

# SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

ISSN 1338-645X

EV 2992/09

Ročník XVI.

Číslo 3-4/2016

*Časopis*

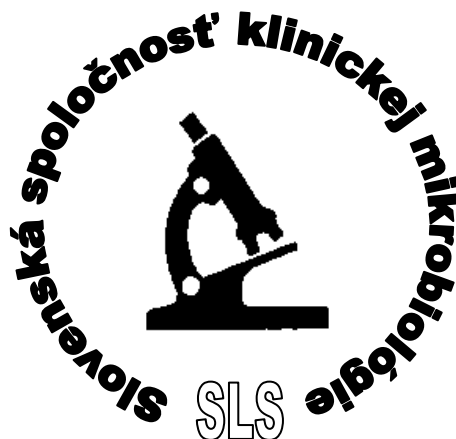
*Slovenskej spoločnosti klinickej mikrobiológie*

*Slovenskej lekárskej spoločnosti*

*a*

*Sekcie klinickej mikrobiológie*

*Slovenskej lekárskej komory*



Koeditor čísla: **prof. MVDr. Vladimír Kmeť, DrSc.**

## OBSAH

<i>Príhovor redakčnej rady</i> .....	3
<i>Adhezíny u enterovirulentných Escherichia coli</i>	
Kmeťová M., Vargová R., Siegfried L. ....	4
<i>Testovanie citlivosti na antibiotiká potravinových izolátov laktobacilov</i>	
Kmeť V., Bujňáková D., Tomáška M.....	12
<i>Mikroflóra tenkého čreva potkanov - model na testovanie obezity</i>	
Šefčíková Z., Bujňáková D., Kmeť V. ....	20

<i>Analýza klastrov Salmonella typhimurium pomocou PFGE elektroforézy a MALDI-TOF spektrofotometrie. ....</i>	<b>30</b>
<b>Sojka M., Majtánová L., Majtán V., Kmet' V.....</b>	<b>30</b>
<i>Immunomodulatory therapy of chronic uroinfections in colonised patients.....</i>	<b>38</b>
<b>Vašková S., Blažíčková S., Slobodníková L., Botek R. ....</b>	<b>38</b>
<i>Správy z odborných podujatí.....</i>	<b>44</b>
<i>Zápisnica Výboru SSKM SLS zo dňa 10. júna 2016.....</i>	<b>46</b>
<i>Zápisnica Výboru SSKM SLS zo dňa 2. decembra 2016 .....</i>	<b>49</b>

## Príhovor redakčnej rady

---

Vážení čitatelia, milí priatelia,

dostáva sa Vám do rúk ďalšie číslo nášho časopisu, tematicky venované predovšetkým otázkam patogénnych a fyziologicky prítomných mikroorganizmov v tráviacom trakte.

Poblematika faktorov virulencie u patogénnych *Escherichia coli* je stále aktuálna, špecifické adhezíny sú jedným z hlavných kritérií pri určovaní patotypu *Escherichia coli* a v posudzovaní ich ďalšieho uplatnenia v patogenéze.

Ďalšia práca je orientovaná na porovnanie biodiverzity izolátov *Salmonella typhimurium* pomocou pulznej elektroforézy a MALDI-TOF typizácie. Vedecké bádanie je niekedy zložitú, čo potvrdzuje aj tento článok. Očakávané nahradenie pulznej elektroforézy jednoduchšou a menej pracnou typizáciou pomocou Maldi sa podarilo potvrdiť len pri jednotlivých izolátoch *Salmonella typhimurium* resp. skupinách analyzovaných kmeňov, nie všeobecne

Laktobacily môžu mať gény rezistencie na tetracyklín, erytromycín a gentamicín. Testovanie citlivosti na antibiotiká u laktobacilov zohráva významnú úlohu v potravinárstve. Je odlišné od bežných klinicky významných baktérií. V uvedenej práci sa popri inom bližšie opisuje aj platná ISO norma 10932 na testovanie citlivosti laktobacilov.

Ďalšia experimentálna práca je venovaná etiológii obezity. Je známou skutočnosťou, že zloženie mikroflóry tráviaceho traktu zohráva dôležitú úlohu v patofyziológii obezity. Obézni ľudia majú zvyčajne vyššie počty baktérií kmeňa Firmicutes (kmeň baktérií so zhrubnutou bunkovou stenou; obsahuje aj laktobacily). Ako model na testovanie úlohy Firmicutes v črevnej fyziológii sa používa mikroflóra tenkého čreva potkana.

Práca venovaná o uroinfekciám síce nespadá do tematiky tráviaceho traktu, prezentuje však zaujímavý pokus o ovplyvnenie bakteriálneho biofilmu antibiotikami v kombinácii s lyzátom *E.coli* ako imunomodulátorom.

Milí čitatelia a kolegovia, veríme, že Vás aktuálne číslo SKM zaujme a bude inšpiráciou pre vašu ďalšiu prácu. Tešíme sa na Vaše ďalšie odborné príspevky.

Vladimír Kmeť

## Adhezíny u enterovirulentných *Escherichia coli*

Kmeťová, M., Vargová, R., Siegfried, L.

Ústav lekárskej a klinickej mikrobiológie, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika,  
Lekárska fakulta, SNP 1, 040 11 Košice

### Súhrn

Detekcia prítomnosti špecifických adhezínov je jedným z hlavných kritérií pri určovaní patotypu *E.coli* a posudzovaní ich ďalšieho uplatnenia v patogenéze, v koexistencii s ďalšími faktormi virulencie. Adhezíny sú nevyhnutné pre iniciálne štádia infekcie. V súbore 43 klinických izolátov *E. coli*, izolovaných pri črevných ochoreniach, sme zaznamenali vysoký výskyt génov *fim A* (37 kmeňov, 86 %), ktoré kódujú fimbrie typu 1. Gény *bfp*, vyskytujúce sa u enteropatogénnych patotypov, boli dokázané v 8 % (19 kmeňov). Prítomnosť adhezínu *eae*, označovaného aj ako intimín, sa potvrdila u 20 % izolátov (9 kmeňov). Gény adherencie typické pre extraintestinálne patogénne *E.coli* (ExPEC, napr. *sfa*, *afa*, *pap*), ktorých prítomnosť sme detegovali, sa môžu sporadicky vyskytovať aj v genotype enterovirulentných *E.coli* (EVEC), avšak k ich fenotypovému vyjadreniu pri gastrointestinálnych infekciách nedôjde.

*Kľúčové slová:* *E.coli*, adherencia, patotyp, virulencia

### Úvod

Najčastejším bakteriálnym patogénom, ktorý sa spája s endemickou hnačkou, je *Escherichia coli*. Je to je jeden z prvých kolonizátorov ľudského čreva a patrí k väčšinovej, fakultatívne anaeróbnej mikroflóre hrubého čreva ľudí a zvierat. Niektoré kmene *E. coli* sa však vyznačujú výrazným patogénnym potenciálom v dôsledku získania rôznych faktorov virulencie. Úlohu zohráva aj ich fylogenetický pôvod. Patogénne *E. coli* sa na základe spektra klinických príznakov, lokalizácie a spôsobu uplatnenia rozdeľujú na intestinálne patogénne *E.coli* (InPEC), označované aj ako enterovirulentné (EVEC) a extraintestinálne patogénne *E.coli* (ExPEC).

Patogénne intestinálne *E. coli* sa na základe prítomnosti génov virulencie ďalej delia do siedmych dobre definovaných enterovirulentných patotypov (Humphries & Armstrong, 2010; Jafari a spol., 2012): enteropatogénne (EPEC), enterotoxigénne (ETEC), shiga-toxín produkujúce (STEC), enteroinvazívne (EIEC), enteroagregatívne (EAggEC), difúzo-adherentné (DAEC) a adherentno-invazívne *E.coli* (AIEC). Rozdielne patotypy EVEC kolonizujú rôzne miesta v ľudskom čreve. EPEC, ETEC, DAEC a AIEC prednostne pôsobia v tenkom čreve, kým STEC a EIEC infikujú kolón a EAgEC, pôsobia tak v tenkom ako aj hrubom čreve (Liévin-LeMoal, 2013; Dias a kol., 2016).

K významným ExPEC patria uropatogénne *E.coli* (UPEC), ktoré sa ako hlavné etiologické agens podieľajú na vzniku nekomplikovaných infekcií dolných močových ciest (asymptomatická bakteriúria, cystitídy) resp. infekcií horného močového traktu (Köhler & Dobrindt, 2011; Kmeťová a kol., 2005; 2012). Na vzniku bakteriémie sa podieľajú septikemické *E.coli* (SEPEC) a pri meningitíde novorodencov sa uplatňujú *E.coli* vyvolávajúce neonatálnu meningitídu (NMEC).

Z iných extraintestinálnych patotypov je potrebné ďalej spomenúť *E.coli* vyvolávajúce infekcie mäkkých tkanív, infekcie respiračného traktu alebo kože (Poolman & Wacker, 2015).

Rôzne patotypy *E.coli* sa odlišujú spôsobom adhérence, typmi adhezínov, spektrom ďalších faktorov virulencie a klinickou manifestáciou ochorení, ktoré vyvolávajú (Kaper, 2004; Siegfried & Kmet'ová, 1997; Siegfried a kol. 2004). K definovaným patotypom patrí aj aviárny typ *E.coli* (AVEC) a známe sú aj králičie enteropatogénne *E.coli* (REPEC). Výskyt niektorých patotypov je viazaný iba na ľudskú populáciu (EIEC, EAaggEC, DAEC). Rezervoárom ETEC a EPEC je človek, rôzne prežúvavce, ošípané a iné domáce zvieratá, ako sú kozy, psy a mačky. STEC boli izolované od rôznych prežúvavcov, predovšetkým od hovädzieho dobytká, ale aj od oviec, kôz a jeleňov. Zaujímavé je, že boli tiež izolované od voľne žijúcich vtákov, vrabcov, škorcov a iných druhov vtákov (Persad & LeJeune, 2014). UPEC a NMEC sú bežne izolované z ľudského materiálu, APEC hlavne z hydiny.

Pre patogénne EVEC a ExPEC platí, že vo vysokom percente patria k fylogenetickej skupine B2, resp. D, kým komenzálne *E.coli* sa najčastejšie zatriedujú do skupín B1 a D (Clermont a kol., 2000). Fylogenetická skupina B2, resp. v menšej miere skupina D sa vyznačuje potenciálnou schopnosťou vyvolať ochorenie, aj bez získavania faktorov virulencie a signifikantne nižším výskytom u komenzálnych *E.coli*. Prítomnosť faktorov virulencie potencuje uplatnenie kmeňov pri vzniku infekcií.

Patogenita konkrétneho kmeňa *E.coli* je primárne určená špecifickými faktormi virulencie, ktoré zahŕňajú adhezíny, rôzne exotoxíny, invazíny, či evazivitu podporujúce faktory. Spektrum faktorov virulencie sa líši v závislosti na konkrétnom patotype (Jafari a kol., 2012). Faktory virulencie uľahčujú kolonizáciu a inváziu do submukózy, spôsobujú poškodenie tkanív hostiteľa, vedú k narušeniu jeho obranných mechanizmov a stimulujú vznik zápalového procesu (Clements a kol., 2012; Čurová a kol., 2014).

Schopnosť adhérence a kolonizácie je u väčšiny patogénnych EVEC sprostredkovaná bielkovinovými vláknitými štruktúrami na povrchu ich bunky, ktoré sa označujú ako fimbrie. Iný spôsob prichytenia na hostiteľské bunky, zvlášť významný u ExPEC, je pomocou adhezínov afimbriálnej povahy (Hernandes a kol., 2011). V súčasnosti je známych niekoľko typov adhezínov fimbriovej povahy, ako aj afimbriálnych adhezínov (Pereira & Giugliano, 2013; Ribet & Cossart, 2015) (Tab 1 .)

Prototypom fimbrií, zodpovedných za lokalizovaný typ adhérence (LA), sú BFP fimbrie, vyskytujúce sa u EPEC. Pre tento typ adhérence je charakteristická tvorba mikrokolónií (bakteriálnych klastrov) na povrchu hostiteľskej bunky, ktoré sú viditeľné už po 3 hodinách kontaktu medzi baktériami a bunkami (Saldana a kol., 2009; Humphries a Armstrong, 2010; Benevides-Matos a kol., 2015). Pre patotypy EPEC a STEC je charakteristická adhérenca typu AE (attachment and effacement), za ktorú sú zodpovedné adhezíny typu intimínu, kódované génmi *eae* (Pereira a kol., 2013). Prítomnosť dochádza k zmene v ultraštruktúre napadnutých buniek a k preskupeniu aktínu v blízkosti adherujúcich baktérií. Na sliznici čreva vznikajú vyhladené mikroskopické lézie označované ako lézie AE (attachment and effacement). Mechanizmus vzniku infekcie pri EPEC a STEC je však odlišný. EPEC sa delia na typické a atypické kmene práve na základe typu adhérence a prítomnosti adhérenčného plazmidu EAF (Ifeanyi a kol., 2015). Atypické EPEC neadherujú na epitel čreva spôsobom LA a sú podobné iným patovom EVEC. Heterogénnou skupinou sú fimbriové adhezíny ETEC, u ktorých sa označujú ako kolonizačné faktory (CFs) a je ich známych okolo 21 typov.

## Pôvodné práce

Pri agregatívnom spôsobe adherencie (AA) u EA<sub>g</sub>EC sú *E.coli* adherované na povrchu tkanivových kultúr ako naukladané tehličky. Za tento typ adherencie sú zodpovedné agregatívno-adherenčné fimbrie AAF1-IV. Za ďalší, difúzny typ adherencie, zodpovedajú afimbriálne adhezíny zo skupiny Afa/Dr. Bakteriálne bunky sú pri tomto spôsobe prichytenia náhodne rozptýlené po povrchu hostiteľských buniek, respektíve na abiotických povrchoch (Hedge a spol., 2012).

Na základe prítomnosti špecifických adhezínov vieme *E.coli* nielen zatriediť do patotypov, ale aj predpokladať možnosť ich ďalšieho uplatnenia v patogeneze, v koexistencii s ďalšími faktormi virulencie (Tab. 2).

Tab.1 Prehľad najvýznamnejších adhezínov *E.coli*

Adhezíny	Gén	Receptor	Cieľové miesto/ najčastejšia klinická diagnóza
Fimbrie typu 1	<i>fim</i>	$\alpha$ - D- mannozid	Erytrocyty / cystitída
P-fimbrie	<i>pap</i>	digalaktózid Gal ( $\alpha$ 1-4) $\beta$ Gal	Obličky / pyelonefritída
BFP fimbrie	<i>bfp</i>	$\beta$ <sub>1</sub> integríny	Tenké črevo/ hnačky novorodencov
intimín	<i>eae</i>	Receptor Tir (Translocated intimin receptor), integrin)	Hrubé črevo/dyspepsie, hemoragická kolitída, HUS
S-fimbrie	<i>sfa</i>	sialyl( $\alpha$ 2-3) laktóza	Mozgové, endoteliálne bunky /novorodenecké meningitídy, sepsa
CFA I- CFAV fimbrie	<i>cfa</i>	sialylglykoproteín, glykosfingolipid	Tenké črevo/ cestovateľské hnačky
AAF/I- AAF/III - agregatívne fimbrie	<i>aggA</i> <i>aafA</i> <i>AAG-3A</i>	Fibronektín, endoplazmin GRP-94/Gp96 glykozylfosfatidy linozit	Tenké črevo/ chronické hnačky
afimbriálne adhezíny	<i>afa</i> , <i>Dr</i> , <i>AIDA</i> , <i>nfAa</i> <i>intimin</i> $\alpha$ , <i>tir</i>	krvný Dr determinat, sacharidové skupiny s glykoforínom A, Hep-2, HeLa bunky, Tir proteín	Urinárny trakt, iná extraintestinálna lokalizácia, črevo / urinárne infekcie, iné

Tab. 2 Najčastejšia asociácia génov adhérencie s patotypom humánných *E.coli*

Patotyp <i>E. coli</i>	<i>Fim A</i>	<i>bfp</i>	<i>eae</i>	<i>sfa</i>	<i>cfa</i>	<i>agg</i> <i>A</i> <i>aaf</i> <i>A</i>	<i>pap</i>	<i>Ne</i>
Enteropatogénne (EPEC)	+	+++	+++					
Šigatoxigénne (STEC)			+++					
Vyvolávajúce neonatálnu meningitídu (NMEC)	+			++				
Septikemické (SEPEC)	+			++				
Enterotoxigénne (ETEC)					+++			
Enteroinvazívne (EIEC)								+
Enterogregatívne (EAggEC)						+++		
Uropatogénne (UPEC)	++			+			+++	
Fyziologická mikroflóra	+++							

**Materiál a metódy.**

Študovali sme *E.coli*, izolované z výterov rekta od 43 pacientov s nešpecifickými zápalovými infekciami gastrointestinálneho traktu a s klinickým prejavmi hnačky. Od jedného pacienta bol do súboru zaradený vždy len jeden kmeň.

Metódou PCR sme zisťovali prítomnosť šiestich génov adhérencie: *fimA*, *bfpA*, *pap*, *sfa*, *eae* a *afa*. Prehľad použitých primerov, veľkosť detekovaných produktov a PCR protokolov udáva Tab. 3. Ako referenčné kmene sme použili: *E.coli* EBC(*hly*<sup>+</sup>,*cnfI*<sup>+</sup>,*sfa*<sup>+</sup>,*aer*<sup>+</sup>), *E. coli* EBC (*hly*<sup>+</sup>,*cnfI*<sup>+</sup>, *sfa*<sup>+</sup>,*aer*<sup>+</sup>), *E.coli* O29/A, (*eaeA*<sup>+</sup>, *bfpA*<sup>+</sup>), *E.coli* KS 52 (*afa*<sup>+</sup>, *aer*<sup>+</sup>, *pap*<sup>+</sup>, *fimA*<sup>+</sup>), *E.coli* Nissle (*fimA*<sup>+</sup>, *aer*<sup>+</sup>, *iucC*<sup>+</sup>). Ako negatívnu kontrolu sme použili kmeň *E.coli* C 600<sup>RF</sup> (*hly*<sup>-</sup>, *cnfI*<sup>-</sup>, *pap*<sup>-</sup>, *sfa*<sup>-</sup>, *afa*<sup>-</sup>, *aer*<sup>-</sup>, *ial*<sup>-</sup>, *ipaH*<sup>-</sup>, *iucC*<sup>-</sup>, *pCVD432*<sup>-</sup>. *eaeA*<sup>-</sup>, *bfpA*<sup>-</sup>, *lt*, *st*).

