

**XXXIII. konference mladých mikrobiologů**

# **TOMÁŠKOVY DNY 2024**



**Masarykova univerzita**  
Brno 2024

**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  
ISBN 978-80-280-0550-4  
<https://doi.org/10.5817/CZ.MUNI.P280-0550-2024>

CC BY-NC-ND 4.0 (Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0)

© 2024 Masarykova univerzita

## Sponzoři



# GeneProof®

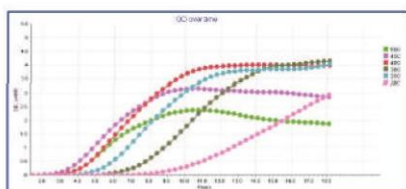
business partner of



## OSOBNÍ BIOREAKTORY RTS v nabídce



Osobní bioreaktory RTS jsou zařízení pro mikrobiální kultivaci s automatickým sledováním růstové křivky v reálném čase s možností uživatelské kalibrace na jakýkoliv měřený mikroorganismus.



### Typické aplikace:

- Sledování kinetiky růstu během fermentace
- Optimalizace vhodného prostředí
- Sledování chování mikroorganismů v různém prostředí / odlišných podmínkách
- Testování antibiotické rezistence
- Sledování exprese proteinu
- Simulace teplotních šoků
- Kontrola kvality kmene

### Patentovaná technologie **Reverse-Spin®**

#### RTS-1C

Rozsah měření: 0 - 10 OD  
Teplotní rozsah: 4 - 70°C  
Objem vzorku: 10 - 30 ml  
Rychlost otáček: 50 - 2000 rpm  
Počet kanálů: 1



#### RTS-8

Rozsah měření: 0 - 100 OD  
Teplotní rozsah: 15 - 60°C  
Objem vzorku: 3 - 50 ml  
Rychlost otáček: 150 - 2700 rpm  
Počet kanálů: 8



### ZAPŮJČENÍ ZDARMA!

PRO ZAPŮJČENÍ ZDARMA NÁS NEVÁHEJTE KONTAKTOVAT

[www.geneproof.com](http://www.geneproof.com)

GeneProof a.s.

Videňská 101/119 / Dolní Heršpice / 619 00 Brno / Czech Republic  
+420 543 211 679 / [info@geneproof.com](mailto:info@geneproof.com)

# Tomáškovy dny 2024 – program

31. 5. 2024

**09:00–09:15 Slavnostní zahájení, začátek valné hromady ČSSM**

**09:15–10:15 Nejlepší mladí mikrobiologové**

**01. Potenciál využívania Ramanovej spektroskopie v (klinickej) mikrobiológii**

K. Rebrošová, M. Šiler, M. Šerý, O. Samek, F. Růžička

**02. Výskyt baktérií rezistentných voči antibiotikám v potravinovom reťazci a v environmente**

M. Krahulcová, L. Bírošová, K. Cverenkárová, J. Koreneková, I. Segěňová

**10:15–10:30 Firemní sdělení iBioTech – Automatické systémy identifikace mikroorganismů Autobio**

**10:25–10:55 Coffee break**

**10:55–12:15 Lékařská a klinická mikrobiologie**

**03. Záchyt kvasinek z hemokultur a umělých materiálů od pacientů v roce 2022**

V. Fremlová, A. Siváková, F. Růžička

**04. *Campylobacter curvus* jako původce nitrobřišního abscesu**

E. Bartáková, J. Pudil, M. Čurdová

**05. Karbapeném-rezistentná *Klebsiella pneumoniae* v ére COVID-19**

J. Ficik, A. Liptáková, L. Slobodníková

**06. Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* CC398 se schopností produkce Pantonova-Valentinova leukocidinu v České republice**

K. Brodíkova, M. Haenni, R. Karpíšková

**07. Testovanie kolonizácie nosovej sliznice študentov medicíny kmeňmi *Staphylococcus aureus* a potenciálne predispozičné faktory**

S. Kern, S. Kasanická, M. Straka, L. Jánošíková, I. Voronkina, M. Wawruch, M. Dubinová

**08. Patogenita přísátých klišťat odstraněných z dětí**

A. Pechová, A. Žáková, H. Nejezchlebová

**09. Anikterická forma leptospirózy po pokousání myší**

J. Ondrouch, M. Fajfr, L. Ryšková, R. Bolehovská, R. Kukla, P. Šmahel

**12:15–12:30 Valná hromada ČSSM**

**12:30–13:30 Oběd**

**13:30–14:00 Poster session**

**14:00–14:20 Mikrobiologie potravin a biotechnologie**

**10. Identifikácia génov podieľajúcich sa na virulencii a perzistencii kmeňov *Listeria monocytogenes* v prostredí spracovania potravín**

A. Burdová, Z. Rešková, E. Kacliková, J. Minarovičová, H. Drahovská

**11. Proliferace a metabolická aktivita bakterií na nanovlákných polykaprolaktonových materiálech pro lékařské využití**

M. Štindlová, V. Jenčová, K. Havličková, S. Lencová

**14:20–14:50 Biofilmy**

**12. Studium terapeutického potenciálu pseudomonádových fágových preparátů na bakteriální biofilm**

F. Volný, L. Vacek, R. Pantůček, F. Růžička

**13. Studium antimikrobiální účinnosti katelicidinových peptidů na multirezistentních kmenech bakterií**

M. Šefranko, L. Vacek, A. Pavelka, L. Janda F. Růžička

**14. Vliv stafylokokových fágových preparátů na dynamicky kultivovaný bakteriální biofilm**

M. Elbl, D. Polašník Kleknerová, L. Vacek, R. Pantůček, F. Růžička

**14:50–15:20 Testovanie antimikrobiálních látek na animálním modelu**

**15. Porcinní model komplikované infekce kůže a měkkých tkání**

L. Vacek, B. Lipový, D. Polašník Klenerová, E. Jeklová, L. Lišková, J. Holoubek, D. Matysková, F. Růžička

**16. Fágová terapia v kombinácii s injekčnými hydrogélmi Gum Karaya u liečby infekcie hlbkej rany meticilín rezistentným *Staphylococcus aureus* na porcinnom modeli**

D. Diabelko, L. Vacek, D. Polašník Kleknerová, B. Lipový, M. Knoz, J. Holoubek, E. Černá, J. Brtníková, E. Jeklová, Š. Kobzová, L. Janda, R. Pantůček, L. Vojtová, F. Růžička

**17. Antimikrobiálny účinok hydrogélu na báze Gum Karaye v kombinácii s fágovým preparátom na multirezistentné kmene *Pseudomonas aeruginosa***

D. Polašník Kleknerová, L. Vacek, B. Lipový, E. Jeklová, R. Pantůček, L. Vojtová, F. Růžička

**15:20–15:50 Coffee break**

**15:50–16:30 Přednáška Centra pro transfer technologií**

**18:00–23:00 Společenský večer**

**1. 6. 2024**

**10:00–10:30 Antimikrobiální látky**

**18. Antibakteriální efekt peptidu Pac525 na intracelulární infekci *E. coli***

M. Coufalová, H. Michálková, V. Milosavljevic, K. Číhalová

**19. Antibakteriální účinky modifikovaných triterpenoidních látek**

L. Černá, A. Massyagutova, P. Lovecká

**20. Stanovení antimikrobiální účinnosti nátěrových hmot na bázi akrylátových latexů s dispergovanými  $\text{La}_2\text{O}_3$  nanočásticemi a pigmentem  $\text{TiO}_2$  obtiskovou metodou**

N. Baslerová, M. Pejchalová, S. Sabová, K. Bošítková, A. Kalendová

**10:30–11:00 Coffee break**

**11:00–12:00 Technická a environmentální mikrobiologie**

**21. Porovnání T2MR technologie a hemokultivačního vyšetření pro průkaz vybraných bakterií a kvasinek**

J. Štanclová, R. Kukla, M. Vejsová, L. Ryšková

**22. Detekce bakterií *Leptospira interrogans* s.l. u malých savců pomocí metody MAT**

L. Sadilová, A. Žákovská, J. Nepěřený

**23. Bakteriální kontaminace brýlových obrub**

E. Mangerová, O. Zahradníček

**24. Vliv toxicity kyseliny ferulové a kumarové na solventogenní klostridie**

K. Koppová, B. Branská

**25. Programovaná bunková lýza pre biotechnologie baktérie *Pseudomonas putida***

M. Pešta, M. Benešik, P. Dvořák

**12:15 Slavnostní zakončení**

## Postery

**P 01. Deciphering the role of BscX and BscY subunits in the *Bordetella* Type 3 Secretion System**

M. Čížková, V. Veverka, I. Malcová, P. Šebo, J. Kamanová, L. Bumba

**P 02. Vplyv infekcie vírusom kliešťovej encefalitídy na neimunitné bunky ľudskej kože**

J. Džubara, I. Štibrániová, P. Bartíková, M. Novotová

**P 03. Isolation and characterization of new bacteriophages infecting *Escherichia coli* phylogenetic group A strains**

S. Elnwrani, H. Drahovská

**P 04. Analýza pôvodcov komplikovaných a recidivujúcich infekcií močových ciest**

Ž. Füssy, Cs. Haver, M. Straka, A. Liptáková, L. Slobodníková

**P 05. Identification of residues involved in post-translational modification of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin**

M. Grobarcikova, A. Osickova, J. Cerny, S. Knoblochova, D. Jurnecka, R. Osicka, K. Skopova, P. Sebo, J. Masin

**P 06. Vliv fyto-genických aditiv na bachorovou mikroflóru hovězího dobytka a jejich potenciál pro snížení emisí metanu**

B. Holomková

**P 07. Indukce životaschopného, ale nekultivovatelného stavu u stafylokoků a jeho dopad na citlivost k fágové terapii**

P. Jelínek, E. Kučerová, L. Kuntová, L. Micenková, N. Hanišáková, T. Botka

**P 08. Stimulation of BTLA by UL144 promotes clustering of tumour cell line RAJI**

K. Lopusná, M. Benko, J. Džubara, I. Nemčovičová, V. Zezulová, I. Štibrániová, P. Bartíková

**P 09. Kurkumovník dlouhý: přírodní ochrana proti klíšťatům a jejich patogenům**

A. Ludková, M. Kromsiánová, T. Svěchotová, H. Nejezchlebová, M. Budíková, I. Horová, A. Žáková

**P 10. Porovnanie rastových a bioprodukčných vlastností troch kmeňov baktérie *Pseudomonas putida* s ohľadom na produkciu polyhydroxyalkanoátov**

D. Pšenka, P. Dvořák

**P 11. *Kingella kingae* cytotoxin RtxA induces an innate immune response in epithelial cells**

E. Růžičková, K. Zhuk, K. M. Navarrete, A. Osičková, R. Osička

**P 12. Termofilní bakterie rodu *Aneurinibacillus*: Producenti unikátních polyhydroxyalkanoátů**

V. Řeháková, I. Buchtíková, S. Obruča, P. Sedláček, M. Kalina

**P 13. Proč se mladí (ne)chtějí očkovat?**

T. Svěchotová, M. Kromsiánová, A. Ludková, K. Tomanová, H. Nejezchlebová

**P 14. Hlboká krčná infekcia z nekomplikovanej tonzilitídy u mladej pacientky s diabetom – kazuistika**

B. Tóth, M. Tedla



**P15. Isocitrát dehydrogenáza u difúzních gliomů: mutační analýza genů IDH1/2 pomocí sekvenování nové generace**  
K. Zettlová, J. Vrbský, M. Dvořáčková

## **01. Potenciál využívania Ramanovej spektroskopie v (klinickej) mikrobiológii**

K. Rebrošová (1), M. Šiler (2), M. Šerý (2), O. Samek (2), F. Růžicka (1)

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

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

Rýchla a súčasne presná identifikácia a charakterizácia mikroorganizmov predstavuje jednu z veľkých výziev súčasnej medicíny. Napríklad, rezistencia mikróbov voči antimikrobiálnym látkam patrí podľa Svetovej zdravotníckej organizácie k 10 najväčším globálnym výzvam v oblasti ľudského zdravia. Aby mohla byť teda liečba infekčných ochorení účinná, je potrebné včasné odhalenie rezistencie a vhodné prispôsobenie liečby. Ako jedna z možností rýchlej analýzy sa ponúka Ramanova spektroskopia – optická metóda založená na jave neelastického rozptylu svetla, ktorá si v posledných rokoch buduje svoje miesto aj v mikrobiologických aplikáciách. V našom aktuálnom výskume sa zaoberáme využitím Ramanovej spektroskopie na identifikáciu mikroorganizmov a ich charakterizáciu vrátane sledovania vplyvu antimikrobiálnych látok na mikróby.

Našou hlavnou metódou budovania knižnice na identifikáciu je získavanie Ramanových spektier z kolónií narastených na agarových pôdach pomocou komerčného prístroja Renishaw Invia Raman Spectrometer (Renishaw plc., Wotton-under-Edge, UK) s vlnovou dĺžkou laseru 785 nm. Do analýz zaradujeme aj optickú pinzetu, ktorá umožňuje charakterizáciu mikroorganizmov na úrovni jednotlivých buniek. Výsledky sú následne spracované pomocou interne vytvoreného programu založeného na softvéri MATLAB (MathWorks, Natick, MA, USA).

Analýzy spektier ukazujú, že medzi rôznymi druhmi mikroorganizmov sú rozdiely, ktoré umožňujú ich odlišenie. Taktiež, po vystavení mikroorganizmov antimikrobiálnym látkam dochádza k viditeľným zmenám v ich Ramanovom spektre. Naznačuje to, že účinok antimikrobiálnych látok sa premieta do Ramanových spektier mikróbov a tento fakt by mohol byť využitý na detekciu rezistencie voči antimikrobiálnym látkam.

Na základe doterajších výsledkov možno povedať, že Ramanova spektroskopia má potenciál stať sa nástrojom použiteľným na identifikáciu mikroorganizmov a zisťovanie rezistencie voči antimikrobiálnym látkam. Tým pádom by v budúcnosti mohla napomôcť pri voľbe vhodnej a efektívnej liečby infekcií.

Práca bola podporená projektmi NU21-05-00341 (Ministerstvo zdravotníctví ČR), MUNI/LF-SUp/1122/2022, MUNI/A/1507/2023 a MUNI/LF-ACC/1316/2023 (Masarykova univerzita).

