaměřeno na *Borrelia burgdorferi* sensu lato

K. Horáková (1,2), S. Tučková (1,2) A. Žáková (1), H. Nejezchlebová (1)

14. Aktivita klíšťat *Ixodes ricinus* v lokalitě Brno – Líšeň

K. Bechníková, A. Žáková

15:20 – 16:20 Biotechnologie I (Sál 2)

15. Isolace extremofilních bakterií produkující polyhydroxyalkanoáty z přírodních vzorků

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

16. Valorization of pomegranate residue by solid-state fermentation with *Cunninghamella echinulata*

M. Janák, M. Dourou, M. Čertík, G. Aggelis

17. Detekce biofilmu u octových bakterií

L. Bambasová, K. Loupancová, S. Sedláčková, E. Šviráková

18. Cold Plasma as a Novel Strategy to Fungal Inactivation with Impact on Mycotoxin Production

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

19. The Effect of Non-thermal Plasma on Microorganism Inactivation and Germination Improvement on Cereal Seeds

L. Hoppanová, V. Medvecká, J. Dylíková, A. Zahoranová

20:00 – 22:30 Společenský večer

7. 6. 2019

9:30 – 11:00 Antimikrobiální rezistence, faktory virulence I (Sál 1)

20. Penicilin necitlivé/erytromycin rezistentní izoláty *Streptococcus pneumoniae* v letech 2010 až 2017 v České Republice

L. Mališová, V. Jakubů, H. Žemličková

21. Meticilin – rezistentní *Staphylococcus aureus* mezi veterinárními pracovníky v České republice v roce 2017

K. Neradová, V. Jakubů, K. Pomorská, H. Žemličková

22. Účinek macerátu a tinktury z oregana na vybrané bakterie a kvasinky

M. Bakošová, L. Černošská

23. Faktory virulence u *Cutibacterium acnes*

P. Muchová, F. Růžička

24. Sledování působení fágových preparátů na stafylokokový biofilm

D. Bezděková, M. Dvořáčková, L. Vacek, F. Růžička

25. 3D tisk antibakteriálního materiálu

K. Sehnal, M. Staňková, M. Dočekalová, Z. Tóthová, D. Uhlířová, M. Gargulák, R. Kizek

11:00 – 11:30 Poster Session II (Sál 3)

11:30 – 12:15 Antimikrobiální rezistence, faktory virulence II (Sál 1)

26. Charakterizácia baktérií rezistentných voči antibiotikám izolovaných z nápojov typu smoothie

M. Krauhulcová, K. Lépesová, B. Micajová, L. Bírošová

27. Výskyt plazmidově vázané rezistence ke kolistinu u bakterií z odpadních vod v České republice

A. Baráková, T. Gelbíčová, M. Florianová, R. Karpíšková

28. Vliv tetracyklinu na tvorbu biofilmu v čistírnách odpadních vod

T. Stachurová, K. Malachová

12:15 – 12:45 Taxonomie (Sál 1)

29. Charakterizácia a diverzita stafylokokov zo zvieracích izolátov v Antarktíde

V. Vrbovská, I. Sedláček, P. Švec, O. Šedo, L. Křištofová, E. Staňková, J. Doškař, R. Pantůček

30. Isolation of rare actinobacteria from acid waterlogged soil

D. Rapoport, M. Mareckova, J. Kopecky

12:45 Slavnostní zakončení (Sál 1)

7. 6. 2019

11:30 – 12:45 Biotechnologie II (Sál 2)

31. Creation and stability testing of the reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by qPCR

M. Beinhauerová, I. Slaná, P. Králík

32. Quantification of qPCR standards using digital PCR

M. Beinhauerova, P. Kralik

33. Kontrola kontaminácie ako pomocný nástroj analýzy vzoriek s nízkou hladinou mikrobiálnej DNA

E. Mravec, E. Budinská, P. Vídeňská

34. Využití Ramanovy spektroskopie při identifikaci původců infekcí močových cest

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

35. Porovnání metod kvantifikace biofilmu: Start of Growth Time (SGT) a kvantifikace pomocí CFU

L. Vacek, Z. Kellar Tučeková, F. Růžička, R. Krumpolec, J. Kellar, M. Černák

12:45 Slavnostní zakončení (Sál 1)

Postery

P 01. Detekcia kryptosporídiového antigénu u hospitalizovaných pacientov

V. Bednárová, K. Petříková, S. Majlingová, J. Gabzdilová, M. Logoida, P. Juriš

P 02. Tvorba komplexního nanokonstrukturu pro léčbu bakteriálních infekcí na bázi synergie antibakteriálního účinku stříbrných nanočástic připravených zelenou syntézou a antibiotika

M. Čížek, K. Sehnal, M. Staňková, M. Dočekalová, D. Uhlířová, M. Gargulák, R. Kizek

P 03. Testování extraktů zázvoru, máty a křenu u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*

S. Lisická, B. Hollá, L. Černohorská

P 04. Screening biotechnologického potenciálu vybraných zástupců rodu *Geobacillus*

X. Kouřilová, I. Pernicová, S. Obruča

P 05. Dva klinicky zajímavé bakteriální izoláty zachycené v NRL pro antibiotika a České národní sbírce typových kultur (CNCTC) v roce 2018 a 2019.

L. Mališová, R. Šafránková, P. Ježek, H. Žemličková

P 06. Role nových cefalosporinů v terapii infekčních komplikací pacientů s termickým traumatem.

A. Mertová, B. Lipový, M. Hanslianová, J. Bartošková, I. Suchánek, P. Brychta

P 07. Antimycobacterial activity of selected ring-substituted 8-styrylquinolines

H. Michnová, Š. Pospíšilová, W. Cieslik, E. Spaczyńska, A. Čížek, R. Musioł, J. Jampilek

P 08. Adaptation of selected PHA producing bacteria to biotechnologically relevant stressors

I. Novackova, D. Kucera, J. Porizka, P. Sedlacek, S. Obruca, I. Pernicova

P 09. Antibiofilm activity of pyrrolidine-substituted derivatives of carbamic acid

Š. Pospíšilová, I. Malík, J. Csöllei, A. Čížek, J. Jampilek

P 10. Role of *Achromobacter xylosoxidans* in chronic sternal osteomyelitis

R. Ramesh, K. Neradova

P 11. SigA a SigB-dependentni promotory u *Corynebacterium glutamicum*

A. Rapoport, J. Nešvera, M. Pátek

P 12. Využitie Ramanovej spektroskopie pri rozlišovaní schopnosti kmeňov tvoriť biofilm

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

P 13. Šíření dřevomorky domácí (*S. lacrymans*) mezi sousedícími zděnými objekty: případová studie

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

P 14. Vymezení nejdůležitějších parametrů aktivity klíšťat na lokalitách v Brně a jeho okolí (od r. 2016)

A. Žákovská, H. Nejezchlebová, M. Dušková a kolektiv studentů: K. Bechníková, M. Dvořák, L. Šmídová, J. Veselý, K. Horáková, S. Tučková, J. Janeček, T. Humeňanský, B. Švejdomá

9:00		10:00		11:00		12:00		13:00		14:00		15:00		16:00		
6.6.	Sál 1	Z	Nejlepší mladi mikrobiologové	V	Oběd	P	Klinická mikrobiologie I	P	Klinická mikrobiologie II	VM	Biotechnologie I	P	Klinická mikrobiologie II	VM	Biotechnologie I	
	Sál 2	H														
	Sál 3															
7.6.	Sál 1		ATM rezistence, faktory virulence I	P	ATM rezistence, faktory virulence II	Tax	Slavnostní zakončení									
	Sál 2			P	Biotechnologie II											
	Sál 3			Poster session												

Poste
r
sessio
n

Z = Slavnostní zahájení, začátek valné hromady ČSSM

VH = Valná hromada ČSSM

P = přestávka

VM = Veterinární mikrobiologie

Tax = Taxonomie

01. Mapovanie úlohy povrchového antigénu CR3-RP kvasiniek rodu *Candida* participujúceho v adherencii a tvorbe biofilmu

J. Dekkerová (1), J. L. Lopez-Ribot (2), E. Borghi (3), G. Morace (3), H. Bujdaková (1)

(1) Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra mikrobiológie a virológie, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, SK

(2) Department of Biology and South Texas Center for Emerging Infectious Diseases, The University of Texas at San Antonio, San Antonio, TX 78249, USA

(3) Department of Health Sciences, San Paolo Medical School, Università degli Studi di Milano, Via A. di Rudini 8, 20142 Milan, IT

jaroslava.dekkerova@uniba.sk

Kvasinkový biofilm formovaný na medicínskych pomôckach je asociovaný s nozokomiálnymi infekciami a je charakteristický vysokou rezistenciou voči antifungálnym látkam. Za najčastejšieho pôvodcu infekcií asociovaných s biofilmom kvasiniek sa považuje *Candida albicans*, avšak výskyt non-*Candida albicans* druhov v klinickom materiáli nie je tiež zanedbateľný. Problematickou je tiež terapia multirezistentných kvasiniek, ako napr. *Candida auris*, preto je dôležité venovať pozornosť výskumu alternatívnych spôsobov terapie. Jedným z takýchto prístupov môže byť aj použitie povrchových antigénov resp. protilátok proti nim. Povrchové antigény reprezentujú zložky bunkovej steny, ktoré sú nevyhnutné pri interakcii kvasinky a hostiteľa počas kolonizácie povrchov, invázie do tkaniva, tvorbe biofilmu či imunitnej odpovedi. Prvá časť práce bola zameraná na identifikáciu antigénu CR3-RP (komplementového receptora 3-podobný proteín). Pomocou imunologických a molekulárno-biologických techník (ELISA, Western Blot) bola potvrdená prítomnosť CR3-RP vo viacerých patogénnych *Candida* sp. Ďalej bol výskum zameraný hlavne na kvasinky *C. albicans*, *C. dubliniensis* a *C. auris*, pri ktorých bol študovaný potenciálny anti-biofilmový účinok polyklónovej protilátky anti-CR3-RP, a to aj na 24-h maturovaný biofilm. Stanovenie citlivosti biofilmov na antifungálne látky (ATF) – kaspofungín (CAS), flukonazol (FLU) a amfotericín B (AMB) odhalilo, že biofilmy *C. auris* sú rezistentné jednak pri pridaní ATF na začiatku, ale aj k 24-h biofilmu. Následne bola porovnaná účinnosť protilátky na tieto biofilmy, ktorá odhalila, že protilátka je v terapii efektívnejšia ako ATF pri aplikácii na začiatku tvorby biofilmu (v čase $t=0$ h; inhibícia biofilmu 73% pre *C. auris* 0390, 36% pre *C. auris* 0383 a 49% pre *C. auris* 0386), ale aj ak sa pridala k 24-h biofilmu (inhibícia 28% pre *C. auris* 0390, 46% pre *C. auris* 0383 a 42% pre *C. auris* 0386). V experimentálnej práci boli tiež využité aj alternatívne modelové systémy pre štúdium biofilmu (*ex vivo* model biofilmu na myšacom jazyku a *in vivo* modelový organizmus *Galleria mellonella*). Výsledky poukazujú na potenciálne využitie protilátky anti-CR3-RP v prevencii či eradikácii kvasinkových biofilmov. Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-15-0347 a grantom VEGA 1/0537/19 financovaného Ministerstvom školstva, vedy výskumu a športu SR.

02. Directly sequenced genomes of contemporary strains of syphilis revealed recombination-driven diversity in genes encoding predicted surface-exposed antigens

L. Grillová (1), D. Šmajš (2)

(1) Biology of Spirochetes Unit, Institut Pasteur, Paris, France

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

Syphilis has been a major scourge of human populations for centuries. Today, syphilis is considered a re-emerging disease with over 5.6 million cases worldwide. However, very little is known about the pathogenesis of syphilis, largely as the result of the inability to routinely propagate *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPA) *in vitro*. TPA infections are usually characterized by fast dissemination, immune evasion and long persistence. We demonstrate, for the first time, that an enrichment using methyl-directed restriction endonuclease can enable complete genome sequencing of TPA isolates directly from biological samples. Thus we were able to avoid culturing of the pathogen in rabbit testes which is a technically challenging process. Using this approach, we determined complete genome sequences, which represents the vast majority (92%) of complete TPA genomes sequenced directly from clinical samples. Further, we were able to address a fundamental question, still open in many bacterial pathogens: how can this important human pathogen escape the immune system and adapt to the host during the infection process?

Our data reveal high genetic variability among genomes of this monomorphic bacterium, and, to our surprise, we identified one half of this diversity to be driven by inter- and/or intra-strain recombination events. While the mechanisms resulting in intra-strain recombination included gene conversion, duplication or deletion of repetitive sequences, and reciprocal translocation, the inter-strain recombination events arose likely during co-infection of patients with treponemes either belonging to two different syphilis clades or two different subspecies of *Treponema* (causing syphilis and bejel). Moreover, the observed recombination-driven diversity strictly corresponded to the residues located at the host-pathogen interface.

This discovery, beyond being relevant to the understanding of basic biology of treponemes, highlights the presence of different repertoires of alleles coding for potential virulence factors, which circulate in the current human population.

03. Přímá detekce *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Escherichia coli* ze vzorků plné krve na principu PCR a T2 vážené magnetické rezonance

J. Hurych (1), M. Antušková (1), E. Bébrová (1), J. Tkadlec (1), J. Beroušek (2), M. Souček (3), V. Martínková (4), V. Hyšperská (5), P. Dřevínek (1)

- (1) Ústav lékařské mikrobiologie, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, CZ
- (2) Klinika anesteziologie, resuscitace a intenzivní medicíny, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, CZ
- (3) Interní klinika, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, CZ
- (4) III. chirurgická klinika, 1. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, CZ
- (5) Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství, 2. lékařská fakulta a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, CZ

Úvod

Mikrobiologická diagnostika infekcí krevního řečiště (IKŘ) se standardně opírá o hemokultivační vyšetření, které má však řadu limitů – zejména nízkou senzitivitu a dlouhý čas do výsledku. Časná a spolehlivá detekce původců IKŘ tak zůstává nenaplněným cílem laboratorní diagnostiky. Příležitostí k jejímu zlepšení se stala v roce 2017 komerčně dostupná platforma využívající magnetické rezonance k detekci ampflikované DNA mikrobiálních buněk šesti bakteriálních druhů ze skupiny ESKAPEc (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*). V tomto projektu jsme si kladli za cíl zhodnotit výhody této inovativní technologie v praxi laboratoře klinické mikrobiologie.

Metodika

Uzavřený systém T2Bacteria (T2Biosystems, USA) simultánně detekuje šest vybraných agens ze 4 ml plné krve. Výsledek je k dispozici v průměru za 3 hodiny 50 minut od vložení materiálu do přístroje. Do studie byli zařazeni pacienti hospitalizovaní na vybraných odděleních Fakultní nemocnice v Motole s podezřením na sepsi, kterým byla paralelně provedena hemokultivace ze 40 až 60 ml krve.

Výsledky

Do průběžné analýzy jsme zařadili 36 pacientů, z nichž 15 mělo pozitivní nález alespoň jednou z aplikovaných metod (u 2 z nich byla identifikována dvě různá agens zároveň). U 4 pacientů panovala plná shoda ve výsledku T2 a hemokultury ale u 4 dalších byla přítomnost bakterií odhalena pouze metodou T2. Skupina hemokultivačně pozitivních/T2 negativních vzorků sestávala z 5 vzorků, kde se jednalo buď o zjevně kontaminující flóru (4 případy), nebo jiného původce nedetekovatelného metodou T2 (1 případ *Streptococcus agalactiae*). U dvou pacientů panovala diskrepance nálezů – 1x systém T2 detekoval *S. aureus*, ale nedetekoval *E. coli* zachycenou v hemokultuře, 1x systém T2 detekoval *P. aeruginosa*, v hemokultuře byl však zachycen *Staphylococcus epidermidis* (zjevně kontaminující flóra).