Tab 3 Primery použité na detekciu génov adherencie

Gén	Sekvencie 5' - 3'	Veľkosť (bp)	Produkt génu	PCR protokol podľa:
<i>fim A</i>	F:GGCGAATTCTGTTCTGTCGGCTCTGTC R:TTGGAATTCAACCTTGAAGGTCGCATC	510	Fimbrie typu 1	Kuhnert a kol. (1997)
<i>afa</i>	F:GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC R:CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCG	750	afimbriálny adhezín	Yamamoto a kol. (1995)
<i>sfa</i>	F:CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC R:CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	410	S fimbrie	Yamamoto a kol. (1995)
<i>pap</i>	F:GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT R:AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA	328	P-fimbrie	Yamamoto a kol. (1995)
<i>eae</i>	F:GACCCCGCACAAGCATAAG R:CCACCTGCAGCAACAAGAG	384	Intimin	Lopez-Saucedo a kol. (2003)
<i>bfp</i>	F:AATGGTGCTTGCGCTTGCTGCGC R:GCCGCTTTATCCAACCTGGTA	324	Fimbrie tvoriace zväzky	Lopez-Saucedo a kol. (2003)

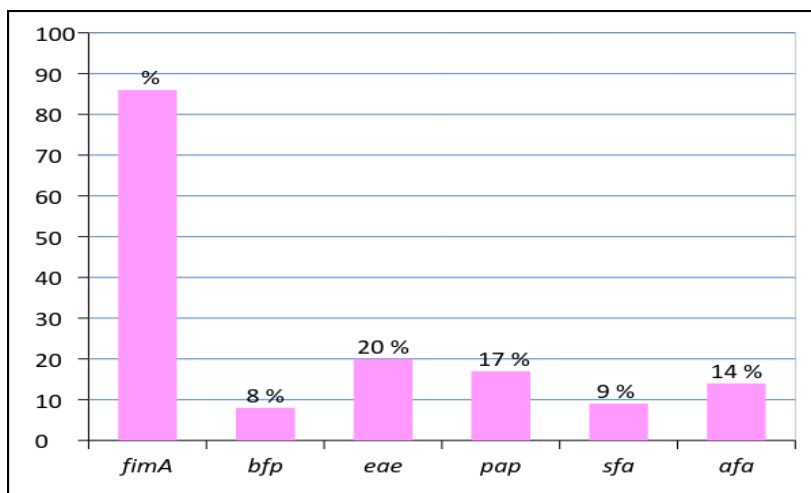
### Výsledky a diskusia

U všetkých EVEC, vyvolávajúcich gastrointestinálne problémy dospelých jedincov, sme dokázali prítomnosť aspoň jedného génu, kódujúceho schopnosť adherovať na enterocyty. V súlade s literárnymi údajmi sme zaznamenali v našom súbore klinických izolátov *E. coli* vysoký výskyt génov *fim A* (37 kmeňov, 86 %), ktoré kodujú fimbrie typu 1. Tieto fimbrie patria medzi nešpecifické adhezíny a môžu sa vyskytovať tak u kmeňov *E.coli*, patriacich k fyziologickej mikroflóre, ako aj u patogénnych kmeňov. Podporujú internalizáciu *E.coli* do hostiteľských buniek a sú považované za mimoriadne univerzálne faktory virulencie. (Iida a kol., 2001, Bien, Tchesnokova a kol. 2011). Expresia fimbrií typu 1 je spojená s virulenciou kmeňov *E. coli* a ich strata často vedie k strate virulencie (Vizcarra a kol., 2015). U patogénnych kmeňov sa vyskytujú často v asociácii s hostiteľsko-špecifickými adhezínmi. Podľa autorov Bateman a spol. (2013) fimbrie typu 1 vykazujú vysoko pozitívnu koreláciu s výskytom faktorov virulencie, čo naznačuje ich potenciálnu úlohu v patogenetickom procese. Gény *bfp*, vyskytujúce sa u enteropatogénnych patotypov, boli dokázané v testovanom súbore v 8 % (19 kmeňov).



## Pôvodné práce

Prítomnosť EA adhezínu (odvodené z ang. attachment and effacement), označovaného aj ako intimín, je kódovaná génmi *eae*. Je to ďalší adhezín vyskytujúci sa u EPEC. V našom súbore testovaných kmeňov sa tieto gény vyskytovali v 20 % izolátov (9 kmeňov). Gény adherencie typické pre ExPEC (napr. *sfa*, *afa*, *pap*), ktorých prítomnosť sme detegovali, sa môžu sporadicky vyskytovať aj v genotype EVEC, avšak k fenotypovému vyjadreniu pri gastrointestinálnych infekciách nedôjde. Gény *sfa*, kódujúce adhezíny typické pre *E. coli* podieľajúce sa na vážnych, až život ohrozujúcich infekciách súvisiacich s neonatálnou meningitídou a septikémiou sme dokázali u 4 kmeňov (9%) a gény pre afimbriálny adhezín *afa* u 6 kmeňov (14%) izolátov. P fimbrie (*pap* gény) sa primárne vyskytujú u uropatogénnych kmeňov *E. coli* vyvolávajúcich pyelonefritídu. Až 7 kmeňov (17%) izolovaných pri ochoreniach GIT-u bolo pozitívnych na prítomnosť génu *pap*. Detekcia P fimbrií potvrdzuje predpoklad Johnsona a kol. (2005), že *E. coli* izolované z rekta pri neliečenej ascendentnej uroinfekcii majú vysokú predispozíciu vyvolať pyelonefritídu. Výskyt génov adherencie u testovaných kmeňov *E. coli* je znázornený na grafe 1.



**Graf 1.** Výskyt génov virulencie v testovanom súbore kmeňov *E. coli*

## Záver

Prítomnosť jedného alebo viacerých druhov adhezínov je základným predpokladom pre vznik infekcie. V študovanom súbore klinických izolátov *E. coli* z výterov rekta sme dokázali najčastejšie prítomnosť nešpecifických génov adherencie *fim A* (86%). Gény pre rôzne špecifické adhezíny (*bfp*, *eae*, *pap*, *sfa* a *afa*), sa vyskytovali buď v koexistencii s génom *fimA*, alebo samostatne a ich počet neprevyšil hodnotu 20%. Nezachytili sme ani jeden kmeň bez prítomnosti aspoň jedného génu kódujúceho adhezenčné vlastnosti EVEC.

Korelácia výskytu niektorých adhezínov s produkciou toxínov a s fylogenetickými skupinami B2 a D zaraďuje adhezíny medzi najvýznamnejšie ukazovatele virulencie *E. coli*, na základe ktorých je možné klinické izoláty rýchlo a spoľahlivo zaradiť k známym EVEC a ExPEC patotypom.

### Literatúra

1. ANTÃO, EM a kol. 2009. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*, 22: doi:10.1186/1757-4749-1-22.
2. BATEMAN, SL.a kol. 2013: Typ 1 Pili Regulátor Gene *fimX* a patogenity Island PAI-X ako molekulárne markery Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*, , 159, 1606-1617.
3. BENEVIDES-MATOS, N., a kol., 2015. Adherence and virulence genes of *Escherichia coli* from children diarrhoea in the Brazilian Amazon. *Braz J Microbiol.*, 46: 131–137
4. CLEMENTS, A. a kol. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3: 71–87
5. CONNELL, H a kol. 1996. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceed. Nat. Acad. Scien.* 93: 9827 -9832
6. CLERMONT, O., S. BONACORSI, E.BINGEN., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.*, 66: 4555-4558
7. DIAS. R.C. B a kol. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes investigation revealed atypical enteropathogenic *E. coli* as putative emerging diarrheal agents in children living in Botucatu, São Paulo State, Brazil. *APMIS*, 124: 299–308
8. ČUROVÁ, K. a kol. 2014. Toxins of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolated from Blood Culture. *Clin Microbiol* 3: 171. doi:10.4172/2327-5073.1000171
9. HEGDE, A. a kol., 2012. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by multiplex PCR. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2012, 30, 279 -284
10. HERNANDES, R. a kol. 2011. Fimbrial adhesins produced by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Applied Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 8391 -8424
11. HUMPHRIES RM & ARMSTRONG GD. Sticky situation: Localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol.* 2010;5:1645–1661.
12. IFEANYI, C. C.I. a kol. 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes isolated from children with diarrhea in the Federal Capital Territory Abuja, Nigeria. *J Infect Dev Ctries.* 9: 165-174
13. IIDA, K.I., MIZUNOE, Y., S. N. WAI, S.I. YOSHIDA, 2001. Type 1 Fimbriation and Its Phase Switching in Diarrheagenic *Escherichia coli* Strains. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 8: 489–495, doi: 10.1128/cdli.8.3.489-495.2001
14. Jafari, A., Mm Aslani, Saeid Bouzari, 2012. *Escherichia coli*: a brief review of diarrheagenic patho types and their role in diarrheal diseases in Iran.. *Iranian Journal of Microbiology*, 4: 102-17.
15. JOHNSON, JR. a kol. 2005. Bacterial Characteristics in Relation to Clinical Source of *Escherichia coli* Isolates from Women with Acute Cystitis or Pyelonephritis and Uninfected Women. *J Clin Microbiol*, 143: 6064-72
16. Kaper, JB., JP. Nataro, H.L.T.Mobley, 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2: 123-140
17. KMEŤOVÁ, M. a kol., 2005. *Escherichia coli* strains isolated from patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. *Biologia*, 60: 717-721

18. KMEŤOVÁ, M. a kol., 2012. Virulentný profil a rezistencia *Escherichia coli* izolovaných od imunokompromitovaných pacientov pri urosepse. *Urol Listy*, 10: 37-40
19. Köhler, C.-D. Dobrindt, U., 2011. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*? *Int J Med Microbiol*, 301: 642–647
20. KUHNERT, P. a kol. 1997. Detection system for *Escherichia coli*-specific virulence genes: absence of virulence determinants in B and C strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 703-709
21. LIÉVIN-LE MOAL, VANESSA a A. L. SERVIN, 2013. Pathogenesis of Human Enterovirulent Bacteria: Lessons from Cultured, Fully Differentiated Human Colon Cancer Cell Lines. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77: 380–439
22. LOPEZ-SAUCEDO, C. a kol: 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 127-131
23. PEREIRA, A. L., L.G. GIUGLIANO, 2013. Adhesion of Diarrheagenic *Escherichia coli* and Inhibition by Glycocompounds Engaged in the Mucosal Innate Immunity. *Biology*, 2: 810-831
24. LOPEZ-SAUCEDO a kol., 2003: Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 127-131
25. PERSAD AK & I. T. LeJEUNE, 2014. Animal reservoirs of Shigatoxin-producing *Escherichia coli*, *Microbiol Spectrum* , 2: doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0027-2014
26. POOLMAN, JT & M. WACKER, 2015. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *J Infect Dis*, 2: doi:10.1093/infdis/jiv429
27. RIBET, D. & P. COSSART,, 2015. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes and Infection*, 17: 173-183
28. SALDANA, Z. a kol. 2009. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* 191: 3451 – 3461
29. SIEGFRIED L & M. KMEŤOVÁ, 1997. Role of virulence factors in pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Biologia* 1997; 52: 697-705
30. TCHESNOKOVA, V. a kol. 2011. Type 1 fimbrial adhesin FimH elicits immune response which enhances cell adhesion of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 79: 3895-3904
31. VIZCARRA, IA a kol.. 2016. How type 1 fimbriae help *Escherichia coli* to evade extracellular antibiotics. *Sci. Rep.* 6: doi:10.1038/srep18109.
32. YAMAMOTO, S. a kol.. 1995. Detection of virulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immuno. Med. Microbiol.*, 12, 85-90

**Práca vznikla v rámci riešenia projektu Centrum excelentnosti CEMIO, ITMS 26220120058 (100%).**

## Testovanie citlivosti na antibiotiká potravinových izolátov laktobacilov

Vladimír Kmeť, Dobroslava Bujňáková, Martin Tomáška\*

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice

\*Výskumný ústav mliekárenský a.s., Dlhá 95, 010 01 Žilina

### SÚHRN

Pomocou MALDI-TOF hmotnostnej spektrometrie sme v ovčích syroch identifikovali nasledovné druhy laktobacilov: *Lactobacillus casei/paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* a *P. acidilactici*. Vyšetrenie antibiotickej citlivosti izolátov potvrdilo, že z 200 testovaných izolátov len jeden kmeň *Lactobacillus fermentum* mal zvýšenú hodnotu MIC pre klindamycín, a to na úrovni 1 mg/L, meranú MIC epsilon testom. V práci sa komentuje norma ISO 10932 na testovanie citlivosti laktobacilov na antibakteriálne látky.

### ÚVOD

Laktobacily sú dôležitou časťou fyziologickej mikroflóry ľudí a zvierat. Majú dlhú históriu v podobe bezpečných výživových a aj terapeutických doplnkov. Postupne sa začali objavovať správy aj o negatívnych účinkoch probiotických preparátov vrátane laktobacilov. Preto EFSA (Európska agentúra pre potravinovú bezpečnosť) stanovila kritériá bezpečnosti. Prvé dve kritériá sú neprítomnosť získanej rezistencie na antibiotiká a absencia schopnosti translokácie génov probiotického kmeňa.

### Rezistencia na antibiotiká u klinických izolátov laktobacilov.

Prvé správy o rezistencii na antibiotiká sa objavili u izolátov zo zvierat a v humánných klinických kmeňoch v súvislosti so selekčným tlakom antibiotík. Lin a kol. (1996) detekovali u kmeňa *Lactobacillus reuteri* z hydiny plazmid pTC82 kódujúci rezistenciu na chloramfenikol. Goldstein a kol. (2000) pri testovaní účinnosti preparátu MK 0826 (ertapeném) zistili u rôznych laktobacilov MIC<sub>90</sub> na imipeném na úrovni 8 mg/L. Tí istí autori v r. 2002 uvádzajú aj hodnotu MIC<sub>90</sub> pre ertapeném zistenú v zmesi laktobacilov na úrovni >16 mg/L. Podľa terajších kritérií na testovanie citlivosti na antibiotiká laktobacilov (norma ISO 10932) je však nutné stanoviť aj druh laktobacila, lebo každý druh má iné hraničné hodnoty MIC. Údaj citlivosti pre zmes rôznych druhov laktobacilov preto treba prijímať s výhradou. Najčastejšie detekovanými génmi pre rezistenciu u laktobacilov sú gény pre rezistenciu na erytromycín (*ermB*) a tetracyklín, napr. *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(L)*, *tet(W)*. Aj v našom laboratóriu sme dokázali prítomnosť *ermB* a *tet* génov u laktobacilov izolovaných od kurčiat (Demánková a Kmeť 2008 a Kmeť a Piatnicová 2010). Skôr ojedinele bola dokázaná aj prítomnosť génu *vat(E)* u kmeňa *Lactobacillus amylovorus* rezistentného na quinupristin/dalfopristin a génu *cat-TC* like u troch chloramfenikol-rezistentných *Lactobacillus johnsonii* (Mayrhofer a kol. 2010).

### **Probiotické kmene nesmú mať schopnosť translokovať gény.**

Vanichanan a kol. (2016) izoloval od pacienta s intra-abdominálnou infekciou po transplantácii obličky karbapeném rezistentný *Lactobacillus casei* s MIC na meropeném a na ertapeném >32 mg/L. Pacient užíval aj probiotikum na báze *L. casei*, pričom tento kmeň mal hodnotu MIC na ertapeném >32 mg/L, ale MIC na meropeném mala hodnotu iba 3 mg/L. Salminen a kol. (2006) opísali laktobacilové bakterémie (endokarditída) u 85 pacientov vo Fínsku v r. 1989 - 2004 s nízkymi hodnotami MIC na imipeném, piperacilín-tazobaktám, erytromycín a klindamycín.

### **Prirodzená rezistencia laktobacilov.**

Najčastejším typom rezistencie u laktobacilov je prirodzená rezistencia. U laktobacilov bola opísaná vrodenná rezistencia na aminoglykozidy (nízka hladina MIC na gentamicín, streptomycín a kanamycín), na fluorochinolóny, na glykopeptidy (vankomycín a teikoplanín), na cefoxitín, sulfonamidy a kotrimoxazol. Potravinové laktobacily sú pravidelne citlivé na ampicilín, chloramfenikol, erytromycín, linezolid a quinupristin/dalfopristin (Ammor a kol., 2007). Skupina *Lactobacillus acidophilus* je zvyčajne citlivá na vankomycín, tab. č 2 (EFSA 2012). MIC<sub>90</sub> teikoplanínu u *L. acidophilus* bola na úrovni  $\leq 0,125$  mg/L (Klare a kol. 2007).

Danielsen a Wind (2003) opísali u laktobacilov vysoký stupeň vrodenej rezistencie na cefoxitin, ciprofloxacín, kanamycín, gentamicín, streptomycín, teikoplanín, kotrimoxazol a vankomycín. Rezistencia na cefoxitín bola pozorovaná u väčšiny laktobacilových izolátov s hodnotami MIC 4–64 mg/L a hodnotami MIC pre penicilín 0,06–0,25 mg/L (Delgado a kol. 2007). Prirodzená rezistencia je vrodenná (nie-získaná) rezistencia, charakteristická pre daný druh baktérie, alebo pre väčšinu zástupcov daného druhu. Prirodzená rezistencia u laktobacilov je všeobecne akceptovaná ako netransferabilná (Rosander a kol. 2008) na ďalšie druhy baktérií.

**Norma ISO 10932 pre testovanie citlivosti** (Klare a kol. 2007, Kuyshiro a kol. 2009, Huys a kol. 2010). Ako základná živná pôda pre testovanie citlivosti na antibiotiká u ne-enterokokových baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu (NELAB) bola navrhnutá kombinácia 90% IST bujónu (Iso-sensitest) s 10% MRS (de Man, Rogosa a Sharpe) bujónu (Huys a kol. 2010).

Pri testovaní citlivosti na antibiotiká u ne-enterokokových baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu sa preferujú dilučné agarové metódy, epsilon-testy (E-testy) alebo stanovenie MIC dilučnou bujónovou metódou. Disková metóda sa pri laktobaciloch nepoužíva. Pri testovaní je potrebné presné určenie druhu laktobacila, najlepšie molekulárno-biologickými metódami, pretože každý druh laktobacila má iné hodnoty breakpointov v starších normách (SCAN a FEEDAP) resp. cut-off hodnoty v norme ISO 10932 resp. v kľúčových publikáciách ako napr. Klare a kol. (2007). V norme ISO 10932 sa neuvádzajú pediokoky, možno ich však nájsť v starších normách.

**Vývoj normy ISO 10932 a základné pojmy.** Na testovanie citlivosti na antibiotiká u tzv. ne-enterokokových baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu nebola dostupná norma, a to najmä z dôvodu ich neschopnosti rastu na Mueller-Hintonovej agare (MHA), ktorý je základnou živnou pôdou na testovanie citlivosti bakteriálnych patogénov, včítane enterokokov.

U laktobacilov, laktokokov a bifidobaktérií vývoj normy sa začal od SCAN (vedecký výbor pre výživu zvierat) 2003, cez FEEDAP panel (Aditíva a produkty alebo substancie používané vo výžive zvierat) v r. 2005 a jeho inováciou v r. 2008, ktoré už obsahovali breakpointy pre všetky druhy baktérií používané ako výživové a kŕmne doplnky, avšak ešte bez špecifikácie živnej pôdy. V tom čase sa najčastejšie používal MHA s prídavkom konskej krvi alebo MRS agar (Mann, Rogosa, Sharp), ktoré však ovplyvňovali namerané hodnoty MIC, resp. veľkosť inhibičných zón pri diskovej metóde a v E-testoch.

Od roku 2002 sa riešili dva európske projekty, a to v 5. rámcovom programe „Biosafety Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria used for Human Consumption, PROSAFE“ (2002-2006) a v 6.RP projekt „Assessment and Critical Evaluation of Antibiotic Resistance Transferability in Food Chain, ACE-ART“ (2004-2008), ktorých výsledky výrazne napomohli k tvorbe normy ISO 10932 (Klare a kol. 2007, Kuyshiro a kol. 2009, Huys a kol. 2010).

Podľa normy ISO 10932 sa ako základná živná pôda pre testovanie citlivosti NELAB zaviedla kombinácia 90% IST bujónu (Iso-sensitest) s 10% MRS bujónu (Huys a kol. 2010).

Pri citlivých izolátoch laktobacilov sa výsledok má vyjadrovať ako „wild type“ (divoký, prirodzene citlivý kmeň) a pri rezistentných ako non wild type. Európsky výbor pre testovanie antimikrobiálnej citlivosti (EUCAST, <http://www.srga.org/eucastwt/eucastdefinitions.htm>) definuje „epidemiologické cut-off“ hodnoty (ECOFF) - takú hodnotu MIC pre príslušné antibiotikum, ktorá umožňuje rozlíšiť tzv. wild-type (**WT**) izoláty (nemajú žiadnu získanú rezistenciu na antibiotiká a ani mechanizmy rezistencie získané mutáciou) od tzv. non-wild-type (**NWT**) izolátov (majú získanú rezistenciu na antibiotiká, alebo mechanizmus rezistencie vytvorený mutáciou). Matematicky je vyjadrený  $WT \leq x \text{ mg/L}$  a non-wild typ ako  $NWT > x \text{ mg/L}$ . Izolát NWT má tzv. **mikrobiologickú rezistenciu**. Naproti tomu **klinická rezistencia** na antibiotiká je definovaná hodnotou klinického breakpointu ako  $R > y \text{ mg/L}$ . Hodnota cut-off ECOFF sa nebude v budúcnosti meniť, zatiaľ čo hodnota klinických breakpointov závisí aj od spôsobu aplikácie liečiva a dávky a môže sa meniť rozhodnutím príslušnej komisie.