## 02. Výskyt baktérií rezistentných voči antibiotikám v potravinovom reťazci a v environmente

M. Kraulcová (1), L. Bírošová (1), K. Cverenkárová (1), J. Koreneková (1), I. Segěňová (2)

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

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

[monika.kraulcovastu@gmail.com](mailto:monika.kraulcovastu@gmail.com)

Monitoring, prevencia a obmedzenie výskytu mikrobiálnej rezistencie je potrebný v celom potravinovom reťazci, „od poľa ku konzumentovi“. Cieľom tejto práce bolo monitorovanie indikátorových skupín baktérií v potravinovom reťazci, ako aj ich výskyt v životnom prostredí na Slovensku. Sledovaný bol navyše výskyt rezistentných variantov týchto skupín ako aj bližšia charakterizácia zachytených rezistentných izolátov.

Monitoring bol vykonaný na 9 vzorkách povrchových vôd a ich sedimentov, 5 kusoch žiabrá a čriev Kapra obyčajného, 13 vzorkách rýb a kôrovcov, 54 vzorkách pokrmov sushi a poké, 10 vzorkách ovocných a zeleninových šalátov a na 20 vzorkách smoothie nápojov. Skrining prebiehal kultivačne pomocou Chromocult Coliform agaru s a bez prídavku antibiotík. Následné boli rezistentné izoláty identifikované MALDI-TOF hmotnostným spektrometrom, ich profil citlivosti bol vyhodnotený prostredníctvom makrodilučnej kvapkovej metódy a rezistentné gény PCR reakciami.

Výsledky práce preukázali prítomnosť rezistentných koliformných baktérií v akvakultúre povrchových vôd a sedimentov, ale aj v potravinách na domácom trhu, určených na priamu spotrebu. Bola zaznamenaná istá korelácia výskytu rezistencie vo vode a sedimente rybníka v porovnaní s prítomnou rezistenciou vo vzorkách čriev a žiabrá vylovených kaprov. Pri procese úpravy rýb na konzumáciu môže dôjsť ku krížovej kontaminácii týmito baktériami. U vzoriek sushi bola pozorovaná rezistencia viazaná na konkrétnu potravinovú prevádzku ako aj čas odberu. Zistené počty napovedajú skôr kontaminácii z prostredia, aj vzhľadom na skutočnosť neprítomnosti chovných staníc týchto druhov rýb na Slovensku a s tým spojený dovoz mrazených jedincov. Vzorky smoothie rovnako obsahovali rezistentné baktérie. Baktérie vykazujúce fenotyp mnoholiekovej rezistencie a nesúce gény rezistencie boli detegované nielen v environmente, ale aj v potravinách.

V predkladanej práci sú navzájom prepojené rôzne oblasti výskytu rezistencie s potravinami. Prostredníctvom takto kontaminovanej konzumovanej potraviny sa rezistentné baktérie a determinanty rezistencie dostávajú späť k človeku. Stravovacie návyky populácie sa neustále vyvíjajú a nové preferencie stravy prinášajú nové riziká spojené nielen s výskytom alimentárnych infekcií, ale aj s výskytom bakteriálnej rezistencie. Riziko predstavujú najmä potraviny určené na priamu spotrebu, bez tepelného ošetrovania.

Táto práca bola podporená VEGA 1/0464/21 a Agentúrou na výskum a vývoj na základe zmlúv č. APVV-19-0250, PP-COVID-20-0019. Táto štúdia bola realizovaná vďaka štedrej podpore v rámci Operačného programu Integrovaná infraštruktúra pre projekt: „Strategický výskum v oblasti SMART monitorovania, liečby a preventívnej ochrany pred koronavírusom (SARS-CoV-2)“, Projekt č. 313011ASS8, spolufinancovaný Európskym fondom regionálneho rozvoja.

### 03. Záchyt kvasinek z hemokultur a umělých materiálů od pacientů v roce 2022

V. Fremlová (1), A. Siváková (2), F. Růžička (2)

(1) Vyšší odborná škola zdravotnická Brno, Brno, CZ

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

Výzkum byl zaměřen na pacienty s diagnózou kandidémie nebo kvasinkovou kolonizací katetrů v roce 2022 vyšetřených na MIU FN u sv. Anny v Brně. Byly hodnoceny zachycené druhy kvasinek a jejich citlivost k antimykotikům. Dále jsme sledovali věk, pohlaví a diagnózy pacientů, délku hospitalizace a typ oddělení, na kterém byli pacienti uloženi.

Hemokultury se kultivovaly v hemomatu DB Bactec FX 200 (Becton Dickinson, FR). Pozitivní záchyty se barvily podle Grama a dále kultivovaly na standardních kultivačních půdách. Katétry se vyšetřovaly semikvantitativně sonifikací (Sonorex Digital 10P, Bandelin, DE) s následnou kultivací na standardních médiích a Sabouraudově agaru (Milipore, DE). Kvasinky byly identifikovány orientačně pomocí selektivní chromogenní půdy CHROMagar (Trios, FR) a poté dourčeny MALDI TOF MS (Bruker Daltonics, USA). Citlivost k antimykotikům byla stanovena primárně difuzním diskovým testem (Liofilchem, IT) a E – testy (Biomérieux, FR), v klinicky závažných případech pomocí Sensititre YestOne (ThermoFisher Scientific, USA).

Z celkem 1327 pozitivních hemokultur bylo zachyceno 46 s kvasinkami od 19 pacientů. Nejčastěji byla identifikována *C. albicans* (CAAL, 11 pacientů), která vyrostla průměrně ve 2 lahvičkách. Dále jsme zachytili *C. glabrata* (CAGL, 5 pacientů), která rostla průměrně ve 4 lahvičkách, *C. tropicalis* (CATR, 3 pacienti) průměrně 3 záchyty a *C. parapsilosis* (CAPA, 1 pacient) se 3 záchyty. U 2 pacientů vyrostly kvasinky pouze v anaerobních lahvičkách a to 1 CAAL a 1 CAGL. Vyšší prevalence záchytu byla u pacientů hospitalizovaných na oddělení JIP a ARO a hospitalizovaných delší dobu než 21 dní. Věkový medián pacientů byl vyšší než 70 let a nebyl ovlivněn pohlavím. Kvasinkovou sepsí nejčastěji trpěli pacienti na chirurgii s postižením gastrointestinálního traktu (5 pacientů), což odpovídá i datům nadnárodní studie ECMM Candida III multinational European observational cohort study.

Z celkem 1911 pozitivních záchytů kultivace katetrů bylo 33 od 30 pacientů s nárůstem kvasinek, 5 pacientů mělo pozitivní i hemokulturu. Nejčastěji byla identifikována CAAL (18 pacientů), dále jsme zachytili CAGL (5 pacientů), CAPA (4 pacienti), CATR (2 pacienti) a *C. krusei* (1 pacient). Nejčastější diagnózou pacientů s kvasinkovou kolonizací katetrů byla kardiovaskulární onemocnění.

Tato práce byla podpořena z projektu MUNI/A/1507/2023.

#### 04. *Campylobacter curvus* jako původce nitrobřišního abscesu

E. Bartáková (1), J. Pudil (2), M. Čurdová (1)

(1) Oddělení klinické mikrobiologie, Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice, Praha, CZ

(2) Chirurgická klinika 2. LF UK a ÚVN, Ústřední vojenská nemocnice – Vojenská fakultní nemocnice, Praha, CZ

*Campylobacter curvus* je nesporulující mikroaerofilní gramnegativní bakterie vyskytující se u lidí jako komenzál dutiny ústní a bývá spojován s onemocněním periodontu. Extraorální kultivační nález *C. curvus* je v literatuře popsán pouze v jednotkách případů. V tomto sdělení předkládáme kazuistiku nitrobřišní infekce s jediným kultivačním nálezem *C. curvus*, a tedy pravděpodobným původcem nitrobřišního abscesu.

51letá pacientka bez závažných komorbidit byla vyšetřena pro bolesti břicha a občasné epizody zvýšené tělesné teploty. U pacientky bylo provedeno CT vyšetření břicha s nálezem rozměrného abscesu ventrálně před játry, v jedné době byla provedena CT navigovaná punkce a zavedena drenáž. Drén byl extrahován 7. den, kontrolní CT s odstupem 1 měsíce bylo s uspokojivým nálezem. Pacientka je nyní 3 měsíce zcela bez obtíží.

Ze dvou vzorků drénovaného obsahu abscesu jsme zachytili pouze drobný nárůst gramnegativních bakterií za anaerobních podmínek, které jsme identifikovali (MALDI-TOF) jako *C. curvus*. Kmen byl následně potvrzen v referenční laboratoři (Státní veterinární ústav v Olomouci). U izolovaného kmene jsme vyšetřili minimální inhibiční koncentrace (MIC) amoxicillinu/klavulonátu (MIC > 256 mg/l), ciprofloxacinu (MIC = 0,25 mg/l), metronidazolu (MIC = 2 mg/l) a tetracyklinu (MIC = 0,75 mg/l), nicméně pro *C. curvus* nejsou stanoveny breakpointy a v literárních zdrojích je o citlivosti dané bakterie dosud velmi málo poznatků. Pacientka byla od příjmu empiricky léčena ampicillinem/sulbactamem s dobrou klinickou odpovědí a antibiotická terapie tedy byla ponechána.

Touto kazuistikou prezentujeme vzácný případ extraorálního výskytu *C. curvus* u člověka. Vzhledem k diskrepanci *in vitro* citlivosti kmene a klinické odezvy na léčbu je k diskuzi, zda zde byl *C. curvus* jako patogen při tvorbě nitrobřišního abscesu či byl součástí směsné flory, kterou se však kultivačně prokázat nepodařilo.

## 05. Karbapeném-rezistentná *Klebsiella pneumoniae* v ére COVID-19

J.Ficik (1,2), A. Liptáková (2), L. Slobodníková (2)

(1) Ústav klinickej mikrobiológie, Ústredná vojenská nemocnica SNP-FN v Ružomberku, Ružomberok, SK

(2) Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského a Univerzitná nemocnica Bratislava, SK

Obdobie pandémie COVID-19 prinieslo nové medicínske výzvy, ktoré spolu s nozokomiálnymi bakteriálnymi infekciami znamenali pre zdravotníctvo obrovskú záťaž. Jednou z najalarmujúcejších nozokomiálnych hrozieb bola *Klebsiella pneumoniae* rezistentná voči karbapenémom (CRKP). Je nesmierne dôležité monitorovať výskyt CRKP kmeňov a ich antimikrobiálnu rezistenciu, a to ako na globálnej, tak na lokálnej úrovni. V retrospektívnej štúdii realizovanej v Ústrednej vojenskej nemocnici v Ružomberku bol zisťovaný výskyt CRKP kmeňov v období pred COVID-19 (2017–2019) a počas pandémie COVID-19 (2020–2022). Relatívny výskyt CRKP sa počas obdobia COVID-19 výrazne zvýšil – 4,8krát, z 0,18 na 0,76 %. Zároveň 47 % CRKP-pozitívnych pacientov malo súčasne aj COVID-19. Identifikovalo sa 26 izolátov produkujúcich KPC enzýmy a 69 izolátov produkujúcich enzýmy NDM. Vybrané CRKP kmene izolované v roku 2022 boli podrobené celogenómovému sekvenovaniu a ich citlivosť bola testovaná na cefiderokol, ceftazidím–avibaktám, imipeném–relebaktám a meropeném–vaborbaktám s vynikajúcimi výsledkami. Izoláty produkujúce KPC boli tiež vysoko citlivé na kolistín (92 %). Izoláty NDM mali nižšiu mieru citlivosti na kolistín (iba 57 %). U KPC izolátov prevládal sekvenčný typ ST-307 a u NDM izolátov ST-11. Napriek vynikajúcej aktivite nových antimikrobiálnych látok je nevyhnutné dôsledné dodržiavanie racionálnej antibiotickej politiky podporené doplnkovou liečbou a prísnyimi protiepidemickými opatreniami.

**Kľúčové slová:** *Klebsiella pneumoniae* rezistentná voči karbapenémom; KPC; NDM; COVID-19; antimikrobiálna rezistencia; celogenómové sekvenovanie

## 06. Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* CC398 se schopností produkce Pantonova-Valentinova leukocidinu v České republice

K. Brodíkova (1), M. Haenni (2), R. Karpíšková (1)

(1) Ústav veřejného zdraví, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, Brno, CZ

(2) Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence Unit, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety, Lyon, FR

Meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) klonálního komplexu CC398 je spojován s výskytem u hospodářských zvířat. Tato skupina MRSA se vyznačuje rezistencí k tetracyklinu a absencí genů virulence, které jsou detekovány u komunitních kmenů. Nová varianta kmenů MRSA CC398 s produkcí Pantonova-Valentinova leukocidinu (PVL) a dalšími geny typickými pro humánní kmeny si proto zaslouží zvýšenou pozornost.

Izoláty byly potvrzeny jako MRSA pomocí PCR. Následně bylo provedeno testování PCR na příslušnost k CC398 a na přítomnost genů kódujících produkci PVL. Všechny MRSA CC398 s produkcí PVL byly následně podrobeny celogenomovému sekvenování (WGS) a analýze výsledků sekvenování.

Bylo získáno 5 izolátů PVL pozitivních MRSA CC398. Všechny patřily k sekvenčnímu typu ST1232 a *spa* typům t034 a t571. U každého kmene byla hodnocena přítomnost tzv. immune-evasion genů, genů kódujících biofilm a dalších genů virulence. Kmeny vykazovaly rezistenci ke klindamycinu, erytromycinu a tetracyklinu a nesly i další geny rezistence.

Tato studie uvádí první výskyt PVL pozitivních kmenů MRSA CC398 v České republice. Tyto kmeny jsou rozšířeny zejména v Asii a liší se od izolátů animálních. Další epidemiologické studie a sledování šíření těchto kmenů jsou významné zejména s ohledem na jejich potenciál způsobovat závažné infekce.

Studie byla podpořena z projektu NU23-09-00488.

## 07. Testovanie kolonizácie nosovej sliznice študentov medicíny kmeňmi *Staphylococcus aureus* a potenciálne predispozičné faktory

S. Kern (1), S. Kasanická (1), M. Straka (1), L. Jánošíková (1), I. Voronkina (1), M. Wawruch (2), M. Dubinová (1)

(1) Mikrobiologický ústav, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SK

(2) Ústav farmakológie a klinickej farmakológie, Lekárska fakulta Univerzity Komenského, Bratislava, SK

### Úvod

*Staphylococcus aureus* je oportúnny patogén, ktorý kolonizuje sliznice a kožu človeka. Zároveň má schopnosť vyvolávať respiračné infekcie, infekcie mäkkých tkanív a kože, ale aj závažné systémové infekcie. Jedným z rizikových faktorov rozvoja týchto infekcií je nosičstvo *S. aureus*, ktorý sa najčastejšie vyskytuje na nosovej sliznici. Cieľom tejto práce bolo zistiť prevalenciu nosičstva *S. aureus* na nosovej sliznici u študentov Lekárskej fakulty, keďže táto skupina ľudí predstavuje potenciálne riziko pre hospitalizovaných pacientov. Bola stanovená aj citlivosť na antimikrobiálne látky izolovaných kmeňov a analyzovaná súvislosť kolonizácie s vybranými predispozičnými faktormi.