Závěr

Naše průběžná data poukazují na přidanou hodnotu nové metody v klinicko-mikrobiologické praxi: v 11,1% (4 z 36 pacientů) detekovalo T2 klinicky významné agens nezachycené hemokulturou. Limitací T2 zůstává omezené spektrum detekovaných agens i riziko, byť velmi nízké (2,8% z 36 vzorků), falešně negativního výsledku.

04. Zlepšení diagnostiky *Streptococcus pneumoniae* ve vzorcích z respiračního traktu metodou real-time PCR

R. Kukla (1), R. Bolehovská (1), J. Radocha (2), K. Neradová (1), L. Plíšková (3), P. Žák (2), H. Žemličková (1,4)

(1) Ústav klinické mikrobiologie, Fakultní nemocnice Hradec Králové a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, CZ

(2) IV. interní hematologická klinika, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, CZ

(3) Ústav klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice a Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, CZ

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

Úvod

Streptococcus (S.) pneumoniae je významným patogenem člověka způsobující komunitní pneumonie, sinusitidy, otitidy, meningitidy i septické stavy. Průkaz DNA *S. pneumoniae* metodou PCR ve vzorcích z respiračního traktu je náročný vzhledem k velké podobnosti některých viridujících streptokoků s pneumokoky. Jedná se zejména o *S. mitis*, *S. pseudopneumoniae* nebo *S. oralis*. Z tohoto důvodu jsme se zaměřili na zlepšení diagnostiky pneumokoků metodou real-time PCR (RT-PCR).

Materiál a metody

V naší laboratoři jsme na základně známých sekvencí primerů a sond zavedli metodu RT-PCR pro průkaz genů *cpsA*, *lytA* a *ply* specifických pro pneumokoky. Ověřili jsme negativní specifitu na 80 kmenech viridujících streptokoků a pozitivní specifitu na 15 kmenech pneumokoků. Kmeny byly identifikovány na základě typického růstu, citlivosti k optochinu, rozpustnosti ve žluči a metodou MALDI-TOF MS. Rovněž jsme ověřili účinnost RT-PCR ve vzorcích od pacientů s komunitní pneumonií.

Výsledky

Zjistili jsme, že geny *cpsA* a *lytA* mají pro pneumokoky 100% negativní i pozitivní specifitu. U genu *ply* byla negativní specifita hodnocena jako nízká, neboť uvedený gen byl přítomen i u 9 (45 %) kmenů *Str. mitis* a u 2 (100 %) kmenů *Str. pseudopneumoniae*. Z 25 klinických vzorků od pacientů s pneumonií, byla kultivačně nebo antigenem v moči u 12 z nich prokázána pneumokoková etiologie. Metodou RT-PCR byla DNA *Str. pneumoniae* prokázána u 20.

Závěr

V současnosti nabývá diagnostika pneumokoků ve vzorcích z respiračního traktu nezávislá na kultivačních metodách stále většího významu. Pacienti s komunitní pneumonií jsou často empiricky léčeni širokospektrými antibiotiky, čímž jsou negativně ovlivněny výsledky kultivace. U RT-PCR jsme ověřili analytickou specifitu pro detekci DNA *Str. pneumoniae* a rovněž jsme metodu aplikovali na klinické vzorky. Potvrdili jsme, že samotná detekce v minulosti používaného *ply* genu je problematická, vzhledem k pozitivitě u 45 % kmenů *S. mitis*. Pro detekci DNA pneumokoků ve vzorcích z respiračního traktu doporučujeme používat RT-PCR průkaz všech tří genů.

Práce byla podpořena z projektu Ministerstva zdravotnictví, č. 17-28539A.

05. Využití metody celogenomové sekvenace v surveillance invazivního meningokokového onemocnění v ČR

M. Honskus (1), Z. Okonji (1), M. Musílek (1), J. Kozáková (1), P. Křížová (1)

(1) Národní referenční laboratoř pro meningokokové nákazy, Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

Cílem studie bylo metodou celogenomové sekvenace (WGS) zmapovat genetickou diverzitu izolátů *Neisseria meningitidis* séroskupiny W, které byly zachyceny na území České republiky v letech 1984-2017. Důvodem byl celosvětový vzestup hypervirulentní linie W: P1.5,2:F3-3:ST-11 (cc11) v posledních letech. Pro studii byl vybrán soubor 31 izolátů, které pocházely z invazivního meningokokového onemocnění (n = 22) i od zdravých nosičů (n = 9). Izoláty byly charakterizovány klasickými metodami a zároveň celogenomově sekvenovány. S využitím PubMLST databáze pak proběhla molekulární charakterizace izolátů a sestavení fylogenetické sítě, která zobrazuje vzájemnou příbuznost izolátů. Dalším krokem bylo porovnání s celosvětovými WGS daty, které proběhlo obdobným způsobem. Metoda WGS poskytla vysoce přesnou molekulární charakterizaci izolátů *N. meningitidis* W a umožnila identifikaci dosud nepopsaných alelových variant i sekvenačních typů. Analýza genetické diverzity celogenomových dat pak umožnila stanovit vzájemnou příbuznost mezi jednotlivými izoláty. Bylo zjištěno, že současný celosvětový vzestup hypervirulentní linie W: P1.5,2:F3-3:ST-11 (cc11) se zatím České republice vyhýbá, jelikož jediný izolát, který do této hypervirulentní linie patřil, pocházel kanadského cestovatele kanadské národnosti. WGS data také poskytla přesnější informace o teoretickém pokrytí izolátů novými vakcínami proti *N. meningitidis* B. Metoda WGS prokázala vyšší diskriminační možnosti v porovnání s klasickými sekvenačními metodami a poskytla detailní pohled na vzájemnou příbuznost izolátů *N. meningitidis* W. Zařazení metody WGS do rutinní molekulární surveillance invazivního meningokokového onemocnění v České republice je žádoucí.

Poděkování

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. 15-34887A. Veškerá práva podle předpisů na ochranu duševního vlastnictví jsou vyhrazena.

06. Kazuistika. Závažná alimentární infekce s překvapivým zdrojem.

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

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

Alimentární onemocnění jsou infekční onemocnění se zdrojem v potravě či vodě. Člověk se tak nakazí požitím původce, který může být bakteriální, mykotický či parazitární. Alimentární infekce mohou být typické (s typickými gastrointestinálními projevy) či atypické (s atypickými projevy, např. neurologickými). Na projevech těchto onemocnění se často podílí toxiny uvolněné do potravy daným mikroorganismem. Terapie takovýchto nákaz se většinou obejde bez podávání antibiotik. Některé alimentární infekce ovšem mohou mít pro pacienta fatální následky.

Prezentuji případ 31-letého muže původně hospitalizovaného pro rehydrataci po několik dní trvajícím zvracení, kdy uvádí, že něco špatného snědl. U pacienta se postupně rozvinula změna hlasu (později až dysfagie), malátnost a dvojité vidění. Zobrazovací vyšetření ukázala rozšířené střevní kličky až ileózního charakteru. Nakonec neurologické vyšetření odhalilo mnohočetnou parézu hlavových nervů.

Po včasné suspekci ošetřujících lékařů na toto „učebnicové“ onemocnění byl prokázán původce infekce ze stolice i potravy. Kromě alimentárních infekcí může způsobovat i infekce ranné, které vznikají po kontaktu rány s půdou. Tato infekce vyžaduje specifickou terapii, kterou je nutné podat co nejdříve.

Z obvyčejné alimentární infekce se tak vyvinul stav, který vyžadoval téměř 20 dní hospitalizace pacienta a následnou logopedickou a nutriční terapii.

07. Kazuistika – nález neobvyklého původce otitis externa

G. Kroneislová (1), D. Balíková (1)

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

Úvod

Vnější ušní kanál je přirozeně osídlen bakteriální flórou. Nejčastějšími původci zánětu vnějšího ucha jsou *Staphylococcus aureus*, *Candida sp.* a *Pseudomonas aeruginosa*.

Metodika

Výtěr z ucha dítěte byl do laboratoře přijat standardně na transportním Amies médiu. Byl naočkován na krevní agar s čarou (*Staphylococcus aureus* CNCTC 6719), čokoládový agar, McConkey agar a Sabouraudův agar. K pomnožení byl použit živný bujón. Naočkované plotny byly inkubovány při cca 37 °C 20–24 h, Sabouraudův agar 48 h. Krevní a čokoládový agar v CO₂ atmosféře. Pomnožení bylo provedeno cca za 24 h na krevní agar a McConkey agar. Dourčení bylo provedeno pomocí MALDI-TOF (Bruker), ověření pomocí ENTEROtestu 24. K potvrzení byl vzorek poslán do Národní referenční laboratoře pro *E. coli* a shigely.

Výsledky

Po 24 h byl na krevním agaru četný nález hemolytických kolonií, které byly identifikovány MALDI-TOF (Bruker) jako *Vibrio albensis*. To je nepatogenní environmentální druh, ale standardní knihovna (MBT Compass Library) nedokáže určit *Vibrio cholerae*, proto bylo potřeba provést ENTEROtest 24 a aglutinaci kmene *Vibrio cholerae* O1 a vzorek byl přeposlán do Národní referenční laboratoře pro *E. coli* a shigely, která má k dispozici "vojenskou" databázi (Biotyper Security Relevant Library - obsahující i spektra vysoce patogenních mikroorganismů patřících do skupiny BSL-3). Zde byla potvrzena identifikace *Vibrio cholerae* non O1/ non O139.

Závěr

Záchyt *Vibrio cholerae* z výtěru z ucha jako původce otitis externa je zcela neobvyklý, přesto je možný.

08. Očná toxoplazmóza u HIV pozitívneho pacienta

K. Bírová (1), F. Ondriska (1,2), V. Boldiš (2), L. Soják (3), P. Bukovinová (3), J. Burdová (4), P. Mikula (5)

(1) Katedra laboratórných vyšetrovacích metód v zdravotníctve, Fakulta zdravotníctva a sociálnej práce, Trnavská univerzita v Trnave, Trnava, SK

(2) Oddelenie parazitológie, Medirex a.s., Bratislava, SK

(3) Klinika infektológie Lekárskej fakulty Univerzity Komenského a Slovenskej zdravotníckej univerzity, Bratislava, SK

(4) Fakulta sociálnych vied a zdravotníctva, Univerzita Konštantína Filozofa, Nitra, SK

(5) Klinika rádiológie, Bratislava, SK

Toxoplazmóza u pacientov s HIV infekciou najčastejšie postihuje CNS, zriedkavejšie býva lokalizovaná v oku. V našej práci predstavujeme zaujímavý prípad mozgovej a očnej toxoplazmovej koinfekcie u HIV pozitívneho pacienta.

35-ročný heterosexuál s nechráneným pohlavným stykom v minulosti, bol hospitalizovaný na neurologickej klinike pre silný epileptický záchvat. Ďalej bola zistená somnolencia, porucha reči a stredne ťažká pravostranná hemiparéza s intermitentnými teplotami. CT vyšetrením boli zistené cystické expanzie temporálne a okcipitálne vpravo. 12 dní od epizáchvatu sa objavili poruchy zraku. Očné vyšetrenie ľavého oka ukázalo známky obliterujúcej vaskulitídy a flebitídy s edémom terča zrkovitého nervu a makuly a pribudli známky chorioretinitídy. Na základe týchto nálezov bola podávaná antiedematózna liečba (Manitol, Fortecortin). Stav rýchlo progredoval do úplnej slepoty. Okrem týchto nálezov sa zistila vysoká reaktivita na HIV infekciu ($CD4+ = 24/\mu l$). Pátralo sa po etiológii, v sére pacienta sme zistili vysoké titry proti-toxoplazmových IgG ($>200UI/ml$), IgA hraničné titry, IgM a KFR boli negatívne. Na základe tohto nálezu bola nasadená anti-toxoplazmová liečba. Kontrolné vyšetrenie MR mozgu zistilo regresiu ložísk vo veľkosti. Pre podozrenie na očnú toxoplazmózu bolo vykonané paralelné vyšetrenie séra a sklovca, kde sme zistili autochtónnu produkciu anti-toxoplazmových protilátok triedy IgG v oku, prítomnosť toxoplazmového infektu bola potvrdená pozitivitou PCR v sklovci. Ostatné markery (CMV, HSV, VZV, EBV, toxokaróza) boli negatívne. Kontrolné vyšetrenia po liečbe ukázali vzostup $CD4+$ na $180/\mu l$, v MRI vyšetrení sa zaznamenala postupná regresia ložísk v mozgu. Epi-paroxyzmy boli zaznamenané po liečbe dva, amauróza pretrvávala.

Záver: Išlo o pomerne raritný prípad neuro a očnej toxoplazmózy u HIV+ pacienta. Napriek rádiologickým a oftalmologickým nálezom na toxoplazmovú etiológiu ochorenia bolo zamerané až po výsledkoch laboratórných vyšetrení.

09. Role enterovirových a adenovirových infekcí v patogenezi celiakie

K. Chudá (1), C. R. Kahrs (2, 3, 4), G. Tapia (2), L. C. Stene (2), K. Mårild (5), T. Rasmussen (6), S. Kjersti (7), K. S. Rønningen (7), K. E. A. Lundin (8, 9), L. Kramna (1), O. Cinek (1), K. Størdal (4, 2)

(1) Pediatrická klinika, 2. lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice v Motole, Praha, Česká republika

(2) Norský institut veřejného zdraví, Oslo, Norsko

(3) Institut klinické medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Oslo, Oslo, Norsko

(4) Pediatrická klinika, Østfold Hospital Trust, Grålum, Norsko

(5) Pediatrická klinika, Institut klinických věd, Sahlgrenska akademie, Univerzita Gothenburg a Dětská nemocnice královny Silvie, Gothenburg, Švédsko

(6) Oddělení zdravotnických informačních technologií, Útvar institucionálních zdrojů, Norský institut veřejného zdraví, Oslo, Norsko

(7) Oddělení pro pediatrický výzkum, Fakultní nemocnice Oslo, Oslo, Norsko

(8) Oddělení gastroenterologie, Fakultní nemocnice Rikshospitalet, Oslo, Norsko

(9) Centrum pro výzkum celiakie K.G. Jebsen, Univerzita Oslo, Oslo, Norsko

Úvod: Celiakie, chronické imunitně zprostředkované onemocnění sliznice tenkého střeva, postihuje pacienty s genetickými predispozicemi konzumující lepek, manifestuje se většinou již v dětském věku. Pro iniciaci nemoci jsou klíčové faktory prostředí. Naše práce se zaměřila na adenovirové a enterovirové střevní infekce v norské prospektivně sledované novorozenecké kohortě nositelů HLA alel DR4-DQ8/DR3-DQ2, přispívajících k vyššímu riziku celiakie. V rámci kohorty byla vytvořena studie případů a kontrol.

Cíl: Určit, zda běžné střevní infekce lidským enterovirem nebo adenovirem predikují rozvoj celiakie.

Materiál a metody: Celiakie byla diagnostikována dle standardních kritérií. Markery celiakie byly testovány ve vzorcích krve odebíraných ve věku 3, 6, 9 a 12 měsíců a poté jednou ročně. Enterovirus a adenovirus byl detekován pomocí real-time PCR ve vzorcích stolice odebíraných jednou měsíčně od 3 do 36 měsíců života. K odhadu síly asociace mezi virovými infekcemi a markery celiakie byly použity adjustované poměry šancí (aOR) získané z logistické regrese se smíšenými efekty.