## MATERIÁL A METODIKA

**Bakteriálne kmene a ich diagnostika.** Celkovo 200 bakteriálnych izolátov predbežne identifikovaných ako laktobacily a laktokoky z ovčieho syra bolo poskytnutých z VÚ mliekárenského v Žiline v rámci riešenia spoločného projektu. Pre porovnanie sme použili aj črevné laktobacily izolované z trusu brojlerov zo slovenských chovov. Izoláty boli identifikované na prístroji Maldi Biotyper (Bruker Daltonik). Každý izolát bol spracovaný extrakčným postupom etanol/kyselina mravčia a 1  $\mu\text{l}$  proteínového extraktu po jeho vysušení na platničke bol prekrytý 2  $\mu\text{l}$  roztoku matrice obsahujúcej nasýtený „ $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid“ v 50% acetonitrile s 2.5% trifluoroctovou kyselinou a vysušený na vzduchu. Získané spektrá boli vyhodnotené a identifikácia určená pomocou softvéru BioTyper, verzia 2.0.

**Citlivosť laktobacilov na antibiotiká.** Stanovenie antibiotickej citlivosti bolo vykonané podľa normy ISO 10932, ktorá je opísaná v práci Mayrhofera a kol (2010). Norma vyšla aj samostatne v r. 2010, avšak samotná neuvádza hodnoty mikrobiologických cut-off. Doporučovaný koncentračný rozsah antibiotík podľa normy ISO 10932 uvádzame v tab. č. 1. Úplný rozsah testovaných riedení spĺňa iba finančne nákladná komerčná švédka súprava obsahujúca dvojicu platničiek VetMIC Lact1 a VetMic Lact2, ktorú vyrába SVA (National Veterinary Institute) Uppsala. Z dôvodu vysokej ceny súpravy sme skúšali aj lacnejšiu súpravu Trek Diagnostics (nemá potrebný rozsah koncentrácie antibakteriálnych látok), ako aj MIC stripy.

## Pôvodné práce

---

V našich pokusoch sme použili modifikovaný LSM bujón obsahujúci 90% Mueller Hintonovej bujóny (Biorad FR) a 10% MRS bujónu (Oxoid GB). Modifikácia bola v zámene pomerne drahého ISO-sensitest bujónu za lacnejší MH bujón. MIC sme testovali na Gram-pozitívnych (CMV3AGPF) mikrotitračných platničkách (Trek Diagnostic Systems Inc. USA), ktoré obsahovali tigecyklín, tetracyklín, chloramfenikol, daptomycín, tylozín, quinupristín/dalfopristín, linezolid, penicilín, erytromycín, ciprofloxacín, vankomycín a linkomycín. Citlivosť na gentamicín, streptomycín a klindamycín sme vykonali pomocou MIC stripov (Liofilchem, IT) podľa metodiky Kushiro a kol. (2009), pretože použité Trek platničky sú určené pre enterokoky a neobsahujú všetky potrebné antibiotiká. MIC strip testy ako aj MIC platničky boli odčítavané po 48 h kultivácie.

Tab. 1. Koncentračný rozsah antibiotík pre stanovenie citlivosti podľa normy ISO 10932.

Antibiotikum	Koncentračný rozsah mg/L
Gentamicín	0,5-256
Kanamycín	2- 1024
Streptomycín	0,5- 256
Neomycín	0,5- 256
Tetracyklín	0,125- 64
Erytromycín	0,016- 8
Klindamycín	0,032- 16
Chloramfenikol	0,125- 64
Ampicilín	0,032- 16
Vankomycín	0,25- 128
Quinupristín/ Dalfopristín	0,016- 8
Linezolid	0,032-16
Trimetoprim	0,125-64
Ciprofloxacín	0,25- 128
Rifampicín	0,125- 64

**PCR diagnostika génov rezistencie.** Gén rezistencie na gentamicín a aminoglykozidy *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia* a gén rezistencie na kanamycín *aph(3')-IIIa* sme detekovali metódou podľa Vakulénka a kol. (2003), gény rezistencie na tetracyklín *tet(L)*, *tet (M)*, *tet (S)* metódou podľa Ng a kol. (2001) a gén rezistencie na streptomycín/spektinomycín *aadA* podľa Clarka a kol. (1999).

Tab. č. 2 Mikrobiologické cut-off hodnoty (mg/L) pre hodnotenie získanej rezistencie baktérií vo výživových a kŕmnych doplnkoch (EFSA 2012)

	ampicillín	vankomycín	gentamicín	kanamycín	streptomycín	erythromycín	klindamycín	tetracyklín	chloramfenikol
<i>Lactobacillus</i> obligátne homofermentatívny	1	2	16	16	16	1	1	4	4
Skup. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligátne heterofermentatívny	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> fakultatívne heterofermentatívny	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4
<i>Bacillus spp</i>	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
<i>E.faecium</i>	2	4	32	102 4	128	4	4	4	16

Legenda: n.r. nepožadované

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

MALDI-TOF analýzou bolo možné zaradiť testované izoláty z ovčích syrov do nasledovných druhov: *Lactobacillus casei/paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus* a *P. acidilactici*.

Väčšina z 200 testovaných izolátov bola citlivá na antibiotiká, teda boli typu WT (wild type). Hodnoty MIC na tetracyklín boli v rozmedzí od 1 do 8 mg/L, na chloramfenikol od 2 do 4 mg/L, na penicilín od 0,25 mg do 0,5 mg/L, na tylozín od 0,25 do 4 mg/L, na erytromycín od 0,25 mg do 1 mg/L, na quinupristín/dalfopristín od 0,5 mg do 2 mg/L a na linezolid od 0,5 mg do 2 mg/L. Väčšina testovaných laktobacilov mala hodnoty MIC na vankomycín na úrovni 32 mg/L a na ciprofloxacín 4 mg/L. Jeden kmeň *Lactobacillus fermentum* mal zvýšenú hodnotu MIC na klindamycín, a to na úrovni 1 mg/L, meranú strip testom.



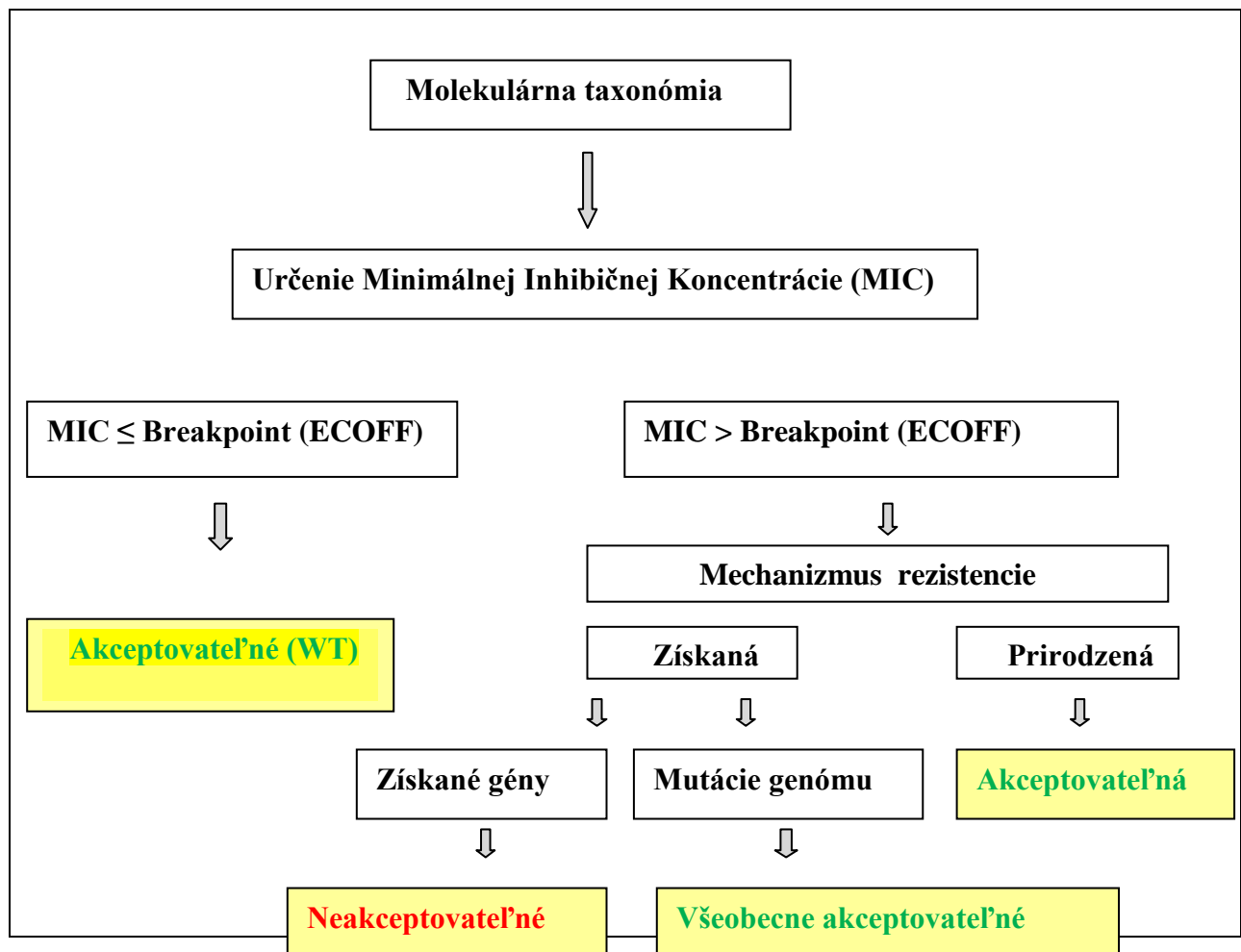
## Pôvodné práce

Spomedzi izolátov laktobacilov z čreva hydiny, ktoré sme použili na porovnanie s izolátmi zo syra, obsahoval *Lactobacillus salivarius* 12K gén rezistencie na gentamicín *aac(6')-Ie-aph(2')-Ia*, pričom kmeň mal hodnotu MIC na gentamicín 256 mg/L.

Z výsledkov našej štúdie, ale aj predchádzajúcich výsledkov testovania laktobacilov izolovaných z mliečnych výrobkov a jogurtov (Kmeť, Demánková 2008) vyplýva, že laktobacily izolované z ovčích syrov dodávaných na slovenský trh, spadajú do kategórie WT izolátov.

Pri NELAB je možné dokázať metódami molekulárnej biológie (PCR, DNA microarray) prítomnosť špecifických génov rezistencie na antibiotiká pre nedostupnosť takýchto testov len ťažko. Jediný parameter, ktorý nám ostáva na zhodnotenie citlivosti probiotických a štartérových kmeňov, je ich zradenie do WT alebo NWT podľa príslušnej hodnoty MIC. Pri probiotických enterokokoch je to podstatne jednoduchšie, enterokoky sa bežne vyšetrujú v bakteriologických laboratóriách ako patogény a detekcia génov rezistencie pomocou PCR je rutinnou záležitosťou. Na obr. č.1 je uvedená schéma testovania a vyhodnotenia laktobacilov, laktokokov, bifidobaktérií na prítomnosť získanej rezistencie na antibiotiká podľa EFSA (2008).

Obr.č.1. Modifikovaná schéma testovania laktobacilov podľa EFSA 2008.



### ZÁVER

V práci sa opisuje vývoj problematiky stanovenia citlivosti na antibiotiká u laktobacilov používaných ako probiotiká a štartérové kultúry od roku 2003 doteraz. Nová norma ISO10932 definuje základné živné pôdy pre testovanie bifidobaktérií a ne-enterokokových baktérií produkujúcich kyselinu mliečnu, rozpätie testovaných koncentrácií antibiotík pri mikrodilučnej metóde, spôsob kultivácie a kontrolné kmene pre hodnotenie správnosti stanovenia MIC. Väčšina nami testovaných laktobacilov z ovčích syrov spadala do kategórie WT. Laktobacily izolované z trusu kurčiat, ktoré boli pod selekčným tlakom antibiotík, obsahovali len očakávané gény rezistencie na tetracyklín. Výskyt génu rezistencie na gentamicín *aac(6′)-Ie-aph(2′)-Ia* u kmeňa *Lactobacillus salivarius* 12K treba považovať za výnimočný.

**Pod’akovanie.** Výsledky tejto práce boli dosiahnuté pri riešení projektu č. 26220220065 „Izolácia, identifikácia a charakterizácia kyslomliečnych baktérií pre ich aplikáciu v mliekárenskom priemysle „Operačného programu výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

### Literatúra

1. AMMOR M.S., FLÓREZ A.B., MAYO B.: Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. In: Food Microbiol. 24, 2007, 559–570.
2. CLARK N. C., OLSVIK O., SWENSON J. M., SPIEGEL C. A., TENOVER .F.C (1999 ) Detection of a Streptomycin/Spectinomycin Adenylyltransferase Gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*. In: Antimicrob. Agents Chemother. 43, 1999, 157-160
3. DANIELSEN, M., WIND A. : Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. In: Int. J. Food Microbiol. 82, 2003, 1–11
4. DELGADO S, O’SULLIVAN E, FITZGERALD G, MAYO B.: Subtractive screening for probiotic properties of lactobacillus species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. In: J. Food Sci. 72, 2007, M310-315.
5. DEMÁNKOVÁ D, KMEŤ V.: Výskyt génu rezistencie *tet(M)* na tetracyklín u laktobacilov. In: Biologická bezpečnosť a agropotravinárstvo 2008, 3-5, Ed. D.Tóth, J. Brindza. SPU Nitra, ISBN 978-80-552-0078-1
6. FEEDAP Panel. Opinion of the Scientific Panel on additives and products or substances used in animal feed on the updating of the criteria used in the assessment of bacteria for resistance to anti-biotics of human or veterinary importance. In: EFSA J. 223, 2005, 1 – 12
7. GOLDSTEIN E.J, CITRON D.M, VRENI MERRIAM C, WARREN Y, TYRRELL K.L. Comparative In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against 1,001 anaerobes isolated from human intra-abdominal infections. In: Antimicrob .Agents Chemother. 44, 2000, 2389-2394.
8. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 2012;10(6):2740. [10 pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2740. Available online: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)

10. HUYS G, D'HAENE K, CNOCKAERT M, TOSI L, DANIELSEN M, FLÓREZ AB, MÄTTÖ J, AXELSSON L, KORHONEN J, MAYRHOFER S, EGERVÄRN M, GIACOMINI M, VANDAMME P.: Intra- and interlaboratory performances of two commercial antimicrobial susceptibility testing methods for bifidobacteria and nonenterococcal lactic acid bacteria. In: Antimicrob. Agents Chemother. 54, 2010, 2567-2574
11. ISO 10932/IDF 233 standard “ Milk and milk products — determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria ” 2010, 1 – 31
12. KLARE I. , KONSTABEL C., WERNER G., HUYS G., VANKERCKHOVEN V. , KAHLMETER G., HILDEBRANDT B., MULLER-BERTLING S., WITTE W., GOOSSENS H.: Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. In: J. Antimicrob. Chemother. 59, 2007, 900–912
13. KMEŤ V., PIATNICOVÁ E.: Antibiotic resistance in commensal intestinal microflora. In : Folia Microbiol. (Praha) 55, 2010, 332-335
14. KUSHIRO A, CHERVAUX C, COOLS-PORTIER S, PERONY A, LEGRAIN-RASPAUD S, OBIS D, ONOUE M, VAN DE MOER A. Antimicrobial susceptibility testing of lactic acid bacteria and bifidobacteria by broth microdilution method and Etest. In: Int. J. Food Microbiol. 132, 2009, 54-88
15. LIN C.F, FUNG Z.F, WU C.L, CHUNG T.C. Molecular characterization of a plasmid-borne (pTC82) chloramphenicol resistance determinant (cat-TC) from *Lactobacillus reuteri* G4. In: Plasmid. 36, 1996, 116-124.
16. MAYRHOFER S, VAN HOEK A.H, MAIR C, HUYS G, AARTS H.J, KNEIFEL W, DOMIG K.J. Antibiotic susceptibility of members of the *Lactobacillus acidophilus* group using broth microdilution and molecular identification of their resistance determinants. In: In J. Food Microbiol. 144, 2010, 81-87.
17. NG L.K., MARTIN .I, ALFA M., MULVEY M. : Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. In: Mol. Cell Probes 15, 2001, 209-215.
18. ROSANDER A., CONNOLLY E., ROOS S.: Removal of antibiotic resistance gene-carrying plasmids from *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 and characterization of the resulting daughter strain, *L. reuteri* DSM 17938. In: Appl. Environ. Microbiol. 74, 2008, 6032-6040.
19. SALMINEN M.K, RAUTELIN H, TYNKKYNNEN S, POUSSA T, SAXELIN M, VALTONEN V, JÄRVINEN A. *Lactobacillus* bacteremia, species identification, and antimicrobial susceptibility of 85 blood isolates. In: Clin. Infect. Dis. 42, 2006, e35-44.
20. VAKULENKO S.B. , DONABEDIAN S.M., VORKRESENSKIY A.M., ZERVOS M.J. , LERNER S.A, CHOW J.W.: Multiplex PCR for detection of aminoglycoside resistance genes in enterococci. In: Antimicrob. Agents Chemother. 47, 2003, 1423–1426.
21. VANICHANAN J, CHÁVEZ V, WANGER A, DE GOLOVINE A.M, VIGIL KJ. Carbapenem-resistant *Lactobacillus* intra-abdominal infection in a renal transplant recipient with a history of probiotic consumption. In: Infection, 2016, 1-4, DOI 10.1007/s15010-016-0903-1,

## **Mikroflóra tenkého čreva potkanov - model na testovanie obezity**

**Zuzana Šefčíková, Dobroslava Bujňáková, Vladimír Kmet'**

*Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice*

Adresa pre korešpondenciu: sefcikz@saske.sk

### **Súhrn**

Výskyt obezity na celom svete v posledných desaťročiach výrazne stúpol. Súčasné stratégie podieľajúce sa na prevencii a liečbe obezity sú minimálne efektívne, preto neustále narastá záujem o nové terapeutické postupy. Zároveň rastie aj počet informácií o tom, že ďalším environmentálnym faktorom podieľajúcim sa na vzniku obezity sú okrem zvýšeného príjmu energetickejšie potraviny a sedavého spôsobu života aj mikroorganizmy tráviaceho traktu. Z dostupných údajov je zrejmé, že črevná mikroflóra je zapojená do kontroly energetickej rovnováhy a telesnej hmotnosti a teda zohráva dôležitú úlohu v patofyziológii obezity. Ideálnou stratégiou v liečbe obezity môže byť v budúcnosti manipulácia so zložením črevnej mikroflóry. Sledovanie dvoch dominantných mikrobiálnych kmeňov Firmicutes (*Lactobacillus/ Enterococcus*) a Bacteroidetes (*Bacteroides/Prevotella*) v tenkom čreve laboratórnych potkanov podrobených nutričnému zásahu v rozdielnych etapách života môže prispieť k objasneniu úlohy mikroorganizmov pri vzniku a rozvoji obezity.

### **Úvod**

Obezita je stav charakterizovaný nadmerným hromadením tuku v organizme. Vzniká následkom zvýšeného príjmu energetickejšie potraviny v kombinácii so zníženou telesnou aktivitou. Dochádza tak k pozitívnej energetickej bilancii, t.j. stavu, kedy príjem energie dlhodobo prevyšuje výdaj. Postihuje tak deti ako aj dospelých. Obezita je príčinou mnohých závažných ochorení ako je diabetes mellitus typ II, kardiovaskulárne a nádorové ochorenia [23]. Aktuálne stratégie podieľajúce sa na znižovaní vysokej prevalencie obezity sú minimálne účinné, jej výskyt neustále stúpa a stáva sa celosvetovou epidémiou, až pandémiou.