### Metodika

Bolo vyšetrených 303 vzoriek výterov z nosa pri 1. odbere a po ôsmich mesiacoch 272 výterov pri 2. odbere. Oba odbery boli realizované u tých istých študentov. Kmene *S. aureus* boli identifikované na základe kultivačných a biochemických vlastností a následne bola testovaná ich citlivosť voči antimikrobiálnym látkam. Študenti vyplnili dotazník týkajúci sa predispozičných faktorov (fajčenie, opakované a chronické infekcie, alergie, návšteva zdravotníckych zariadení, nadmerné používanie sprejov do nosa). Výsledky boli štatisticky spracované pomocou Pearsonovho  $\chi^2$  - testu a modelom binárnej logistickej regresie. Všetky štatistické testy boli realizované na hladine štatistickej významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### Výsledky

Bolo izolovaných 123 (41 %) kmeňov *S. aureus* pri 1. odbere a 133 (44 %) pri 2. odbere. Testované kmene *S. aureus* boli citlivé voči antimikrobiálnym látkam, najnižšia miera citlivosti bola zistená voči erytromycínu (49 % v 1. odbere a 51 % v 2. odbere). Z predispozičných faktorov sa ukázalo ako štatisticky významné mužské pohlavie, u ostatných sa štatistická významnosť nepotvrdila.

### Záver

Bola zaznamenaná vysoká miera kolonizácie kmeňmi *S. aureus* u študentov medicíny, ktorá bola vyššia ako u bežnej populácie. Citlivosť kmeňov na antimikrobiálne látky bola vysoká, vrátane mupirocínu, ktorý je vhodný na lokálnu dekolonizáciu *S. aureus*.

Táto práca bola podporená grantom KEGA002UK-4/2022.



## 08. Patogenita přisátých klíšťat odstraněných z dětí

A. Pechová (1), A. Žáková (1,2), Helena Nejezchlebová (2)

(1) Katedra biologie, Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

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

Klíšťata *Ixodes ricinus* jsou vektory patogenních mikroorganismů, které mohou být po procesu sání přeneseny na hostitele. Pokud do tohoto cyklu zasáhne náhodně člověk nebo hospodářské zvíře, výsledkem pak může být závažné onemocnění způsobené přenosem určitého patogenu. Cílem práce je detekce vybraných patogenů v klíštěti obecně odstraněném z dětí na letním táboře. Dalším cílem práce je na základě výsledků seznámit veřejnost s rizikem přenosu infekce prostřednictvím klíštěte a zdůraznit důležitost dodržování preventivních opatření. Zjištění přítomnosti patogenů bylo provedeno pomocí PCR metody. U 110 klíšťat byla zjišťována přítomnost mikroorganismu *Borrelia burgdorferi* s.l. a posléze byla prováděna detekce dalších čtyř patogenů (*Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Ehrlichia chaffeensis* a *Francisella tularensis*). Všechny tyto patogeny vyvolávají závažná zoonotická onemocnění. Průměrná pozitivita všech vzorků na Bbsl byla 40 %. Promořená klíšťata se objevila u dětí ve věku 7–13 let. Bylo také analyzováno celkem 10 klíšťat rodu *Dermacentor* a *Haemaphysalis* posbíraných z vegetace. Pozitivita nebyla odhalena u žádného z nich.

## 09. Anikterická forma leptospirózy po pokousání myší

J. Ondrouch (1), M. Fajfr (1,3), L. Ryšková (1,3), R. Bolehovská (1,3), R. Kukla (1,3), P. Šmahel (2,3)

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

(2) Klinika infekčních nemocí Fakultní nemocnice Hradec Králové, CZ

(3) Lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Hradec Králové, CZ

Úvod: Leptospiróza je celosvětově nejrozšířenější zoonóza. Rezervoárem jsou zejména hlodavci a prostředí kontaminované jejich močí. Onemocnění je pravděpodobně často poddiagnostikováno z důvodu výskytu převážně mírně probíhající anikterické formy (blatácká, žňová nebo polní horečka). Závažnější průběh je popisován u ikterické formy – Weilovy choroby, u které je zpravidla nutná hospitalizace. Níže popisujeme případ anikterické formy leptospirózy u pacienta, který se nakazil netypicky po pokousání myší.

Kazuistika: Šestnáctiletý chlapec byl pokousán myší 24. 12. 2023 do distálního článku 4. prstu. Po ošetření byla rána do 4. 1. 2024 klidná, postupně však nastoupila únava, bolesti zad, končetin, cefalea a febrilie 39 °C doprovázené zimnicemi. Antipyretika byla účinná pouze krátkodobě a od 5. 1. se objevila nevolnost, zvracení a průjem. Po vyšetření u praktického lékaře byl chlapec přijat k dalšímu vyšetření na Dětskou kliniku FNHK. Laboratorně byly zjištěny známky zánětu – CRP 137 mg/l, vzestup dusíkatých katabolitů, dále zvýšena hladina AST a mírná splenomegalie. Terapie byla zahájena perorálním cefprozilem, pro jeho intoleranci byl pacient odeslán na Kliniku infekčních nemocí k intravenózní terapii cefotaximem. Pro přechodný výsev makulózního exantému byl přidán klaritromycin. Ze séra a moči byla metodou PCR detekována slabá pozitivita DNA *L. grippityphosa*. Mikroskopickým aglutinačním testem byla potvrzena *L. grippityphosa* sérotyp Z6. Antibiotická léčba byla deeskalována na intravenózní cefotaxim a po 7 dnech postupného zlepšování stavu byl pacient propuštěn do domácí péče a terapie byla změněna na perorální doxycyklin s celkovou délkou 14 dní.

Závěry: Při diagnostice leptospirózy je nutné myslet i na vzácnější cesty přenosu, v tomto případě se jednalo o pokousání nakaženou myší. Průkaz *L. grippityphosa* sérotyp Z6 koresponduje s pozorovaným mírnějším průběhem anikterické formy bez závažnějších následků.

## 10. Identifikácia génov podieľajúcich sa na virulencii a perzistencii kmeňov *Listeria monocytogenes* v prostredí spracovania potravín

A. Burdová (1), Z. Rešková (2), E. Kačíková (2), J. Minarovičová (2), H. Drahovská (1)

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

(2) Výskumný ústav potravinársky, Bratislava, SK

*Listeria monocytogenes* je bakteriálny patogén zodpovedný za listeriózu, ochorenie prenášané potravinami, ktoré je nebezpečné najmä medzi zraniteľnými skupinami. Táto baktéria môže prežiť a rásť v drsných podmienkach prostredia, aké sa používajú v závodoch na spracovanie potravín. Jej rozšírený výskyt priamo súvisí so schopnosťou tvoriť biofilmy. Bunky v rámci biofilmov sú zároveň odolnejšie voči stresovým podmienkam, ako je čistenie a dezinfekcia. Vystavenie tohto patogénu subinhibičným koncentráciám dezinfekčných prostriedkov na báze kvartérnych amóniových zlúčenín môže zvýšiť rýchlosť tvorby biofilmu. Technológia celogenómového sekvenovania (WGS) a bioinformatickej analýzy poskytuje cenné údaje na charakterizáciu izolátov, ako je identifikácia génov virulencie, sérotypov, typov sekvencií a génov antimikrobiálnej rezistencie.

Cieľom tejto práce bola analýza prítomnosti génov virulencie, génov podieľajúcich sa na perzistencii, génov kódujúcich antibiotickú rezistenciu u kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z dvoch výrobných prevádzok. Na izoláciu chromozomálnej DNA *L. monocytogenes* sme použili QIAamp DNA Mini Kit a kontrolu koncentrácie DNA sme overili na prístroji Qubit™ dsDNA HS Assay Kit. Genómové knižnice určené na sekvenovanie sme pripravili podľa protokolu Nextera XT DNA Prep Kit a prečistili na magnetických guľôčkach AMPure XP magnetic beads. Priemernú dĺžku finálnych knižníc sme stanovili pomocou prístroja Bioanalyser 2100 a samotné sekvenovanie prebehlo na platforme Illumina. Dáta zo sekvenátora sme poskladali do kontigov pomocou algoritmu SPAdes a genómy sme anotovali pomocou online platformy RAST a analyzovali pomocou online platformy BIGSdb.

Priemerná dĺžka genómu 27 sekvenovaných kmeňov bola 2,9 Mb s priemerným počtom kontigov 35 a pokrytím 51. Na základe cgMLST analýzy sme kmene *L. monocytogenes* rozdelili do 10 sekvenčných typov (ST-6, ST-8, ST-9, ST-14, ST-20, ST-87, ST-91, ST-121, ST-194, ST-394). Tri skupiny kmeňov sa pri cgMLST analýze líšilo v menej ako desiatich lokusoch, a preto sme tieto kmene zaradili k jednému klonu perzistujúcemu v prevádzke: 7 kmeňov zaradených k sekvenčnému typu ST-14 izolovaných z ovčej farmy, 3 kmene ST-14 izolované z mäsovej prevádzky a 2 kmene ST-2 z mäsovej prevádzky. V kmeňoch sme analyzovali prítomnosť 69 génov. Spomedzi analyzovaných génov kódujúcich antibiotickú rezistenciu bol gén *mprF* kódujúci bifunkčný membránový proteín prítomný iba u 4 kmeňov. V časti analýzy génov súvisiacich s tvorbou biofilmu sme zistili, že gény *bcrB* a *bcrC* sú prítomné u 3 z 27 kmeňov *L. monocytogenes* izolovaných z tej istej prevádzky na spracovanie potravín a všetky prislúchali sekvenčnému typu 14. Gény *bcrB* a *bcrC* kódujú rezistenciu na benzalkoniumchlorid, na ktorého báze sú založené bežne využívané dezinfekčné prostriedky v prostredí potravinárskeho priemyslu, a preto tieto kmene môžu, byť odolnejšie voči sanitácii a perzistovať v danom prostredí. V prípade analýzy ostrovov patogenity listérií sme identifikovali variant LIPI-1 u 3 z 27 kmeňov *L. monocytogenes* (ST-9, ST-14, ST-451), LIPI-3 bol prítomný u 2 z 27 kmeňov *L. monocytogenes* (ST-6) a LIPI-4 prítomný u 2 z 27 kmeňov *L. monocytogenes* (ST-194, ST-87). Ostrov SSI-2 bol prítomný iba u jedného kmeňa ST-121. Pomocou celogenómového sekvenovania sme charakterizovali 27 kmeňov *L. monocytogenes*. V kmeňoch sme celkovo analyzovali 69 génov, pričom sme zistili, že väčšina analyzovaných kmeňov mala prítomné všetky dôležité faktory virulencie. Výsledky z našich analýz môžu

napomôcť pri hľadaní nových spôsobov dekontaminácie prostredia spracovania potravín na Slovensku.

Podakovanie

Práca bola zrealizovaná vďaka finančnej podpore z projektu APVV-20-0001.

## 11. Proliferace a metabolická aktivita bakterií na nanovlákněných polykaprolaktonových materiálech pro lékařské využití

M. Štindlová (1), V. Jenčová (2), K. Havlíčková (2), S. Lencová (1)

(1) Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CZ

(2) Katedra chemie, Technická univerzita Liberec, Liberec, CZ

Biodegradabilní nanovlákněné materiály (NM) jsou v dnešní době základem mnoha sterilních krytí ran nebo povrchů implantátů. Jejich porézní struktura podobná tkáním s sebou nese riziko kolonizace patogenními mikroorganismy, které zde mohou vytvářet biofilm a infekční ložiska. Strukturování povrchu hladkých vláken NM by však mohlo potlačit schopnost bakterií proliferovat.

Z tohoto důvodu byly testovány dva polykaprolaktonové (PCL) NM o různé molekulové hmotnosti (45 a 80 kDa) s hladkými (PCL45\_h; PCL80\_h) nebo strukturovanými (PCL45\_s; PCL80\_s) povrchy vláken. NM byly kultivovány 48 h s bakteriemi *Staphylococcus aureus* (CCM 3953 a 4516) a *Escherichia coli* (CCM 3954 a 4517). Nárůst bakterií byl hodnocen kvantitativně pomocí počtu KTJ/cm<sup>2</sup> a kvalitativně pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Dále byla hodnocena metabolická aktivita biofilm-tvořících buněk pomocí upravené MTT eseje.

Naměřená data ukazují, že PCL NM jsou po 48 h hojně kolonizovány oběma typy bakterií, ale ve všech případech kromě PCL80\_s u kmene CCM 4516 signifikantně méně než kontrolní polystyrenová destička. Dle SEM jsou vlákna PCL45 primárně kolonizována na povrchu, zatímco u PCL80 bakterie pronikají i do vnitřních struktur. Rozdíl v nárůstu na PCL\_h a PCL\_s vláknech byl signifikantní v případě PCL45 u kmenů CCM 4516 a CCM 4517, a v případě PCL80 u obou kmenů *S. aureus* a *E. coli* CCM 3954. Získaná data metabolické aktivity ukazují rozdíly způsobené hlavně počtem KTJ/cm<sup>2</sup> a ne morfologií NM.

Lze tedy usuzovat, že testované změny morfologie vláken nejsou ve většině případů po 48 h tvorbě biofilmu relevantní a pro použití pro lékařské účely je nutné tyto NM stále aplikovat společně s léčivými. Nicméně úpravou průměru vláken lze ovlivnit lokalizaci nárůstu bakterií.

Výzkum byl podpořen Grantovou agenturou České republiky č. 23-05154S a Specifickým univerzitním výzkumným grantem č. A2\_FPBT\_2024\_023.

## 12. Studium terapeutického potenciálu pseudomonádových fágových preparátů na bakteriální biofilm

F. Volný (1), L. Vacek (1), R. Pantůček (2), F. Růžička (1)

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

(2) Oddělení genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, Brno, CZ

Korespondenční adresa: [484031@mail.muni.cz](mailto:484031@mail.muni.cz)

*P. aeruginosa* je oportunně patogenní bakterie, která je schopna vytvářet biofilm na nejrůznějších živých i neživých substrátech. Buňky v biofilmu vykazují často velmi odlišné vlastnosti v porovnání s jejich planktonickými protějšky a bývají mnohonásobně rezistentnější k různým antimikrobiálním činidlům. Současná léčba se zaměřuje na používání antibiotik, častá rezistence a exprese velkého počtu faktorů virulence touto bakterií však vede k její neúspěšnosti. Neúčinnost antibiotik si žádá hledání alternativních strategií, slibnou léčbou pseudomonádových infekcí by mohla být fágová terapie.