Výsledky: Z 220 dětí ve věku $9,9 \pm 1,6$ let (průměr \pm směrodatná odchylka), bylo 25 dětí diagnostikováno s celiakií. Ke každému případu byly přiřazeny dvě kontroly. Enterovirus byl detekován v 370 (17 %) z 2 135 vzorků stolice a byl signifikantně častěji zachycený ve vzorcích odebraných před rozvojem prvních markerů celiakie v porovnání s kontrolami (aOR = 1,49; 95% interval spolehlivosti, 95% CI = 1,07-2,06; $p = 0,02$). Riziko stoupalo se zvyšující se kvantitou virů ve vzorcích ($>100\ 000$ kopií/ μ l) (aOR = 2,11; 95% CI = 1,24-3,60; $p = 0,01$) a s dlouhotrvajícími infekcemi (>2 měsíců) (aOR = 2,16; 95% CI = 1,16-4,04; $p = 0,02$). Signifikantně byly asociovány s celiakií oba běžně detekované enterovirové druhy, *Enterovirus A* a *Enterovirus B*. Asociace nebyla nalezena pro enterovirové infekce prodělané po rozvoji markerů celiakie. Adenovirus nebyl s celiakií asociován.

Závěr: Vyšší frekvence enterovirů v časném dětství byla v této longitudinální studii asociována s následnou celiakií. Díky prospektivnímu designu studie lze oproti průřezovým studiím vyloučit zpětnou kauzalitu.

10. Adenovirus 31 u imunosuprimovaných pediatrických pacientů FN Motol: dá se nosokomiální přenos odhalit pomocí sekvenování nové generace?

L. Kramná (1), A. Briksí (2), P. Hubáček (2), O. Cinek (1)

(1) Pediatrická klinika a Ústav lékařské mikrobiologie, Univerzita Karlova v Praze a FN Motol, Praha, CZ

(2) Oddělení virologie, FN Motol, Praha, CZ

Adenovirové infekce významně zvyšují riziko morbidity a mortality u pacientů po imunosupresi. Existují dva možné způsoby vzniku nebo rozvoje infekce: reaktivace latentního viru v důsledku imunosuprese a nosokomiální přenos. V letech 2011–2014 jsme zaznamenali prudký nárůst adenovirových infekcí na dětské transplantační jednotce FN Motol. Cílem této studie bylo zjistit, zda se jedná o nosokomiální přenos pomocí porovnávání celých adenovirových genomů.

Celogenomové sekvenování dvou nejčastějších sérotypů HAdv31 a HAdv2 bylo provedeno u celkem 69 pacientů z nichž každý poskytl 1–22 vzorků stolice. Vzorky pokrývaly období 2006–2016. Pro srovnání s adenovirovými genomy vyskytujícími se mimo FN Motol byl použit HAdv31 od dospělého pacienta po transplantaci na jiném pracovišti v roce 2014. Příprava vzorku spočívala v izolaci DNA viru, přepisu genomu pomocí Klenowova fragmentu a náhodných primerů a amplifikaci pomocí PCR. Pro přípravu knihovny byl použit kit Nextera XT a vzorky byly sekvenovány na přístroji MiSeq, Illumina.

Fylogenetická analýza celých genomů byla možná pouze pro sérotyp HAdv31, HAdv2 nebyl ze sekvenáčnických dat dostatečně pokryt. Srovnání genomů HAdv31 ukázalo vznik klastrů velmi příbuzných sekvencí vyskytujících se na transplantační jednotce v různých letech: klaster z roku 2006 (2 pacienti, naprosto shodné genomy), klaster 2009–2010 (3 pacienti, naprosto shodné genomy), klaster z let 2012–2015 (20 pacientů, maximální rozdíl v genomech HAdv31 4 nukleotidy), klaster 2016 (4 pacienti, naprosto shodné genomy). Genom kontrolního HAdv31 neklastroval s genomy odebranými na transplantační jednotce ve stejném časovém období (klaster zahrnující rok 2014), nicméně byl velmi příbuzný klastru z roku 2016.

Sekvenování nové generace prokázalo vznik klastrů téměř shodných genomů HAdv31 vyskytujících se na transplantační jednotce FN Motol v různých časových obdobích což naznačuje na možný nosokomiální přenos. Porovnání s kontrolním genomem viru odebraným mimo FN Motol ukázalo existenci velmi příbuzných adenovirových genomů vyskytujících se populaci v různých časových obdobích a místech, což komplikuje využití této metody pro průkaz nosokomiálního přenosu.

11. Extraintestinální améboza po návratu ze Sierra Leone

J. Peštová (1), V. Skála (1, 3), J. Ulrych (2), E. Nohýnková (3)

1) Klinická mikrobiologie a ATB centrum, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta UK, Praha, CZ

2) I. Chirurgická klinika, Všeobecná fakultní nemocnice v Praze a 1. lékařská fakulta UK Praha, CZ

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

Entamoeba histolytica (Amebozoa: Archamoebae) patří mezi kosmopolitní parazitická protista, vyskytující se zejména v rozvojových zemích. Sporadicky však byly i v ČR zaznamenány autochtonní infekce.

Trofozoiti a cysty této améby jsou vylučováni ve stolici. K infekci člověka může dojít požitím zralých cyst v kontaminované vodě, potravě či ze znečištěných rukou. Po excystaci améb dochází v lumen tlustého střeva k dělení trofozoitů a produkci cyst, které mohou ve vnějším prostředí přežít až měsíce.

E. histolytica se ve střevě člověka může vyskytovat ve dvou formách, a to jako forma minuta nebo forma magna. Forma minuta žije v lidském střevě jako komenzál a produkuje odolné cysty. Člověk v tomto případě slouží jako rezervoár s asymptomatickou nákazou. Za určitých podmínek se však forma minuta může transformovat na formu magna, jež invaduje střevní sliznici. Forma magna neprodukuje cysty a není tedy přenosná na další hostitele. Tato forma způsobuje amébovou dyzenterii, jež je charakteristická průjmy s krví a hlenem, doprovázenými dalšími gastrointestinálními symptomy. Améby pronikají střevní sliznicí do submukózy a vytvářejí typické léze lahovitého tvaru. To může vést k perforaci střeva a rozvoji peritonitidy. Améby také mohou být hematogenně zaneseny do jiných orgánů, a to např. do jater, plic, mozku, sleziny a dalších měkkých tkání, kde jejich působením vzniká absces. Nejčastější extraintestinální formou bývá jaterní améboza. Nezřídka dochází také k ruptuře jaterního abscesu a k jeho provalení přes bránici do pleurální oblasti a do plic.

K diagnostice extraintestinální amébozy je nezbytné zachycení léze pomocí zobrazovacích metod a serologické vyšetření na průkaz *E. histolytica*. Vzhledem k tomu, že vnitřek abscesů je vyplněn nekrotickou tkání a tekutinou a živé améby se nachází pouze na okraji lézí, je mikroskopická diagnostika punktátu nepřínosná. Pomocí PCR lze však zachytit DNA améb z dutiny abscesu. Přibližně u 20 % pacientů s extraintestinální amébozou jsou zároveň ve stolici zachyceni trofozoiti či cysty.

Kazuistika v tomto příspěvku demonstruje pacienta s bolestmi na hrudi a s respirační symptomatologií, kde byl rozvinut jaterní amébový absces a fluidothorax.

Odhalení jaterního abscesu pomocí zobrazovacích metod v kontextu s cestovatelskou anamnézou vedlo k podezření na invazivní amébozu a provedení série výše zmíněných vyšetření.

12. Fluorochinolóny – výhody verzus riziká.

M. Šefranková (1)

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

V dôsledku aktuálneho nadmerného užívania antibiotík, dochádza k explozívnomu nárastu rezistentných mikrobiálnych patogénov. Pri infekciách urogenitálneho traktu sú prioritne indikované fluorochinolóny, ktoré sú v podstate chemoterapeutiká. Určite nejde o lieky prvej voľby. Indikácia by mala byť skôr len pri horných močových cestách. Pri respiračných ochoreniach ide viacmenej o kontraindikáciu. Za výhody sa považuje ich účinnosť a finančná nenáročnosť. Priaznivý je aj biologický polčas, postantibiotický efekt a zároveň ľahký prienik do buniek, čo sa uplatňuje pri liečbe intracelulárnych patogénov. Veľkou devízou je aj možnosť sekvenčnej terapie.

Mnohé aktuálne štúdie však naznačujú, že s bezpečnosťou je to nie až také ideálne. Dynamika toxických účinkov je lekárom a pacientom do značnej miery neznáma. V roku 2015 FDA (Food and Drug administration) vydal odporúčanie, výraznejšie uvádzať na baleniach varovania pred nežiadúcimi účinkami. Následne o rok na to, zverejnil stanovisko, že pacienti s nekomplikovanými infekčnými chorobami by nemali byť liečení touto skupinou antibiotík. V USA pre ťažkú toxicitu stiahli niekoľko fluorochinolónov a ukazuje sa, že sa v tom bude pokračovať. Rovnako slovenský úrad ŠÚKL (Štátny ústav pre kontrolu liečiv) vyzýva na obmedzenie ich indikácie. Nepopierateľné sú taktiež závažnejšie vedľajšie účinky, ktoré aj napriek tomu, že sa liečba preruší, naďalej prebiehajú.

Fluorochinolóny sa taktiež vo veľkej miere indikujú vo veterinárnej medicíne a vo veľkochovoch, čím humánna populácia významne stráda. Po útokoch z 11. septembra 2001 v USA, sa ľudia vo veľkej miere chránili pred antraxom hlavne ciprofloxacínom. Preskripcia sa tak znásobila desaťnásobne a jej nárastom začala stúpať aj rezistencia, ktorá sa vytvára pomerne rýchlo, niekedy už počas liečby. Aj centrálné laboratórium spoločnosti Alpha medical v Bratislave zaznamenáva prudký pokles rezistencie na značne populárny ciprofloxacín. Ten sa pravdepodobne vytratí z trhu a to i napriek tomu, že je zaradený do zoznamu základných liekov, ktoré vypracovala WHO.

13. Sledování výše aktivity a promoření klíšťat na vybrané spirochetální mikroorganismy, zaměřeno na *Borrelia burgdorferi* sensu lato

K. Horáková (1,2), S. Tučková (1,2) A. Žáková (1), H. Nejezchlebová (1)

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

(2) Gymnázium a ZUŠ Šlapanice, Šlapanice, CZ

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je hematofágní členovec rozšířený po celé České republice, ale i jinde v Evropě a v Severní Americe. Jedná se o hlavního přenašeče spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), které způsobují Lymeskou borreliózu. Nejúčinnější prevenci proti klíšťatům představují repelenty. Každoročně onemocní v České republice průměrně 4000 obyvatel, čímž se Česká republika řadí mezi státy s největší nemocností v Evropě.

Tato práce je zaměřena na sledování aktivity a pozitivitu klíšťat v lokalitě Pozořice-Pančava. Aktivita byla sledována každotýdenním sběrem a působením repelentů. Následovalo vyhodnocení přítomnosti spirochét *Borrelia burgdorferi* sensu lato pomocí metody mikroskopie v zástinu – DFM (Dark Field Microscopy) a pomocí metod molekulární biologie – PCR (Polymerase Chain Reaction) společně s metodou gelové elektroforézy.

V období od 6.4.2018 do 9.11.2018 bylo natchytáno 218 klíšťat *Ixodes ricinus* v lokalitě Pozořice-Panská zahrada metodou vlajkování. Množství klíšťat se měnilo v závislosti na teplotě, vlhkosti, ročním období, délce porostu a dalších faktorech. U metody DFM byly pozorovány spirochéty ve 13 z 86 vzorků (15,11 %). Metodou PCR byla zjištěna pozitivita na DNA *Borrelia burgdorferi* s. l. u minimálně 9 jedinců z 48 (18,75 %). Dále byla porovnávána účinnost čtyř různých repelentů. Dle našich experimentů se jako nejúčinnější jeví *Repellent Predator Outdoor* impregnace na oděvy, u kterého byla pozorována úspěšnost odpuzení 96 %. Výsledky tedy celkově ukazují, že repelenty odpuzují vysoké procento klíšťat.

V lokalitě byl natchytán podprůměrný počet klíšťat kvůli již výše zmíněnému suchu a sekání trávy. Byla dokázána závislost klíšťat na vlhkosti. Počet klíšťat pozitivních na spirochéty *Borrelia burgdorferi* sensu lato se v České republice pohybuje mezi 5–25 %, tudíž námi monitorovaná lokalita je téměř uprostřed tohoto rozmezí.

14. Aktivita klíšťat *Ixodes ricinus* v lokalitě Brno-Líšeň

K. Bechníková (1), A. Žáková (1)

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

Klíšťata jsou přenašeči různých zoonotických onemocnění. Monitoring výskytu těchto drobných členovců je tedy poměrně důležitým nástrojem prevence. Tato přednáška se zaměřuje na výskyt klíšťat druhu *Ixodes ricinus* mezi květnem roku 2017 a dubnem 2018 v Brně – Líšni, konkrétně v lokalitě Staré Zámky. Tato lokalita je oblíbená pro vycházky a venčení psů, zároveň zde žije velké množství ptáků a drobných savců, kteří slouží jako rezervoáry různých zoonotických onemocnění. V lokalitě se nachází světlý les, vysychavý potok a pěší cesta s listovou hrabankou. Mezi typické druhy zde patří *Acer campestre* (javor babyka), *Acer pseudoplatanoides* (javor klen) a *Alliaria petiolata* (česnáček lékařský). Lokalita se nachází 325 m n. m. Monitoring probíhal metodou vlnkování jednou týdně v přesně stanovenou dobu, odchyceno zde bylo 197 klíšťat, nejvíce zastoupené vývojové stadium byly nymfy (74). Kritické měsíce jsou duben a květen, kdy bylo za celý měsíc odchyceno přes 60 klíšťat. Na této lokalitě se podařilo prokázat závislost počtu odchycených klíšťat na teplotě, závislost na vlhkosti nebyla prokázána.

15. Isolace extremofilních bakterií produkujících polyhydroxyalkanoáty z přírodních vzorků

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

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

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

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery, které jsou vhodnou alternativou k polymerům vyráběných z ropy. Jsou plně biodegradabilní a biokompatibilní. Také je lze vyrábět z obnovitelných zdrojů. Lze je použít jako obalový materiál či jako vstřebatelné chirurgické nitě. Jejich nevýhodou je však jejich vysoká cena. Snížení ceny biotechnologické produkce lze dosáhnout například použitím odpadních zdrojů jako uhlíkatého substrátu či využitím extremofilních bakterií.

Extremofilní mikroorganismy jsou organismy, které žijí v extrémních podmínkách, jako je například vysoká teplota, kyselé nebo zásadité pH či vysoká salinita. Použití extremofilů pro biotechnologické produkce přináší mnoho výhod, jednou z nich je snížení ceny produkce, díky kultivaci v semisterilních či dokonce nesterilních podmínkách.

Z přírodních zdrojů jako je kompost či aktivovaný kal lze izolovat extremofilní bakterie, které jsou schopny produkce PHA. V našem experimentu byl použit kompost z kompostárny v Blansku a kal z čističky odpadních vod Brno-Modřice a Bystřice pod Hostýnem. Také bylo použito několik isolačních technik, jako je například aerobní dynamické krmení (ADK), které vede k obohacení mikrobiálního konsorcia o PHA produkujících bakterií, selektivní barvení PHA produkujících kolonií pomocí Nilské červeně. Další použitou technikou byl námi navržený originální postup, kdy je směsná kultura vystavena působení hypertonického a následně hypotonického šoku. Logika tohoto postupu je založena na té skutečnosti, že PHA poskytují bakteriálním buňkám ochranu vůči osmotickému namáhání. Pomocí tohoto původního postupu jsme byli schopni vyisolovat extremofilní producenty PHA schopné akumulace PHA až do 60 % suché hmoty buněk.