Počas pôrodu dieťaťa mikroorganizmy matky a prostredia začínajú kolonizovať gastrointestinálny trakt novorodenca. V priebehu prvých dvoch rokov života je zloženie mikrobiálnej flóry nestabilné a menej rôznorodé ako v dospelosti. Zloženie črevnej mikroflóry je jedinečné pre každého človeka, vysoko variabilné medzi jednotlivcami, pozostávajúce v 90% z 2 kmeňov baktérií, Bacteroidetes a Firmicutes [6]. Zloženie môže ďalej ovplyvniť mnoho vonkajších faktorov, predovšetkým strava, hygienické podmienky, alebo používanie antibiotík [10].

Práce publikované v poslednom desaťročí poukázali na to, že črevná mikroflóra je spoluzodpovedná za nárast telesnej hmotnosti, zvýšené ukládanie tukových zásob a vznik obezity. Túto hypotézu predložili prvýkrát v roku 2004 Bäckhed a kol. [2], ktorí zistili, že bežné myši majú približne o 40% telového tuku viac ako myši bez vlastnej mikroflóry (germ free), napriek výrazne nižšiemu kalorickému príjmu. V ďalšom experimente transplantovali mikroorganizmy distálnej časti tráviaceho traktu bežných myši v procese nazývanom konvencionalizácia gnotobiotickým myšiam, čo malo za následok dramatický až 60% nárast telového tuku za 2 týždne, napriek zníženému príjmu krmiva o 29% a zvýšenej aktivite o 27% v porovnaní s germ free zvieratami.

Nárast tukového tkaniva bol ešte výraznejší, ak bola prenesená črevná mikroflóra geneticky obéznych (ob/ob) myší [22]. Ley a kol. [17] potvrdili kvantitatívne rozdiely medzi dvoma hlavnými bakteriálnymi kmeňmi (Firmicutes a Bacteroidetes) u obéznych a chudých myší, s vyšším pomerom medzi Firmicutes a Bacteroidetes v slepom čreve obéznych myší. Mozeš a kol. [20] zistili súvislosť medzi zmenami v črevnej mikroflóre a nastavením budúcich stravovacích návykov a využívaním energie. U laboratórnych potkanov vplyvom prekrmovania v ranom postnatálnom období zaznamenali okrem rýchlejšieho rastu a výraznejšieho ukladania telového tuku aj vyšší počet *Enterococcus* a *Lactobacillus* a nižší počet *Bacteroides* v tenkom čreve prekrmených mláďat. Nadobudnuté rozdiely pretrvávali a ani príjem krmiva s nízkym obsahom tuku nevedol k zmierneniu prejavov nadobudnutého obézneho stavu.

Podobné zmeny v zložení črevnej mikroflóry ako u obéznych myší (zvýšený počet Firmicutes, pokles Bacteroidetes) zaznamenal Ley a kol. [18] aj u 12 obéznych pacientov v porovnaní s neobéznymi. Zníženie počtu Bacteroidetes a zároveň zvýšenie počtu *Lactobacillus* patriaceho ku kmeňu Firmicutes u obéznych pacientov potvrdil aj Armougom a kol. [1]. Následkom transplantácie mikroorganizmov z feces dospelých obéznych a neobéznych dvojčiat germ free myšiam došlo k zvýšenému ukladaniu telového tuku u myší s črevnou mikroflórou obéznych dvojčiat, v porovnaní s myšami s mikroflórou neobéznych dvojčiat [21]. Naproti tomu Duncan a kol. [7] nezaznamenali rozdiely v počte Bacteroidetes vo vzorkách stolice medzi obéznymi a neobéznymi jedincami.

Doteraz neexistuje zhoda v literárnych údajoch ohľadne zloženia črevnej mikroflóry u obéznych a neobéznych jedincov, čo súvisí pravdepodobne s variabilitou použitých metód použitých na analýzu črevnej mikroflóry.

Keďže presný mechanizmus, prostredníctvom ktorého črevná mikroflóra prispieva k rozvoju obezity zostáva stále nejasný, v našich sledovaniach sme sa zamerali na objasnenie úlohy črevnej mikroflóry v kontrole energetickej rovnováhy a telesnej hmotnosti u obéznych a neobéznych potkanov.

### **Prehľad experimentov vykonaných na laboratórnych potkanoch kmeňa Sprague-Dawley**

*Zmeny črevnej mikroflóry potkanov prijímajúcich vysokotukové/vysokoenergetické krmivo pred a po odstavě (1.-40. deň)*

Za účelom získania obéznych mláďat, sme laktujúcim samiciam podávali od 1. dňa laktácie krmivo s vysokým obsahom tuku (30% tuku; 4,04 kcal/g). Počet mláďat v hniezde sme upravili na 10, čo predstavuje optimálny počet na 1 laktujúcu samicu. Analýzou vzoriek mlieka sme u týchto samíc zaznamenali zvýšenú koncentráciu tuku v mlieku. V porovnaní s matkami na kontrolnej diéte (9,5% tuku; 3,2 kcal/g), hodnoty tuku v mlieku prekrmovaných matiek boli  $17,7 \pm 0,8$  vs.  $15,0 \pm 0,2$  g/100ml ( $P < 0,05$ ). U mláďat konzumujúcich takéto vysokotukové mlieko sme zistili výrazne vyššie zásoby epididymálneho a perirenálneho tuku na 15. a 20. deň v porovnaní s kontrolami. Obézny stav u týchto zvierat pretrvával aj po odstavě (21. deň), v dôsledku podávania vysokotukovej/vysokoenergetickej diéty s 30% obsahom tuku. Vplyv takéhoto nutričného zásahu sa zreteľne prejavil aj na zložení mikroflóry v tenkom čreve. U obéznych mláďat sme na 40. deň zaznamenali v jejune vyšší počet *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a redukovaný počet *Bacteroides/Prevotella* (BAC) stanovených fluorescenčnou in situ hybridizačnou (FISH) metódou oproti kontrolám. Zvieratá na vysokotukovej diéte mali vyšší LAB/BAC index ako ich kontroly (Tabuľka č. 1).

## Pôvodné práce

Zloženie črevnej mikroflóry v jejune sme hodnotili metódou (FISH) za použitia sondy Lab 158 pre skupinu *Lactobacillus/Enterococcus* sp. Cy3—5'-GGT ATT AGC A(C/T)C TGT TTC CA-3' [13] a Bac303 pre skupinu *Bacteroides/Prevotella* FITC—5'-CCA ATG TGG GGG ACC TT-3' [19].

**Tabuľka 1. Somatické a mikrobiálne parametre potkanov prijímajúcich kontrolnú alebo vysokotukovú (HF) diétu od 1. do 40. dňa**

	15. deň		20. deň		40. deň	
	Kontrola	HF	Kontrola	HF	Kontrola	HF
Telesná hmotnosť (g)	32.3±1.0	34.2±0.5	41.1±0.5	42.3±0.4	156.5±5.4	128.6±3.9**
Prírastky (g)	25.7±0.9	27.4±0.4	34.5±0.5	35.4±0.4	149.4±5.4	122.0±4.0***
Epididymálny tuk (% b. w.)	0.07±0.01	0.14±0.01	0.10±0.01	0.19±0.02*	0.31±0.02	0.48±0.03***
Perirenálny tuk (% b. w.)	0.15±0.01	0.32±0.02***	0.14±0.01	0.44±0.02***	0.17±0.03	0.43±0.05***
LAB jejunum	6.47±0.03	6.89±0.05**	7.08±0.04	7.26±0.03	8.66±0.08	9.93±0.09**
BAC jejunum	5.38±0.07	5.3±0.06	6.46±0.01	6.13±0.04**	6.77±0.06	5.61±0.08***
LAB/BAC index	1.2±0.02	1.3±0.02**	1.1±0.01	1.2±0.01*	1.3±0.02	1.8±0.03***

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ±SEM. Hodnoty *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a *Bacteroides/Prevotella* (BAC) sú dané ako log [no. of bacteria (0.1 g mucose)<sup>-1</sup>]. Signifikantné rozdiely oproti kontrolnej skupine \*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. Rozdiely medzi uvedenými skupinami boli hodnotené dvojcestnou ANOVOU (Tukeyho test).

### *Zmeny črevnej mikroflóry potkanov prijímajúcich vysokotukové/vysokoenergetické krmivo po odstave od 21.-40. dňa*

V ďalšom pokuse sme sa zamerali na zloženie črevnej mikroflóry u potkanov, ktorí prijímali vysokotukovú diétu len v období po odstave. Samcom sme podávali od odstavu okrem štandardného krmiva aj tekutú diétu s vysokým obsahom tuku (Sunar Heinz Product, 0.7 kcal/ml; 27% tuku). Na 40. deň sme u týchto potkanov zaznamenali o 27% viac telového tuku v porovnaní s kontrolnými zvieratami kŕmenými len štandardnou laboratórnou diétou s 9,5% obsahom tuku. Rozdielny energetický príjem okrem nadobudnutého obézneho statusu výrazne ovplyvnil aj mikroflóru v jejune sledovaných zvierat. U obéznych zvierat sme zaznamenali nárast *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a pokles *Bacteroides/Prevotella* (BAC) stanovených FISH metódou (Tabuľka č. 2).

**Tabuľka 2. Somatické a mikrobiálne parametre potkanov prijímajúcich kontrolnú alebo vysokotukovú (HF) diétu po odstave (od 21. do 40. dňa)**

---

	Kontrolné	HF
Telesná hmotnosť (g)	156.3±5.4	145.8±6.3
Tuk (%)	0.47±0.04	0.71±0.05**
LAB jejunum	8.31±0.14	10.63±0.14***
BAC jejunum	7.09±0.13	5.48±0.11***
LAB/BAC index	1.18±0.04	1.95±0.06***

---

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ±SEM. Hodnoty *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a *Bacteriodes/Prevotella* (BAC) sú dané ako log [no. of bacteria (0.1 g mucose)<sup>-1</sup>]. Signifikantné rozdiely oproti kontrolnej skupine: \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001.

### *Zmeny črevnej mikroflóry potkanov pochádzajúcich z hniezd s rozdielnym počtom mláďat*

Ďalším možným spôsobom ako získať obézne mláďatá je úprava veľkosti hniezda. Z toho dôvodu sme prvý deň po narodení upravili matkám počet mláďat na 3-4 ks (malé hniezdo, N4) vďaka čomu došlo k prekrmeniu už v ranom období. Ako kontrola slúžilo stredné hniezdo (N10) s 10 mláďatami. Takto upravené hniezda sú zaužívaným celosvetovým modelom vo výskume obezity laboratórných zvierat.

Analýzou vzoriek mlieka, ktoré sme odobrali potkaním matkám na 11. deň laktácie, sme zistili vyšší obsah mliečného tuku u matiek so 4 mláďatami v porovnaní s mliekom kontrolných matiek s 10 mláďatami (21,0±0,7 vs. 16,4±0,8 g/100ml). Príjem mlieka so zvýšeným obsahom tuku viedol okrem vyššej telesnej hmotnosti a prírastkov hmotnosti u mláďat z malého hniezda na 15., 20. a 40. deň aj k signifikantne vyšším hodnotám telového tuku o 67%, 39% a 48% v sledované dni, v porovnaní s hodnotami mláďat zo stredného hniezda (Tabuľka č. 3). Vplyv prekrmovania následkom zvýšeného obsahu tuku v mlieku sa prejavil aj vo vývojovej rozmanitosti črevnej mikroflóry. V jejune obéznych samcov z malého hniezda bol zaznamenaný vyšší počet *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB). Toto zvýšenie pretrvávalo aj po odstave, kedy už zvieratá prijímali krmivo s obvyklým zložením. Navyiac po odstave došlo aj k významnému zníženiu *Bacteriodes/Prevotella* (BAC) v jejune obéznych zvierat (Tabuľka č. 3).

**Tabuľka 3. Somatické a mikrobiálne parametre potkanov pochádzajúcich zo stredného (N10) a malého hniezda (N4)**

	15. deň		20. deň		40. deň	
	N 10	N 4	N 10	N 4	N 10	N 4
Telesná hmotnosť (g)	26.6±0.3	38.0±0.5**	47.5±1.5	57.8±0.9*	147.7±5.4	191.3±3.7***
Prírastky (g)	19.6±0.2	31.2±0.3*	41.0±1.5	51.4±0.8*	140.9±5.3	184.6±3.7***
Epididymálny tuk (% b. w.)	0.07±0.01	0.08±0.02	0.15±0.02	0.22±0.02*	0.32±0.04	0.45±0.03***
Perirenálny tuk (% b. w.)	0.08±0.01	0.24±0.02***	0.24±0.02	0.32±0.02*	0.18±0.03	0.30±0.03**
LAB jejunum	6.47±0.03	6.89±0.05***	5.57±0.05	6.62±0.05***	7.39±0.02	8.09±0.08***
BAC jejunum	5.38±0.06	5.32±0.05	5.88±0.06	6.01±0.03	8.00±0.0	6.91±0.18***

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ±SEM. Hodnoty *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a *Bacteroides/Prevotella* (BAC) sú dané ako log [no. of bacteria (0.1 g mucose)<sup>-1</sup>]. Signifikantné rozdiely oproti kontrolnej skupine (N10): \*P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. Rozdiely medzi uvedenými skupinami boli hodnotené dvojcestnou ANOVOU (Duncenov test).

*Následky antibiotickej intervencie na vývoj črevnej mikroflóry obeznych potkanov*

Na základe dosiahnutých výsledkov v predchádzajúcich experimentoch, sme sa zamerali aj na sledovanie vývoja obezity laboratórných potkanov s redukovanou mikroflórou v jejune. Tento stav sme docielili podávaním antibiotika pred a po odstave. Mláďatám, ktoré pochádzali z malého a stredného hniezda, a teda prijímali mlieko s rozdielnym obsahom tuku, sme podávali Amoxygal plv. sol. (amoxicillinum trihydricum; Pharmagal, Nitra, SR): a) do 15. dňa laktácie (antibiotikum sme podávali 2 krát denne v pitnej vode matkám; 30 mg/kg, koncentrácia 0,2 g/l); b) Amoxygal sme podávali mláďatám v pitnej vode od 21. do 40. dňa života. Po antibiotickom ošetrení sme v tenkom čreve týchto zvierat zaznamenali výrazný pokles sledovaných bakteriálnych skupín *Lactobacillus/Enterococcus* a *Bacteroides/Prevotella* (Tabuľka č. 4, 5). Napriek zníženému počtu LAB a BAC nedošlo k významným zmenám v ukladaní telového tuku u prekrmených potkanov z malého hniezda. Zvýšené vytváranie tukových zásob pretrvávalo u nich aj po odstave, t.j. po prechode na príjem štandardnej diéty a nebolo ovplyvnené výraznou kvantitatívnou zmenou LAB a BAC.



## Pôvodné práce

**Tabuľka 4. Somatické a mikrobiálne parametre 40 dňových N10 (stredné hniezdo) a N4 (malé hniezdo) potkanov vystavených antibiotickému ošetrovaniu pred odstavom**

	Kontrolné N10	Antibiotické N10	Kontrolné N4	Antibiotické N4
Telesná hmotnosť (g)	155.4±5.9	163.3±6.3	185.3±4.8 <sub>c</sub>	188.0±5.4 <sup>b</sup>
Prírastky (g)	148.4±5.9	156.8±6.1	178.7±4.8 <sub>c</sub>	181.3±5.3 <sup>b</sup>
Tuk (%)	0.50±0.05	0.54±0.04	0.78±0.06 <sub>c</sub>	0.78±0.04 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> jejunum	7.40±0.02	6.43±0.16***	8.19±0.09 <sub>d</sub>	6.93±0.04** <sup>d</sup>
<i>Bacteroides/Prevotella</i> jejunum	8.06±0.05	6.16±0.11***	7.15±0.06 <sub>d</sub>	6.71±0.12* <sup>d</sup>

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM. Hodnoty *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a *Bacteroides/Prevotella* (BAC) sú dané ako log [no. of bacteria (0.1 g mucose)<sup>-1</sup>]. Signifikantné rozdiely oproti kontrolnej skupine \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. Signifikantné rozdiely medzi skupinami N10 a N4 <sup>b</sup> P<0.01, <sup>c</sup> P<0.001, <sup>d</sup> P<0.0001. Rozdiely medzi uvedenými skupinami boli hodnotené dvojcestnou ANOVOU (Tukeyho test).

**Tabuľka 5. Somatické a mikrobiálne parametre 40 dňových N10 (stredné hniezdo) a N4 (malé hniezdo) potkanov vystavených antibiotickému ošetrovaniu po odstave**

	Kontrolné N10	Antibiotické N10	Kontrolné N4	Antibiotické N4
Telesná hmotnosť (g)	153.9±5.8	160.9±7.4	178.4±3.2 <sup>c</sup>	183.6±3.1 <sup>d</sup>
Prírastky (g)	146.9±5.7	153.9±7.3	171.9±3.1 <sup>b</sup>	177.1±3.1 <sup>b</sup>
Tuk (% b. w.)	0.42±0.05	0.53±0.04	0.79±0.06 <sup>c</sup>	0.72±0.05 <sup>c</sup>
<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> jejunum	7.42±0.01	6.49±0.14***	8.38±0.07 <sup>d</sup>	6.84±0.03*** <sub>b</sub>
<i>Bacteroides/Prevotella</i> jejunum	8.03±0.09	6.61±0.17***	7.43±0.07 <sup>c</sup>	6.80±0.11**

Hodnoty sú vyjadrené ako priemer ± SEM. Hodnoty *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a *Bacteroides/Prevotella* (BAC) sú dané ako log [no. of bacteria (0.1 g mucose)<sup>-1</sup>].

Signifikantné rozdiely oproti kontrolnej skupine \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Signifikantné rozdiely medzi skupinami N10 a N4 <sup>b</sup>  $P < 0.01$ , <sup>c</sup>  $P < 0.001$ , <sup>d</sup>  $P < 0.0001$ . Rozdiely medzi uvedenými skupinami boli hodnotené dvojcestnou ANOVOU (Tukeyho test).

### Diskusia

Podávanie vysokotukového/vysokoenergetického krmiva laboratórnym potkanom v odlišných obdobiach života viedlo k zmenám v počte dvoch dominantných bakteriálnych skupín *Lactobacillus/Enterococcus* (LAB) a *Bacteroides/Prevotella* (BAC) v jejune. Metódou FISH bol v našich experimentoch zaznamenaný znížený počet BAC a naopak zvýšenie LAB. U prekrmovaných zvierat boli tieto mikrobiálne zmeny spojené s významným nárastom objemu epididymálneho a perirenálneho tuku.

Vo všeobecnosti sú mikroorganizmy črevného traktu považované za významný faktor ovplyvňujúci energetickú rovnováhu. Viaceré práce poukázali na úzky vzťah medzi črevnými mikroorganizmami, využívaním živín a ukladaním energie hostiteľským organizmom. Táto hostiteľsko-bakteriálna vzájomnosť je tiež spojená s rozdielmi v získavaní energie z diéty, čo sa môže prejaviť v odlišnej telesnej hmotnosti a množstve tukových zásob u obéznych a neobéznych jedincov. V čreve obéznych myši [17], prasiat [11] a ľudí [22] bolo zaznamenané proporcionálne zvýšenie Firmicutes a zníženie Bacteroidetes. Okrem toho bolo zistené, že črevná mikrobiálna podnecuje efektívnejšiu absorpciu monosacharidov z čreva a de novo lipogénu v pečeni [2; 4]. Tieto hostiteľsko-bakteriálne vzájomnosti pozitívne ovplyvňujú vývoj obezity u myši na vysokotukovej diéte [3; 5]. Prídavok pektínu do krmiva s vysokým obsahom tuku upravil potkanom množstvo Bacteroidetes a Firmicutes na úroveň kontrolných zvierat [14]. Naproti tomu Lecomte a kol. [16] zaznamenali vo feces potkanov na vysokotukovej diéte nárast Bacteroidetes a pokles Firmicutes. Tento pokles bol do značnej miery zapríčinený zníženým množstvom *Lactobacillus sp.*

Naše výsledky poskytli nový pohľad na otázky týkajúce sa účasti mikroorganizmov v mechanizme regulujúcom somaticko/metabolickú homeostázu u obéznych a chudých zvierat. Výsledky poukázali na vyšší počet LAB, nižší počet BAC, výrazný nárast telesnej hmotnosti a telového tuku u prekrmovaných potkanov v porovnaní s optimálne živými. Následkom mikrobiálnej manipulácie (podávanie Amoxicillinu) nebola u mláďat pochádzajúcich z rozdielneho vývojového a nutričného prostredia ovplyvnená funkcia tenkého čreva, nutričné chovanie ani somatický vývoj, napriek výraznému zníženiu týchto bakteriálnych skupín po antibiotickej intervencii. Zdá sa, že kľúčovým faktorom dlhodobého ovplyvňujúcim metabolický a somatický vývoj zvierat v našich experimentoch bolo rané prekrmovanie a nie mikrobiálna tráviaceho traktu.