Tato práce se věnovala vlivu fágového preparátu na biofilm klinicky významných zástupců druhu *P. aeruginosa*. Jeho účinek byl posuzován u biofilmů kultivovaných staticky a dynamicky, dále na formaci biofilmu a v kombinaci s antibiotiky. Fágový preparát vykazoval proti biofilmu podstatně vyšší účinnost, pokud byl podán spolu s antibiotiky. Samostatně se jevil jako neúčinnější, když byl opakovaně aplikován během formace biofilmu.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU20-05-00166.

### **13. Studium antimikrobiální účinnosti katelucidinových peptidů na multirezistentních kmelech bakterií**

M. Šefranko (1), L. Vacek (1), A. Pavelka (2), L. Janda (2), F. Růžička (1)

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

(2) Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, CZ

V súčasnej dobe sa stretávame s narastajúcou hrozbou rezistentných kmeňov baktérií voči bežne dostupným antibiotikám. Tento problém nás núti hľadať nové spôsoby liečby infekcií. Jedným z možných riešení sú antimikrobiálne peptidy. Antimikrobiálne peptidy sú krátke reťazce aminokyselín, ktoré sa nachádzajú v prirodzených obranných mechanizmoch organizmov. Ich účinnosť spočíva v schopnosti ničiť bunky patogénnych baktérií, vrátane multirezistentných kmeňov.

Cielom tejto práce je stanovenie účinnej koncentrácie katelucidinových peptidov proti multirezistentným kmeňom *P. aeruginosa*. Testovanie prebiehalo aplikáciou katelucidinových peptidov LL-37, PMAP-23, SMAP-29, PG-1 a chCATH-2 jednotlivo a následne v kombináciách pre planktonické bunky. Najefektívnejší účinok bol preukázaný vo dvojiciach peptidov LL-37 v kombináciách so SMAP-29, PG-1 a chCATH-2. Naopak, an-agonistické pôsobenie bolo pozorované v kombináciách SMAP-29 spoločne s PG-1 a chCATH-2. Ďalším záujmom v tejto práci bolo skúmanie antimikrobiálneho účinku katelucidínov na elimináciu bakteriálnych buniek v podobe biofilmu, kde sa prejavili ako účinné vysoké a aj nízke koncentrácie skúmaných peptidov.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU22-05-00475.

## 14. Vliv stafylokokových fágových preparátů na dynamicky kultivovaný bakteriální biofilm

M. Elbl (1), D. Polašík Kleknerová (1), L. Vacek (1), R. Pantůček (2), F. Růžička (1)

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

(2) Oddělení genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, Brno, CZ

### Úvod

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) patří mezi nejčastější bakteriální patogeny způsobující nozokomiální infekce. Obzvláště závažné jsou infekce projevující se produkcí biofilmu, což je mikrobiální struktura tvořena buňkami obklopenými extracelulární matrix s vysokou mírou odolnosti vůči antimikrobiálním látkám. Zejména v případě rezistentních kmenů MRSA je zkoumáno využití specifických bakteriofágů, které dokáží efektivně eradikovat stafylokoka.

### Cíle

Cílem experimentální části diplomové práce byla optimalizace dynamického systému kultivace stafylokokového biofilmu za použití vybraného stafylokokového kmenu (ST 22) a bakteriofága (JK2). Zároveň cílem bylo i stanovení a zaznamenání hranice vhodných použitelných koncentrací fágového preparátu prokazatelně inhibující růst stafylokokového biofilmu.

### Metody

Experiment byl prováděn opakovaně pomocí metody kultivace na silikonových discích za dynamických podmínek v průtokových silikonových komůrkách. Bakteriofág byl do systému zaveden po 48 hodinách kultivace, aby bylo množství biofilmu dostatečné.

### Výsledky a závěr

Výsledky byly vyhodnocovány metodou spektrofotometrie s využitím fluorescenčního barviva resazurinu k měření a stanovení životaschopnosti buněk. Následně byly změřené koncentrace naředěny a vysety na MH agar, kde proběhla kvantifikace počítáním CFU/ml. Předběžné výsledky naznačují, že účinná koncentrace fágového preparátu je  $10^{11}$  až  $10^9$  PFU/ml. Klinicky vhodná koncentrace odpovídá přibližně  $10^6$  PFU/ml, a proto je nutné vyzkoušet vhodné kombinace s jinými antimikrobiálními látkami. V současnosti experimenty směřují k fázi testování synergického účinku fágového preparátu a vhodného antibiotika.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU20-05-00166.



## 15. Porcinní model komplikované infekce kůže a měkkých tkání

L. Vacek (1), B. Lipový (2,3), D. Polaščík Klenerová (1), E. Jeklová (4), L. Lišková (5), J. Holoubek (2), D. Matysková (2), F. Růžička (1)

(1) Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(2) Klinika popálenin a plastické chirurgie, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(3) Pokročilé biomateriály, Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Brno, CZ

(4) Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, CZ

(5) Ústav Histologie a Embryologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

S rostoucí antimikrobiální rezistencí je naléhavě zapotřebí nových terapeutických strategií. Ačkoli jsou zvířecí modely pro preklinické studie klíčové, pro prasečí modely, konkrétně pro komplikované infekce kůže a měkkých tkání (cSSTI) způsobené *Pseudomonas aeruginosa*, jsou k dispozici jen omezené údaje. Tato studie představuje nový prasečí model vyvolávající a udržující cSSTI po dobu 14 dnů.

Šest prasat (120 ran) bylo použito pro rozvoj infekce a v rámci této skupiny byla dvě prasata (40 ran) použita pro hodnocení progresu infekce cSSTI.

Model vykazoval bakteriální zátěž vyšší než  $10^7$  CFU/gram tkáně nebo vyšší. cSSTI se plně rozvinula během tří dnů a zůstala výrazně nad těmito hodnotami až do 14. dne po infekci.

Díky imunokompetenci tohoto modelu jsou zachovány všechny imunologické procesy spojené s reakcí na přítomnost infekce a proces hojení rány.

Podpořeno z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU20-05-00166 a NU22-05-00475.

## 16. Fágová terapia v kombinácii s injekčnými hydrogélmi Gum Karaya u liečby infekcie hlbkej rany meticilín rezistentným *Staphylococcus aureus* na porcínnom modeli

D. Diabelko (1), L. Vacek (1), D. Polašík Kleknerová (1), B. Lipový (2,3), J. Holoubek (2), E. Černá (3), J. Brtníková (3), E. Jeklová (4), Š. Kobzová (4), L. Janda (4), L. Lišková (5), T. Botka (6), R. Pantůček (6), L. Vojtová (3), F. Růžička (1)

(1) Mikrobiologický ústav Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(2) Klinika popálenin a plastické chirurgie, Fakultní nemocnice Brno, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(3) Pokročilé biomateriály, Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické, Brno, CZ

(4) Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, CZ

(5) Ústav Histologie a Embryologie, Lékařská fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

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

Infekcie kože a mäkkých tkanív predstavujú významnú výzvu v oblasti zdravotnej starostlivosti, najmä v súvislosti s rastúcou antibiotickou rezistenciou. V tejto štúdii sa skúma účinnosť nového terapeutického prístupu kombinujúceho terapiu bakteriofágmi (fágmi) s hydrogélovým nosičom na báze Gum Karaya (GK) na modeli hlbokých stafylokokových kožných infekcií u prasiat. V štúdii sa využíva stafylokokový fág 812K1/420 z rodu *Kayvirus*, ktorý sa vyznačuje svojou lytickou aktivitou, bezpečnosťou a jeho aktivitou proti meticilín-rezistentnému zlatému stafylokokovi (MRSA). Injekčné hydrogély a hydrogélové filmy GK vyvinuté našou výskumnou skupinou slúžia ako účinné, netoxické a ľahko aplikovateľné aplikačné systémy, ktoré podporujú vlhké hojenie rán a ich reepitelizáciu.

Na modeli ošípaných vykazovala kombinovaná liečba synergický účinok, ktorý viedol k významnému zníženiu bakteriálnej záťaže ( $2,5 \log$  CFU/gram tkaniva) v priebehu jedného týždňa. Lokálne príznaky zápalu sa výrazne znížili do 8. dňa, pričom sa jasne preukázala rýchlejšia reepitelizácia a kontrakcia rany. Dôležité je, že počas celej štúdie neboli pozorované žiadne nežiaduce účinky testovaného systému na báze GK.

Výsledky zdôrazňujú potenciál tohto inovatívneho terapeutického prístupu na účinnú liečbu hlbokých kožných stafylokokových infekcií, čo poskytuje sľubnú cestu pre ďalší výskum a klinické využitie v oblasti infekcií spôsobených rezistentnými baktériami.

Podporené z programového projektu Ministerstva zdravotníctva ČR s reg. č. NU20-05-00166.

## 17. Antimikrobiálny účinok hydrogélu na báze Gum Karaye v kombinácii s fágovým preparátom na multirezistentné kmene *Pseudomonas aeruginosa*

D. Polašík Kleknerová (1), L. Vacek (1,2), B. Lipový (3,5), E. Jeklová (2), R. Pantůček (4), L. Vojtová (5), F. Růžička (1)

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

(2) Oddělení infekčních chorob a preventivní medicíny, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, CZ

(3) Klinika popálenin a plastické chirurgie Fakultní nemocnice Brno a Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity, Brno, CZ

(4) Oddělení genetiky a molekulární biologie, Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, Brno, CZ

(5) Pokročilé biomateriály, Středoevropský technologický institut Vysokého učení technického, Brno, CZ

### Úvod

*P. aeruginosa* predstavuje významnú hrozbu pre imunokompetentných aj imunokompromitovaných jedincov a často vedie k život ohrozujúcim infekciám, ktoré sú spôsobené multirezistentnými kmeňmi. Vzhľadom na rastúcu antimikrobiálnu rezistenciu je potrebné hľadať nové terapeutické stratégie, ktoré nahradia klasickú liečbu antibiotikami.

### Ciele

Otestovanie možnosti suplementácie hydrofilmov a hydrogélů na báze živice Gum Karaya (GK) pomocou fágových preparátů vhodných k liečbe infekcií spôsobených multirezistentnými kmeňmi *P. aeruginosa*.

### Metódy

*In vivo* testy na animálnom modeli infekcie multirezistentným kmeňom *P. aeruginosa* FF2 boli prevedené na štyroch prasatách. Na chrbte prasiat bolo vytvorených 20 kožných defektů s veľkosťou 5 x 5 cm. Na rany bolo aplikovaných 5 ml bakteriálneho inokula ( $2 \times 10^9$  CFU/ml). Pre overenie miery infekcie boli v dňoch 4, 7, 10 a 14 odobrané otláčky z povrchu rán, bioptický odber tkanív rán a histologické farbenie odobraných tkanív. V rámci liečby boli na povrch rany aplikované GK hydrofilmy/gély doplnené dvoma rôznymi pseudomonádovými fágovými preparátmi – preparát s kmeňom MB501 a preparát s dvoma kmeňmi (MB501 a LUZ19).

### Výsledky a záver

V priebehu pokusu sa preukázal štatisticky významný liečebný efekt antimikrobiálneho krytia s fágovými preparátmi infekcie spôsobenej kmeňom *P. aeruginosa*. Z priemerného množstva  $7,8 \pm 0,4$  log CFU/gram tkaniva došlo k poklesu bakteriálnej nálože v ranách na hodnoty  $5,1 \pm 0,8$  log CFU/gram tkaniva ( $p < 0,001$ ), teda priemerné zníženie o 2,7 log CFU/gram tkaniva medzi počiatkom liečby a 11. dňom liečby infekcie. Výrazný liečebný efekt krytia rán založenom na živici GK suplementovanej fágovými preparátmi bol úspešne preukázaný a získané výsledky majú uplatnenie na nadväzujúci výskum a prax.

Podporené z programového projektu Ministerstva zdravotníctva ČR s reg. č. NU20-05-00166 a NU22-05-00475.

## 18. Antibakteriální efekt peptidu Pac525 na intracelulární infekci *E. coli*

M. Coufalová (1), H. Michálková (1), V. Milosavljevic (1), K. Číhalová (1)

(1) Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta Mendelovy univerzity, Brno, CZ

Intracelulární infekce vyvolané bakteriemi se schopností invaze představují komplexní problém v léčbě, neboť tyto bakterie mohou přežívat a rozmnožovat se uvnitř hostitelských buněk. V důsledku toho se stává léčba intracelulárních infekcí obtížnou, jelikož jsou bakterie uvnitř buňky odolné vůči běžným léčebným postupům. Jen omezené množství antibiotik má schopnost proniknout do intracelulárního prostoru, což vyvolává potřebu vývoje nových antimikrobiálních látek. Vzhledem k rostoucímu riziku vzniku a šíření antibiotické rezistence se zdá být vhodnou strategií inspirace přírodními látkami. Tyto látky mohou nabídnout naději na omezení rozvoje rezistence a minimalizaci kontaminace životního prostředí. Mezi takové přírodní látky patří antimikrobiální peptidy, které jsou součástí produkce vrozené imunity všech tříd živých organismů a díky své nespecifické povaze dokáží účinně působit proti širokému spektru mikroorganismů.

Cílem výzkumu byl vývoj nového konceptu léčiva pro léčbu intracelulárních bakteriálních infekcí na bázi krátkých antimikrobiálních peptidů. Byl vybrán antimikrobiální peptid s vysokým obsahem tryptofanu (Pac525), který byl konjugován s tripeptidovou doménou RGD, která je komplementární k sekvenci integrinů na povrchu eukaryotních buněk, čímž umožňuje vazbu na jejich povrch a penetraci do intracelulárního prostoru. Byly syntetizovány tři peptidy – RGD, Pac525 a konjugát RGD-Pac525, jejichž vlastnosti byly ve studii porovnávány.

V naší studii byla prokázána účinnost antimikrobiálního peptidu proti invazivní bakterii *E. coli* při testování na makrofágové buněčné linii RAW 264.7. Fluorescenční mikroskopie dále potvrdila schopnost léčiva proniknout do intracelulárního prostoru eukaryotních buněk po bakteriální invazi. Kultivační metodou byla následně prokázána účinnost peptidů, přičemž konjugát RGD-Pac525 byl schopen vymýtit až polovinu intracelulárních bakterií *E. coli* uvnitř makrofágů.