16. Valorization of pomegranate residue by solid-state fermentation with *Cunninghamella echinulata*

M. Janák (1, 2), M. Dourou (2), M. Čertík (1), G. Aggelis (2)

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

(2) Division of Genetics, Cell & Developmental Biology, Department of Biology, University of Patras, 26504 Patra, Greece

Pomegranate residues (PR) consist of pomegranate peel (PP), seeds (PS) and juice (PJ) as environmental burden, that contains a variety of assimilable carbon sources and therefore they can be considered as a resource that could be valorized as a substrate for various microorganisms, rather than waste. On the other hand, PR also contains natural inhibitors of microbial growth, such as phenolic compounds (PC) (i.e. ellagic acid, gallic acid, caffein acid). Lower filamentous fungi belonging to *Cunninghamella* genus can utilize reducing sugars or polysaccharides as starch and convert them into lipids containing γ -linolenic acid (GLA) but PC may cause inhibition of growth. GLA is nutritionally important for human as it is an intermediate for the biosynthesis of prostaglandins, prostacyclins, and tromboxanes. Fungal solid-state fermentation (SSF) has been optimize as an effective technology for the valorization of various waste agro-industrial byproducts (cereals, fruits). SSF is a fermentation technique that is executed on solid substrate in absence of free water.

Solid-state fermentations with *C. echinulata* CCF 2195 strain were performed in HDPE bags with pure pomegranate residue (PR) and with mixtures of PR with wheat bran (PRWB) or oat flakes (PROF). The substrate was inoculated with spore suspension and fermentations were carried out for 5 days at 25 °C. Substrate reducing sugars, polysaccharides and phenolics were spectrophotometrically determined. Determination of the fatty acid composition of fermented bioproduct (BP) lipids was performed by gas chromatography (Agilent Technologies 7890 A) equipped with a flame ionization detector.

C. echinulata was able to grow on mixtures of PPWB and PPOF containing PR up to 30%. The substrate utilization was gradually reduced with the increase of PR content in the substrate. In SSFs with pure PR growth was completely inhibited. GLA yields in BPs of mixtures PRWB with 30% of PR were 3.2 mg / g of BP that represents 7.0% of GLA in total fatty acids (TFA) and 2.5 mg / g of BP in PPOF mixtures with 20% of PR, that represents 4.5 % of GLA in TFA. The present study provides new perspectives for the valorization of PR by SSFs with oleaginous fungi.

Acknowledgement: Erasmus+ Traineeship program.

17. Detekce biofilmů u octových bakterií

L. Bambasová (1), K. Loupancová (1), S. Sedláčková (1), E. Šviráková (1)

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

U nealkoholických nápojů bývá případná bakteriální kontaminace často spojována s octovými bakteriemi, které mají statut technologicky nežádoucích bakterií. Je pro ně typická tvorba obtížně odstranitelných biofilmů. Finální výrobky, kontaminované těmito bakteriemi a jejich biofilmy, mají negativně pozměněnou chuť, vůni, barvu, texturu a stávají se defektními. V průmyslu výroby nealkoholických nápojů je proto důležité věnovat pozornost především účinným sanitačním procesům při odstraňování octových bakterií a jejich biofilmů, a také metodám jejich rychlé detekce.

Cílem této práce je zjistit schopnost tvorby biofilmů u 9 kmenů octových bakterií, (*Gluconoacetobacter hanseii* CCM 1808, *Gluconoacetobacter liquefaciens* CCM 3621, *Gluconoacetobacter xylinus* CCM 3611^T, *Gluconobacter albidus* CCM 2365, *Gluconobacter cerinus* CCM 1792, *Gluconobacter cerinus* CCM 1806^T, *Gluconobacter oxydans* CCM 1772, *Gluconobacter oxydans* 3618, *Kozakia baliensis* CCM 7137), která u nich prozatím nebyla testována.

Tvorba biofilmů byla u testovaných kmenů prokázána za pomoci třech detekčních metod, a to modifikované Christensenovy zkumavkové metody v mikrotitračních destičkách, kultivační metody s využitím agarů s kongo-červení a sprayové metody pro rychlou detekci povrchových biofilmů vyvinuté společností Betelgeux - Christeys Food Hygiene (Valencie, ESP). Bylo zjištěno, že většina testovaných octových bakterií byla schopna tvořit biofilmy, a že výsledky získané s použitím všech detekčních metod se shodovaly.

Závěrem bylo možné konstatovat, že výsledky této práce mohou být využity zejména v průmyslu výroby nealkoholických nápojů při eliminaci octových bakterií a jejich biofilmů, a při zvyšování jejich zdravotní bezpečnosti a jakosti.

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

18. Cold Plasma as a Novel Strategy to Fungal Inactivation with Impact on Mycotoxin Production

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

Aspergillus spp. colonizes a wide variety of foods and commodities, such as cereal grains, peanuts, tree nuts and other. Food contamination by *Aspergillus* spp. is a huge problem, mainly due to the mycotoxins production. Aflatoxins, ochratoxins, patulin and cyclopiazonic acid produced by this genus have a negative impact on human health but also on the economy. Minimizing fungal infection is so essential to manage mycotoxin contamination, but many control methods are not without their own safety concerns for the consumers. The cold plasma treatment has been shown to be suitable tool for fungal and mycotoxin decontamination. In this study, we focused on devitalisation effects of plasma, mode of plasma action and affecting of the mycotoxin production. *Aspergillus* species were treated by cold atmospheric pressure plasma generated by the Diffuse Coplanar Dielectric Barrier Discharge in ambient air. The decrease in viability was detected after short time of plasma treatment in all tested species. A loss of the integrity and oxidative changes of the envelope structures were determined in plasma treated cells depending on the plasma dose. Moreover, an antioxidant defense system was activated, which has been reflected in increased enzyme activities and in a reduction of low molecular weight antioxidants. Changes in production of total aflatoxins and ochratoxin A were observed after cultivation of plasma treatment conidia. Based on results, the use of low-temperature plasma is promising method to decontamination this fungus with influence on mycotoxin production depending on plasma treatment time.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-16-0216 and the STU Grant Scheme for Support of Young Researchers.

19. The Effect of Non-thermal Plasma on Microorganism Inactivation and Germination Improvement on Cereal Seeds

L. Hoppanová (1), V. Medvecká (2), J. Dylíková (1), A. Zahoranová (2)

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

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

Non-thermal plasma (NTP) generated at atmospheric pressure is a promising alternative method in agriculture. The application of NTP in microbial decontamination and improvement of seeds physiological parameters present an ecological and economical alternative to traditional chemical methods of seed disinfection.

In this work, we studied the effect of NTP treatment on cereal seeds. The atmospheric pressure ambient air plasma generated by the Diffuse Coplanar Surface Barrier Discharge was used for plasma treatment. The impact of NTP treatment on inactivation of naturally occurring microorganisms localized on surface of seeds and on the surface artificially infected by filamentous fungi was determined. The inactivation effect of NTP on fungi increased with increasing plasma treatment time. We observed the effect of low-temperature plasma on the germination and on the basic growth characteristics of seedling. Short time application of low-temperature plasma on seeds had no effect on germination but stimulated the seedlings vigor index. The negative effects are predominant when the low-temperature plasma exposure is longer.

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-16-0216 and No. APVV-16-0439 and the STU Grant Scheme for Support of Young Researchers.

20. Penicilin necitlivé/erytromycin rezistentní izoláty *Streptococcus pneumoniae* v letech 2010 až 2017 v České Republice

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

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

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

Úvod

Národní referenční laboratoř pro Antibiotika (NRL pro ATB) pravidelně sleduje trendy antibiotické rezistence u vybraných patogenů v rámci EARS-Net a Respirační studie v České republice. Cílem této studie bylo sledování izolátů *Streptococcus pneumoniae*, významného původce respiračních onemocnění v souvislosti s betalaktamovými a makrolidovými antibiotiky, tj. léky první a alternativní volby. Sledování probíhalo v období od října do prosince v letech 2010–2017.

Metodika

Do studie byly zařazeny kmeny izolované z horních a dolních dýchacích cest u pacientů s pneumonií a infekcí dýchacích cest pneumokokové etiologie. Izoláty necitlivé k penicilinu a/nebo rezistentní k erytromycinu byly zaslány do NRL pro ATB pro ověření a vyšetření antibiotické citlivosti pomocí minimální inhibiční koncentrace (metodika EUCAST). U vybraných kmenů byla provedena molekulárně typizační analýza, multilocus sequence typing (MLST), výslední sekvence byly hodnoceny pomocí softwaru Bionumerics 7.6.2.

Výsledky

Od roku 2010 až 2017 byla analyzována data od 7 491 pneumokoků. Za sledované období stoupla rezistence *S. pneumoniae* k makrolidům o 2,3%, zatím co k penicilinu klesla o 1,4%. Nejvíce zastoupenými sérotypy u penicilin necitlivých izolátů byly 19F, 15A, u erytromycin rezistentních kmenů zas 19A a 3. Do NRL pro ATB bylo pro potvrzení zasláno celkem 126 kmenů *S. pneumoniae*. MLST analýza u izolátů zasláných do NRL pro ATB v roce 2017 (26) odhalila přítomnost 13 sekvenčních typů (ST), s prevalencí ST416 (42%, n=11). Nejvíce izolátů, celkem 50% kmenů patřilo do klonálního komplexu Netherlands^{15B}-37 (ST416, ST1464, ST13400).

Závěr

Surveillance *S. pneumoniae* v průběhu 7 let odhalila pokles výskytu kmenů necitlivých k penicilinu a rostoucí trend erytromycinové rezistence, která pravděpodobně souvisí s narůstající spotřebou makrolidových antibiotik v České republice.

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

21. Meticilin – rezistentní *Staphylococcus aureus* mezi veterinárními pracovníky v České republice v roce 2017

K. Neradová (1), V. Jakubů (1, 2), K. Pomorská (2), H. Žemličková (1, 2)

(1) Ústav klinické mikrobiologie, Lékařská fakulta, Univerzita Karlova a Fakultní nemocnice v Hradci Králové, Česká republika

(2) Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika

Úvod

Případy kolonizace nebo infekce způsobené zvířecími liniemi meticilin-rezistentních *Staphylococcus aureus* (MRSA) jsou hlášeny i u lidí pracujících se zvířaty, včetně veterinárního personálu. Cílem této studie bylo zjistit prevalenci kolonizace MRSA u veterinárních pracovníků.

Metodika

Na přítomnost MRSA byly testovány stěry z nosní sliznice, které byly získány od zdravých účastníků (134) veterinární konference VETfair 2017 pořádané v Hradci Králové. Získané kmeny byly dále genotypově a fenotypově charakterizovány. Devět izolovaných kmenů MRSA bylo typizováno molekulárními metodami a každý byl charakterizován svým sekvenčním typem (ST), *spa* typem (t) a typem stafylokokové chromozomové kazety *mec* (SCC*mec*).

Výsledky

Z pěti různých genotypů byl nejčastější ST398-t011-IV (n=5), po jednom izolátu se pak vyskytoval ST398-t2330-IV (n=1), ST398-t034-V (n=1), ST225-t003-II (n=1) a ST4894-t011-IV (n=1). Nosičství zvířecího MRSA bylo potvrzeno v 8 případech, charakteristiky jednoho izolátu nasvědčovaly příbuznosti s typickými nemocničními MRSA prevaluujícími v ČR. Mezi zvířecími izoláty byly popsány tři *spa* typy (t011, t034, t2330) náležící k jednomu dominantnímu klonálnímu komplexu CC11.

Závěr

Podíl nosičství MRSA u veterinárních pracovníků dosáhl v této studii 6,7%. V porovnání s výsledky předchozí studie s obdobným designem došlo k nárůstu nosičství MRSA, avšak oproti výsledkům ze sousedních evropských zemí zůstává prevalence nosičství zvířecích kmenů v rizikových skupinách v České republice nízká. Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišným spektrem zvířat, které jsou hlavním předmětem praxe veterinářů a chovatelů.

Práce byla podpořena SVV 260398/2017.

22. Účinek macerátu a tinktury z oregana na vybrané bakterie a kvasinky

M. Bakošová (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

Už staletí je známo používání bylin pro jejich antibakteriální a fungicidní účinky. Dobromysl obecná (*Origanum vulgare*) se používala jako expektorans, vykazuje spasmolytické či diuretické účinky, má i zklidňující účinky a konečně účinky antiseptické. Předpokladem pro dosažení maximální účinnosti je extrakce co největšího množství silic thymolu, karvakrolu, tujonu, cymolu, cyklických seskviterpenů a geranylacetátu, dále tríslovin, flavonoidů, karotenu, vitamínu C aj.

Z oregana byly připraveny dva roztoky. Prvním roztokem byl macerát – bylina byla macerována ve studené vodě 24 hodin, následně byl roztok přefiltrován. Při přípravě tinktury byla dobromysl naložena do 60% etanolu a po 24 hodinách přefiltrována. Pro oba roztoky byla jako výchozí koncentrace zvolena koncentrace 2 mg/ml.

Pro vlastní testování bylo použito 8 kontrolních kmenů: *S. aureus* CCM 3953, *S. aureus* CCM 4750 „MRSA“, *E. faecalis* CCM 4224, *E. coli* CCM 3954, *K. pneumoniae* CCM 4985 „ESBL“, *C. albicans* CCM 8261, *P. aeruginosa* CCM 1960, *P. aeruginosa* CCM 7393 „MBL“.

Ke stanovení byly použity mikrotitrační destičky naplněné vždy 50 µl roztoku o stoupající koncentraci bylinného extraktu. Nejvyšší použitá koncentrace u obou roztoků byla 2 mg/ml a nejnižší 0,0156 mg/ml. Z vyšetřovaných kmenů byla připravena suspenze v bujónu o hustotě inokula 0.5-1.1 McFarlanda. Do všech důlků destičky pak bylo naočkováno 50 µl této suspenze. Mikrotitrační destička byla kultivována 18–24 hodin při teplotě 37 °C. Následující den proběhl odečet, za MIC (minimální inhibiční koncentraci) byla považována nejnižší koncentrace antimikrobiální látky, která potlačila růst daného kmene. U jednotlivých mikrobů bylo testování provedeno a odečítáno pro kontrolu 3x.

U macerátu (vodného roztoku oregana) byly hodnoty MIC > 2 mg/ml pro všechny druhy mikrobů, tj. vodný roztok na inhibici růstu v téhle koncentraci nestačil. V případě tinktury byl inhibován růst většiny mikrobů při MIC 2 mg/ml. Pro *K. pneumoniae* CCM 4985 „ESBL“ nebyla tato koncentrace dostačující, u *S. aureus* CCM 3953 byla MIC dokonce nižší, a to 1 mg/ml.

Některé bylinné výtažky mají potenciál zvýšit účinnost antibiotik, aniž by bylo nutné zvyšovat dávku hlavní účinné látky. V budoucnu by takové bylinky mohly pomoci v boji se zvyšující se antibiotickou rezistencí.

23. Faktory virulence u *Cutibacterium acnes*

P. Muchová (1), F. Růžička (1)

(1) Mikrobiologický ústav - Společná pracoviště s Fakultní nemocnicí u sv. Anny v Brně - Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Pekařská 53, Brno, Česká republika

Chronické bolesti zad mohou být nazvány epidemií moderní populace. Při kultivaci meziobratlových destiček pacientů s posunem disků s vážnými neurologickými obtížemi lze z materiálu, který by měl být sterilní, vykultivovat bakterii *Cutibacterium acnes*. Problematika výskytu této bakterie (zda se jedná o kontaminaci či klinicky významný nález) je široce diskutována. V rámci studia izolátů od pacientů se pomocí klasifikace jednotlivých kmenů, a to po stránce genetické i v rámci faktorů virulence (schopnost tvořit biofilm, hemolýza, produkce hyaluronidázy, CAMP faktor) snažíme porozumět výskytu bakterií a jejich vlastnostem, zda se odlišují od kmenů nasbíraných od zdravých dobrovolníků.