Účasť črevných baktérií v rozvoji obezity v procesoch regulácie metabolizmu sa zdá byť viac plastická, než sa pôvodne predpokladalo. V súlade s tým bolo tiež dokumentované, že zloženie črevnej mikrobiálnej flóry samo o sebe nemá výslovný vplyv na udržiavanie energetickej rovnováhy. Po prvé, výsledky z experimentu, v ktorom obézne potkany prijímali krmivo s vysokým obsahom tukov s prídavkom bifidobaktérií ukázali, že u týchto potkanov nedošlo k zmene obézneho statusu [24]. Po druhé, experimentálne manipulácie, t.j. kvantitatívne zníženie a proporcionálne zmeny črevnej mikrobiálnej flóry po antibiotickej liečbe nevedli v našich experimentoch k zníženému ukladaniu telového tuku. A konečne bolo preukázané, že neprítomnosť črevnej mikrobiálnej flóry neposkytuje žiadnu všeobecnú ochranu pred diétou indukovanou obezitou, t.j. germ-free myši pri kŕmení diétou s vysokým obsahom tuku mali väčšiu telesnú hmotnosť a viac telového tuku než bežné myši [9].

## Pôvodné práce

Vzhľadom na neexistujúcu zhodu v literatúre, bude potrebné získať ďalšie informácie zamerané na lepšie pochopenie účasti mikroorganizmov v mechanizmoch podieľajúcich sa na kontrole príjmu potravy a regulácií telesnej hmotnosti a tukového tkaniva. Výber niektorých mikroorganizmov a ich vzťah k obezite je v Tabuľke 6 [12].

**Tabuľka 6 Výber niektorých mikroorganizmov a ich vzťah k obezite (*Harakeh a kol. 2016*)**

Firmicutes	Bohatý výskyt u obéznych jedincov. Je dominantou mikroflórou detí z Európy. Po bypasse žalúdka dochádza k poklesu Firmicutes.	Turnbaugh a kol., 2009; DiBaise a kol., 2012; Bested a kol., 2013
<i>Bacteroidetes</i> ( <i>Bacteroides</i> spp. a <i>Prevotella</i> )	Zníženie telesnej hmotnosti. Je dominantou mikroflórou detí z afrických dedín. Zvýšený výskyt u myší prijímajúcich diétu s vysokým podielom vlákniny.	De Filippo a kol., 2010; Kovatcheva-Datchary a Arora, 2013
<i>Prevotella</i> a <i>Bacteroides</i>	Pokles adipozity u pacientov, po bypasse žalúdka.	Yatsunenko a koll., 2012; Kovatcheva-Datchary a Arora, 2013
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Pozitívne súvisí s obezitou. U detí trpiacich Kwashiorkor ochorením bol pozorovaný prírastok hmotnosti po prijímaní terapeutickú potraviny obohatenej o túto baktériu.	Million a kol., 2013b
<i>Firmicutes/Bacteroidetes</i>	Vysoký pomer F/B u obéznych jedincov potkanov.	Santacruz a kol., 2010 Možeš a kol. 2008
<i>Lactobacillus curvatus</i> HY7601a <i>Lactobacillus plantarum</i> KY1032	Zníženie telesnej hmotnosti u obéznych myší.	Park a kol., 2013
<i>Lactobacillus casei</i> CRL431	Zníženie telesnej hmotnosti u obéznych myší.	Nunez et al., 2014

Pokiaľ ide o zložitosti mikrobiálneho ekosystému, existujú dôkazy o význame iných intestinálnych bakteriálnych skupín, ktoré môžu napovedať o vývoji rozdielneho metabolického fenotypu. Bolo potvrdené, že nutričné zmeny v ranom období môžu ovplyvniť vývoj a zloženie črevných mikroorganizmov. U detí prijímajúcich materské mlieko je bakteriálna kolonizácia krátko po narodení spojená s vývojom flóry bohatej na *Bifidobacterium* spp., kým počet *Bacteroides* spp. vykazuje obmedzený rast. Naopak, u detí na umelej mliečnej výžive (zvýšený energetický príjem) bola zaznamenaná opačná tendencia, t.j. limitovaný rast bifidobaktérii a zvýšený počet *Bacteroides*. Tieto zmeny je možné považovať za pôvodcu budúcej nadváhy [8; 15].

### Záver a budúce výzvy

Keďže väčšina doterajších dôkazov o prípadnom vzťahu medzi črevnou mikroflórou a vývojom obezity pochádza zo štúdií na zvieratách, bude nevyhnutné uskutočniť ďalšie sledovania predovšetkým u ľudí. Súčasné humánne práce zaoberajúce sa štúdiom črevnej mikroflóry sú založené na analýzach vzoriek stolice, ktorá neodráža zloženie mikroflóry tenkého čreva a dokonca ani čreva hrubého.

1. Vzhľadom na neexistujúcu zhodu v literatúre, bude dôležité v budúcnosti zamerať sa na získanie čo najväčšieho množstva nových poznatkov určujúcich skutočný význam mikroflóry vo vývoji obezity. Z doterajších sledovaní je zrejmé, že niektoré mikroorganizmy tráviaceho traktu dokážu ovplyvniť energetickú bilanciu vďaka efektívnejšiemu získavaniu energie z diéty a následnou tvorbou tukových zásob.

2. Bude potrebné vykonať ciele štúdie na určenie takých bakteriálnych kmeňov, ktoré pozitívne ovplyvňujú metabolické zdravie, t.j. podieľajú sa na prevencii resp. liečbe rôznych metabolických ochorení vrátane obezity.

3. Po preukázaní súvislosti medzi črevnou mikroflórou a zdravotným stavom hostiteľa, využiť potenciál prebiotík, probiotík, alebo ich kombináciu na úpravu črevnej mikroflóry tak, aby sa dosiahli konkrétne zdravotné výhody.

4. Hoci zvieracie modely poskytujú zaujímavý náhľad, vo vzťahu k ľuďom nemožno zatiaľ vyvodzovať žiadne priame závery. Preto pri liečbe obezity a s obezitou súvisiacich ochorení zatiaľ prvoradou zostáva zmena životného štýlu, ktorá zahŕňa vhodne zvolenú stravu doplnenú zvýšenou fyzickou aktivitou.

### Podakovanie

*Práca bola podporená grantom VEGA 2/0011/14 SAV.*

### Literatúra

1. ARMOUGOM F., HENRY M., VIALETTES B., et al.: Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and *Methanogens* in anorexic patients. In: PLoS One 4, 2009, e7125.
2. BÄCKHED F., DING H., WANG T., et al.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. In: Proc Natl Acad Sci USA, 101, 2004, 15718–15723.
3. BÄCKHED F., MANCHESTER J.K., SEMENKOVICH C.F., GORDON J.I.: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. In: Proc Natl Acad Sci U S A 104, 2007, 979-984.
4. CANI P.D., NEYRINCK A.M., FAVA F., et al.: Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. In: Diabetologia 50, 2007 a, 2374-2383.
5. CANI P.D., AMAR J., IGLESIAS M.A., et al.: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. In: Diabetes 56, 2007 b, 1761-1772.
6. DIBASE, J.K., ZHANG, H., CROWELL, M.D., et al.: Gut microbiota and its possible relationship with obesity. In: Mayo Clin Proc 83, 2008, 460-469.
7. DUNCAN S.H., LOBLEY G.E., HOLTROP G., et al.: Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. In: Int J Obes 32, 2008, 1720-1724.
8. FANARO S., CHERICI R., GUERRINI P., VIGI V.: Intestinal microflora in early infancy: composition and development. In: Acta Paediatr Suppl. 91, 2003, 48-55.

9. FLEISSNER C.K., HUEBEL N., ABD EL-BARY M.M., et al.: Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity. In: *Br J Nutr* 104, 2010, 919-929.
10. FRAZIER T.H., DIBIASE J.K., MCCLAIN C.J.: Gut Microbiota, intestinal permeability, obesity-induced inflammation, and liver injury. In: *J Parenter Enteral Nutr* 35, 2011, 14S- 20S.
11. GUO X., XIA X., TANG R., et al.: Development of a real-time PCR method for Firmicutes and Bacteroidetes in faeces and its application to quantify intestinal population of obese and lean pigs. In: *Lett Appl Microbiol* 47, 2008, 367-373.
12. HARAKEH MS, KHAN I, KUMOSANI T.: Gut Microbiota: A Contributing factor to obesity. In *Front Cell Infect Microbiol*. doi: 10.3389/fcimb.2016.00095.
13. HARMSSEN H.J.M., ELFFERICH P., SCHUT F., WELLING G.W.: A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent in situ hybridization. In: *Microb Ecol Health Dis* 11, 1999, 3-12.
14. JIANG T., GAO X., WU C., et al.: Apple-derived pectin modulates gut microbiota, improves gut barrier function, and attenuates metabolic endotoxemia in rats with diet-induced obesity. In: *Nutrients* 8, 2016, 126 doi: 10.3390/nu8030126.
15. KALLIOMÄKI M., COLLADO M.C., SALMINEN S., ISOLAURI E.: Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. In: *Am J Clin Nutr* 87, 2008, 534-538.
16. LECOMTE V., KAAKOUSH N.O., MALONEY C.A., et al.: Changes in gut microbiota in rats fed a high fat diet correlate with obesity-associated metabolic parameters. In: *PLoS One* 10, 2015, e0126931.
17. LEY R.E., BÄCKHED F., TURNBAUGH P. I., et al.: Obesity alters gut microbial ecology. In: *Proc. Natl Acad. Sci USA* 102, 2005, 11070–11075.
18. LEY R.E., TURNBAUGH P.J., KLEIN S., GORDON J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. In: *Nature* 444, 2006, 1022–1023.
19. MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., et al.: Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga–flavobacter–bacteroides in the natural environment. In: *Microbiology*, 142, 1996, 1097–1106.
20. MOZEŠ Š., BUJŇÁKOVÁ D., ŠEFČÍKOVÁ Z., KMEŤ V.: Intestinal microflora and obesity in rats. In: *Folia Microbiol (Praha)* 53, 2008, 225-228.
21. RIDAURA V.K., FAITH J.J., REY F.E., et al.: Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. In: *Science* 341, 2013, 1241214.
22. TURNBAUGH P.J., LEY R.E., MAHOWALD M.A., et al.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. In: *Nature* 444, 2006, 1027–1031.
23. WORLD HEALTH ORGANIZATION website. Obesity and overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>. Updated January 2015
24. YIN Y.N., YU Q.F., FU N., LIU X.W., LU F.G.: Effects of four Bifidobacteria on obesity in high-fat diet induced rats. In: *World J Gastroenterol* 16, 2010, 3394-3401.

## **Analýza klastrov *Salmonella typhimurium* pomocou PFGE elektroforézy a MALDI-TOF spektrofotometrie.**

**Martin Sojka<sup>1</sup>, Ľubica Majtánová<sup>1</sup>, Viktor Majtán<sup>1</sup>, Vladimír Kmet<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>NRC – Zbierka kultúr patogénnych mikroorganizmov, Ústav mikrobiológie, Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Limbová 14, 033 03 Bratislava

<sup>2</sup>Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4, 040 01 Košice

### **SÚHRN**

Cieľom práce bolo porovnať diskriminačnú schopnosť metód fágotypizácie, PFGE a MALDI-TOF pri subtypizácii a stanovení príbuznosti kmeňov salmonel. Pri hodnotení 24 izolátov sporadicky zachytených monofázických *S. typhimurium* sme pomocou PFGE zistili dva klastre relatívne príbuzných kmeňov. Kmene sme následne analyzovali metódou MALDI-TOF. 12 kmeňov klastra „a“ sa rozdelilo do dvoch diskretných skupín, čo by čiastočne zodpovedalo aj výsledkom PFGE. Naproti tomu šesť kmeňov klastra „b“ vykazovalo v MALDI-TOF vysokú podobnosť, čo nie celkom zodpovedalo výsledkom PFGE.

### **ÚVOD**

Monofázický variant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar typhimurium (monofázická *S. typhimurium*) s antigénnou štruktúrou 1,4,[5],12:i:- je považovaný za emergentného patogéna v mnohých Európskych krajinách a v súčasnosti predstavuje tretí najčastejší sérovar v Európe, vrátane Slovenskej republiky (SR). Klinické kmene monofázického variantu sa v SR prvý krát identifikovali v r. 2009, v ďalších rokoch sa ich počet výrazne zvyšoval a v súčasnosti predstavuje spolu 441 izolátov.

Mechanizmy pre vývoj kmeňov 1,4,[5],12:i:- ostávajú neznáme. V expresii druhej fázy bičíkového antigénu sú zahrnuté viaceré gény, vrátane génov *fljA*, *fljB* a *hin* umiestnené v operóne *fljBA*. Mutácie (delécie alebo inzercie) v géne *fljB*, ktorý kóduje druhú fázu bičíkového antigénu, spolu s narušením regulačných mechanizmov variácií fáz, by mohli byť príčinou zlyhania expresie druhej fázy bičíkového antigénu (Soyer a spol., 2009, Wasyl a Hoszowski, 2012).

Rýchla a špecifická identifikácia salmonel je integrálnou súčasťou vyšetřovania epidemiologickej situácie. Konvenčná metóda molekulárno-biologickej typizácie - PFGE (pulzná elektroforéza) je síce považovaná za zlatý štandard, avšak je pracná a trvá celý pracovný týždeň od doručenia vzorky po výslednú typizáciu bakteriálnych kmeňov. Typizácia salmonel pomocou MALDI-TOF biotypera trvá iba niekoľko minút po doručení čistej kultúry, pričom deteguje ribozomálne bielkoviny o hmotnosti od 2 do 20 kDa len na úrovni rodu. MALDI-TOF biotyper analyzuje jednotlivé kmene pomocou tzv. MSP (main spectrum) - hlavného spektra všetkých bielkovín alebo aj pomocou PCA (analýza hlavného komponentu), pri ktorej redukuje spektrum len na prvé tri bielkovinové komponenty. PCA sa používa hlavne v prípade ak MSP analýza ukazuje na totožnosť vyšetřovaných kmeňov t.j. program Maldi Biotyper 3.0 nedokáže zobrazit' „MSP“ strom zobrazujúci príbuznosť kmeňov. V svetovej literatúre sú dva názory na porovnanie PFGE a MALDI-TOF. Prvý názor zavrhuje MALDI-TOF ako nereprodukateľnú a nevhodnú metódu (Rim a kol. 2015), zatiaľ čo druhá skupina názorov MALDI-TOF odporúča (Egli a kol. 2015, Mutters a kol. 2015, Kmet' a kol. 2013).

Cieľom našej práce bolo porovnať diskriminačnú schopnosť viacerých metód subtypizácie a stanovenia príbuznosti kmeňov salmonel.

### MATERIÁL A METÓDY

Zo súboru klinických kmeňov monofázického variantu *S. Typhimurium* izolovaných v r. 2009-2012 sme vybrali 24 sporadických kmeňov, izolovaných od pacientov s gastroenteritídou, ktoré sme porovnávali použitím metódy fágovej typizácie, PFGE, a metódy hmotnostnej spektrometrie MALDI-TOF.

**Fágová typizácia** kmeňov bola vykonaná podľa typizačnej schémy Anderson et al. (1977) použitím štandardných fágov WHO Referenčného centra pre fágovú typizáciu Health Protection Agency, Colindale, Londýn.

**Citlivosť na antibiotiká:** Kmene boli testované na citlivosť voči 11 antibiotikám agarovým diskovým difúznym testom podľa EUCAST (2016). Použité disky antibiotík: ampicilín (A 20µg), ceftriaxon (CRO 30µg), chloramfenikol (C 30µg), ciprofloxacín (Cip 5µg), gentamicín (G 10µg), streptomycín (S 10µg), tetracyklín (T 30µg), trimetoprim (TMP 5µg), sulfizoxazol (Su 250µg), trimetoprim-sulfametoxazol (SxT 1.25/23.7µg), nalidixová kyselina (NA 30µg). *Escherichia coli* ATCC 25922 bol použitý ako referenčný kmeň.

**PFGE** - Izoláty boli subtypizované metódou elektroforézy celkovej DNA v pulznom poli po naštípení restriktívnou endonukleázou XbaI (Invitrogen, UK) podľa Laconcha et al. (2000) a Majtánovej et al. (2004). Získané profily boli analyzované s použitím softwaru Phoretix 1D Pro (TotalLab, UK) za uplatnenia Sørensen–Dice korelácie. V danom súbore boli identifikované hlavné klastre podobných/príbuzných kmeňov, ktoré boli ďalej analyzované.

**MALDI TOF** - Na sledovanie fylogenetickú príbuznosť medzi bakteriálnymi kmeňmi bola použitá klastrová analýza hlavných spektier proteínov MSP, pomocou MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik, GmbH, Bremen, Germany) na základe porovnania hlavných spektier proteínov jednotlivých kmeňov v programe BioTyper 3.0. Grafickým výstupom klastrovej analýzy bol dendrogram hlavného spektra „MSP“ ribozomálnych bielkovín (Lay, 2001).

### VÝSLEDKY A DISKUSIA

U vybraných kmeňov sme identifikovali ich fágotyp, citlivosť na antibiotiká. Výsledky sú uvedené v tabuľke 1. Fágovou typizáciou sa kmene diferencovali do 5 fágotypov (U302, DT193, DT208, U311 a DT18), 7 kmeňov bolo netypovateľných (NT) a jeden kmeň vykazoval atypické lytické reakcie (ALR). Uvedené fágotypy, hlavne DT193, U302, DT208 a U311 patria medzi dominantné u kmeňov monofázického variantu (Hopkins et al., 2010, Madajczak et al., 2014, Myšková et al., 2014). Okrem vplyvu kmeňov monofázického variantu na ľudské zdravie, je významná ich zvýšená rezistencia na antibiotiká. Epidemická multirezistentná klonálna línia 1,4,[5],12:i:-, označená ako európsky klon, je charakterizovaná rezistenciou na ampicilín, streptomycín, sulfonamidy a tetracyklín (R-typ ASSuT). Tento rezistotyp bol najčastejšie detegovaný aj v súbore 24 kmeňov (58.3%). R-typ ASSuT bol tiež najčastejší profil medzi monofázickými kmeňmi *S. typhimurium* izolovanými v Nemecku od ľudí, ošípaných a produktov z bravčového mäsa (Hauser et al., 2010), ako aj medzi kmeňmi izolovanými z ľudských a potravinových zdrojov v Anglicku, Francúzsku, Nemecku, Taliansku, Španielsku, Švajčiarsku a Holandsku (Gallati et al., 2013, Hopkins et al., 2010b). Šírenie tejto klonálnej línie je závažné z dôvodu, že bola zodpovedná za epidémiu v Luxembursku v r. 2006 (Mossong et al., 2007) a v Taliansku v r. 2010 (Barco et al., 2014), ktoré boli spojené dokonca s úmrtím.

Výsledky testovania jednotlivých kmeňov pomocou PFGE sú v obrázku č. 1. Celý súbor kmeňov vykazoval značné odlišnosti, strom príbuzností kmeňov potvrdzuje fakt, že kmene pochádzali zo sporadických prípadov salmonelóz. V celom súbore sme identifikovali dva klastre (a, b) kmeňov, ktoré však stále vykazovali aspoň nízky stupeň príbuznosti (obrázok 1, tabuľka 1).