Výzkum byl podpořen grantem Interní grantové agentury Agronomické fakulty MENDELU AF-IGA2023-IP-014.

## 19. Antibakteriální účinky modifikovaných triterpenoidních látek

L. Černá (1), A. Massyagutova (1), P. Lovecká (1)

(1) Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CZ

Předmětem práce bylo testování antibakteriálních účinků oximových derivátů triterpenoidních kyselin, konkrétně betulonové a platanové kyseliny. Tyto kyseliny patří mezi sekundární metabolity produkované rostlinami z čeledi *Betulaceae* a *Platanaceae*. Jejich syntetické deriváty vykazují často lepší farmakologické vlastnosti. Antimikrobiální aktivita byla stanovena na 4 kmenech patogenních bakterií (*Staph. aureus*, *Enteroc. faecalis*, *E. coli*, *Pseud. aeruginosa*). U nejaktivnějších derivátů byla jejich aktivita otestována také na 4 rezistentních klinických izolátech (*Staph. epidermidis* 335, *Staph. hominis* 334, *Staph. aureus* 368, *Staph. aureus* 670) získaných z Fakultní Nemocnice Královské Vinohady. Pro orientační stanovení antimikrobiální aktivity byla využita difúzní disková metoda. Přesnější měření zahrnovaly spektrofotometrické testy provedené diluční metodou a barvením buněk resazurinem. Celkem bylo testováno 17 derivátů. Betulonová kyselina, platanová kyselina a jejich deriváty vykazovaly vyšší citlivost vůči gram-pozitivním bakteriím než gram-negativním bakteriím. Nejúčinnějšími vzorky, u kterých byla pozorována 90–100 % inhibice růstu včetně inhibice rezistentních kmenů byly: oximesterový derivát betulonové kyseliny syntetizovaný z 1-adamantyloctové kyseliny, oxim betulonové kyseliny a C-3 acetátový derivát platanové kyseliny. Tyto látky vyžadují detailnější zkoumání, avšak zdají se být potenciálně vhodným základem ve vyhledávání nových antimikrobiálních látek s budoucím klinickým využitím.

Tato práce byla podpořena projektem TA ČR BIOCIRKL č. TN02000044.

## 20. Stanovení antimikrobiální účinnosti nátěrových hmot na bázi akrylátových latexů s dispergovanými $\text{La}_2\text{O}_3$ nanočásticemi a pigmentem $\text{TiO}_2$ obtiskovou metodou

N. Baslerová (1), M. Pejchalová (1), S. Sabová (1), K. Bošíková (2), A. Kalendová (2)

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

(2) Ústav chemie a technologie makromolekulárních látek, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice, CZ

Mezi účinné přístupy k prevenci patogenních infekcí patří výzkum a vývoj antimikrobiálních nátěrů, čímž dochází k omezení výskytu a kolonizací mikroorganismy. Testované nátěrové hmoty byly na bázi akrylátových latexů s využitím samosíťujícího systému diacetonakrylamidu a N-methylakrylamidu, které obsahovaly 1,5 % nanočástic oxidu lanthanitého a pigment oxidu titaničitý. Jednou možností antimikrobiálního působení nátěrů je znemožnění přichycení bakterií na povrch polymerními řetězci v nátěrové hmotě. Druhou možností je baktericidní účinek přidaných aditiv. K získání maximální účinnosti mohou být využity oba tyto přístupy současně.

Z předem připravených volných filmů akrylátových latexů byly připraveny čtverce o rozměrech 2,5 x 2,5 cm, ty byly následně sterilizovány pod UV zářením po dobu 20 minut. Připravené vzorky filmů byly sterilní pinzetou přeneseny do Petriho misky. Následně na filmy bylo napipetováno 0,1 ml bakteriální suspenze, každý vzorek byl překryt sterilní krycí fólií o rozměrech 2 x 2 cm tak aby se suspenze nacházela mezi vzorkem a fólií a aby inkulum nepřetékało z okrajů. Po inkubaci byl každý vzorek obtisknut třikrát na Petriho misku s MPA agarem. Petriho misky s agarem, na kterých byly obtisknuté vzorky, byly dále inkubovány a následně bylo provedeno odečtení bakteriální kontaminace.

Bylo testováno 12 typů barev na bázi akrylátových latexů. Jako základ byly použity latexy bez přidaného síťování a se síťováním DAAM a NMA. Ke každému z těchto typů byly přidány nanočástice oxidu lanthanitého (1,5 %) a pigment oxidu titaničitý. Byly hodnoceny latexy bez a s přidanými antimikrobiálními přísadami. Chemicky zesíťované nátěrové filmy dosahují mnohem lepších konečných vlastností.

Výsledky testů dokazují, že nanočástice lanthanu mají antimikrobiální vlastnosti, zejména proti grampozitivním bakteriím, které umožňují použití nátěrů v místech s vysokou úrovní hygieny, jako jsou nemocnice, školy a domácnosti. Účinnost nanočástic je zvýšena fotokatalytickým efektem pigmentu  $\text{TiO}_2$ .

## 21. Porovnání T2MR technologie a hemokultivačního vyšetření pro průkaz vybraných bakterií a kvasinek

J. Štanclová (1), R. Kukla (1), M. Vejsová (1), L. Ryšková (1)

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

T2MR technologie na přístroji T2Dx (T2MR) kombinuje PCR a nukleární magnetickou rezonanci a představuje velice slibnou molekulárně diagnostickou metodu. Jedná se o kvalitativní diagnostickou metodu schválenou FDA, pro detekci až 6 agens ze 4 ml plné krve u pacientů s podezřením na sepsi.

Na Ústavu klinické mikrobiologie FN HK byly zavedeny dva panely – T2 Bacteria a T2 Candida panel. Diagnostický panel T2 Bacteria je využíván pro detekci DNA tzv. ESKAPE bakterií: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Panel T2 Candida slouží pro průkaz DNA *C. albicans*/*C. tropicalis*, *C. glabrata*/*C. krusei* a *C. parapsilosis*. Cílem práce bylo vyhodnocení nálezů získaných z T2MR a jejich porovnání s hemokultivačním vyšetřením za období říjen 2022–březen 2024.

Za uvedené období bylo provedeno celkem 143 T2MR vyšetření, 86 T2 Bacteria a 57 T2 Candida panelů. Jednalo se zejména o pacienty, kteří byli hospitalizováni na jednotce intenzivní péče, hematologickém oddělení a anesteziologicko-resuscitačním oddělení FN HK. Celkem bylo zjištěno 22 pozitivit, v jednom případě byly v rámci T2 Bacteria panelu detekovány dva bakteriální patogeny. U 13 vzorků se výsledek shodoval s nálezem z hemokultury. Ve 2 případech došlo k diskrepanci mezi výsledkem z T2MR a hemokultivačním nálezem. V prvním z nich byla detekována DNA *Enterococcus faecium*, v hemokultuře bylo zachyceno *Corynebacterium tuberculoostearicum*. Další diskrepance byla zjištěna mezi průkazem DNA *Escherichia coli* na T2MR a *Ruminococcus gnavus* zachyceným v hemokultuře. U 6 vzorků byl na T2MR přístroji zaznamenán pozitivní výsledek, zatímco hemokultivace byla negativní.

Přestože hemokultivace stále zůstává zlatým standardem v mikrobiologické diagnostice bakteriemi a sepsi, nový systém T2MR představuje významný posun v rychlé diagnostice vybraných agens u pacientů se sepsi, kdy výsledek je dostupný za 3-5 hodin. Výhodou je rovněž vysoká citlivost 1-10 CFU/ml, měření není náchylné k interferenci běžnými antimikrobiálními látkami a dále dochází k minimálním ztrátám při zpracování vzorku, jelikož vyžaduje malý objem plné krve.

## 22. Detekce bakterií *Leptospira interrogans* s.l. u malých savců pomocí metody MAT

L. Sadilová (1), A. Žáková (1, 2), J. Nepeřený (3)

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

(2) Katedra biologie, Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

(3) Bioveta, a.s., Ivanovice na Hané, CZ

Prezentace se zabývá skupinou bakterií *Leptospira interrogans* sensu lato. Jedná se o patogenní skupinu leptospir způsobující zoonotické onemocnění leptospirózu, která může v některých svých formách být pro člověka smrtelná. V České republice se objevuje kolem 20 až 30 případů ročně. Nejčastějšími hostiteli těchto bakterií jsou malí savci, převážně pak hlodavci.

Metoda, kterou se prezentace zabývá, je MAT (mikroskopický aglutinační test). Jedná se o nepřímou metodu detekce leptospir, která detekuje přítomnost protilátek proti bakteriím. Tato metoda se považuje za zlatý standard při detekci leptospir. Je založena na reakci všech tříd protilátek z těla vyšetřovaných savců (v tomto případě výplachu sleziny, ledviny a jater z malých savců) s živými kmeny leptospir. Po kultivaci se bakterie sledují pod mikroskopem v temném poli, kdy se zjišťuje, jestli došlo k aglutinaci.

Vzorky získané z malých savců byly získány z odchytů v Moravském krasu (povoleno projektem MŽP). V období 2021–2023 bylo odchyceno přes 200 jedinců malých savců. Vzorky z těchto zvířat byly využity k detekci protilátek, proti kterým bylo použito 9 různých sérovarů leptospir vyskytující se na území ČR.

Zatím bylo vyšetřeno 75 vzorků. U 18 z nich se prokázala pozitivita v titru 1:100, jedná se tedy o 13,5 % pozitivitu. Nejčastějšími sérovary byly grippotyphosa a sejroe. Tyto sérovary jsou popisovány za nejčastěji se vyskytující v hlodavcích.

Z těchto a dalších výsledků pak bude možné vyvodit prevalenci *Leptospira interrogans* s.l. v CHKO Moravský kras, jednotlivé nejčastěji se vyskytující sérovary v této oblasti a riziko přenosu na člověka.

Tato práce je součástí diplomové práce s názvem Porovnání metod detekce bakterií *Leptospira interrogans* s.l. u malých savců.



## 23. Bakteriální kontaminace brýlových obrub

E. Mangerová (1), O. Zahradníček (1)

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

### Úvod

Bakteriální kontaminaci brýlových obrub je spjatá s péčí a čištěním brýlí. Při nedostatečném čištění může dojít i k očním zánětům.

### Metodika

Odběr vzorků probíhal v oční optice Optik Krouman v Brně, vyhodnocení odebraných vzorků bylo prováděno na Mikrobiologickém ústavu Fakultní nemocnice u svaté Anny v Brně. Klient oční optiky vyplnil dotazník týkající se péče o brýlové obruby. Po vyplnění dotazníku respondentem byly otisknuty části brýlové obruby do krevního agaru. Jednotlivé vzorky byly umístěny do doby transportu v lednici a uchovávaly se při teplotě 4 °C. Do 24 hodin byly otisky převezeny na Mikrobiologický ústav, kde se krevní agary přetiskly do půdy Uriselect. Vzorky byly uloženy do termostatu ke kultivaci, která probíhala 16–24 hodin při 37 °C. Následující den po kultivaci byly jednotlivé otisky vyhodnoceny a případné patogenní nálezy byly určeny pomocí přístroje MALDI TOF. V den vyhodnocení byly spočítány kolonie na krevním agaru pro jednotlivé části brýlové obruby.

### Výsledky

Dotazníkového šetření se zúčastnilo 110 probandů. Z dotazníkového šetření, vyplývá, že více než polovina respondentů si čistí své brýle vícekrát do týdne. 35 respondentů si čistí své brýle každý den. 79 respondentů si čistí jen brýlové čočky na svých brýlích. Nejčastěji k čištění využívají mýdlovou vodu a látkový hadřík. Nejvyšší bakteriální osídlení brýlové obruby je na sedlech/anatomickém nosníku brýlové obruby. Průměrná míra znečištění sedel/anatomického nosníku byla 0,190 kolonií/mm<sup>2</sup>. Nejméně byl znečištěn brýlový střed s průměrným znečištěním 0,062 kolonií/mm<sup>2</sup>. U kovových obrub bylo vyšší bakteriální osídlení než u plastových. Průměrná míra znečištění plastových obrub byla 0,072 kolonií/mm<sup>2</sup>, kovové obruby byly průměrně kontaminovány 0,127 kolonií/mm<sup>2</sup>. Na obrubách se vyskytovalo celkem 13 bakteriálních rodů (*Staphylococcus*, *Bacillus*, *Peribacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Exiguobacterium*, *Neobacillus*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* a *Aerococcus*). Celkový počet koaguláza-pozitivních stafylokoků byl 8, všechny nálezy byly MRSA negativní.

### Závěr

Ze studie vyplývá, že je vhodné více edukovat klienty očních optik, aby si více čistili brýlové obruby. Klientům, kteří mají kožní či oční onemocnění, je vhodnější vybírat plastové obruby.

## 24. Vliv toxicity kyseliny ferulové a kumarové na solventogenní klostridie

K. Koppová (1), B. Branská (1)

(1) Ústav Biotechnologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, CZ

Lignocelulosoové odpady mohou sloužit jako potenciální substráty pro produkci bio-rozpouštědel produkovaných solventogenními klostridii pomocí tzv. ABE fermentace (název dle hlavních produktů aceton-butanol-ethanol). Jelikož se jedná o velmi kompaktní a odolný materiál, je nutné ho rozvolnit pomocí kyselého či alkalického působení, tlaku nebo teploty. Takovýto přístup však vede k uvolnění vedlejších produktů, které poté působí na mikroorganismy jako inhibitory. Jedněmi z nejzastoupenějších inhibičních látek jsou kyselina ferulová a kumarová, které vznikají během rozkladu ligninu obsaženého v jednoletých rostlinách.

Cílem této práce bylo sledování vlivu kyseliny ferulové a kumarové na produkci rozpouštědel při vsádkové a přítokované kultivaci kmene *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598. V případě vsádkové kultivace byla všechna koncentrace inhibitorů přidána do reaktorů ještě před inokulací, zatímco u přítokované kultivace byly inhibitory přítokovány v rámci živění. Během samotné kultivace byly sledovány parametry jako redox potenciál a pH média. Výsledné koncentrace produkovaných rozpouštědel a množství spotřebovaného substrátu byly analyzovány pomocí HPLC.

V případě vsádkové kultivace byla v přítomnosti směsi kyseliny ferulové a kumarové (0,2 g/l každé) pozorována snížená produkce rozpouštědel oproti kontrole. Jestliže byla stejná vstupní koncentrace dávkována přítokovaně od počátku 5. hodiny od inokulace, byla výsledná koncentrace rozpouštědel přibližně 5krát vyšší než u vsádkové kultivace.