Bylo testováno 252 kmenů od pacientů s invazivní infekcí *Cutibacterium acnes* a 83 kmenů izolovaných z kožních stěrů zdravých dobrovolníků. Kmeny byly testovány multiplex PCR a zařazeny do příslušného fylo typu. Vlastnosti bakterií izolovaných od dobrovolníků se od skupiny klinických kmenů statisticky signifikantně liší pouze v případě tvorby biofilmu. Analýza vazby mezi jednotlivými vlastnostmi a genetickou skupinou prokázala vazbu mezi fylotypem a intenzitou hemolýzy. Následující výzkum bude zaměřen na antibiotickou odolnost jednotlivých kmenů.

Práce byla podpořena z projektu MUNI/A/1189/2018.

24. Sledování působení fágových preparátů na stafylokokový biofilm

D. Bezděková (1), M. Dvořáčková (1), L. Vacek (1), F. Růžička (1)

(1) Mikrobiologický ústav - Společná pracoviště s Fakultní nemocnicí u sv. Anny v Brně - Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Pekařská 53, Brno, Česká republika

Staphylococcus aureus je významným humánním patogenem, vyvolávající infekce se širokou škálou příznaků. Velkým problémem při léčbě nejen stafylokokových infekcí je vznik rezistencí a také schopnost tvořit biofilm. Důsledkem je rozvoj obtížně léčitelných chronických infekcí. Do popředí zájmu se tak znovu dostává dlouho opomíjená léčba využívající fágové preparáty, popřípadě i purifikované fágové enzymy.

V rámci práce byly testovány účinky komerčně dostupného přípravku Stafal[®], a to jak na planktonní formy, tak na biofilm tvořený rezistentními kmeny MRSA. Vliv na biofilm byl testován také u lysostaphinu a purifikovaného fágového enzymu LysF1.

Testování účinnosti fágových preparátů na planktonní formy bakterií bylo hodnoceno metodou dvouvrstevného agarů a na základě změn optické denzity suspenze během 20 hodin. Testování schopnosti stafylokokových kmenů tvořit biofilm bylo dosaženo pomocí barvení krystalovou violetí dle Christensena. Na vybraných kmenech MRSA byly testovány účinky preparátů (Stafal[®], lysostaphin, LysF1), a to pomocí měření metabolické aktivity za pomoci resazurinu a dále barvením krystalovou violetí dle Christensena. Bylo prokázáno, že se zvyšující se koncentrací preparátů dochází ke snížení metabolické aktivity biofilmu a také úbytku biomasy.

Možnou alternativou klasické antibiotické terapie je využití fágových preparátů nebo purifikovaných složek bakteriofágů. Stejně jako fágy, i enzymy z nich izolované vykazují dobrou účinnost při inhibici biofilmu.

25. 3D tisk antibakteriálního materiálu

K. Sehnal (1,3), M. Staňková (2), M. Dočekalová (2), Z. Tóthová (2), D. Uhlířová (2), M. Gargulák (1,2), R. Kizek (1,2)

(1) Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, CZ

(2) Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals s.r.o., Brno, CZ

(3) Ústav vinohradnictví a vinařství Mendelova univerzita, Valtická 337, 691 44 Lednice

Úvod. Nozokomiální infekce spolu s bakteriálními rezistencemi vůči používaným antibiotikům představují velký problém světového zdravotnictví. Jako jedno z nových řešení se nabízí nanotechnologické přístupy. Nanočástice (NPs) jsou běžně připravovány chemickou syntézou. Zelená syntéza využívá při přípravě NPs rostlinných extraktů (řada rostlinných druhů vykazuje antibakteriální účinek). NPs mohou být využity jako příměsi do materiálů (pro 3D tisk) pro zlepšení fyzikálně-chemických vlastností. Cílem práce bylo navrhnout koncept modifikace 3D vlákna ABS (akrylonitrilbutadienstyren) stříbrnými nanočásticemi (AgNPs). Vláknem lze použít v 3D tisku při zachování antibakteriální aktivity.

Metodika. Pomocí zelené syntézy za využití rostlinných vodných extraktů (80 °C; 60 min; 10 g/100 ml – *T. serpyllum*, *S. officinalis*, *T. pratense*) byly připraveny tři druhy AgNPs (S, T, TP). Směs byla přesrážena methanolem (1:1) a vysušena (24 hodin; 60 °C). Vysušené AgNPs byly dispergovány v ultračisté vodě a acetonu (1:1; 3 mg/ml) pomocí ultrazvuku (30 W, 40 min). Směs byla nanášena na 3D vlákno. Tisk probíhal na 3D tiskárně Profi3DPrinter (Technologie – FDM), kultivace mikroorganismů v LB médiu, 24 h, 37 °C, zákal OD₆₂₀ byl měřen v 15 min po dobu 12 h.

Výsledky. Charakterizace AgNPs – Velikost: 20–60 nm, maxima absorpčních spekter: 435–455 nm, výtěžnost: asi 70 %, zhášení volných radikálů: ABTS 40–80%, DPPH 15–55% pokles za 15 min, celkové fenoly: 160–180 µg/ml ekv. GA. Antibakteriální aktivita byla stanovena na modelových organismech (*S. aureus*, *E. coli*). Byly měřeny růstové křivky ve variantách ABS; ABS-AgNPs; OD 0.05, materiál: 1 mg. Vyhodnocení bylo určeno jako Diferenciál vz/k OD (rozdíl jednotlivých bodů růstové křivky a bodů inhibice AgNPs). Na základě výpočtu IC₅₀ byly stanoveny MIC: AgNPsT, S, TP (2,5; 3; 6 µg/ml). AgNPs na ABS materiálu vykazovaly po tisku inhibiční aktivitu o 20 až 40 % z kontroly.

Závěr. Zelenou syntézou lze modifikovat AgNPs biomolekulami z extraktů, a tím předcházet bakteriální rezistenci vůči AgNPs. AgNPs byly nanášeny na ABS materiál, který po vytištění vykazoval antibakteriální účinek. Předpokládáme, že materiál lze využít v nemocničních zařízeních k eliminaci nozokomiálních infekcí (kliky, držáky apd.).

Práce byla realizována za podpory projektu H2020 CA COST Action CA15114, INTER-COST LTC18002.

26. Charakterizácia baktérií rezistentných voči antibiotikám izolovaných z nápojov typu smoothie

M. Krahlucová (1), K. Lépesová (1), B. Micajová (1), L. Bírošová (1)

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

monika.krahlucova23@gmail.com

Úvod: V posledných rokoch sledujeme výrazné zmeny v životospráve. Stále pribúdajú ľudia dbajúci na zdravý životný štýl, ktorí sa stravujú najmä pokrmami zo zeleniny a ovocia, ktorých príkladom sú šaláty, čerstvé šťavy a smoothie nápoje ľahko dostupné v uliciach miest, ale aj jednoduché z hľadiska domácej prípravy. Nápoje typu smoothie sú nutrične bohaté nakoľko predstavujú tepelne neupravenú potravinu avšak rovnako tak môžu byť zdrojom mikroorganizmy práve dôsledkom surovosti produktu. Mikrobiologická nezávadnosť nápojov smoothie je závislá predovšetkým od dodržiavania správnej výrobných praxe v prevádzkach vyrábajúcich tieto nápoje. Potraviny predstavujú významný vektor šírenia baktérií rezistentných voči antibiotikám v prostredí, preto sme sa v práci venovali monitoringu a charakterizácii koliformných baktérií (KFB) rezistentných voči antibiotikám vo vzorkách smoothie pochádzajúcich z rôznych prevádzok v Bratislave.

Metodika: Vzorky nápojov smoothie sme odobrali zo šiestich prevádzok v Bratislave a jednu vzorku sme pripravili priamo v laboratóriu označenú ako „domáce smoothie“. Mikrobiologickú analýzu sme realizovali ihneď po transporte do laboratória pričom sme sa zamerali na monitoring celkového počtu KFB a ich rezistentných kmeňov kultivačnou metódou pomocou Chromocult Coliform agaru. Na selekciu rezistentných baktérií sme pridali k živnému médiu vybrané antibiotiká. Aplikovali sme koncentrácie antibiotík zodpovedajúce hraniciam rezistencie, ktoré sú dané organizáciou *Európskeho výboru pre testovanie citlivosti na antimikrobiálne látky* (EUCAST). Rezistentné izoláty sme ďalej identifikovali pomocou hmotnostného spektrometra MALDI-TOF a následne sme ich charakterizovali z pohľadu rezistencie. Tvorba biofilmu sme sledovali spektrofotometricky s kryštálovou violetou. Nadprodukcia efluxných púmp sme detegovali agar Cartwheelovou metódou pomocou etídium bromidu.

Výsledky: Všetky vzorky nápojov typu smoothie odobrané z prevádzok v Bratislave obsahovali baktérie rezistentné voči ATB. Medzi izolátmi KFB prevažujú zástupcovia rodov *Enterobacter* (51 %) a *Klebsiella* (28 %). Najčastejšie sme zachytili rezistenciu KFB voči ampicilínu (97 %) a gentamicínu (26 %). Multirezistenciu sme zaznamenali v 17 prípadoch. 28 % izolovaných KFB patrí medzi veľmi silných a 63 % medzi silných producentov biofilmu. Nadprodukcia efluxných púmp sme detegovali u 19 % rezistentných izolátov.

Záver: Rezistencia baktérií voči antibiotikám je v súčasnosti jednou z najväčších hrozieb pre globálne zdravie, potravinovú bezpečnosť a rozvoj. Potravinový reťazec môže predstavovať vehikulum takýchto baktérií. V súčasnosti sa zvyšuje dopyt po „zdravších“ potravinách, medzi ktoré patrí aj smoothie. Vzhľadom k tomu, že tieto nápoje sú vyrábané zo surového ovocia a zeleniny, ktorých mikrobiota je spravidla veľmi bohatá, môžu obsahovať patogénne a často aj rezistentné baktérie. V našej práci sme potvrdili prítomnosť týchto baktérií, preto je potrebné zabezpečiť lepšiu informovať verejnosť o možných rizikách vyplývajúcich z konzumácie nápojov typu smoothie a potrebe dodržiavania hygienických návykov.

Podakovanie: Autori ďakujú za finančnú podporu Vedeckej grantovej agentúry VEGA (1/0096/17), Výskumnej agentúry SR (ITMS 2623012006) a Agentúre pre výskum a vývoj (16-0171).

27. Výskyt plazmidově vázané rezistence ke kolistinu u bakterií z odpadních vod v České republice

A. Baráková (1,2), T. Gelbíčová (1), M. Florianová (1), R. Karpíšková (1)

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

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

Úvod

Voda z čistírny odpadních vod (ČOV) může sloužit jako rezervoár bakterií rezistentních k antimikrobikům, včetně kolistinu využívanému k léčbě infekcí vyvolaných multirezistentními gram-negativními bakteriemi. Sledování genů rezistence v odpadních vodách napomáhá predikovat výskyt bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám v populaci lidí, zvířat a prostředí. Cílem této pilotní studie bylo sledovat výskyt genů *mcr* kódujících plazmidově vázanou rezistenci ke kolistinu v odpadních vodách ČR, detekovat tyto bakterie a blíže je charakterizovat.

Metodika

Celkem bylo vyšetřeno 14 vzorků odpadních vod pocházejících z ČOV v Jihomoravském (n=11) a Středočeském kraji (n=3) odebraných v letech 2018–2019 (březen). 25 ml vzorku bylo pomnoženo v pufrované peptonové vodě a inkubováno při 37 °C přes noc. Poté byla izolována celková DNA a metodou PCR detekovány geny *mcr-1* až *mcr-8*. Současně byla provedena inokulace na *Brilliance* UTI Clarity agar s přídatkem kolistinu (3,5 mg/L). Získané izoláty byly identifikovány metodou hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) a přítomnost genů *mcr* byla ověřena metodou PCR. U vybraných izolátů (n=7) byla provedena celogenomová sekvenace (WGS) a detailní analýza genomu (MLST, serotyp, rezistence, přítomnost a charakterizace plazmidů).

Výsledky

Všechny vzorky odpadních vod byly po izolaci celkové DNA pozitivní na výskyt některého z *mcr* genů. Nejčastěji byl detekován gen *mcr-1* (13/14) a dále geny *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-3* a *mcr-8* (10/14, 9/14, 8/14 a 1/14). Geny *mcr-2*, *mcr-6* a *mcr-7* nebyly v testovaných vzorcích prokázány. Pouze z osmi (57 %) vzorků byly izolovány bakterie nesoucí některý ze sledovaných genů. Bylo získáno 10 izolátů *E. coli* nesoucích gen *mcr-1* a dva izoláty *Aeromonas* spp. s genem *mcr-3*. Výsledky WGS prokázaly vysokou heterogenitu (MLST i serotypu) a multirezistenci u testovaných izolátů *E. coli*. Gen *mcr-1* bylo možné lokalizovat u šesti *E. coli* na plazmidech typu IncX4 (n=4), IncI2 (n=1) a IncP1 (n=1).

Závěr

Výsledky studie potvrzují rozšíření plazmidově vázané rezistence ke kolistinu u bakterií v odpadních vodách v ČR. Možnost horizontálního šíření genů *mcr* v odpadních vodách a dále ve vnějším prostředí může představovat hrozbu pro veřejné zdraví.

Studie byla podpořena projektem Ministerstva zdravotnictví NV 18-09-00254.

28. Vliv tetracyklinu na tvorbu biofilmu v čistírnách 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 hlavní rezervoáry ARGs. Studium přenosu ARGs a rezistentních bakterií odpadní vodou a následná kumulace v biofilmech přispěje k pochopení perzistence a selekce ARGs v životním prostředí. Naše studie monitorovala vliv tetracyklinového antibiotika na rezistenci bakterií v biofilmu. Cílem bylo zhodnotit a porovnat tvorbu biofilmu rezistentními bakteriálními kmeny izolovanými z nitrifikační a sedimentační nádrže ČOV. Kultivovatelné bakteriální kmeny rezistentní na tetracyklin 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. Následně byl sledován vliv přítomnosti různých koncentrací tetracyklinu na tvorbu biofilmu. Výsledky ukazují, že bakteriální kmeny z nitrifikační nádrže produkují biofilm až s 10x větší intenzitou vzhledem k bakteriálním kmenům ze sedimentační nádrže. U izolátů rodu *Enterobacter*, *Enterococcus* a *Escherichia* z nitrifikační nádrže byla zaznamenána zvýšená produkce biofilmu v přítomnosti tetracyklinu od koncentrace 0,03125 µg/ml. Na základě těchto výsledků se lze domnívat, že jedním z faktorů ovlivňujících tvorbu biofilmů v odpadní vodě v ČOV může být přítomnost tetracyklinu.

Poděkování: Studie byla podpořena SGS projektem Dynamika struktury rezistomu v odpadní vodě, pokračilý výzkum nekanonických DNA struktur a analýzy genové exprese dehydrinů u máku setého (ID: SGS09/PřF/2019).

29. Charakterizácia a diverzita stafylokokov zo zvieracích izolátov v Antarktíde

V. Vrbovská (1), I. Sedláček (1), P. Švec (1), O. Šedo (2), L. Krištofová (1), E. Staňková (1), J. Doškař (1), R. Pantůček (1)

(1) Ústav Experimentální Biologie, Masarykova Univerzita, Brno, CZ

(2) CEITEC, Masarykova Univerzita, Brno, CZ

Rod *Staphylococcus* predstavuje rozmanitú skupinu baktérií, ktoré primárne osídľujú povrch tela, kožné žľazy a sliznice človeka a zvierat. Často sa správajú ako oportúnne patogény, schopné vyvolať závažné ochorenia. Stafylokoky bývajú izolované z rôznych prostredí, existuje však limitujúce množstvo informácií o ich výskyte v Antarktíde.