Klastre „a“ a „b“ sme analyzovali ďalej pomocou MALDI-TOF, výsledky sú znázornené na obrázkoch č. 2 a 3. Na obrázku č. 2. vidíme, že 12 kmeňov klastra „a“ sa rozdelilo do dvoch skupín, pričom kmene vykazujú jemné rozdiely čo by čiastočne zodpovedalo aj výsledkom PFGE. Naproti tomu šesť kmeňov klastra „b“ (obr. 3) malo úroveň vzdialenosti iba do hodnoty 100, t.j. boli veľmi podobné, hoci podľa PFGE boli rozdielne. V plynulom desaťročí viacerí autori publikovali štúdie, z ktorých vyplynula použiteľnosť MALDI-TOF na subklasifikáciu kmeňov pre epidemiologické účely (napríklad Griffin and Price, 2012; Dieckmann et al., 2008). Mutters et al. (2015) v prípade vankomycín rezistentných enterokokov konštatovali, že MALDI-TOF poskytuje výsledky porovnateľné s PFGE. V našej štúdiiv prípade klastra „a“ boli výsledky MALDI-TOF zodpovedajúce PFGE, v prípade klastra „b“ výsledky subtypizácie pomocou MALDI-TOF porovnateľné s PFGE neboli.

## ZÁVER

Z dosiahnutých výsledkov tejto práce ako aj z literárnych údajov vyplýva, že porovnanie MALDI-TOF typizácie s PFGE závisí od jednotlivých prípadov resp. skupín analyzovaných kmeňov. Pravdepodobne preto sú v literatúre opísané pozitívne a aj negatívne výsledky korelácie oboch uvedených metód subtypizácie. Hoci metóda MALDI-TOF ukázala istú schopnosť diferencovať medzi kmeňmi konkrétneho sérotypu salmonel, výsledky získané v našej práci neboli úplne porovnateľné s PFGE. Metóda ostáva štandardnou a vo svete používanou metódou pre stanovenie príbuznosti kmeňov salmonel.



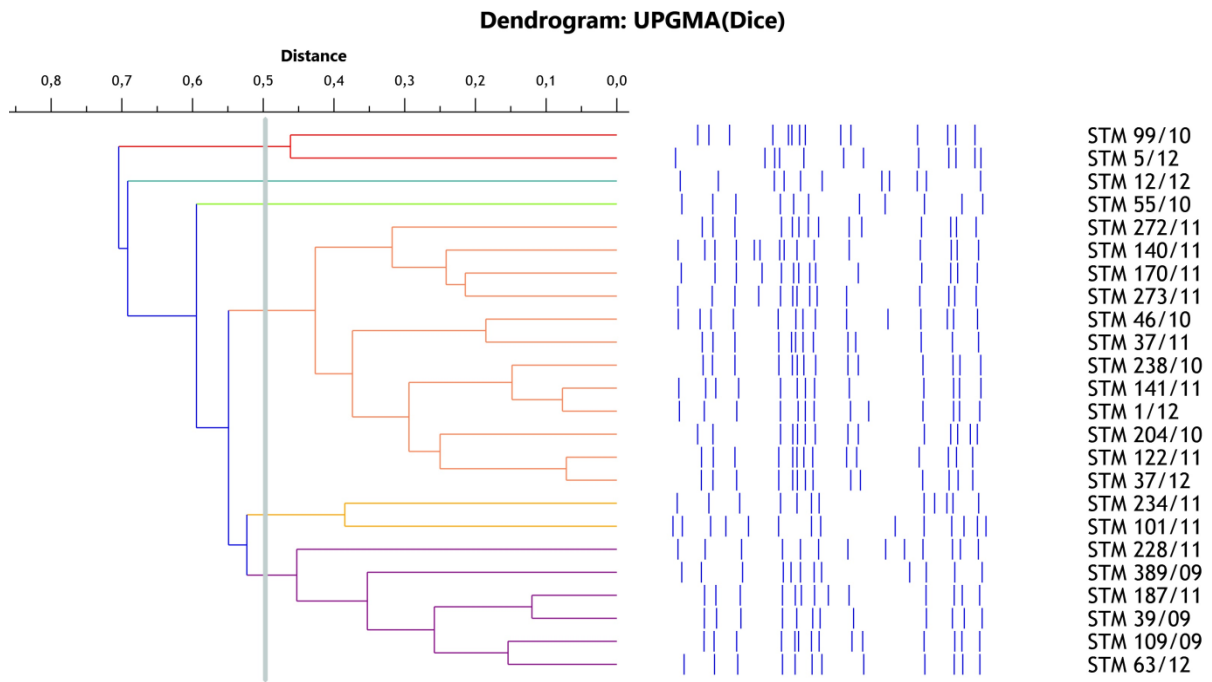
## Pôvodné práce

---

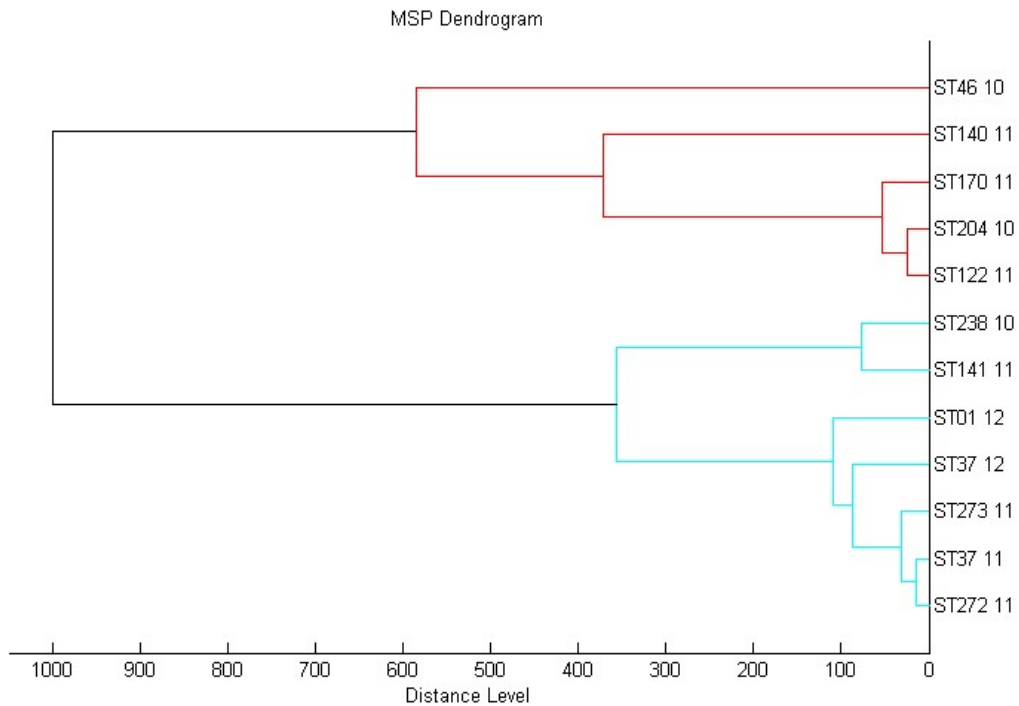
Tab. č. 1 Monofázický variant kmeňov *Salmonella typhimurium* (r. 2009-2012). Fágotypy, rezistotypy a zaradenie do klastrov podľa výsledkov PFGE.

Č.kmeňa	Fágotyp	Rezistotyp [c/r]	Klaster
39/09	U302	A,S,Su,T	b
109/09	DT193	A,S,Su,T	b
389/09	DT18	C,S,Su,SxT,T,TMP	b
46/10	U302	C,S,Su,SxT,T,TMP	a
55/10	DT193	A,S,Su,T	-
99/10	DT193	S	-
204/10	DT193	A,S,Su	a
238/10	U311	A,S,Su	a
37/11	NT	A,S,Su	a
101/11	DT193	A,S,Su,T	-
122/11	U311	A,S,Su,T	a
140/11	NT	Su	a
141/11	NT	A,S,Su,T	a
170/11	DT208	A,S,Su,T	a
187/11	DT208	S,Su,T	b
228/11	U302	A,S,Su,T	b
234/11	U302	A,C,S,Su,T,NA	-
272/11	NT	A,S,Su,T	a
273/11	U302	A,S,Su,T	a
1/12	NT	A,S,Su,T	a
5/12	NT	A,S,Su,T	-
12/12	NT	A,S,Su,T	-
37/12	ALR	A,S,Su,T	a
63/12	U302	S,Su,T	b

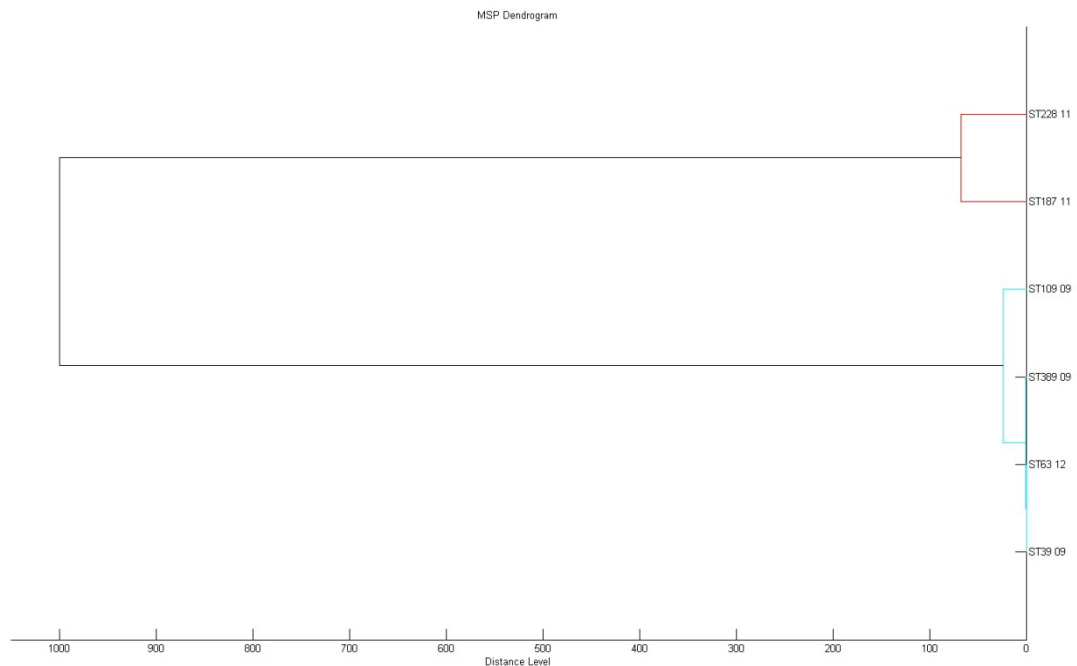
Obrázok č. 1 PFGE klastrová analýza izolátov monofázického variantu *S. enterica* sérovar Typhimurium



Obrázok č. 2 MSP analýza kmeňov klastra „a“



Obrázok č.3 MSP analýza kmeňov klastra „b“



### Pod'akovanie.

***Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Centrum excelentnosti environmentálneho zdravia“, ITMS č. 24240120033, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Práca bola podporená projektami APVV 0009–10, LPP-0045-09.***

### LITERATÚRA

1. ANDERSON A.S., WARD L.R., DE SAXE M.J., et al. (1977): Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. In: J. Hygiene, 78, 297-300
2. BARCO L., RAMON E., CORTINI E., LONGO A., DALLA POZZA M.C., LETTINI A.A. et al. (2014): Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],1:i:- DT193 ASSuT strains from two outbreaks in Italy. Foodborne Pathog Dis, 11, 138-144
3. DIECKMANN R., HELMUTH R., ERHARD M., MALORNY B. (2008): Rapid classification and identification of salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl Environ Microbiol 74: 7767-7778.
4. EGLI A., TSCHUDIN-SUTTER S., OBERLE M., GOLDENBERGER D., FREI R., WIDMER AF. (2015): Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *E. coli* - a novel tool for real-time outbreak investigation. In: PLoS ONE 10(4): e0120624, doi:10.1371/journal.pone.0120624
5. EUCAST (2016) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, ww.eucast.org). Accessed 28 april 2016

6. GALLATI C., STEPHAN R., HÄCHLER H., MALOMY B., SCHROETER A., NÜESCH-INDERBINEN M. (2013): Characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,[5],12:i:- clones isolated from human and other sources in Switzerland between 2007 and 2011. *Foodborne Pathog Dis*, 10, 549-554
7. GRIFFIN P.M., Price G.R., SCHOONEVELDT J.M. (2012): Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to identify vancomycin-resistant enterococci and investigate the epidemiology of an outbreak. *J Clin Microbiol* 50: 2918-2931.
8. HAUSER E., TIETZE E., HELMUTH R., JUNKER E., BLANK K., PRAGER R. et al. (2010): Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans. *Appl Environ Microb*, 76, 4601-4610
9. HOPKINS K.L., KIRCHNER M., GUERRA B., GRANIER S.A., LUCARELLI C., PORRERO M.C., JAKUBCZAK A., THRELFALL E.J., MEVIUS D.J. (2010): Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill*, 15, (22) pii=19580 Available online: <http://www.eurosurveillance.org/>
10. HOPKINS K.L., NAIR S., KIRCHNER M., GUERRA B., GRANIER S., LUCARELLI C., et al. (2010b): Genetic variation in emerging multidrug-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- from seven European countries, S1:1, p 13. *Abstr. 2nd Antimicrob. Resist. Zoonotic Bacteria Foodborne Pathog. Animals Hum. Environ. Meet. Am Soc Microbiol American Society for Microbiology, Washington, DC.*
11. KMET V, L. MAJTANOVA, V. MAJTAN. (2013): Typing human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates by pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. In: ECCMID Berlin, Abstract R2712
12. LACONCHA, I., BAGGESEN, L.D., REMENTERIA, A., GARAIJAR, J. (2000): Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. In: *Veterinary Microbiology*, 75, 155-165.
13. LAY, J. O. Jr. (2001) MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. In: *Mass Spectrom. Rev.*, 20, 172-94.
14. MADAJCZAK G., WOLKOWICZ T., DERA-TOMASZEWSKA B., WASIAK M., CHRÓST A., SZYCH J. (2014): Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* with antigenic formula 1,4,[5],12:i:- isolated in Poland in 2007-2012. *Med Dosw Mikrobiol*, 66, 65-78
15. MAJTÁNOVÁ Ľ., SZABÓOVÁ M., MAJTÁN V. (2004): Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Strains by Pulsed-field Gel Electrophoresis Isolated in the Slovak Republic. In: *Polish Journal of Microbiology* 53, 287-290.
16. MOSSONG J., MARQUES P., RAGIMBEAU C., HUBERTY-KRAU P., LOSCH S., MEYER G. et al. (2007): Outbreaks of monophasic *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Luxemburg, 2006. *Eurosurveillance*, 12, 719
17. MUTTERS N.T. , BURCKHARDT I. , HEEG K. (2015): MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Tool for Epidemiological Outbreak Analysis – Can it Work? In : *J Med Diagn Meth* 4, 1-4, <http://dx.doi.org/10.4172/2168-9784.1000.184>
18. MYŠKOVÁ P., OSLANECOVÁ L., DRAHOVSKÁ H., KARPÍŠKOVÁ R. (2014): Clonal distribution of monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,[5],12:i:- in the Czech Republic. *Foodborne Pathog Dis*, 11, 664-666

19. RIM J.H., LEE Y., HONG S.K., PARK Y., KIM M., D'SOUZA R., PARK E.S., YONG D., LEE K. (2015): Insufficient Discriminatory Power of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Dendrograms to Determine the Clonality of Multi-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates from an Intensive Care Unit. In: Biomed Res Int. Vol. 2015, 1-8, doi: 10.1155/2015/535027
20. SOYER Y., SWITT A.M., DAVIS M.A., MAURER J., MCDONOUGH P.L., SCHOONMAKER-BOPP D.J. et al.(2009): *Salmonella enterica* 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J Clin Microbiol 47, 3546-3556
21. WASYL D., HOSZOWSKI A. (2012): Occurrence and characterization of monophasic *Salmonella enterica* serovar typhimurium (1,4,[5],12:i-) of non-human origin in Poland. Foodborne Pathog Dis, 9, 1037-1043

## Immunomodulatory therapy of chronic uroinfections in colonised patients

Vašková S.<sup>1,2</sup>, Blažičková S.<sup>1,2</sup>, Slobodníková L.<sup>3</sup>, Botek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Laboratoria Piešťany, s. r. o., Piešťany*

<sup>2</sup> *Faculty of Health Science and Social Work, Trnavian University, Trnava*

<sup>3</sup> *Institute of microbiology, Faculty of medicine, Comenius University, Bratislava*

### Abstract

Microbial communities in biofilms decrease the susceptibility to the host immune system and to the antimicrobial agents. Aim of the study was to compare effect of antibiotic therapy alone and effect of adjuvant immunomodulatory therapy in 36 patients with chronic uroinfections caused by bacterial species that form biofilm *in vitro*. Clinical benefit after adjuvant immunomodulatory therapy was observed in 4 (57 %) from 7 patients; clinical benefit after antibiotic treatment alone was observed in 9 (31 %) from 29 patients. When evaluating inflammatory parameters any statistically significant changes were not find. The present study is a pilot study. Despite a low number of analysed patients adjuvant immunomodulatory therapy seems to have benefit for patients with chronic uroinfections.

**Key words:** *chronic uroinfections, biofilm, adjuvant immunomodulatory therapy.*

### Introduction

Identical bacterial species repeatedly isolated from urine of patients with chronic urinary tract infections (UTIs) are supposed to colonize distal segment of genitourinary tract and to form biofilm on mucous surface. Moreover, the microbial cells adhered to superficial urothelial cells are endocytosed. Microbes that are not immediately cycled out by exocytosis, replicate and form biofilm-like intracellular bacterial communities (IBC). The IBC are so expansive that they cause the apical cell membrane to bulge into the bladder lumen and it is considered a major source of recurrent UTIs (Bishop *et al.* 2007; Scott *et al.* 2015).

Biofilm is a natural structure composed of individual microbial cells attached to the surface and surrounded with extracellular matrix produced by the cells. Gellike structure of the matrix inhibit phagocyte migration, phagocytosis and penetration of antiinfectives through the matrix toward the microbial cells. The matrix environment allows accumulation of enzymes which modify and degrade chemical structure of antibiotics and inactivate them. To eradicate microbial cells growing in biofilm a manifold higher antibiotic concentration is needed (Kotulová et Slobodníková, 2010 and others). Combinations of antibiotic and adjuvant therapies of chronic biofilm infections are recommended (Tré-Hardy *et al.* 2010, Pushpalatha *et al.* 2012).

Perorally used immunomodulatory substances stimulate lymphatic Peyer's plates (GALT) and activated immunocompetent cells (T-cells and dendritic cells) to migrate lymphatic tissues associated with mucous tissue (MALT). The recognition of pathogens by pattern recognition receptors (PRRs) leads on one hand to the activation of inflammation mediated by the host innate defense, and on the other hand to the initiation of adaptive immunity (Timmermans *et al.* 2013).

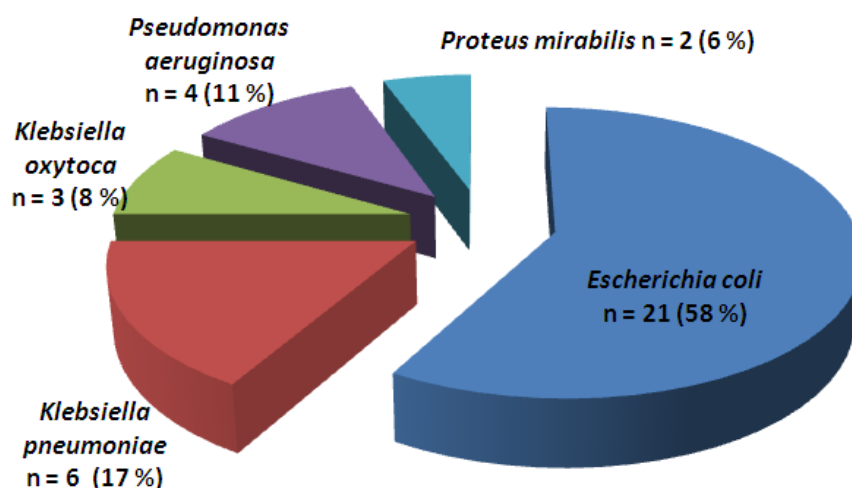
## Pôvodné práce

Adjuvant therapy of chronic biofilm infections stimulates macrophages, B-lymphocytes, natural killer cells, increases the synthesis of serum interferon, urinary secretory IgA and the number of activated T-lymphocytes (Rosenthal *et al.* 1986; Wybran *et al.* 1989) and allows penetration of polymorphonuclear leukocytes into the biofilm (Bjarnsholt *et al.* 2013).