Přítokovaná kultivace solventogenních klostridií umožňuje lépe eliminovat vliv toxicity inhibitorů přítomných v lignocelulosových substrátech. Tento jev může být vysvětlen z velké části tím, že postupné dávkování substrátu s inhibitory umožňuje bakteriím aktivovat vybrané geny, díky jejichž aktivitě se následně lépe přizpůsobí měnícímu se prostředí.

Tento výstup vznikl v rámci projektu Specifického vysokoškolského výzkumu – projekt č. A2\_FPBT\_2024\_047.

## 25. Programovaná bunková lýza pre biotechnológie baktérie *Pseudomonas putida*

M. Pešta (1), M. Benešík (1), P. Dvořák (1)

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

Implementácia programovateľných lytických systémov do „mikrobiálnych bunkových tovární“ s cieľom dosiahnuť časovo kontrolovanú životaschopnosť buniek predstavuje zaujímavú stratégiu, ktorá by mohla umožniť vývoj udržateľnejších a lacnejších biotechnologických procesov. Táto stratégia by mohla zefektívniť nielen uvoľňovanie intracelulárnych produktov z buniek, ale tiež konštrukciu syntetických mikrobiálnych konzorcií.

Z tohto dôvodu sme sa v tejto práci rozhodli i) skonštruovať nový rekombinantný lytický systém, ii) otestovať a porovnať jeho funkčnosť s ďalšími dvoma systémami s iným mechanizmom účinku v biotechnologicky atraktívnej baktérii *Pseudomonas putida* a iii) odhaliť genetické módy, akými je *P. putida* schopná uniknúť letálnemu pôsobeniu lytických génov.

V tejto práci bola použitá široká paleta in silico nástrojov, pomocou ktorých sme boli schopní identifikovať a charakterizovať kandidátny gén *PP\_2269* pravdepodobne kódujúci fágový endolýzín. Tento gén bol sfúzovaný so signálnou sekvenciou a klonovaný do tzv. digitalizačného modulu metódou bezšvového *USER* klonovania. Následne bola stanovená funkčnosť a efektivita vybraných lytických systémov (*PP\_2269*, *EstPbeta*, *ColE3*) indukovať tzv. „lýzu zvnútra“ v *P. putida* využitím priamej (detekcia uvoľneného GFP proteínu z buniek), ako aj nepriamej metódy (na základe zmien hodnôt OD600). K odhaleniu mutácií vedúcich k inaktivácii lytického systému bolo použité celoplazmidové sekvenovanie využitím technológie Oxford Nanopore.

Bolo zistené, že všetky tri lytické systémy sú schopné lýzovať *P. putida*, avšak ich funkčnosť a efektivita výrazne závisia na načasovaní ich indukcie. Nami pripravený systém (*PP\_2269*), pravdepodobne degradujúci peptidoglykán, je najúčinnější z hľadiska rozpadu buniek a uvoľňovania GFP do média. Na druhej strane však bolo preukázané, že *P. putida* môže inaktivovať letálnu aktivitu týchto systémov v čase. V dvoch z celkovo troch analyzovaných mutantov bolo terčom úniku poškodenie indukčného expresného systému. Celkovo naše výsledky ukazujú, že nami testované systémy by mohli po optimálnom doladení zefektívniť uvoľňovanie naakumulovaných biosyntetických produktov z „mikrobiálnych tovární“.

## P 01.

### **Deciphering the role of BscX and BscY subunits in the *Bordetella* Type 3 Secretion System**

M. Čížková (1,2), V. Veverka (3), I. Malcová (1), P. Šebo (1), J. Kamanová (1), L. Bumba (1)

(1) Institute of Microbiology AS CR v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, CZ

(2) Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, University of Chemistry and Technology, Prague, CZ

(3) Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague, CZ

The type 3 secretion system (T3SS), also known as the bacterial injectosome, is a multisubunit protein-export apparatus that enables the delivery of bacterial effector proteins directly from bacterial cytosol into the cytosol of the host cells. The structural organization of the injectosomes is highly homologous among the Gram-negative bacteria, but some additional regulatory and structural components are species-specific. In *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough, as well as in *Bordetella bronchiseptica*, which primarily causes respiratory infections of rodents, the T3SS comprises small protein subunits, BscX and BscY, of which the structure and function remain unknown. Here, we present the solution structure of the BscX-BscY heterodimer determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy and demonstrate that both BscX and BscY subunits are critical for the proper function of the T3SS apparatus. The structure shows that BscY adopts a six helical fold, which is wrapped by BscX consisting of the long N-terminal unstructured region with three helices at the C terminus of the protein. In vitro pull-down assays revealed that the BscX-BscY heterodimer directly interacts with the cytosolic domain of the BcrD protein, suggesting that the heterodimer might regulate the interaction of the inner membrane export apparatus with the cytoplasmic sorting platform. Even though both subunits appear to be tightly connected within the complex, the BscX subunit was also found to be secreted out of the bacterial cells, demonstrating a certain dynamic of the T3SS apparatus during the secretion of the effectors. Moreover, deletion of the individual *bscX* and *bscY* genes, or the removal of the N-terminal twelve residues of BscX rendered the bacterial mutant non-cytotoxic against the HeLa cells, indicating that the structural integrity of the BscX and BscY subunits is essential for the proper function of the *Bordetella* T3SS apparatus.

## **P 02.**

### **Vplyv infekcie vírusom kliešťovej encefalitídy na neimunitné bunky ľudskej kože**

J. Džubara (1), I. Štibrániová (1), P. Bartíková (1), M. Novotová (2)

(1) Biomedicínske centrum SAV, Virologický ústav, Bratislava, SK

(2) Biomedicínske centrum SAV, Ústav experimentálnej endokrinológie, Bratislava, SK

Úvod: Vírus kliešťovej encefalitídy (TBEV), neurotropný flavivírus prenášaný kliešťami, spôsobuje kliešťovú encefalítidu (TBE), jednu z najzávažnejších ľudských nervových infekcií v Európe a Ázii. Z dôvodu jeho neurotropizmu sa venuje málo pozornosti vstupnej bráne – koži. Na myšiach bola potvrdená primárna replikácia TBEV v kožných dendritických bunkách, neutrofiloch, makrofágoch, ale aj fibroblastoch a keratinocytoch. Vzhľadom na početnosť, štruktúrne bunky kože môžu predstavovať potenciálnu zásobáreň TBEV, a tak zvyšovať riziko infekcie cieľového orgánu. Rozhodli sme sa vyšetriť antivírusovú odpoveď ľudských kožných keratinocytov a fibroblastov na TBEV infekciu, ale aj zmeny vyvolané TBEV v týchto bunkách na ultraštruktúrálnej úrovni.

Metódy: Po potvrdení množenia TBEV v bunkách infikovaných rôznou multiplicitou infekcie (MOI) vo vybraných časových intervaloch (24hod, 48hod, 72hod) sme expresiu vybraných génov asociovaných s antivírusovou odpoveďou analyzovali metódou génovo špecifickými real time RT-PCR s využitím delta delta Ct metódy. Morfológické zmeny v TBEV-infikovaných bunkách a prítomnosť TBEV sme vyšetrili konvenčnou transmisnou elektrónovou mikroskopiou (TEM).

Výsledky: V TBEV-infikovaných bunkách sme identifikovali rôzne spektrá génov závislých od typu buniek, MOI a dĺžky infekcie. Rozdiely sme zaznamenali v spektre receptorov rozpoznávajúcich vírusové antigény (PRR), v type IFN-odpovede a s ňou súvisiacich regulačných faktoroch a génov stimulovaných IFN. U väčšiny génov pre oba línie sme zaznamenali najvyššie miery expresie 48 h po infekcii. Pomocou TEM sme identifikovali vírus v endo/exozómoch, vo vakuolách, fagolyzozómoch a endoplazmatickom retikule (ER). V infikovaných keratinocytoch sme pozorovali zvýšenú vakuolizáciu, zmeny v ER, prítomnosť fagofórov, fagolyzozómov, endo-/exozómov, pohlcovanie mitochondrií fagolyzozómami. Vo fibroblastoch degradáciu mitochondriálnych kríst a vakuolizáciu.

Záver: Potvrdili sme schopnosť TBEV infikovať ľudské štruktúrne kožné bunky, navodiť v nich obrannú antivírusovú imunitnú odpoveď a vyvolať zmeny vnútrobunkových štruktúr.

### **P 03.**

#### **Isolation and characterization of new bacteriophages infecting *Escherichia coli* phylogenetic group A strains**

S. Elnwrani (1), H. Drahovská (1)

(1) Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences of Comenius University, Bratislava, SK

*Escherichia coli* is a gram-negative rod, that belongs to the family *Enterobacteriaceae*. It is a commensal of the vertebrate gut that is increasingly involved in various intestinal and extra-intestinal infections as an opportunistic pathogen. The growing resistance of *E. coli* to antibiotic therapy is a global problem and alternative therapies should be considered to reduce the burden of these common infections [5]. Phage therapy is one of these promising alternatives to conventional antibiotic treatment of *E. coli* infections. Bacteriophages are viruses that attack bacteria to complete their life cycle.

In the present study, we aimed to isolate bacteriophages infecting *E. coli* strains that were resistant to phages present in our collection. Clinical *E. coli* strains originated from Bratislava University Hospital were used for phage propagation and host range determination. Bacteriophages were isolated from wastewater. As an alternative to isolating new phages, we tested enhancing of phage host range by the Appelmans protocol. A cocktail of several bacteriophages was repeatedly cultured with different bacterial strains in a micro-titre plate and the assessment of the new lysates was tested on double agar plates.

Three phages were isolated by using three different strains belonging to phylogroup A. A cocktail of seven phages infecting preferentially phylogenetic group B2 strains were prepared and used for Applemans protocol. Four different group A strains resistant to cocktail phages were used for host range modification. After 20 rounds of Applemans protocol, two strains became sensitive to the modified cocktail, but two other strains were still resistant to the phage infection. With some modification, this protocol could be used to improve the properties of therapeutic bacteriophages.

Acknowledgment: The project was supported by grants APVV-16-0168 and APVV-20-0001.

## **P 04.**

### **Analýza pôvodcov komplikovaných a recidivujúcich infekcii močových ciest**

Ž. Füssy (1,2), Cs. Haver (2), M. Straka (2), A. Liptáková (2), L. Slobodníková (2)

(1) UNB Bratislava, Nemocnica Sv. Cyrila a Metoda, Urologické oddelenie, SK

(2) Mikrobiologický ústav LF UK a UN Bratislava, SK

Úvod: Infekcie močových ciest sú častou príčinou návštevy lekára, ich následky môžu byť invalidizujúce až život ohrozujúce. Ich skorá diagnóza a korektná liečba má ekonomický aj medicínsky význam. V tejto práci prezentujeme výsledky vyšetrenia pacientov s komplikovanými – s prítomnými rizikovými faktormi, a recidivujúcimi infekciami: 3 infekcie za posledných 12 mesiacov, resp. 2 za posledných 6 mesiacov.

Metodika: Vzorky moču sa odoberali a transportovali do mikrobiologického laboratória podľa aktuálne platného štandardného postupu pre laboratórnu diagnostiku. Vzorky sa spracovali a výsledky sa interpretovali podľa štandardizovaných metód pre mikrobiologickú diagnostiku.

Výsledky: Vzorky moču boli získané od 70 pacientov, po selekcii, aby spĺňali kritériá recidivujúcich resp. komplikovaných infektov. 5 pacientom sa moč vyšetroval opakovane. Súbor pacientov tvorilo 24 mužov a 41 žien, vo veku od 25 do 89 rokov. Močové infekcie v 50% zodpovedali definícii recidivujúcich, 40% tvorili komplikované IMC.

Izolované boli bakteriálne druhy: *E. coli* (25.71%), *P. aeruginosa* (5.68%), *Enterobacteriaceae* (4.26%), druhy rodu *Klebsiella* (4.26%), v 22.72 % prípadov - polymikrobiálne infekcie – vyššie uvedené druhy + *P. mirabilis*. Kontamináciu sme evidovali u 12.78% vzoriek. 1 vzorka zachytila solitárnu infekciu *C. glabrata*. Zachytené izoláty mali variabilnú citlivosť. V prípade 22.72% pacientov sa neizoloval z moču žiaden pôvodca, pravdepodobne pre dlhodobú, alebo svojvoľne nasadenú ATB liečbu, alebo prekryvanie príznakov infekcie s príznakmi chronického dráždenia močových ciest.

Záver: U pacientov s opakovanými IMC sme potvrdili rôznorodé spektrum pôvodcov s rôznou antimikrobiálnou citlivosťou, z čoho vyplýva nevyhnutnosť cielenej liečby. Vzhľadom na stúpajúcu rezistenciu mikroorganizmov na dostupné antibiotiká a na alergické reakcie pacientov opakovane liečených je nutné klásť čo najväčší možný dôraz na prevenciu, ktorá zahŕňa behaviorálne, neantibiotické a vhodne volené antibiotické režimy.

## **P 05.**

### **Identification of residues involved in post-translational modification of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin**

M. Grobarcikova (1), A. Osickova (1), J. Cerny (2), S. Knoblochova (1), D. Jurnecka (1), R. Osicka (1), K. Skopova (1), P. Sebo (1), J. Masin (1)

(1) Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, CZ

(2) Institute of Biotechnology of the Czech Academy of Sciences, BIOCEV Research Center, Vestec, CZ

*Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin (CyaA) plays a crucial role in the virulence of *Bordetella pertussis*. CyaA translocates its N-terminal adenylyl cyclase enzyme (AC) domain into the cytosol of phagocytes and disrupts their bactericidal functions by unregulated conversion of ATP to cAMP. Additionally, CyaA permeabilizes the membranes of eukaryotic cells by forming cation-selective pores. The toxin preferentially binds to cells expressing the complement receptor 3 (CR3) but can also penetrate the membranes of cells not expressing CR3 on their surface.

CyaA is synthesized as a protoxin (pro-CyaA) and is activated to mature CyaA by covalent post-translational acylation that is catalyzed by the dedicated acyltransferase CyaC. The acyl groups are linked to  $\epsilon$ -amino groups of two lysine residues located within conserved acylation sites, namely Lys860 and Lys983 in CyaA. Using chimeric CyaA/HlyA molecules (HlyA,  $\alpha$ -hemolysin, the RTX toxin of *Escherichia coli*), we identified the sequence essential for acyltransferase-mediated acylation of CyaA. Site-directed mutagenesis defined the residues involved in the recognition of the toxin acylation site by the acyltransferase. We demonstrate that substitution of Arg991 in CyaA causes a reduction in the extent of acylation of Lys983. Furthermore, this substitution decreases the cytotoxic and cytolytic capacity of CyaA towards model sheep erythrocytes and human macrophage THP-1 cells.