V priebehu rokov 2013–2017 boli na ostrove Jamesa Rossa a Seymourovom ostrove v Antarktíde odobrané vzorky so zobáka a kloaky tučniakov, trusu a peria vtákov skua a nosa a rekta tuleňov. Získané bakteriálne kmene, ktoré boli predbežne identifikované pomocou konvenčných biochemických, fyziologických a rastových testov ako zástupcovia rodu *Staphylococcus*, boli ďalej testované. Identifikácia do druhu bola prevedená pomocou komerčných kitov API ID 32 Staph a STAPHYtest24, MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie a molekulárne biologických metód ako je repetitívna-PCR s primerom (GTG)₅ a sekvenovanie čiastočných génov pre 16S rRNA a *rpoB*. U všetkých kmeňov bola testovaná rezistencia k antibiotikám.

Fenotypová identifikácia mnohých izolátov ukázala pochybné alebo neakceptovateľné výsledky, ktoré sa odlišovali od hodnôt typických pre referenčné kultúry popísaných stafylokokov. Pomocou molekulárnych metód však bolo možné identifikovať tieto kmene na úroveň druhu. Klasifikácia izolátov z Antarktídy je nasledovná: *S. haemolyticus* (n = 17), *S. sciuri* (n = 15), *S. delphini* (n = 13), *S. aureus* (n = 11), *S. epidermidis* (n = 8), *S. schleiferi* (n = 4), *S. capitis* (n = 4), *S. warneri* (n = 3), *S. saprophyticus* (n = 3), *S. vitulinus* (n = 1), *S. fleuretti* (n = 1), *S. equorum* (n = 1), *S. hominis* (n = 1) a *S. edaphicus* (n = 1). Kmene boli prevažne citlivé na testované antibiotiká, prevládala rezistencia na penicilin G, ceftazidim, kyselinu fusidovú a novobiocin.

Zástupcovia rodu *Staphylococcus* pochádzajúci zo zvieracích izolátov z Antarktídy vykazujú značnú fenotypovú variabilitu a ich biochemické profily sa často líšia od referenčných hodnôt. Pomocou molekulárne biologických metód je možné zaradiť tieto kmene až na úroveň druhu, preto ich charakterizujeme ako ekovary prispôbené odlišnému prostrediu.

Podakovanie: Práca bola podporená z projektov Špecifického výskumu Masarykovej Univerzity MUNI/A/0958/2018 a CzechPolar 2.

30. Isolation of rare actinobacteria from acid waterlogged soil

D. Rapoport (1,2), M. Mareckova (1,3), J. Kopecky (1)

(1) Crop Research Institute, Prague, CZ;

(2) Charles University, Prague, CZ;

(3) Czech University of Life Sciences, Prague, CZ

Actinobacteria are famous for the production of antibiotics. Due to the spreading of resistance to antimicrobials, isolation of new strains from unusual environments and belonging to new lineages is of particular interest. The actinobacterial community of acid waterlogged soil in the Trebon region in the Czech Republic was reported to be dominated by unknown taxonomic group sharing a common ancestral node with *Streptosporangiales* (we name it Trebon Clade). The aim of the work was to isolate rare actinobacteria from this soil.

Mineral and organic horizons of soil were used for plating on VL medium with pH adjusted to 5,5. The medium was reported to be used for isolation of previously uncultivable actinobacteria. Plates were incubated at 25C for 1,2,3,5 and 8 weeks. At each time point, strains were isolated and purified. 16s rRNA was amplified with universal primers, sequenced, aligned with SINA with type actinobacterial strains sequences from the SILVA database. Phylogenetic trees were built by FastTree and visualized in iTOL. Taxonomic assignments were fulfilled with the RDP Classifier tool, manually curated according to the tree.

Collection of 471 actinobacterial strains were created. The most frequent isolates belong to *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Streptacidiphilus*, *Actinospica* and *Catenulispora* genera. A high share of isolated streptomycetes clustered separately from the known type strains within the tree. The rest of the strains belong to *Actinomadura*, *Streptosporangium*, *Kribella*, *Plantactinospora*, *Nocardia*, *Pseudonocardia* and previously unknown lineage (Trebon Clade). Some phylogenetic clusters were isolated only at a particular time period of incubation. Trebon Clade strain was isolated from mineral horizon after 30 days of incubation.

Unusual environments represent a valuable source of rare and previously uncultured actinobacteria, which may produce novel secondary metabolites such as antibiotics. The time of incubation matters for isolation of particular actinobacterial groups distinct within known genera. The longer incubation time, the more chance to isolate unknown slow-growing bacterium.

31. Creation and stability testing of the reference standard for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faeces by qPCR

M. Beinhauerová (1,2), I. Slaná (1), P. Králík (1)

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

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

Quantitative PCR (qPCR) is nowadays one of the most widely used direct methods for the detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP). However, the amount of MAP determined by qPCR depends on the type of quantification standard used (plasmid, isolated DNA), which in practice can lead to a situation where it is not possible to compare the resulting data of different qPCR tests in different laboratories. The creation of the reference standard should bring the unification of quantification standards in MAP detection and allow comparison of quantitative data between different laboratories.

The aim of this study was the preparation of reference standard prototype for quantification of MAP in faeces by qPCR method, to find a suitable storage matrix and test stability and reproducibility over time. With regard to stability, storage and possible shipment, a lyophilized suspension of faeces artificially contaminated with a reference MAP strain was chosen as the most suitable form of standard. In total, five types of lyophilization matrices were used and their effects on MAP stability were monitored at two-weekly intervals. DNA from the lyophilized standard was isolated using a standardized protocol, and MAP quantification was performed using qPCR. The most suitable lyophilization matrix was selected and is used in further testing to monitor the effect of different storage conditions on standard stability.

The work was supported by Ministry of the Interior of the Czech Republic (VI20152020044) and Ministry of Agriculture of the Czech Republic (RO0518).

32. Quantification of qPCR standards using digital PCR

M. Beinhauerova (1,2), P. Kralik (1)

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

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

Quantitative real-time PCR (qPCR) is currently one of the most commonly used molecular biological methods for the detection and quantification of various microbial pathogens. In order to quantify the amount of microbial pathogens in the sample, it is necessary to construct a calibration curve from standards containing known amount of copies of plasmids, genomic DNA or other nucleic acid molecules. Accurate determination of the amount of nucleic acid copies in the standard is therefore essential for proper quantification of pathogens in the sample. Spectrophotometric measurement of absorbance of nucleic acid is the most commonly used for this purposes, however, insufficient purity can affect the results of measurement and subsequent dilution of qPCR standards. Digital PCR (dPCR), which allows absolute quantification of the target nucleic acid sequence, is not, unlike qPCR, dependent on the construction of a calibration curve, therefore it is a promising tool for independent verification of qPCR standards. The principle of dPCR is the division of the initial sample to several thousands of reaction compartments in which nucleic acid amplification takes place separately. The reaction compartments may be emulsion droplets (droplet dPCR) or wells placed on a small digital microchip (chip dPCR). After amplification, positive and negative reaction compartments are counted based on the presence or absence of a fluorescence signal. Positive reaction compartments containing at least one target nucleic acid molecule are then used to calculate the concentration of the target nucleic acid in the sample using Poisson's statistics. The aim of the work was to determine and compare the concentration of 45 qPCR standards using two dPCR platforms and to determine the effect of using several isolation kits on the preparation of qPCR standards.

The work was supported by projects RO0518 and QK1810212.

33. Kontrola kontaminácie ako pomocný nástroj analýzy vzoriek s nízkou hladinou mikrobiálnej DNA

E. Mravec (1), E. Budinská (1), P. Vídeňská (1)

(1) Centrum pro výzkum toxických látek v prostředí, Masarykova Univerzita, Brno, CZ

Metagenomické prístupy sa v klinickej praxi zatiaľ široko neuplatňujú najmä kvôli problémom ako je introdukcia kontaminantnej mikrobiálnej DNA počas laboratórneho spracovania vzorky a následná problematická interpretácia mikrobiálneho profilu. Zdrojom kontaminácie môžu byť okrem prostredia aj izolačné a PCR kity vzhľadom na ich bazálny obsah mikrobiálnej DNA. Práve vzorky tkanív a telových tekutín určené k diagnostickým účelom sú na prejavy kontaminácie na sekvenačnom profile prirodzene náchylnejšie, pretože majú nízku hladinu mikrobiálnej DNA. Z tohoto dôvodu majú nižšiu schopnosť súťažiť o reagencie v PCR reakcii oproti vzorkám s vysokou hladinou mikrobiálnej DNA. Naším cieľom je vyvinutie komplexného nástroja na monitorovanie kontaminácie, ktorý nám umožní dosiahnuť presné a reprodukovateľné výsledky na poli analýzy matric s nízkou hladinou mikrobiálnej DNA.

Na pilotnú evaluáciu kontaminácie bolo vybraných 5 matric s rôznym obsahom mikrobiálnej DNA a to stolica a bukálny ster (vysoký podiel DNA), ster z prostredia (kontrola kontaminácie z prostredia), tkanivo ľudského mozgového nádoru (reálna vzorka pre diagnostiku), tkanivo kuracej pečene s obsahom *Salmonella enterica* (pozitívna kontrola). Knižnica bola pripravená podľa modifikovaného protokolu Illumina na sekvenovanie 16S rRNA génu. Súbežne s každou izoláciou boli vykonané extrakčné kontroly a s každou PCR negatívne kontroly. Následne bola vykonaná sekvenácia na prístroji MiSeq a bioinformatická analýza.

V pilotnom testovaní sme sekvenovaním preukázali prítomnosť bakteriálnych komunit v kontrolách. Diverzita bakteriálnych komunit je vyššia v prípade izolačných kontrol ako pri negatívnych PCR kontrolách, čo je vysvetlené vyšším počtom krokov spracovania. Najviac zastúpenými čeľadami boli v súbore extrakčných kontrol *Lachnospiraceae* a *Prevotellaceae* a v prípade PCR kontrol *Moraxellaceae* a *Comamonadaceae*. V prípade tkanív sme však zaznamenali pokles počtu čítaní oproti ostatným matriciam.

Následujúcimi krokmi bude optimalizácia izolácie, deplécie eukaryotickej DNA a zvýšenie počtu vzoriek.

34. Využití Ramanovy spektroskopie při identifikaci původců infekcí močových cest

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

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

(2) Ústav přístrojové techniky Akademie věd ČR, Brno, 612 00, CZ

Infekce močových cest patří mezi nejběžnější typy infekcí vyskytujících se u lidí, zejména u žen. Tyto infekce jsou velmi časté příčiny návštěvy lékařů a následné léčby, která může být nákladná a zkomplikována přítomností antibiotické rezistence u patogenu. Infekce močových cest se staly nejběžnější nozokomiální infekcí. Za použití současných metod zabere diagnostika a charakteristika patogenu poměrně dlouhou dobu. Pro rychlejší, přesnější a levnější léčbu pacientů je nezbytný účinnější způsob identifikace a charakterizace mikroorganismů. Jednou z potenciálních metod je Ramanova spektroskopie.

Ramanova spektroskopie patří mezi metody vibrační molekulové spektroskopie a je založena na neelastickém optickém rozptylu, který nastává při interakci laserového paprsku s elektrony zkoumaného vzorku. Výstupem analýzy je spektrum daného vzorku, které odpovídá jeho molekulovému složení. Cílem této studie bylo posoudit Ramanovu spektroskopii jako potenciální metodu pro identifikaci skupiny mikroorganismů způsobující infekce močových cest.

V této práci bylo testováno 12 různých druhů mikroorganismů, celkově 109 kmenů oportunních patogenů schopných způsobit infekce močových cest. Dané mikroorganismy byly kultivovány na Mueller-Hinton agaru po dobu 24 hodin a následně analyzovány Ramanovou spektroskopií. Výsledná spektra z Ramanovy spektroskopie byla zpracována pomocí chemometrických metod, PCA (Principal Component Analysis) a 1-NN (1-nearest neighbor).

Přesnost identifikace mikroorganismů pomocí Ramanovy spektroskopie byla 98,55 %. Ramanova spektroskopie se jeví jako vhodná metoda pro identifikaci široké škály mikroorganismů a charakterizaci jejich virulentních faktorů. Výhodami jsou urychlení diagnostického postupu, snížení nákladů na diagnostiku a rovněž na následnou péči pacientů.

35. Porovnání metod kvantifikace biofilmu: Start of Growth Time (SGT) a kvantifikace pomocí CFU

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

(1) Mikrobiologický ústav - Společná pracoviště s Fakultní nemocnicí u sv. Anny v Brně - Lékařská fakulta, Masarykova Univerzita, Pekařská 53, Brno, Česká republika

(2) CEPLANT – Ústav fyzikální elektroniky - Přírodovědecká fakulta, Masarykova Univerzita, Kotlářská 2, Brno, Česká republika

Jednou z nejběžnějších metod a zároveň zlatý standard mikrobiologie je stanovení počtu životaschopných buněk pomocí počtu kolonie tvořících jednotek (CFU). Její nespornou výhodou je možnost kvantifikovat téměř jakékoli množství bakterií díky předředění stanovované bakteriální suspenze. Její nevýhodou jsou pak nároky na čas, pracnost a vysoké nároky na materiál, zvláště pak v případě, že je nutné zpracovat velké množství vzorků.

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

Techniky SGT a CFU byly použity pro kvantifikaci baktericidního efektu prototypu dekontaminačního přístroje (CEPLANT, Ústav fyzikální elektroniky Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity) na biofilmy kmenů *Staphylococcus aureus* CCM 4750, *Staphylococcus epidermidis* CCM 7221 a *Pseudomonas aeruginosa* FB 45. Obě techniky byly schopné kvantifikovat baktericidní efekt dekontaminačního přístroje, přičemž výsledky obou technik se lišily maximálně o 0,5 log₁₀ počtu buněk.

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

Tato práce byla podpořena projekty Regionální VaV centrum pro nízkonákladové plazmové a nanotechnologické povrchové úpravy - CEPLANT (CZ.1.05/2.1.00/03.0086), projektem LO1411 (NPU I) financovaným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR, projektem, TG02010067 financovaným Technologickou agenturou ČR a grantem číslo 16-29916A financovaný Ministerstvem zdravotnictví ČR.

P 01.

Detekcia kryptosporídiového antigénu u hospitalizovaných pacientov

V. Bednárová (1), K. Petříková (1), S. Majlingová (2), J. Gabzdilová (3), M. Logoida (1), P. Juriš (1)

(1) Ústav Epidemiológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice, SK

(2) Detská fakultná nemocnica v Košiciach, Košice, SK

(3) Klinika Hematológie a Onkohematológie, Lekárska fakulta, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach, Košice, Sk

Úvod

Kryptosporidióza je endemická parazitárna infekcia s globálnym rozšírením. Infekciu spôsobujú patogénne druhy kryptosporidií. U zdravých osôb sa kryptosporidióza najčastejšie vyskytuje ako samolimitujúca infekcia. U imunokompromitovaných pacientov môže infekcia prechádzať do chronického stavu podobného cholere. Infekcia môže spôsobiť významné zhoršenie zdravotného stavu pacienta a prerušiť liečbu primárneho ochorenia.

Materiál a metodika

V našej štúdii sme zisťovali výskyt kryptosporídiového antigénu u hospitalizovaných pacientov z Detskej fakultnej nemocnice a Univerzitnej nemocnice L. Pasteura v Košiciach. Pacienti v štúdii boli vo veku 4 až 71 rokov. Bolo vyšetrených celkom 122 vzoriek stolice, z ktorých 37 vzoriek pochádzalo od dospelých pacientov a 85 vzoriek pochádzalo od detských pacientov. Na detekciu kryptosporídiového antigénu bola použitá priama ELISA, slúžiaca na kvalitatívnu detekciu antigénu v stolici.

Výsledky

Kryptosporídiový antigén bol detegovaný v 6 vzorkách, čo predstavuje 4,9% pozitivitu. U detských pacientov sme zistili antigén v 4 (4,7%) vzorkách. U dospelých pacientov sme zistili antigén v 2 (5,4%) vzorkách.