Present study is focused on adjuvant immunomodulatory therapy of chronic UTIs in colonised patients that, to our knowledge, has not been study, yet.

### Material and methods

36 ambulatory patients with a history of recurrent UTIs with at least 3 documented episodes in the previous year, clinical signs of acute UTI persisting at least 2 days, bacterial count of  $\geq 10^4$ /ml in non-catheterized urine in men and  $\geq 10^5$ /ml in women, and  $\geq 10^2$ /ml in catheterized urine have been enrolled in the study. Identical laboratory parameters with identical bacterial species isolated from urine were observed during 2 – 4 years with a period from 2 to 20 months. There were 28 (78 %) women aged 22 - 94 years and 8 (22 %) men aged 36 – 83 years, the average  $65 \pm 2$  years. The main exclusion criteria were complicated or neurogenic urogenital disorders and renal or hepatic insufficiency. Isolated bacterial strains were identified using routine biochemical tests. Antibiotic susceptibility testing was assigned as minimal inhibition concentration (MIC). *In vitro* biofilm formation was tested by the standardized micromethod (Stepanovic *et al.* 2007). Each experiment was performed in triplicate. Strains were categorized to four biofilm-forming groups (strong-, moderate-, weak-biofilm formers and no-biofilm formers) according to standardized micromethod recommendation (Stepanovic *et al.* 2007). Patients were subdivided into two groups: group A - patients with antibiotic treatment in monotherapy (n = 29), group B - patients treated with antibiotics and concomitant adjuvant immunomodulatory therapy (n = 7). As immunomodulant was used 6 mg of lyophilized lysate of *Escherichia coli*. Inflammatory markers (blood leucocytes, neutrophiles and C-reactive protein) were analysed in patients using routine diagnostic methods.

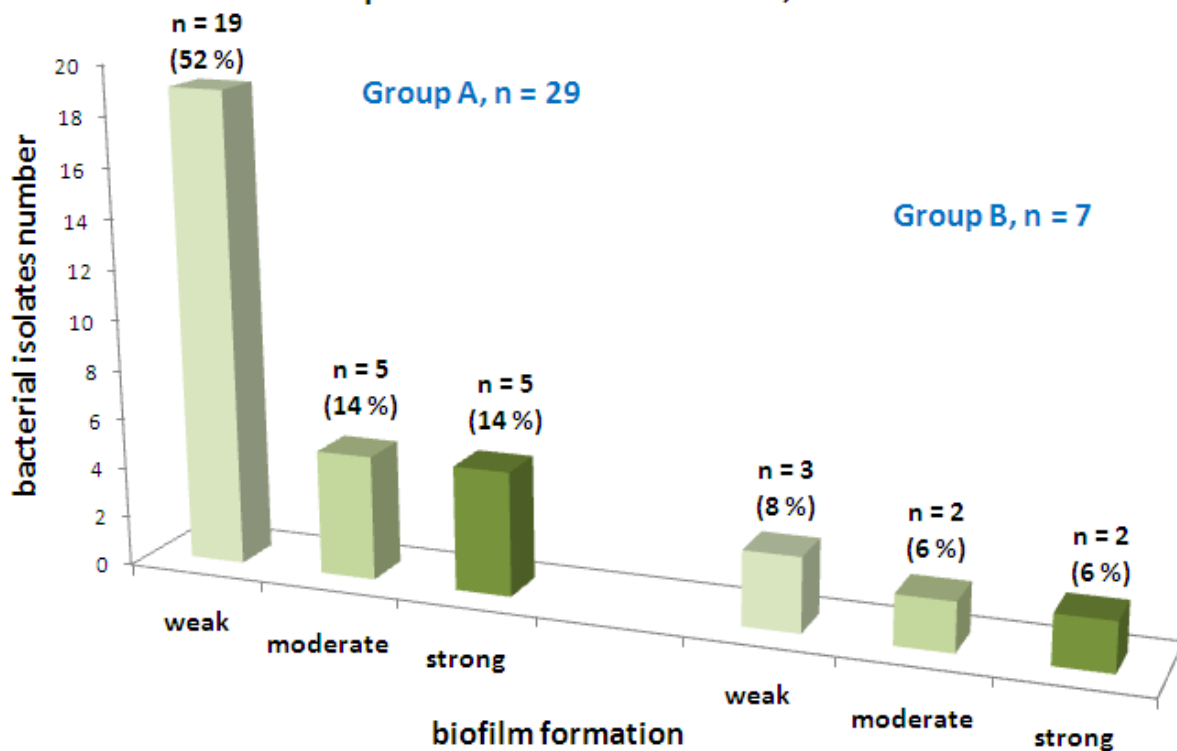


**Graph 1:** Identification of bacterial strains isolated from urine samples of patients with chronic UTIs, n = 36.

### Results

In all analysed patients chronic uroinfections were monobacterial. Frequences of identified bacterial strains are shown in the Graph 1.

All bacterial strains (n = 36) isolated from urine of patients with chronic UTIs enrolled in this study formed biofilm *in vitro* (100 %). As weak biofilm formers were classified 61 % isolates, followed by moderate biofilm formers (19 %) and strong biofilm formers (19 %) (Graph 2).



**Graph 2:** Biofilm formation by bacterial strains isolated from urine of patients with chronic UTIs, n = 36.

In the group A (antibiotic therapy alone, n = 29), clinical benefit after treatment was observed in 9 patients (31 %). Long-standing clinical benefit (15 months) was observed in 1 (3 %) patient, short-standing (6 months) in 7 (24 %) patients. No clinical benefit (relaps in 1 – 3 months) after antibiotic therapy was observed in 20 (69 %) patients. In the group B (antibiotic and immunomodulatory therapy, n = 7), clinical benefit after combined therapy was observed in 4 (57 %) patients. Long-standing clinical benefit was observed in 3 (43 %) patients, short-standing in 1 (14 %) patient. Without clinical benefit after adjuvant therapy were 3 (43 %) patients (Table 1).

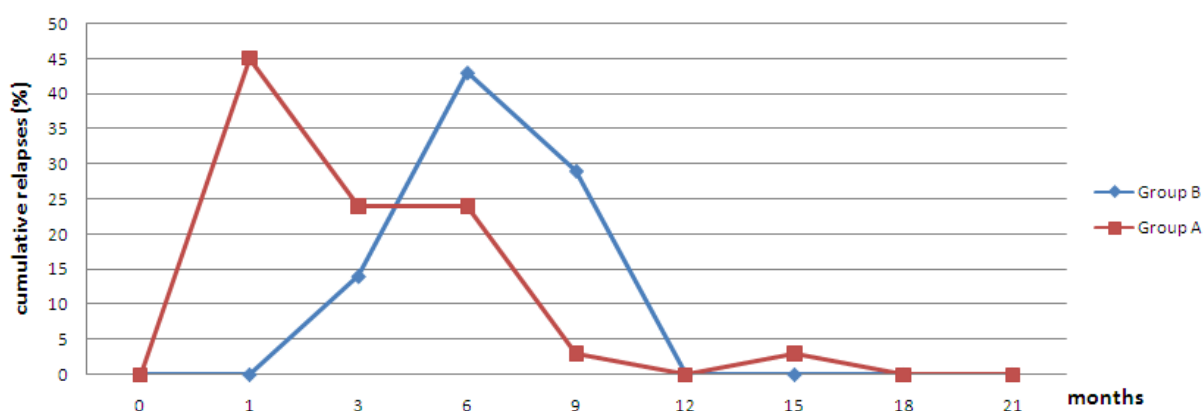


**Table 1:** Biofilm formation in isolates and clinical benefit after therapy in groups of patients.

	Group A (n = 29) <i>antibiotics only</i>		Group B (n = 7) <i>antibiotics and adjuvant immunomodulatory th.</i>	
women, n (age)	22	(22 – 94 y.)	6	(60 – 87 y.)
men, n (age)	7	(36 – 81 y.)	1	(72 y.)
biofilm formation <i>in vitro</i> , n	29	(100 %)	7	(100 %)
clinical benefit after therapy, n	9	(31 %)	4	(57 %)
- long-standing clinical benefit (15 months)	1	(3 %)	3	(43 %)
- short-standing clinical benefit (6 months)	7	(24 %)	1	(14 %)
without clinical benefit after therapy, n	20	(69 %)	3	(43 %)

Relapses of UTIs in the group A after a short-time period of 1 month were observed in 13 (45 %) patients, followed by period of 3 months in 7 (24 %) patients, 6 months in 7 (24 %) patients and 9 months in 1 (3 %) patient. Long-time period without relapses of UTIs was observed only in 1 (3 %) patient. In the group B the most of relapses (43 %) were observed 6 months after the combined therapy, followed by 9 months in 29 % of patients and after 24 months in one patient (14 %). One patient (14 %) had relapse in 3 months after the combined therapy. Results are shown in the Graph 3.

In all patients enrolled in the present study inflammatory parameters (blood leucocytes, neutrophils and C-reactive protein) were analysed. We did not observe any significant changes in these laboratory parameters between the group A and the group B.



**Graph 3:** Cumulative relapses of UTIs (%) in the groups of patients, n = 36, group A - patients with antibiotic treatment alone (n = 29), group B - patients treated with antibiotics and concomitant adjuvant immunomodulatory therapy (n = 7).

### Conclusion and discussion

The presented study was a pilot study that included just 36 patients. Despite a low number of analysed patients adjuvant immunomodulatory therapy seems to have a benefit for patients with chronic uroinfections. Clinical benefit and long-time period without relapses of UTIs was observed in the group B of patients (antibiotics and concomitant adjuvant immunomodulatory therapy) more often than in patients of the group A (antibiotic therapy alone). Our results correspond with results of other randomized multicenter double-blind trials related to immunomodulatory therapy in urinary tract infections (Magasi *et al.* 1994; Bauer *et al.* 2005). When evaluating other laboratory parameters we did not find any statistically significant changes. In the future we would like to focus in more detail on changes in the immune system of patients with acute uroinfections and patients with chronic recurrent uroinfections.

To eradicate biofilm infection a combination antibiotic therapy is recommended (Tré-Hardy *et al.* 2010). No one of patients enrolled in this study was treated with combined antibiotic therapy targeted to eradicate biofilm. Robust host immune response and severe inflammation is thought to predispose the urinary bladder tissue to recurrent infections (Hannan *et al.* 2010). Therefore, immunomodulatory therapy that allows penetration of polymorphonuclear leukocytes into the biofilm (Bjarnsholt *et al.* 2013) and stimulates cellular and humoral immune response (Rosenthal 1986) is suitable additive to preemptive and eradication antibiotic therapy of UTIs. It may allow penetration of antibiotics into the matrix of biofilm, too.

### References

1. BAUER, H.W. *et al.*, 2005. A long-term, multicenter, double-blind study of an *Escherichia coli* extract (OM-89) in female patient with recurrent urinary tract infections. In: *Eur. Urol.* 47, p. 542 – 548.
2. BISHOP, B. L. *et al.*, 2007. Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. In: *Nat. Med.* 13, p. 625–630.
3. BJARNSHOLT, T. *et al.*, 2013. Applying insights from biofilm biology to drug development, can a new approach be developed? In: *Nat. Rev. Drug Disc.* 12, p. 791–808.
4. ESTY, A., J. G. Fox, 2010. Science versus slime. In: *Dartmouth Medicine.* 35 (1).
5. HANNAN, T. J. *et al.*, 2010. Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. In: *PLoS Pathog.* 6: e1001042. doi:10.1371/journal.ppat.1001042
6. JORGENSEN, I., P.C. Seed, 2012. How to Make It in the Urinary Tract: A Tutorial by *Escherichia coli*. In: *PLoS Pathog.* 8(10).
7. KOTULOVÁ, D., L. Slobodníková, 2010. Antibiotic susceptibility of strains *Staphylococcus aureus* growing in biofilm to vancomycin, gentamicin and rifampicin. In: *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.* 59(2), p. 80-87.
8. MAGASI, P. *et al.*, 1994. Urovaxom and the management of recurrent urinary tract infection in adults: A randomized multicenter double-blind trial. In: *Eur. Urol.* 26, p. 137 – 140.
9. PUSHPALATHA, N. *et al.*, 2012. Garlic ointment inhibits biofilm formation by bacterial pathogens from burn wounds. In: *J. Med. Microbiol.* 61, p. 662–671.

10. ROSENTHAL, M., 1986. Effect of a bacterial extract on cellular and humoral immune response in humans. In: *J. Immunopharmacol.* 8, p. 315.
11. SCOTT, V.C.S. *et al.*, 2015. Intracellular Bacterial Communities: A Potential Etiology for Chronic Lower Urinary Tract Symptoms. In: *Urology*, 86(3), p. 425–431.
12. STEPANOVIC, S. *et al.*, 2007. Quantification of biofilm formation in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. In: *APMIS* 115, p. 891-899.
13. TIMMERMANS, K. *et al.*, 2013. Blueprints of Signaling Interactions between Pattern Recognition Receptors: Implications for the Design of Vaccine Adjuvants. In: *Clin. Vac. Immun.* 20(3). p. 427-432.
14. TRÉ-HARDY, M. *et al.*, 2010. Efficacy of the combination of tobramycin and a macrolide in an in vitro *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm model. In: *Antimicrob. Agents Chemother.* 54(10), p. 4409-15.
15. WYBRAN, J. *et al.*, 1989. Enhancement of cytokine production and natural killer activity by an *Escherichia coli* extract. In: *Onkologie.* 12(22).

### **XXIV. ročník Moravsko-slovenských mikrobiologických dní sa konal v Jihlave 10.-12. novembra.**

Po slávnostnom otvorení kongresu sa prvý blok venoval bakteriálnym zoonózam. Otvoril ho doc. Bardoň prednáškou, v ktorej informoval o projekte „One Health“. Ďalšie prednášky sa venovali problematike salmonelóz z hľadiska epidemiológie (Mgr. Gelbíčová a kol.) aj z hľadiska ich extraintestinálnej manifestácie (Dr. Vágnerová a Mgr. Sauer). Epidémiu listeriózy v Moravskosliezskom kraji analyzovali vo svojej prednáške autorky Dr. Karpíšková a kol. a mechanizmy rezistencie baktérií rodu *Aeromonas* izolovaných z KOI kaprov autori Dr. Hanzen a prof. Kmeť. Blok ukončil zaujímavou prednáškou o infekčných komplikáciách po poranení zvierat'om doc. Bardoň.

Ďalší deň kongresu bol venovaný mykotickým a bakteriálnym infekciám a možnostiam ich liečby. Výsledky surveillance invazívnych kvasinkových infekcií hematoonkologických pacientov v Českej a Slovenskej republike (Fungal Infection Database) prezentovali Mgr. Kocmanová a kol. a možnosti terapie invazívnych kandidóz Dr. Haber. O problematike intraabdominálnych kandidóz prednášala Dr. Mallátová a autori doc. Buchta a doc. Špaček sa zamysleli nad vzťahom chronického vulvovaginálneho dyskomfortu a kandidovej infekcie. Prehľad súčasných možností identifikácie dermatofytov uviedli Dr. Bouzková a kol. Terapiu uroinfekcií sa venovala prednáška doc. Žemličkovej, a kol. Úlohu znovaobjaveného fosfomycínu v tejto terapii charakterizovala Dr. Bartoníková a výsledky jeho klinického použitia prezentovali Dr. Louda a Dr. Fajfr. Antibiofilmový účinok chmelových látok bol témou prednášky autorov Dr. Bogdanová a kol. Antibiotickej liečbe nozokomiálnych pneumónií a problematike sepsy z pohľadu mikrobiológa sa venoval vo svojich prednáškach prof. Kolář. Na záľudnosti generickej substitúcie v antinfekčnej terapii upozornil doc. Vetchý. O nových doporučených postupoch diagnostiky, liečby a prevencie infekčných endokarditíd informoval prof. Beneš. Výskyt rôznych druhov baktérií rodu *Campylobacter* u človeka analyzovali Mgr. Krejčí a kol.

Posledné kongresové predpoludnie vyplnili prednášky o diagnostických metódach v lekárskej mikrobiológii a o rezistencii baktérií voči antimikrobiálnym prípravkom. Problematike kožných papilomavírusových infekcií a ich diagnostike molekulárno-biologickými metódami sa venovali Dr. Šmahelová a kol. Príspevok o potrebe rýchlej laboratórnej diagnostiky tuberkulózy prezentovala Dr. Müllerová. Aktuálnej téme laboratórnej diagnostiky infekcií vyvolaných vírusom ZIKA sa venovali MUDr. Zelená a Mgr. Mrázek. Ing. Babušíková oboznámila účastníkov kongresu s možnosťami využitia prietokovej cytometrie v bakteriálnom skríningu tekutých materiálov. O výskyte MDRO u pacientov všeobecnej nemocnice v Skalici informovala Dr. Naďová a kol. a o prevalencii enterobaktérií v klinických materiáloch od pacientov s akútnou leukémiou autori Dr. Holý a kol.

Posterová sekcia ponúkala 8 príspevkov, ktoré boli prístupné počas celého trvania kongresu. Antimikrobiálnemu účinku prírodných látok sa venovali dva príspevky. Dr. Horniačková a kol. prezentovali výsledky testovania antibiofilmového účinku jedľového medovicového medu na polymikrobiálny biofilm a príspevok Dr. Slobodníckovej a kol. sa venoval sledovaniu antimikrobiálneho účinku látok rastlinného pôvodu na baktérie najčastejšie vyvolávajúce nozokomiálne infekcie kože a rán.

## **Správy z odborných podujatí**

---

Klinický a sérologický obraz novodiagnostikovaných HIV-pozitívnych pacientov bol témou príspevku Dr. Jurkoviča a kol. Prehľad rezistencie a liečbe infekcií vyvolaných podmienene patogénnymi mykobaktériami sa venovala Dr. Stolaříková a rýchlej detekcii IgM protilátok proti vírusu kliešťovej encefalítidy Mgr. Večeřová. O možnostiach využitia MALDI TOF MS v priamej identifikácii baktérií v hemokultúrach informovala Dr. Tarabová a kol. Faktory virulencie enterokokov izolovaných na Mikrobiologickom ústave FN u sv. Anny v Brne charakterizovali Dr. Tejkalová a kol. a zaujímavú kazuistiku sepsy u oslabeného pacienta vyvolanú baktériou *Staphylococcus condimentii* prezentovali Dr. Vítková a kol. Naše veľké ďakujeme za kongres plný zaujímavých a užitočných informácií a milých stretnutí patrí jeho organizátorom, v prvom rade pani dr. Helene Skačániovej, pánovi profesorovi Milanovi Kolářovi a pánovi Bořekovi Procházkovi.

RNDr. Lívia Slobodníková, PhD.

### Zápisnica

zo zasadnutia Výboru SSKM SLS zo dňa 10. júna 2016 konaného  
na Ústave mikrobiológie SZÚ v Bratislave

Prítomní: MUDr. R. Botek, MUDr. M. Czirfuszová, RNDr. D. Lacková, PhD., doc. MUDr. M. Nikš, CSc., prof. A. Líšková, PhD., RNDr. M. Poľanová, RNDr. L. Slobodníková, PhD., doc. RNDr. D. Staneková, CSc.