Our aim is to identify residues that are directly involved in the interaction of the acyltransferase CyaC with the pro-CyaA molecule. To achieve this, we are combining mutagenesis, functional assays and homologous modeling of CyaC structure. For structural modeling, we are using AlphaFold predictions and the known structure of ApxC (ApxC, the acyltransferase of *Actinobacillus pleuropneumoniae*).



## **P 06.**

### **Vliv fyto­genních aditiv na bachorovou mikroflóru hovězího dobytka a jejich potenciál pro snížení emisí metanu**

B. Holomková (1)

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

Metan patří mezi druhý nejvýznamnější faktor přispívajícím ke globálnímu oteplování. Emise metanu mohou pocházet jak z přírodních, tak z lidských zdrojů. Přírodně je metan uvolňován do prostředí rozkladem rostlinné hmoty v bažinách a mokřadech nebo uvolňováním z podvodních sedimentů. Na druhé straně lidské zdroje zahrnují emise z odpadních skládek, těžby uhlí, zemědělských činností a určitých průmyslových procesů. Metanogenní archea hrají významnou roli v prostředích, jako jsou bažiny, mokřady, skládky nebo bachorová tekutina dobytka, kde mají ideální anaerobní podmínky pro produkci metanu. Nárůst emisí metanu z chovu dobytka představuje závažný ekologický problém s dalekosáhlými dopady na kvalitu ovzduší a klimatické změny. Vzhledem k tomu, že zemědělský sektor je jedním z hlavních zdrojů těchto emisí, zkoumají se nové přístupy ke snižování této zátěže. Jedním z takových přístupů je využití fyto­genních aditiv jako potenciální prostředek ke snižování produkce metanu v trávicím systému hovězího dobytka. Tato práce se zaměřuje na zkoumání vlivu dvou typů taninů jako fyto­genních aditiv na bachorovou mikroflóru a jejich potenciál pro snižování emisí metanu. Provedené analýzy ukazují, jak fyto­genní aditiva ovlivňují složení mikroflóry bachoru, zahrnující celulótické mikroorganismy a další mikroby účastnící se procesu trávení. Zvláštní pozornost byla věnována mikroorganismům, které jsou klíčové pro produkci metanu, jako jsou metanogenní archea. Experimenty byly provedeny jak u smíšené, tak u čisté kultury a opírají se především o analýzy produkce metanu za použití plynového chromatografu a následnou sekvenaci kontrolního vzorku a vzorku s přísávkem fyto­genního aditiva. Výsledky naznačují, že oba typy taninů inhibují produkci metanu a mění složení ruminálního mikrobiomu, především došlo k snížení populace rodu *Prevotella*, *Succinivibrio* a *Methanobacterium* a zvýšení u rodu *Treponema*, *Ruminobacter* a *Succinivibrio*. Ukazuje se, že by fyto­genní aditiva mohla být slibným přístupem k snížení produkce metanu u hovězího dobytka.

## P 07.

### Indukce životaschopného, ale nekultivovatelného stavu u stafylokoků a jeho dopad na citlivost k fágové terapii

P. Jelínek (1), E. Kučerová (1), L. Kuntová (1), L. Micenková (1), N. Hanišáková (1), T. Botka (1)

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

Stafylokoky jsou významnými původci infekcí člověka i zvířat. Stresové faktory z prostředí, jako je léčba antibiotiky, mohou u stafylokoků vyvolat přechod do stavu dormance, kdy buňky zůstávají životaschopné, ale nejsou nadále kultivovatelné (tzv. stav VBNC, z angl. viable but nonculturable). VBNC populace představují pro pacienty riziko, protože je nelze detekovat s využitím konvenčně používaných laboratorních médií, čímž přispívají k falešné negativitě laboratorních testů. Po ukončení léčby se pak VBNC populace může vrátit do normálního metabolického stavu, a tím navodit rekurentní infekci pacienta.

Pro stafylokoky je typická produkce biofilmu, probíhající ve stavu kultivovatelnosti, která následně napomáhá navodit a udržet stav VBNC vnitřními nepříznivými podmínkami, jako je nízká koncentrace kyslíku a živin. Biofilm buňkám také poskytuje zvýšenou odolnost vůči antimikrobiálním agens. K jeho eradikaci lze kromě antibiotik využít i fágovou terapii, případně kombinaci obou přístupů.

Hlavním cílem prezentované práce bylo indukovat stav VBNC u *Staphylococcus aureus* pomocí antibiotik ciprofloxacin, gentamicin a amoxicilin; a dále ověřit citlivost VBNC kultur k terapeutickému fágu *812h1*. V práci byly použity dva klinické kmeny *S. aureus* sekvenčního typu ST8 (MRSA) a ST121 a dva laboratorní bezprofágové kmeny *S. aureus* sekvenčního typu ST8 a ST4618. U všech kmenů *S. aureus* se podařilo indukovat přechod do VBNC stavu. Životaschopnost kultur byla potvrzena LIVE/DEAD barvením, a následným vyhodnocením fluorescenční mikroskopií a průtokovou cytometrií. Nejrychleji proběhla indukce VBNC u laboratorního kmene SH1000 (ST8) působením amoxicilinu, a to již po třech týdnech. Bakteriofág *812h1* se na kulturách s převahou VBNC buněk sice pomnožoval, avšak se zvyšující se dobou kultivace jeho titr klesal. Stejně tak adsorpce fága na buňky biofilmu vykazovala zpomalený průběh ve srovnání s planktonní populací *S. aureus*.

Práce byla podpořena z programového projektu Ministerstva zdravotnictví ČR s reg. č. NU21J-05-00035, a dále projektem Národního institutu virologie a bakteriologie (Program EXCELES, ID: LX22NPO5103) – Financováno Evropskou unií – Next Generation EU.

## **P 08.**

### **Stimulation of BTLA by UL144 promotes clustering of tumour cell line RAJI**

K. Lopušná (1), M. Benko (1), J. Džubara (1), I. Nemčovičová (1), V. Zezulová (1), I. Štibrániová (1), P. Bartíková (1)

(1) Biomedical Research Center of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, SK

#### Introduction

Inhibitory checkpoint molecule B – and T-lymphocyte attenuator (BTLA), expressed by various immune cells, represses the immune responses by inhibiting T cell receptor. It was shown that BTLA is highly expressed by some tumour cells and might serve as target for immunotherapy. Here, we purified recombinant protein UL144, which is derived from human cytomegalovirus and serves as ligand of BTLA receptor. However, in opposite to natural ligand of BTLA, herpesvirus entry mediator (HVEM), UL144 binds specifically only to BTLA. We tested, whether recombinant protein UL144 can affect proliferation of Burkitt's lymphoma cell line RAJI.

#### Methods

Recombinant protein UL144 was expressed using the baculovirus expression system in Sf9 cells. After 84 hours of expression, the culture medium was spun down and supernatant was filtrated. UL144 protein was purified by Immobilized metal affinity chromatography, concentrated to 1 ml and dialyzed in sterile PBS buffer. RAJI cells were seeded at  $40 \times 10^3$  cells/well into 96 well plates and stimulated with recombinant protein UL144 at concentrations 10, 20, 60, 100 and 150  $\mu\text{g/ml}$ . Control cells were treated with PBS. After 72 hours, the cells were observed under microscope and evaluated.

#### Results

RAJI cells grow partly in clusters or clumps, however, treatment of cells with protein UL144 resulted in affected growth of these cells and enhanced formation of clusters in vitro. This effect was observed already at concentration 20  $\mu\text{g/ml}$  of UL144 protein and the effect was even more profound at 150  $\mu\text{g/ml}$ . Treatment of RAJI cells with PBS did not affect cluster formation compared to untreated cells.

#### Conclusion

Recombinant protein UL144 affects the growth of Burkitt's lymphoma cell line RAJI by promoting cluster formation in vitro. Further experiments will evaluate, which signalling pathways are deregulated in tumour cells after treatment with UL144 protein.

The work was funded by the project No. 1136/01/02, which has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme on the basis of the Grant Agreement under the Marie Skłodowska-Curie funding scheme No. 945478 - SASPRO 2; by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic (VEGA 2/0063/21); and by the Slovak Research and Development Agency (APVV-19-0376).

## P 09.

### Kurkumovník dlouhý: přírodní ochrana proti klíšťatům a jejich patogenům

A. Ludková (1), M. Kromsíanová (1), T. Svěchtová (1), H. Nejezchlebová (1), M. Budíková (2), I. Horová (2), A. Žáková (1)

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

(2) Ústav matematiky a statistiky, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Korespondující autor: H. Nejezchlebová, helanej@sci.muni.cz

#### Úvod

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je hematofágní členovec, který přenáší mnoho bakteriálních a virových původců onemocnění. Mezi nejrozšířenější se řadí lymeská borelióza a klíšťová encefalitida. Původcem lymeské boreliózy je bakterie *Borrelia burgdorferi sensu lato*. Klíšťová encefalitida je naopak virového původu. Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí předpokládá v dalších letech nárůst infikovaných těmito nemocemi. Z důvodu vysokého počtu případů onemocnění přenášených klíšťaty a s ohledem na vzrůstající rezistenci klíšťat vůči chemickým repelentům je třeba hledat možné přírodní alternativy repelentu. Rostlina kurkumovník dlouhý z čeledi zázvorovitých (*Zingiberaceae*) má díky svým obsahovým látkám biocidní účinky, které mohou být uplatněny při vývoji nových repelentů.

#### Metodika

V rámci výzkumu byl testován repelentní účinek esenciálního oleje z oddenku a listů kurkumovníku v alkoholové emulzi o koncentraci 0,8 mg/cm<sup>2</sup> a 0,005 mg/cm<sup>2</sup> na klíšťata druhu *Ixodes ricinus*. Výzkum probíhal v lokalitě lesoparku Brno-Pisárky a částečně v Chřibech pomocí metody vlajkování. Oproti minulým výzkumům bylo zkoumáno, zda repelentní účinek nevykazuje i samotný alkohol, případně olejovitá struktura. Proto byl zkoumán i repelentní účinek ethanolu a slunečnicového oleje.

#### Výsledky

Na základě statistické analýzy lze říci, že esenciální olej z kurkumovníku vykazuje repelentní účinek na *Ixodes ricinus*. Nejúčinnější je esenciální olej z oddenku o koncentraci 0,8 mg/cm<sup>2</sup> a nejméně účinný je esenciální olej z listů o koncentraci 0,005 mg/cm<sup>2</sup>. Výsledky také ukázaly, že samotný alkohol a slunečnicový olej vykazují určité repelentní účinky, nicméně esenciální olej z kurkumovníku o koncentraci 0,8 mg/cm<sup>2</sup> je vždy účinnější.

#### Závěr

Statistickým šetřením bylo zjištěno, že nejlepší repelentní účinnost vykazuje esenciální olej z oddenku kurkumovníku o koncentraci 0,8 mg/cm<sup>2</sup>. Alkohol a slunečnicový olej mají také repelentní účinky, ale ne tak vysoké, jako při použití esenciálního oleje z kurkumovníku o vyšší koncentraci.

Financováno ze Specifického výzkumu MUNI/A/1258/2022.

## **P 10.**

### **Porovnanie rastových a bioprodukčných vlastností troch kmeňov baktérie *Pseudomonas putida* s ohľadom na produkciu polyhydroxyalkanoátov**

D. Pšenka (1), P. Dvořák (1)

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

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) sú produkované mnohými druhmi baktérii ako rezervný zdroj uhlíku a energie. Tieto biopolyméry vykazujú mnohé fyzikálne a chemické vlastnosti podobné bežným plastom a zároveň poskytujú významnú výhodu, v podobe možnosti byť biologicky rozložiteľné. PHA preto predstavujú sľubnú alternatívu voči rade plastov, získavaných z fosílnych zdrojov.

Práve baktéria *Pseudomonas putida* KT2440 je z viacerých dôvodov atraktívnym hositeľom pre mikrobiálne biotechnológie, vrátane produkcie PHA. Modifikáciou kmeňa KT2440 pomocou techník genetického inžinierstva, boli v posledných desiatich rokoch pripravené dva nové kmene *P. putida* – EM42 a EM371. Upravené kmene by mali predstavovať vhodnejšie alternatívy pre genetické manipulácie a bioprodukcii atraktívnych chemikálii. V súčasnosti však chýba štúdia, ktorá by zrovnávala rastové a bioprodukčné vlastnosti uvedených kmeňov v zrovnateľných podmienkach.

Prezentovaná časť práce porovnáva rastové parametre kmeňov KT2440, EM42 a EM371 na vybraných substrátoch – glukóza, citrát, benzoát a xylóza. Kultivácie boli prevedené v Erlenmayerových bankách s využitím systému Aquila Biolabs, umožňujúceho sledovanie rastových parametrov v reálnom čase. Pre účely rastu na xylóze bolo v genóme každého z testovaných kmeňov potrebné previesť špecifické delécie a taktiež vnieť syntetický operón kódujúci xylózový metabolizmus. Plánovanou súčasťou práce je tiež zrovnanie kmeňov z hľadiska produkcie PHA, ktorých analýza a kvantifikácia bude prevedená príslušnými fyzikálne-chemickými metódami – HPLC, Nile Red assay, FTIR alebo Ramanova spektroskopia.

Hlavným výstupom práce je overenie hypotézy, ktorá predpokladá, že zmeny na úrovni genómu u testovaných kmeňov *P. putida*, majú vplyv na schopnosť spracovávať rôzne zdroje uhlíku a následne ich konvertovať na PHA.

## P 11.

### ***Kingella kingae* cytotoxin RtxA induces an innate immune response in epithelial cells**

E. Růžičková (1), K. Zhuk (1), K. M. Navarrete (1), A. Osičková (1), R. Osička (1)

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

*K. kingae*, a fastidious Gram-negative cocobacillus, has recently been recognised as an emerging paediatric pathogen and a leading cause of osteoskeletal infections in children between 6-36 months of age. The key virulence factor of *K. kingae*, the RtxA toxin, belongs to a large family of multidomain bacterial pore-forming proteins known as RTX (repeats-in-toxin) toxins. RtxA has been shown to target many types of host cells. After binding, RtxA penetrates the cell membrane and forms cation-selective pores that can lead to osmotic lysis of infected cells. RTX toxins have been shown to affect the host immune system either by suppressing the immune response and allowing the bacterial pathogens to evade the immune defences, or by initiating an elaborate immune response in order to eliminate the pathogens. Using quantitative PCR and flow cytometry, we investigated the role of RtxA in the production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and chemokines in oral epithelial cells to determine whether RtxA plays a role in the clearance of bacteria from mucosal surfaces. We found that *K. kingae*, but not other RtxA-deficient *Kingella* species or *K. kingae* RtxA-deficient mutant, increased the production of inflammatory cytokines IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF and the chemokine CXCL10 in human oral epithelial cells. These results suggest that RtxA induces an immune response against *K. kingae* that may cause the elimination of the bacteria from the epithelial surfaces. Indeed, in contrast to other members of the genus *Kingella*, oropharyngeal colonisation rates of *K. kingae* decrease after 36 months of age.