Záver

Naše výsledky ukázali, že výskyt kryptosporídiového antigénu je nízky. Jedným z dôvodov nízkej úrovne záchyty môže byť trvalý lekársky dohľad a prístup ku adekvátnej terapii pre primárne ochorenie aj pre oportúnne infekcie u hospitalizovaných pacientov. V prípade, že sa u týchto pacientov vyvinie oportúnna infekcia, eliminuje sa v počiatočnom štádiu. To je dôvod, prečo je v súčasnosti klinicky zjavná kryptosporidióza zriedkavá. Napriek tomu nesmieme zabúdať na potenciálnu incidenciu kryptosporidiózy u pacientov a v prípade akýchkoľvek symptómov čo najskôr stanoviť správnu diagnózu a eliminovať infekciu.

Ďakovanie

Táto práca vznikla s podporou projektov VEGA MŠVVaŠ SR 1/0084/18 a APVV-0134-15.

P 02.

Tvorba komplexního nanokonstrukturu pro léčbu bakteriálních infekcí na bázi synergie antibakteriálního účinku stříbrných nanočástic připravených zelenou syntézou a antibiotika

M. Čížek (1), K. Sehnal (1,3), M. Staňková (2), M. Dočekalová (2), D. Uhlířová (2), M. Gargulák (1,2), R. Kizek (1,2)

(1) Ústav humánní farmakologie a toxikologie, Farmaceutická fakulta, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, CZ

(2) Oddělení výzkumu a vývoje, Prevention Medicals, s.r.o., Brno, CZ

(3) Ústav vinohradnictví a vinařství, Zahradnická fakulta, Mendelova univerzita, Lednice, CZ

Úvod. Bakteriální infekce jsou závažným zdravotnickým problémem. Jsou hledány nové koncepce jak tuto situaci zvrátit. Byly navrženy a ověřeny efektivní nanotechnologické nástroje pro zacílení na patogenní bakteriální buňku. Cílem práce bylo vytvořit konstrukt s: A) stříbrnými nanočásticemi získanými zelenou syntézou (AgNPsGS); B) apoferritinem (APO) s enkapsulovaným antibiotikem (ATB); C) modifikovanými magnetickými zlatými nanočásticemi (SPION/Au/NPs).

Metodika. Část A) byla připravena metodou zelené syntézy. K přípravě části B) byl použit roztok APO. Enkapsulace vhodného ATB byla provedena změnou pH reakčního roztoku. SPION/Au/NPs (20 mg/ml) byly modifikovány protilátkou proti proteinu A *S. aureus* (1 mg/ml IgY). Modifikace byla provedena standardizovanou metodikou navazování za pomoci polymeru EDC/NHS (2,2 mM EDC, 4 mM NHS, 3 h, 37 °C). Stejná standardizovaná metodika byla použita při navazování jednotlivých segmentů nanokonstrukturu (A + B + C), čímž vznikl kompletní nanokonstrukt SPION/Au/AgNPsGS/APO/ATB. Hodnocení antibakteriálních účinků bylo provedeno dvěma metodami – diskovou difuzní metodou (DDM) a spektrofotometrickým testováním minimální inhibiční koncentrace (MIC).

Výsledky. Bylo připraveno 20 druhů AgNPsGS. Nejlepší antibakteriální efekt (85% inhibice růstu bakterie *S. aureus*) vyjádřený hodnotou MIC₅₀ 0,4 µg/ml byl pozorován u AgNPsGS4 (nať *Thymus serpyllum* L.). Do dutiny APO (12 nm) bylo uzavřeno antibiotikum amoxicillin, které bylo modifikováno zelenými (CdTe) kvantovými tečkami (QDs). Struktura konstrukturu byla vytvořena sítí polymeru EDC/NHS. Na SPION/Au/NPs byl napojen APO s enkapsulovaným ATB (SPION/Au/APO/ATB). Vznikl tak modelový konstrukt SPION/Au/AgNPsGS4/APO/ATB. Vytvořený konstrukt SPION/Au/AgNPsGS4/APO/ATB byl aplikován na kulturu *S. aureus*.

Závěr. V přítomnosti 70 µg SPION/Au/AgNPsGS4/APO/ATB byla zaznamenána dramatická inhibice *S. aureus* (téměř 100% u růstových křivek a 13 mm na standardním agarovém médiu při DDM). Jednoduchou záměnou enkapsulovaného antibiotika a vázané protilátky se stává nanokonstrukt univerzálním a inovativním přístupem v cíleném boji proti různým bakteriálním infekcím.

Práce byla realizována za podpory projektu H2020 CA COST Action CA15114, INTER-COST LTC18002.

P 03.

Testování extraktů zázvoru, máty a křenu u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*

S. Lisická (1), B. Hollá (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

Zázvor lékařský (*Zingiber officinale*) je trvalka, ze které se používá oddenek jako koření, vykazuje však i antimikrobiální účinky na grampozitivní i gramnegativní bakterie a houby. Máta peprná (*Mentha piperita*) je bylinka s vysokým obsahem mentolu, terpenoidů a flavonoidů. Ve formě oleje se používá při křečích a infekcích.

Křen selský (*Armoracia rusticana*) je trvalka, z níž se používá aromatický kořen. Ve formě sirupu se používá jako expektorans při infekcích dýchacích cest. Je zdrojem vitamínu C, minerálních látek a glukosinolátů, které mají antimikrobiální účinky.

Pro vlastní práci byl použit lihový roztok zázvoru, vodný roztok máty, alkoholový roztok křenu a jako kontrola 70% roztok lihu.

Zázvorový roztok byl připraven z čerstvého jemno nastrohaného zázvoru, který se louhoval 24 hodin v 96% benzínalkoholu při teplotě 21 °C a následně se přecedil. Tímto způsobem byly připraveny roztoky s koncentrací 50 % a 25 %.

Na mátový roztok byla použita sušená nať, zalitá vodou o teplotě 100 °C a vylouhovaná v tmavé nádobě 12 minut. Následně byl roztok přeceděn a nechal se vychladnout. Takto byly připraveny roztoky o koncentraci 12,5 % a 8 %.

Z nastrohaného křenu byly připraveny 50% a 75% alkoholové roztoky, které byly louhovány v uzavřené nádobě 24 hodin při pokojové teplotě.

Disky z filtračního papíru o průměru 6 mm byly následně napuštěny připravenými roztoky a položeny na Mueller-Hinton (MH) agar naočkovaný testovanou bakterií (hustota očkovaného inokula byla 0,5–1,5 McFarlanda). Agary byly kultivovány při 35–37 °C po dobu 18–24 hodin. Následně byly změřeny velikosti inhibičních zón. Jako bakteriální kmeny byly pro mátové a zázvorové roztoky použity kmeny *S. aureus* (35) a *E. coli* (30). Pro křen a lihový roztok byly použity kmeny *S. aureus* (54, z toho 30 kmenů MRSA) a *E. coli* (30). Všechny kmeny pocházely od pacientů FN u sv. Anny a byly testovány v průběhu roku 2018.

V případě zázvorového roztoku se účinek objevil pouze u 25% roztoku, a to u 1 kmene *E. coli* a u 1 *S. aurea*, i v těchto případech však došlo k rozšíření zóny pouze na 8 mm. Žádný mátový výluh použitý v experimentu neměl na růst testovaných bakterií účinek. Ani alkoholové roztoky křenu nevykazovaly antimikrobiální účinek (s výjimkou 1 kmene *S. aureus* a 1 kmene MRSA, u obou kmenů byla zóna 8mm, v případě MRSA navíc jen u 75% roztoku). Bez efektu zůstal i samotný 70% roztok lihu.

P 04.

Screening biotechnologického potenciálu vybraných zástupců rodu *Geobacillus*

X. Kouřilová (1), I. Pernicová (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

Termofilní mikroorganismy dokáží přežívat a prospívat i za teplot, které jsou pro většinu mikroorganismů inhibiční či dokonce letální. Již dlouhou dobu jsou termofilové považovány za unikátní zdroj termostabilních látek, především enzymů. Nicméně v posledních několika málo letech se začíná o termofilních mikroorganismech uvažovat také jako o produkčních kulturách, protože vyšší kultivační teploty umožňují dosažení vyšší reakční rychlosti, vyšší rozpustnosti většiny chemikálií či snížení nároků na sterilitu procesu.

Jedním ze zajímavých zástupců termofilních mikroorganismů jsou kmeny rodu *Geobacillus*, obecně se jedná o Gram-pozitivní fakultativně aerobní sporulující termofilní bakterie, které byly dříve součástí rodu *Bacillus* a jejich taxonomické vyčlenění z tohoto rodu proběhlo relativně nedávno. V naší práci bylo vybráno 13 zástupců tohoto rodu a také taxonomicky blízký příbuzný zástupce rodu *Saccharococcus*. U vybraných kmenů byl sledován biotechnologický potenciál ve smyslu schopnosti produkce biosurfaktantů, vybraných hydrolytických enzymů (amylázy, xylanázy, celulózy, lipázy a proteázy), antimikrobiálních látek, organických kyselin a mikrobiálních plastů – polyhydroxyalkanoátů.

Bakterie *G. uzenensis* a *G. zalihae* vykazovaly významnou schopnost produkce biosurfaktantů. Kmeny *G. jurassicus*, *G. uzenensis*, *G. gargensis* a *G. lituanicus* byly schopny intenzivní produkce všech testovaných technologicky významných enzymů. Nejvyšších antimikrobiálních účinků dosahovaly bakterie *G. stearothermophilus* a *G. thermocatenulatus*. Nejvyšší produkce kyseliny octové bylo dosaženo u *G. jurassicus* a kyseliny mléčné u *G. thermodenitrificans*. Nicméně schopnost produkce polyhydroxyalkanoátů nebyla na úrovni genotypu ani fenotypu prokázána pro žádnou z testovaných kultur.

P 05.

Dva klinicky zajímavé bakteriální izoláty zachycené v NRL pro antibiotika a České národní sbírce typových kultur (CNCTC) v roce 2018 a 2019.

L. Mališová (1), R. Šafránková (1,2), P. Ježek (3), H. Žemličková (1,2)

(1) Centrum epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav, Praha

(2) Lékařská fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Hradec Králové

(3) Oddělení klinické mikrobiologie a parazitologie, Oblastní nemocnice, Příbram

Koncem roku 2018 a začátkem roku 2019 byla Česká národní sbírka typových kultur požádána o identifikaci dvou bakteriálních kmenů, které se pomocí biochemických metod nepodařilo na původním pracovišti (OKMP, ON Příbram) dourčit. První izolát (*Aureimonas altamirensis*) byl získán z drepu a druhý izolát (*Psychrobacter sanguinis*) pocházel z hemokultury. Jednalo se o kmeny velmi vzácně izolované nebo neobvyklé ve spojení s danou diagnózou; nehodnotil se etiologický podíl daného izolátu na onemocnění. Tyto kmeny byly nejdříve podrobeny rozšířeným biochemickým identifikačním testům (API-Biomerieux) spolu s identifikací pomocí MALDI-TOF MS (Microflex, Bruker). Vzorky na API byly připraveny podle návodu pro jednotlivé API sety, vzorky na MALDI-TOF MS byly zpracovány přímou metodou dle návodu firmy Bruker. Po částečné (resp. neúspěšné) identifikaci byly oba kmeny dourčeny sekvenční analýzou části genu pro 16S rRNA (Applied Biosystem). Sekvence byly vyhodnoceny v programu BioNumerics 7.6.2 a porovnány s veřejně přístupnou databází (Nucleotide BLAST).

Oba kmeny byly deponovány v CNCTC pod čísly 7794 (*Aureimonas altamirensis*) a 7747 (*Psychrobacter sanguinis*).

Projekt byl podpořen SVV 260398.

P 06.

Role nových cefalosporinů v terapii infekčních komplikací pacientů s termickým traumatem.

A. Mertová (1), B. Lipový (1,2), M. Hanslianová (3), J. Bartošková (1), I. Suchánek (1), P. Brychta (1,2)

(1) Klinika popálenin a plastické chirurgie FN Brno

(2) Lékařská fakulta, Masarykova univerzita Brno

(3) Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno

Infekční komplikace dnes reprezentují dominantní podíl na mortalitě popálených pacientů. Hlavním důvodem této skutečnosti jsou rozsáhlé lokální i systémové změny, které v průběhu popáleninové nemoci nastávají. V rámci lokálních změn dominuje poškození kontinuity kožního krytu v důsledku termického poškození a postupné formování nekrózy, která představuje excelentní růstové médium pro celou řadu potenciálně patogenních mikroorganismů. Systémové změny zahrnují komplexní patofyziologické procesy vedoucí ke ztrátě imunokompetence postižených pacientů a následném rozvoji imunoparalýzy až imunosuprese.

Za poslední dvě dekády zaznamenáváme u našich pacientů dramatický nárůst prevalence rezistentních kmenů bakterií, což činí komplexní antimikrobiální management mnohdy velmi komplikovaný. Zástupci skupiny nových cefalosporinů představují důležitou terapeutickou alternativu, která rozšiřuje možnosti účinné a účelné antimikrobiální terapie.

Ve sdělení prezentujeme naše zkušenosti se třemi zástupci skupin nových cefalosporinů: ceftarolin fosamilu, ceftolozan/tazobaktamu, ceftazidim/avibaktamu. Terapie infekčních komplikací těmito cefalosporiny byla u všech pacientů velmi efektivní, i přes to, že byla indikována pouze v případě infekcí, kterou způsobily rezistentní kmeny bakterií.

P 07.

Antimycobacterial activity of selected ring-substituted 8-styrylquinolines

H. Michnová (1), Š. Pospíšilová (1), W. Cieslik (2), E. Spaczyńska (2), A. Čížek (1),
R. Musioł (2), J. Jampílek (3,4)

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

(2) Institute of Chemistry, University of Silesia in Katowice, Chorzów, Poland

(3) Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in
Bratislava, SK

(4) Division of Biologically Active Complexes and Molecular Magnets, Regional Centre of
Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, CZ

Introduction

Mycobacterium tuberculosis is one of the most dangerous pathogen in the world. It is estimated that one third of the world's population is infected by latent tuberculosis. This problem is getting more serious also due to increasing resistance to treatment. The research of new compounds with antitubercular activity is still urgent needed.

Methods

Selected 8-hydroxystyrylquinoline derivatives substituted by electron-acceptor moieties were tested for their antimycobacterial activity against slowly growing strains *M. tuberculosis* ATCC 25177/H37Ra, *M. kansasii* DSM 44162, *M. marinum* CAMP 5644 and fast growing strain *M. smegmatis* ATCC 700084. The activity was assessed by microdilution method for determination of minimum inhibitory concentration, in case of *M. tuberculosis* with the use of AlamarBlue. The time and the temperature of incubation based on used strain. Rifampicin, isoniazid and ciprofloxacin were used as reference antimycobacterial drugs.

Results and conclusion

Activities of several compounds were comparable with or higher than clinically used antitubercotics against all tested strains, which makes these compounds promise for the future.

Acknowledgments

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency (projects APVV-17-0373 and APVV-17-0318), by the Ministry of Education of the Czech Republic (LO1305) and by NCN grant Opus:DEC-2013/09/B/NZ7/00423 of the Polish National Centre for Science.

P 08.

Adaptation of selected PHA producing bacteria to biotechnologically relevant stressors

I. Novackova (1, 2), D. Kucera (1, 2), J. Porizka (1, 2), P. Sedlacek (2), S. Obruca (1, 2), I. Pernicova (1, 2)

(1) Department of Food Chemistry and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, CZ

(2) Material Research Centre, Faculty of Chemistry, Brno University of Technology, CZ

Evolutionary engineering is useful, quite simple and effective approach how to gain microbial strains with required characteristics on phenotype level (e.g. better growth, producing capability, ability of utilization new carbon sources etc.) without requirement for knowledge of genetics characteristics of original strain. On the other hand experiments are quite time-consuming and it is necessary to screen a lot of evolved phenotypes. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are microbial polyesters which could serve as suitable replacement for traditional petrochemical plastics due to their biodegradability and biocompatibility. Approaches of evolutionary engineering could be applied to gain microorganisms producing PHAs with required properties.