## P 12.

### Termofilní bakterie rodu *Aneurinibacillus*: Producenti unikátních polyhydroxyalkanoátů

V. Řeháková (1), I. Buchtíková (1), S. Obruča (1), P. Sedláček (2) a M. Kalina (2)

(1) Ústav chemie potravin a biotechnologií, Fakulta chemická Vysokého učení technického, Brno, CZ

(2) Ústav fyzikální a spotřební chemie, Fakulta chemická Vysokého učení technického, Brno, CZ

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou mikrobiální polyestery produkované řadou bakterií. Jedná se o biomateriály, které se svými fyzikálně-chemickými vlastnostmi podobají běžným plastům, ale zároveň jsou biokompatibilní, biodegradabilní a nejsou toxické. Mohou tak nacházet uplatnění v nejrůznějších aplikacích, a to zejména v oblasti medicíny, obalového průmyslu, kosmetiky a zemědělství. Nejběžněji produkovaným PHA materiálem je poly(3-hydroxybutyrát). Jedná se však o poměrně tuhý a křehký polymer, který některé důležité vlastnosti postrádá. Řešení nabízí inkorporace jiných, dostatečně strukturně odlišných PHA monomerů do struktury PHA řetězce. Dochází tak k efektivnímu narušení krystalické mřížky; PHA materiály jsou více elastické a mohou lépe konkurovat petrochemickým plastům.

Termofilní bakterie rodu *Aneurinibacillus* prokázaly biosyntézu řady různých PHA polymerů, a to za využití specifických substrátů, jako jsou laktony a dioly. Prekurzory byly do média přidávány buďto samostatně (4 g/l), nebo za současné suplementace glycerolem nebo glukózou (4+4 g/l). Produkce byla realizována ve dvou typech médií: komplexní médium a minerální médium. Izolované PHA materiály pak byly analyzovány řadou technik (GC-FID, FTIR, DSC, SEC-MALS) za účelem charakterizace jejich materiálových vlastností.

Bakterie rodu *Aneurinibacillus* prokázaly produkci PHA materiálů, které obsahovaly monomery jako je 4-hydroxyvalerát (53,1 mol. %), 5-hydroxyvalerát (44,2 mol. %), 4-hydroxybutyrát (80,2 mol. %) nebo 4-hydroxyhexanoát (11,5 mol. %). Začleněním různých PHA monomerů do struktury polymeru vedlo k výraznému snížení teploty tání a efektivnímu narušení jejich krystalické struktury. Standardní P(3HB) je obvykle krystalický zhruba z 59 %. Pokud porovnáme hodnoty produkovaných PHA kopolymerů s hodnotami entalpie tání 100 % krystalického P(3HB), můžeme charakterizovat krystalinitu zkoumaných materiálů takto: 23 % pro kopolymery obsahující 4HV, 3 % pro kopolymery 4HHx a 0 % pro kopolymery s fragmenty 5HV. Schopnost termofilních bakterií rodu *Aneurinibacillus* syntetizovat různorodé PHA kopolymery je zcela mimořádná. Tyto bakterie pravděpodobně disponují málo specifickými PHA syntázami, které jim umožňují využívat širokou škálu substrátů.

## **P 13.**

### **Proč se mladí (ne)chtějí očkovat?**

T. Svěchotová (1), M. Kromsiánová (1), A. Ludková (1), K. Tomanová (1), H. Nejezchlebová (1)

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

Korespondující autor: H. Nejezchlebová, helanej@sci.muni.cz

#### Úvod:

Očkování je klíčovým prostředkem ochrany a prevence jednotlivců i společnosti před infekčními nemocemi způsobenými mikroorganismy. I přes nesporné benefity očkování se setkáváme s narůstajícím trendem odmítání očkování. Odmítající lidé nevidí potřebu očkovat sebe či svoje potomky, často vnímají očkování jako zbytečný či škodlivý úkon. Světová zdravotnická organizace v roce 2019 zařadila klesající míru proočkovanosti mezi deset největších globálních hrozeb pro veřejné zdraví a začala se zabývat otázkami spojenými s negativními reakcemi na očkování a možnými faktory, které ovlivňují jednotlivce v rozhodování přijmout či nepřijmout vakcínu.

#### Metodika:

Studie se zaměřila na zkoumání postojů dospívající generace k tématu očkování pomocí kvantitativního dotazníkového šetření, které probíhalo na sedmi vybraných gymnáziích na začátku roku 2023. Studie zahrnovala studenty nižších ročníků gymnázia, tj. devátých tříd, a také maturitní ročníky. Dohromady bylo do studie zapojeno 531 respondentů.

#### Výsledky:

Statistickým šetřením pomocí Pearsonova-Chí kvadrát testu na 5 % hladině významnosti bylo zjišťováno, které vybrané faktory (celkem 7: věk, pohlaví, bydliště respondentů, lokalita gymnázia, počet sourozenců, uspořádání rodiny a dosažené vzdělání rodičů) mají statisticky významný vliv na stanovené jevy (proočkovanost, názor, motivace a postoje k očkování).

#### Závěr:

Na základě uvedeného statistického vyhodnocení bylo potvrzeno, že mezi významné faktory ovlivňující postoje studentů k vakcinaci patří věk respondentů, jejich pohlaví, místo bydliště, lokalita gymnázia a uspořádání rodiny. V provedené analýze nebyl potvrzen vliv faktoru počtu sourozenců ani dosaženého vzdělání rodičů. V našem výzkumu tvořili odpůrci nepovinného očkování pouze 0,56 % (celkem 3 respondenti) ze zkoumaného vzorku. Konkrétně se jednalo o dvě studentky z maturitního ročníku a jednoho studenta z deváté třídy, kteří studovali ve větší obci a žili v úplné rodině.

Financováno ze Specifického výzkumu MUNI/A/1258/2022.



## **P 14.**

### **Hlboká krčná infekcia z nekomplikovanej tonzilitídy u mladej pacientky s diabetom – kazuistika**

B.Tóth (1), M. Tedla (1)

(1) Klinika otorinolaryngológie a chirurgie hlavy a krku LF UK a Univerzitetnej nemocnice Bratislava, SK

Úvod: Hlboké krčné infekcie sú vážnou komplikáciou infekcií ORL oblasti, ústnej dutiny a menej často pochádzajú z vonkajšieho povrchu krku. Pôvodca sa dostane do hlbokých štruktúr krku *per continuitatem*, lymfogénne, prípadne traumou. Najväčšie riziko zo strany pacienta predstavuje imunodeficit, napríklad diabetes, hematologické ochorenie, resp. imunosupresívna liečba. V našej práci prezentujeme prípad pacientky vyšetrenej na OUM pre pár dní trvajúce bolesti hrdla, u ktorej následne bola zistená hlboká krčná infekcia.

Metodika: 45-ročná pacientka bola odoslaná na ORL vyšetrenie z OUM inej nemocnice pre 3 dni trvajúce bolesti hrdla, opuch krku, ťažkosti pri prehltaní a febrilitami až 39,0°C. V anamnéze pacientky jedinou pozoruhodnosťou je diabetes mellitus 2. typu, podľa poslednej ambulantnej správy od diabetológa len s nutnosťou diéty. Pacientka bola prijatá na kliniku ORL pre výrazne zvýšené zápalové parametre a hydromineralný rozvrat s hyperglykemiou – nad 30 mmol/l. Stav pacientky sa zhoršoval, bola vykonaná nekrektómia, zavedená drenáž, následne pre kardiopulmonálnu dekompenzáciu bola pacientka preložená na ARO za účelom komplexnej intenzivistickej liečby. Opakovane bol konzultovaný diabetológ, realizovali sa mikrobiologické vyšetrenia z obsahu tekutinovej kolekcie, zo sterov z rán, spúta, moču a krvi, následne aj po revíznych zákrokoch. Pacientka bola následne stabilizovaná, po rehabilitácii demitovaná.

Výsledky: Mikrobiologické vyšetrenie z evakuovaného obsahu po prvom zákroku dokázalo prítomnosť *S. pyogenes*, *S. anginosus* a koaguláza negat. stafylokokov. Pre multimikrobiálnu infekciu bola podaná kombinácia ATB, ktorá sa podľa ďalších výsledkov viackrát upravovala.

Záver: Imunodeficit, ako hlavný rizikový faktor vzniku nekrotizujúcej fasciitídy po tonzilitíde nie je zanedbateľná ani pri dobre kompenzovaných diabete. Vzhľadom na závažnosť a potrebu akútnej chirurgickej intervencie je nevyhnutné zvažovať, prípadne cielene vylúčiť túto diagnózu, ak potenciálne imunokompromitovaný pacient prezentuje suspektné príznaky.

## P15.

### **Isocitrát dehydrogenáza u difúzních gliomů: mutační analýza genů IDH1/2 pomocí sekvenování nové generace**

K. Zettlová (1), J. Vrbský (1, 2), M. Dvořáčková (1)

(1) Mikrobiologický ústav – Laboratoř molekulární a genetické diagnostiky, Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno, CZ

(2) Mezinárodní centrum klinického výzkumu, Fakultní nemocnice u sv. Anny, Brno, CZ

Isocitrát dehydrogenáza (IDH) je enzym, který hraje klíčovou roli v řadě biologických procesů, včetně Krebsova cyklu, metabolismu či buněčné homeostázy. Missense mutace v kodonu 132 genu IDH1 a 172 genu IDH2 (genů kódujících cytoplazmatické a mitochondriální formy enzymů – IDH1 a IDH2) jsou spojovány s procesem gliomogeneze. Gliomy jsou nejčastějšími primárními nádory centrálního nervového systému tvořící ~80 % všech malignit mozku. Představují heterogenní skupinu nádorů vykazující různé morfologické a genetické znaky spojené s velmi variabilní odpovědí na terapii. Přesná diagnostika a klasifikace nádoru je klíčová pro volbu vhodné terapie. V roce 2016 byla standardní histopatologická klasifikace rozšířena o molekulární diagnostiku a mutační stav IDH1/2 se stal ústředním diagnostickým markerem difúzních gliomů. Dle doporučení WHO CNS 2021 by u pacientů mladších 55 let s difúzním gliomem měla být po předchozím negativním výsledku imunohistochemického vyšetření (verifikaci nepřítomnosti mutantního proteinu IDH132H pomocí specifické protilátky) provedena sekvenace genů IDH1/2 s cílem odhalit vzácné nekanonické mutace IDH1/2.

V laboratoři Molekulárně genetické diagnostiky FN u sv. Anny v Brně bylo provedeno hodnocení mutačního stavu IDH1/2 pomocí sekvenování nové generace (NGS) u 21 pacientů mladších 55 let s difúzním gliomem. Výsledky byly srovnány s další nezávislou metodou, qPCR. Real-Time PCR byla dále využita k verifikaci výsledků získaných metodou IHC u vzorků, u kterých se dle současných doporučení ověření molekulárně-genetickou metodou standardně neprovádí (tj. IDH1 R132H pozitivních vzorků, IDH1 R132H negativních vzorků pacientů starších 55 let).

Shoda výsledků mezi IHC a NGS byla zaznamenána v 76 % (16/21) případů. U 24 % (5/21) případů byla pomocí NGS prokázána klinická falešná negativita IHC. Byly prokázány nekanonické mutace IDH1/2 – IDH1 R132G (3; 14 %) s frekvencí varianty (VAF) 1.36, 37.46, 1.48 a IDH1 R132L (2; 9,5 %) s VAF 1.28 a 1.45. Metoda qPCR nedokázala detekovat mutace s nízkým VAF. Mutace IDH1 R132H byla v qPCR testu prokázána ve 100 % (7/7) případů (zkřížená reaktivita protilátky neprokázána). V ~43 % (3/7) se však objevila zkřížená reaktivita PCR testu (dvojitá pozitivita s IDH1 R132C). Shoda výsledků mezi IHC (IDH negativní vzorky) a PCR dosahovala 100 %, vzácné nekanonické mutace nebyly u pacientů starších 55 let detekovány.

Výsledky potvrdily důležitost verifikace IHC negativních výsledků pomocí genetického sekvenování, vhodnost IHC jako primární screeningové metody pro detekci kanonické mutace IDH1 R132H a celkově podtrhly klinický přínos NGS (především pak u vzorků s nízkým zastoupením nádorových buněk v diagnostikované tkáni) v porovnání s méně citlivými metodami detekce.

## Seznam prvních autorů:

<b>Prezentující autor</b>	<b>Číslo stránky</b>	<b>Prezentující autor</b>	<b>Číslo stránky</b>
Bartáková	12	Ludková	43
Baslerová	29	Mangerová	32
Brodíková	14	Ondrouch	17
Burdová	18	Pechová	16
Coufalová	27	Pešta	34
Černá	28	Polašník Kleknerová	26
Čížková	35	Pšenka	44
Diabelko	25	Rebrošová	9
Džubara	36	Růžičková	45
Elbl	23	Řeháková	46
Elnwrani	37	Sadilová	31
Ficik	13	Svěchotová	47
Fremlová	11	Šefranko	22
Füssy	38	Štanclová	30
Grobarčíková	39	Štindlová	20
Holomková	40	Tóth	48
Jelínek	41	Vacek	24
Kern	15	Volný	21
Koppová	33	Zettlová	49
Krahulcová	10		
Lopušná	42		

**Poznámky:**

**Poznámky:**

**Poznámky:**

**Tomáškovy dny 2024**  
**XXXIII. konference mladých mikrobiologů**

Mgr. Lukáš Vacek, Ph.D. (ed.)  
Mgr. Dominika Kleknerová (ed.)

Vydala Masarykova univerzita,  
Žerotínovo nám. 617/9, 601 77 Brno  
1. elektronické vydání, 2024  
**ISBN** 978-80-280-0550-4

MUNI  
PRESS

MUNI  
MED

FAKULTNÍ  
NEMOCNICE  
U SV. ANNY  
V BRNĚ 