For selected microorganisms *Cupriavidus necator* H16 (CCM 3726) and *Halomonas halophila* (CCM 3662) several biotechnologically relevant stress factors have been chosen. *C. necator* H16 was exposed to osmotic stress caused by presence of NaCl representing environmental stressor and also to the presence of copper, which can be classified as an anthropogenic pollutant. *H. halophila* was exposed to acetic acid and levulinic acid; both of these are components of hydrolysate of lignocellulosic biomass with inhibitory effect to cell growth.

Evolutionary experiments were provided using multiple serial transfers of cell cultures in Erlenmeyer flasks, always after 48 hours of cultivation. Basic screening of every step included determination of optical density of cell cultures, gravimetrical determination of dry cell weight, analysis of PHAs in biomass and also determination of organic acids in supernatants of *H. halophila*. After more than 20 transfers, cultures were conserved to further characterization and comparison evolved strains with wild-type ones. Within characterization of evolved strains potential of PHAs accumulation, effectivity of utilization of organics acids, testing of robustness against different stress factors, changes in morphology, physico-chemical properties of cells and also changes in genome and transcriptome will be determined.

Acknowledgement: 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 09.

Antibiofilm activity of pyrrolidine-substituted derivatives of carbamic acid

Š. Pospíšilová (1), I. Malík (2), J. Csöllei (3), A. Čížek (1), J. Jampílek (4,5)

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

(2) Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Comenius University in Bratislava, SK

(3) Department of Chemical Drugs, Faculty of Pharmacy, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, CZ

(4) Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University in Bratislava, SK

(5) Division of Biologically Active Complexes and Molecular Magnets, Regional Centre of Advanced Technologies and Materials, Faculty of Science, Palacky University Olomouc, CZ

Introduction

Bacterial biofilms are the cause of 65–80% bacterial infections. *Staphylococcus aureus* is an opportunist pathogen and common cause of device-related biofilm infection. A number of useful anti-biofilm active compounds is still very limited and greater research in this field is strongly needed. In previous studies, some dibasic derivatives of carbamic acid showed good antibacterial activity against a wide spectrum of bacteria, including *Mycobacteria* and methicillin-resistant staphylococci. The most active derivatives were studied for their antibiofilm effect.

Methods

Three derivatives of carbamic acid substituted by pyrrolidine moiety were chosen for evaluating antibiofilm activity against *S. aureus* ATCC 29213. For assessing biofilm inhibitory concentration, the modified Christensen method with crystal violet was used. The ability of the compounds to disrupt matured biofilm was studied by MTT assay.

Results and conclusion

All of the compounds were able to inhibit growth of 80% of the biofilm in concentrations equal or 2-fold higher than MIC and disrupt the mature biofilm in concentrations 2-fold higher than MBC. According to these results, pyrrolidine-1-yl substituted derivatives of carbamic acid seem to be prospective antibacterial agents with wide spectrum of activity.

Acknowledgments

This study was supported by the Slovak Research and Development Agency (projects APVV-17-0373 and APVV-17-0318) and by the Ministry of Education of the Czech Republic (LO1305).

P 10.

Role of *Achromobacter xylosoxidans* in chronic sternal osteomyelitis

R. Ramesh (1), K. Neradova (2)

(1) General Medicine Student, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove

(2) Dept. Of Clinical Microbiology, Fakultni Nemocnice Hradec Kralove

Achromobacter xylosoxidans (AX) is a rare opportunistic pathogen mostly affecting immunocompromised patients. It is an aerobic, catalase-positive, oxidase-positive, gram-negative, peritrichously flagellated, non-fermenting rod usually found in aquatic environment. AX has been associated with outbreaks of nosocomial infection due to contaminated fluids. Few cases are reported in literature identifying AX as causative agent in peritoneal dialysis infection, pneumonia, community acquired acute pancreatitis, bacteraemia and cellulitis.

We present a case of 48yo male patient who was admitted to Fakultni Nemocnice Hradec Kralove with chronic sternal osteomyelitis and broncho-sternal fistulas. We discuss his past medical history, work-up, diagnosis, management and treatment.

AX has rarely been implicated in sternal osteomyelitis. Increased awareness is required for this pathogen due to its ability to cause wide spectrum of diseases and multi-drug resistance, resulting in high mortality rate.

P 11.

SigA a SigB-dependentní promotory u *Corynebacterium glutamicum*

A. Rapoport (1,2), J. Nešvera (1), M. Pátek (1)

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

(2) Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha, CZ

Corynebacterium glutamicum patří k průmyslově využívaným mikroorganismům a je zároveň modelovým organismem pro základní výzkum aktinomycet. Genom *C. glutamicum* kóduje 7 sigma faktorů RNA polymerázy. Sigma faktor SigA řídí expresi genů za optimálních podmínek růstu v *C. glutamicum*, zatímco sigma faktor SigB řídí odpověď buněk na řadu externích stresových faktorů, a také komplexní přepínání metabolismu při stacionární fázi růstu.

Hlavním cílem našeho výzkumu byla analýza SigB-dependentních promotorů a definování konsensus sekvencí promotorů sigma faktorů SigA a SigB u *C. glutamicum*.

Byly vybrány dva předpokládané SigA-dependentní promotory genů: infC (translation initiation factor) a rbfA (ribosome-binding factor A). U nich jsme udělali zaměnu regionu mezi oblastí -10 a transkripčním počátkem, odpovídající sekvenci z promotorové oblasti předpokládaných SigB-dependentních genů: eno (enolase) a phoR (phosphate starvation two component response regulátor). Mutované promotory byly testovány v buňkách *C. glutamicum* a v kmenech s delecí genu sigB. Byl vytvořen dvouplasmidový systém pro měření transkripce *in vivo*. Za promotor testující plasmid byl použit pEPR1, obsahující reporterový gen GFP (green fluorescent protein). Jako expresní vektory byly použity plasmidy pECXT99A a pEKEx3. Odběry byly provedeny v různých fázích růstu. Konečné výsledky byly vyjádřeny jako intenzita fluorescence, vztažená na koncentraci proteinů.

Byly potvrzeny aktivity promotorů P_{infC} a P_{rbfA} jako sigB a sigA-dependentní *in vivo*. Promoter P_{infC} byl potvrzen *in vivo* jako SigA-dependentní. Ale P_{infC} mut, předpokládaný sigB-dependentní, se takto neprokázal. Promoter P_{phoR} *in vivo* se potvrdil jako SigB-dependentní, ale po mutaci nezměnil svou aktivitu na SigA-dependentní, jak jsme předpokládali. Přepínání aktivity promotorů mezi rozpoznáváním SigA a SigB je nezávislé na sekvenci mezi oblastí -10 a transkripčním startem.

P 12.

Využitie Ramanovej spektroskopie pri rozlišovaní schopnosti kmeňov tvoriť biofilm

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

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

(2) Ústav přístrojové techniky, Akademie věd ČR, Královopolská 147, Brno 61264, CZ

Tvorba biofilmu je významným faktorom virulencie, s ktorým sa stretávame u rôznych mikroorganizmov. Liečba biofilmových infekcií býva komplikovaná, preto je dôležité zistiť prítomnosť takýchto kmeňov čo najskôr. V tejto práci sme sa zaoberali využitím Ramanovej spektroskopie, optickej metódy založenej na jave neelastického rozptylu svetla, pri rozlíšení kmeňov schopných tvoriť pevnú biofilmovú vrstvu na umelých povrchoch od kmeňov bez tejto schopnosti. Druhá identifikácia kmeňov vychádzala z výsledkov biochemických testov a hmotnostnej spektroskopie MALDI-TOF. Schopnosť tvoriť biofilm na pevných povrchoch sme testovali pomocou upravenej Christensenovej metódy.

Celkom sme testovali 54 kmeňov *Staphylococcus epidermidis* (23 biofilm pozitívnych, 31 negatívnych) a 51 kmeňov *Candida parapsilosis* sensu stricto (27 biofilm pozitívnych, 24 negatívnych) priamo z kolónií na Mueller-Hintonovom agare po 24 h kultivácie pri 37 °C. Spektrá sme získavali pomocou komerčného spektrometru inVia Raman Spectrometer (Renishaw plc., Wotton-under-Edge, UK) s použitím diódového lasera s vlnovou dĺžkou 785 nm ako zdroja excitácie a mikroskopického objektívu Leica (Wetzlar, Nemecko, 50 x). Z každého kmeňa sme získali minimálne 10 spektier (akvizícia 15 s). Výsledky sme potom spracovali metódami strojového učenia (machine learning), konkrétne 1NN (1 nearest neighbor), SVM (support vector machines) a LDA (linear discriminant analysis).

Úspešnosť Ramanovej spektroskopie pri rozlišovaní biofilm pozitívnych a biofilm negatívnych kmeňov bola u *C. parapsilosis* 98,9 %, u *S. epidermidis* 96,1 %. Preto možno povedať, že Ramanova spektroskopia má potenciál stať sa nástrojom použiteľným na zisťovanie schopnosti tvoriť biofilm v praxi.

Práca bola podporená grantmi 16-29916A (Ministerstvo zdravotníctví ČR), MUNI/A/0874/2017, 16-31593A, ALISI č. CZ.1.05/2.1.00/01.0017 (Európska komisia) a GAČR GA15-20645S (Grantová agentúra ČR).

P 13.

Šíření dřevomorky domácí (*S. lacrymans*) mezi sousedícími zděnými objekty: případová studie

M. Znamínko (1), F. Zaleš (1), K. Švec (1), O. Benada (1), A. Nasswetrová (2), P. Šmíra (2) a J. Gabriel (1)*

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

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

gabriel@biomed.cas.cz

Poster prezentuje příklad prorůstání dřevomorky domácí ze sklepního prostoru zanedbaného činžovního domu ve Vršovicích v Praze do sousedního nově rekonstruovaného domu. Primárním cílem práce bylo zjistit, jak se mohla houba rozšířit z objektu do objektu (cihlové domy sousedící pouze světlíkem; zástavba cca z počátku 20. století).

Šetřením na místě bylo zjištěno, že ke zjištění přítomnosti houby v podlaze nově rekonstruovaného domu došlo v přízemním bytě v ložnici (pod postelí). Poté bylo přistoupeno k odstranění parket a ke zjištění rozsáhlé přítomnosti syrocia (cca 1 až 2 m čtverečních), s pravděpodobným šířením rhizomorfami do dalších místností v bytě. Dům je podsklepený, cihlový. Ve sklepě domu byla zjištěna v sondách přítomnost vějířkovitého či vatovitého mycelia. V sousedním (zanedbaném) domě byla ve sklepě pod schody nalezena uzamčená sklepní kóje, vesměs plná papírových či dřevěných předmětů nejasného určení (prkna, trámky, ½ dřevěných saní, něco kartonů či hader), pokrytá tlustou vrstvou bílého mycelia s náznaky přechodu do žluté. Dále na wc, sousedícím se světlíkem masivní přítomnost (cca 2 mm vysoká vrstva) tmavohnědých spor, ale i rhizomorfy houby o průměru až 40 mm. V několika sousedících kójích byly vidět zcela zřetelně vyvinuté plodnice dřevomorky domácí o velikosti několika dm čtverečních.

Podle bližšího ohledání se houba rozšířila z nalezeného ložiska do sousedního domu nejen světlíkem (nesousedil s ložnicí), nýbrž i prorůstem rhizomorfami skrz strop/podlahu/stěny cihlového domu. Ty jsou schopny produkovat organické kyseliny, díky jimž rozrušují zdivo.

V současné době na trhu není žádný stoprocentně účinný prostředek, dlouhodobě zabraňující kolonizaci dřevěných povrchů či zdiva touto houbou. Některé naše výsledky, v současné době připravované pro patentové řízení však ukazují, že kombinace dosud používaných látek s některými přípravky na bázi nanočástic kovů mohou výrazně omezit kolonizaci uvedených substrátů.

Podpořeno grantem GAČR 17-05497S a MBÚ AV ČR (61388971).

P 14.

Vymezení nejdůležitějších parametrů aktivity klíšťat na lokalitách v Brně a jeho okolí (od r. 2016)

A. Žáková (1), H. Nejezchlebová (1), M. Dušková (1) a kolektiv studentů: K. Bechníková (1), M. Dvořák (1), L. Šmídová (1), J. Veselý (1), K. Horáková (1), S. Tučková (1), J. Janeček (1), T. Humeňanský (1), B. Švejdová (1)

(1) Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Ústav Experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno

V pravidelných intervalech (1x nebo 2x týdně) při sledování okolních klimatických podmínek byl v průběhu celé sezóny od 2016 prováděn odchyt klíšťat (*Ixodes ricinus*) na vybraných lokalitách Brno (Pisárky; přehrada - Ruda, přehrada - Rakovec; Líšeň - Říčky, Líšeň - Staré zámky), Pozořice. Byla sledována závislost výskytu klíšťat na teplotě, vlhkosti a tlaku. Zajímavé jsou výsledky z roku 2018, kdy se při pravidelném monitorování počet klíšťat zvýšil, např. během tří let došlo k dvojnásobnému nárůstu klíšťat na lokalitě Pisárky. Nejvyšší výskyt klíšťat se liší každoročně v závislosti na okolních podmínkách dané lokality. Kritické měsíce pro výskyt klíšťat v dané lokalitě duben, květen, na přehradě červen. U každotýdenního pozorování se projevuje statistická závislost počtu klíšťat na teplotě. Nejvyšší počet nasbíraných klíšťat na přehradě-Rakovec bylo 104 jedinců za hodinu vylajování a celkově za celý rok 1256. Statisticky nejčtenějším stádiem klíšťat je na všech lokalitách stádium nymfy. V některých vybraných lokalitách dosáhla prevalence na *Borrelia burgdorferi* s.l. 17,3%. Poster bude obsahovat grafy a popisy sběrů na jednotlivých sběrových místech.

Seznam prvních autorů

Prezentující autor	Číslo stránky
Bakošová M.	31
Bambasová L.	26
Baráková A.	36
Bednárová V.	45
Bechníková K.	23
Beinhauerová Ma.	41
Beinhauerová Mo.	40
Bezděková D.	33
Bírová K.	17
Čížek M.	46
Dekkerová J.	10
Dylíková J.	27
Grillová L.	11
Hollá B.	47
Honskus M.	14
Hoppanová L.	28
Horáková K.	22
Hurych J.	12
Chudá K.	18
Janák M.	25
Kouřilová X.	48
Krahulcová M.	35
Kramná L.	19
Kroneislová G.	16
Kukla R.	13

Prezentující autor	Číslo stránky
Mališová L.	29
Mertová A.	50
Michnová H.	51
Mravec E.	42
Muchová P.	32
Neradová K.	30
Nováčková I.	52
Pernicová I.	24
Peštová J.	20
Pospíšilová Š.	53
Ramesh R.	54
Rapoport D.	39
Rapoport A.	55
Rebrošová K.	56
Sehnal K.	34
Stachurová T.	37
Šafránková R.	49
Šefranková M.	21
Uhlířová M.	43
Vacek L.	44
Vrbovská V.	38
Závora J.	15
Znamínko M.	57
Žákovská A.	58

Poznámky:

Poznámky:

Poznámky:

Poznámky:

Tomáškovy dny 2019
XXVIII. konference mladých mikrobiologů

Mgr. Lukáš Vacek (ed.)

Vydala Masarykova univerzita,
Žerotínovo nám. 617/9, 601 77 Brno
1. vydání, 2019
Tisk: Tribun EU s.r.o., Cejl 892/32, 602 00 Brno

ISBN 978-80-210-9296-9

MUNI
PRESS

ISBN 978-80-210-9296-9



9 788021 092969