Prizvaní: doc. MUDr. S. Bazovská, CSc., doc. RNDr. F. Ondriska, PhD., RNDr. Ľ. Perďochová

Ospravedlnení: MUDr. A. Purgelová

#### Program:

1. Kontrola zápisnice z predchádzajúceho zasadnutia
2. Publikačná činnosť v odbore, Cena spoločnosti za najlepšiu publikáciu v roku 2015
3. Časopis Správy klinickej mikrobiológie (M. Nikš, D. Staneková)
4. XIV. Prowazekove dni Komárno – vyhodnotenie (M. Czirfuszová)
5. Číselník zdravotných výkonov, zoznam zdravotných výkonov, DRG, katalogizačná komisia SSKM SLS
6. Informácie z ECCMID 2016 (účastníci)
7. Rôzne

#### 1. Kontrola zápisnice z predchádzajúceho zasadnutia:

Uznesenie 01-03-16 splnené

Uznesenie 02-03-16 bude presunuté na nasledujúce zasadnutie výboru

Uznesenie 03-03-16 splnené

#### 2. Publikačná činnosť v odbore, Cena spoločnosti za najlepšiu publikáciu v roku 2015:

Výbor SSKM SLS na základe predloženého zoznamu publikačnej činnosti členov za rok 2015 rozhodol udeliť cenu za najlepšiu publikáciu RNDr. Boldišovi V. a kolektívu za prácu: Boldiš V., Ondriska F., Špitálska E., Reiterová K.: Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Exp Parasitol.* 2015 Dec, 159:252-8. Cena spoločnosti bude udelená RNDr. V. Boldišovi PhD. osobne a zverejnená v časopise spoločnosti Správy klinickej mikrobiológie.

#### 3. Časopis Správy klinickej mikrobiológie:

Číslo časopisu sa pripravujú prevažne monotematicky, na základe vyžiadaných príspevkov, táto koncepcia sa osvedčuje a mala by sa používať aj do budúcnosti. Tohoročné júnové číslo časopisu pripravila doc. Staneková s témou: „Sexuálne prenosné infekcie.“ Témou ďalšieho čísla budú „Gastrointestinálne infekcie“, ktoré garantuje prof. Kmeť. Výbor SSKM SLS vyzýva všetkých svojich členov k aktívnej spolupráci pri zostavovaní jednotlivých čísel časopisu, vítané sú najmä prehľadové práce, prípadne odborné články zamerané na zaujímavé výsledky mikrobiologických analýz v rôznych regiónoch Slovenska.

Pre číslo časopisu 3-4/2016 boli ešte vyžiadané príspevky s témou klostrídiových infekcií (prof. Líšková), stanovenie citlivosti na antibiotiká u *H. pylori* (RNDr. Perďochová, MUDr. Botek) a akútne vírusové gastroenteritídy (RNDr. Lacková).

## Zo zasadnutia výboru

---

Výbor SSKM SLS predbežne navrhol tému nasledujúceho čísla 1-2/2017 „Infekčné ochorenia spojené s migráciou“, koeditorom čísla bude MUDr. Czirfuszová. Číslo bude obsahovať odborné príspevky týkajúce sa tuberkulózy (RNDr. Poľanová M.), ochorenia spôsobených vírusom Zika (doc. Staneková D.) a iné. Predbežnou témou čísla 3-4/2017 budú neuroinfekcie, editorom bude RNDr. Slobodníková, o spoluprácu RR požiada RNDr. Hučkovú. a za infektológiu doc. MUDr. Pieseckú. V čísle by mali dostať priestor aj imunológovia.

### 4. XIV. Prowazekove dni Komárno - vyhodnotenie

Výbor SSKM SLS poďakoval organizačnému výboru, osobitne MUDr. Czirfuszovej a kolektívu pracovníkov HPL Komárno za kvalitné organizačné zabezpečenie konferencie XIV. Prowazekove dni 2016. Z ekonomického hľadiska bola konferencia zabezpečená a financovaná z príspevkov vystavovateľov cestou SLK. Spoločnosti SSKM SLS nevyplynuli žiadne finančné záväzky.

Doc. Ondriška informoval výbor SSKM SLS o stanovisku Slovenskej Parazitologickej spoločnosti, ktorá sa rozhodla, že v budúcnosti sa už nebude spolupodieľať na organizácii podujatia Prowazekove dni Komárno. Keďže na konferencii odzneli aj príspevky s nižšou odbornou úrovňou, výbor SSKM SLS apeluje na odborných garantov, aby venovali väčšiu pozornosť príprave príspevkov mladších kolegov na budúce vedecké konferencie.

### 5. Číselník zdravotných výkonov, katalóg zdravotných výkonov, DRG, katalogizačná komisia SSKM SLS

Doc. Nikš informoval o aktivitách MZ SR pri príprave nového číselníka zdravotných výkonov a katalógu zdravotných výkonov. Podľa informácií z Národného centra zdravotníckych informácií by sa mali oba tieto zoznamy integrovať do jedného zoznamu, ktorý by plnil funkciu číselníka a aj katalógu zdravotných výkonov.

MUDr. Hanzen v mesiaci jún 2016 požiadal o uvoľnenie z funkcie predsedu Subkomisie pre odbor Klinická mikrobiológia Katalogizačnej komisie MZ SR. Za členov katalogizačnej subkomisie MZ SR pre klinickú mikrobiológiu výbor navrhol MUDr. Boteka, MUDr. Czirfuszovú, prof. Líškovú,

J. Morávka a doc. Nikša. Ako predsedu subkomisie výbor navrhol doc. Liptákovu.

### 6. Informácie z ECCMID 2016

Doc. Nikš informoval, že na 26. konferencii ESCMID - ECCMID 2016 v Amsterdame sa opäť zúčastnil minimálny počet účastníkov zo Slovenska. Informácie o podujatí vrátane videozáznamov sú členom SSKM ako pridruženej spoločnosti Európskej spoločnosti klinickej mikrobiológie a infekčných ochorení dostupné na internetovej stránke [www.escmid.com](http://www.escmid.com). Členovia našej spoločnosti pravidelne dostávajú prostredníctvom e-mailového spravodajcu týždenne aktuálne informácie o činnosti a aktivitách ESCMID.

### 7. Rôzne

- Pripomienky ku návrhu MZ SR na Minimálne personálne a materiálne-technické vybavenie pracovísk klinickej mikrobiológie.

Po diskusii výbor dospel väčšinovým hlasovaním ku záveru, že SSKM nebude navrhovať zmeny v platných požiadavkách na minimálne personálne zabezpečenie pracovísk klinickej mikrobiológie.

## Zo zasadnutia výboru

---

- Príprava odborného podujatia 2017

Odborné podujatie „Dni klinickej mikrobiológie“ sa uskutoční v máji/júni 2017 vo Vysokých Tatrách, výbor bol oboznámený s cenovými ponukami hotelov Patria na Štrbskom plese a Átrium v Novom Smokovci. Organizačný výbor podujatia bude pracovať v zložení: doc. MUDr. M. Nikš, CSc., MUDr. R. Botek, RNDr. D. Lacková, PhD., RNDr. M. Poľanová, MUDr. Czirfuszová M., doc. MUDr. A. Liptáková, PhD. Navrhované hlavné témy: identifikácia baktérií, optimalizácia predikcie úspešnosti antibiotickej liečby a varia. Doc. Nikš zistí možnosti organizovania podujatia cestou SLS.

Zapísala: RNDr. Daniela Lacková, PhD.v.r.  
vedecká tajomníčka SSKM SLS

Overila: MUDr. Monika Czirfuszová  
člen výboru SSKM SLS

Doc. MUDr. Milan Nikš, CSc.v.r.  
predseda SSKM SLS

v Leviciach, dňa 17. 6. 2016



## **Zápisnica**

### **zo zasadnutia Výboru SSKM SLS zo dňa 2. decembra 2016 konaného na Ústave mikrobiológie SZÚ v Bratislave**

Prítomní: doc. MUDr. S. Bazovská, CSc., MUDr. R. Botek, RNDr. D. Lacková, PhD., doc. MUDr. M. Nikš, CSc., doc. RNDr. F. Ondriska, PhD., MUDr. A. Purgelová, doc. RNDr. L. Slobodníková, PhD.

Prizvaní: doc. MUDr. A. Liptáková, PhD.

Ospravedlnení: MUDr. M. Czirfuszová, PhD., prof. A. Líšková, PhD., RNDr. M. Poľanová, RNDr. Ľ. Perďochová, doc. RNDr. D. Staneková, CSc.,

#### Program:

1. Kontrola zápisnice z predchádzajúceho zasadnutia (D. Lacková)
2. Členská základňa a aktuálny zoznam členov SSKM SLS (M. Nikš, D. Lacková)
3. Číselník zdravotníckych výkonov, Zoznam zdravotných výkonov, DRG, katalogizačná komisia SSKM SLS (A. Liptáková)
4. Príprava konferencie XXV. Dni klinickej mikrobiológie 2017 (organizačný výbor)
5. Návrh ocenení v roku 2017 (D. Lacková)
6. Časopis Správy klinickej mikrobiológie (M. Nikš)
7. Rôzne

#### 1. Kontrola zápisnice z predchádzajúceho zasadnutia:

Uznesenie 02-03-16.

Členovia redakčnej rady časopisu Správy klinickej mikrobiológie budú navrhovať oponentov pre posudzovanie zasielaných prác podľa tematického zamerania pripravovaného čísla. Proces navrhovania bude prebiehať v aktuálnom čase a elektronickou formou.

#### 2. Členská základňa a aktuálny zoznam členov SSKM SLS:

Dr. Lacková informovala výbor o aktuálnom zozname členov SSKM SLS. Členská základňa odbornej spoločnosti zostáva stabilná a počet jej členov sa v posledných rokoch významne nemení, ale bol zaznamenaný mierny pokles počtu členov. V roku 2016 bol celkový počet platiacich členov 217, ich aktuálny zoznam aj s emailovými adresami je dostupný na webovej stránke SSKM SLS: [www.sskm.tym.sk](http://www.sskm.tym.sk). V prípade akýchkoľvek zmien v údajoch členov odporúčame kontaktovať okrem SLS aj vedeckého tajomníka SSKM SLS, adresa [lackova@hpl.sk](mailto:lackova@hpl.sk).

## Zo zasadnutia výboru

---

### 3. Číselník zdravotníckych výkonov, Zoznam zdravotníckych výkonov, DRG, katalogizačná komisia SSKM SLS:

Katalogizačná komisia MZ SR pre klinickú mikrobiológiu pracovala v zložení: predseda doc. Liptáková, doc. Nikš, prof. Líšková, MUDr. Czirfuszová a J. Morávek. Doc. Liptáková informovala členov výboru o aktuálnej situácii v príprave číselníkov a katalógu zdravotných výkonov. MZ SR pripravuje zoznam zdravotných výkonov pre ambulantnú sféru a Úrad pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou pripravuje systém DRG, pričom zoznam výkonov použijú z ambulantnej sféry. Do konca decembra je termín navrhovania nových kódov, ktoré v bodovníku neexistovali. Zatiaľ bolo navrhnutých 15 nových zdravotných výkonov. Pri zostavovaní nových zoznamov výkonov by mala participovať aj VŠZP. Spoločnosť SSKM SLS by mala vypracovať aj nákladovú efektívnosť, z ktorej by sa vypočítala cena výkonu. V lete 2017 plánuje MZ SR zosumarizovať všetky prijaté návrhy. Doc. Liptáková navrhla zefektívniť prácu katalogizačnej komisie a navrhla za jej člena menovať RNDr. J. Predného. Keďže počet členov subkomisie je limitovaný, Doc. Nikš ponúkol svoje odstúpenie z funkcie člena katalogizačnej subkomisie v prospech RNDr. Predného. Na základe návrhu doc. Liptákovvej prebehlo hlasovanie o odvolaní jedného člena súčasnej katalogizačnej subkomisie. 1 kolo hlasovania: odvolanie doc. M. Nikša z komisie bolo zamietnuté hlasovaním prítomných členov výboru. 2 kolo hlasovania: odvolanie prof. A. Líškovej z komisie bolo odsúhlasené všetkými prítomnými členmi výboru.

#### Uznesenie 01-12-2016

Na základe návrhu doc. Liptákovvej a hlasovaním členov výboru SSKM SLS sa stal členom katalogizačnej subkomisie komisie pre klinickú mikrobiológiu RNDr. J. Predný. Dr. Predný bude sledovať aj aktivity MZ SR a Úradu pre dohľad nad zdravotnou starostlivosťou v oblasti tvorby zoznamu výkonov.

### 4. Príprava konferencie XXVI. Dni klinickej mikrobiológie 2017:

Odborné podujatie XXVI. Dni klinickej mikrobiológie sa uskutoční v dňoch 22. – 24. mája 2017 v hoteli Atrium Nový Smokovec vo Vysokých Tatrách. Organizačný výbor podujatia pracuje v zložení: doc. MUDr. M. Nikš, CSc., MUDr. R. Botek, RNDr. D. Lacková, PhD., RNDr. M. Poľanová, MUDr. Czirfuszová M., doc. MUDr. A. Liptáková, PhD. Hlavné témy odborného podujatia sú: Antibiotická terapia - možnosti optimalizácie (garantuje doc. Nikš a MUDr. Purgelová), Identifikácia patogénnych mikroorganizmov (garantuje MUDr. Botek a Dr. Lacková), Molekulárne metódy v mikrobiologickej diagnostike (garantuje prof. Kmeť a RNDr. Poľanová) a Varia (garantuje doc. Liptáková a MUDr. Czirfuszová). Odborná úroveň zasielaných príspevkov bude posudzovaná vedúcimi jednotlivých blokov, pričom príspevky s nižšou odbornou úrovňou môžu byť zamietnuté. Výbor prijal informáciu, že podujatie bude po organizačnej stránke zabezpečené prostredníctvom SLS, oslovenie sponzorov bude v kompetencii doc. Nikša a doc. Liptákovvej. I. informácia o podujatí a prihláška na účasť v elektronickej forme bude zaslaná členom SSKM SLS do konca roka 2016.

## Zo zasadnutia výboru

---

### 5. Návrh ocenení v roku 2017:

RNDr. D. Lacková ako vedecký tajomník SSKM SLS pripravila zoznam jubilantov z členov SSKM SLS, ktorí dosiahnu v kalendárnom roku 2017 okrúhle životné jubileum. Zoznam jubilujúcich spolu s gratuláciou bude zverejnený v najbližšom čísle časopisu Správy klinickej mikrobiológie v roku 1-2/2017. Výbor SSKM navrhol ocenenia členov SSKM SLS, ktorí významne prispeli k daniu v spoločnosti a zaslúžili sa o rozvoj odboru klinická mikrobiológia:

doc. MUDr. Július Rajčáni DrSc. - gratulačný list, pripraví doc. Nikš

prof. MVDr. Lýdia Čisláková CSc. - zlatá medaila SLS

MUDr. Rudolf Botek – zlatá medaila SLS

doc. RNDr. František Ondriska, PhD. – zlatá medaila SLS

MUDr. Anna Purgelová - zlatá medaila SLS

prof. MUDr. Anna Líšková, PhD. - bronzová medaila

MVDr. Daniela Ohlasová, PhD. – bronzová medaila

### Uznesenie 02-12-16:

Členovia výboru SSKM SLS pripravia jubilujúce listy a listy s návrhmi na medailu, zašlú predsedovi výboru MUDr. Nikšovi.

**Termín: 31. december 2016**

### 6. Časopis Správy klinickej mikrobiológie:

Výbor SSKM SLS vyzýva všetkých svojich členov k aktívnej spolupráci pri zostavovaní jednotlivých čísel časopisu, vítané sú najmä prehľadové práce, prípadne odborné články zamerané na zaujímavé výsledky mikrobiologických analýz v rôznych regiónoch Slovenska. Číslo časopisu SKM 3-4/2016 je už pripravené. Téma nasledujúceho čísla 1-2/2017 bude venovaná rizikám súvisiacim s migráciou „Infekčné ochorenia spojené s migráciou“, koeditorom čísla bude MUDr. Czirfuszová. Číslo bude obsahovať odborné príspevky týkajúce sa tuberkulózy (RNDr. Poľanová.), ochorení spôsobených vírusom Zika (doc. Staneková) a importovaných parazitóz (doc. Ondriska). Číslo 3-4/2017 sa bude venovať téme neuroinfekcií, editorom bude doc. Slobodníková, o spoluprácu redakčná rada požiadala RNDr. Hučkovú a doc. Pieseckú z Infekčnej kliniky Fakultnej nemocnice v Nitre. Výbor prebral edičný plán časopisu 1-2 / 2018 a rozhodol, že číslo bude zamerané na tému antibiotík, garantom čísla bude doc. Nikš.

### 7. Rôzne

Výbor na zasadnutí schválil návrh na uzatvorenie dohody o vykonaní práce pre Ing. P. Valkoviča, technického správcu webovej stránky [www.sskm.tym.sk](http://www.sskm.tym.sk). Zmluva o vykonaní práce je terminovaná na mesiac december 2016, finančná odmena bola stanovená vo výške 200 € netto a bude uhradená z rozpočtu spoločnosti.

## **Zo zasadnutia výboru**

---

Zapísala: RNDr. Daniela Lacková, PhD.v.r.  
vedecká tajomníčka SSKM SLS

Overil: MUDr. Rudolf Botek  
CSc. v.r.  
člen výboru SSKM SLS

Doc. MUDr. Milan Nikš,  
predseda SSKM SLS

v Leviciach, dňa 6. 12. 2016

## **I. INFORMÁCIA**

**XXVI. Dni klinickej mikrobiológie**  
22. - 24. mája 2017 v Novom Smokovci

**Atrium Hotel Nový Smokovec**

Usporiadatelia

**Slovenská spoločnosť klinickej mikrobiológie**  
**Slovenskej lekárskej spoločnosti**

a

**Sekcia klinickej mikrobiológie**  
**Slovenskej lekárskej komory**

**Organizačný výbor :**

**Doc. MUDr. Milan Nikš, CSc.,**

**MUDr. Rudolf Botek**

**MUDr. Monika Czirfuszová, PhD.**

**RNDr. Daniela Lacková, PhD.,**

**Doc. MUDr. Adriana Liptáková, PhD.**

**RNDr. Monika Poľanová**

## Plánované podujatia

---

### Predbežný program :

#### **22. 05. 2017**

12,00 – 18,00	Registrácia
16,00 – 17,00	Otvorenie konferencie
17,00 – 18,30	Úvodné prednášky
18,30 – 20,00	Večera
20,00 – 21,30	Pracovná schôdza schôdza SSKM SLS a SKM SLK (Klinická mikrobiológia a DRG)

#### **23. 05.2017**

09,00 - 12,30	Prednášky
12,30 - 14,00	Obed
14,00 - 16,00	Prednášky
19,00	Večera + spoločenské stretnutie

#### **24. 05.2017**

09,00 - 12,00	Prednášky
12,00 - 12,30	Záver podujatia
12,30 - 14,00	Obed

### **Hlavné témy podujatia:**

**Antibiotická terapia – možnosti optimalizácie** (odborní garanti: doc. MUDr. M. Nikš, CSc., MUDr. A. Purgelová)

**Identifikácia patogénnych mikroorganizmov** (odborní garanti: MUDr. R. Botek, RNDr. D. Lacková, PhD.)

**Molekulárne metódy v mikrobiologickej diagnostike** (odborní garanti: prof. MUDr. V. Kmeť, DrSc., RNDr. M. Poľanová)

**Varia** (odborní garanti: MUDr. Czirfuszová, PhD., doc. MUDr. A. Liptáková, PhD.)

Bližšie informácie možno získať aj na [www.sskm.tym.sk](http://www.sskm.tym.sk)

## Závazná prihláška

Zasielajte výhradne e-mailom na adresu: lacková@hpl.sk

### XXVI. Dni klinickej mikrobiológie


(Konferencia SKM SLK a SSKM SLS)

22. až 24. mája 2017, Nový Smokovec, Hotel ATRIUM

#### Osobné údaje

Priezvisko:.....Meno:.....Titul:.....

Trvalý pobyt:.....

.....fax: .....

e-mail: .....

Pracovisko: .....

.....

ID (SLK).....nečlen SLK dátum narodenia: .....

Účasť aktívna  pasívna  prednáška  poster

Názov prezentácie:

.....

.....

.....

Autor/autori: .....

.....

.....

#### **Ubytovanie a stravovanie** (orientačné ceny, zaškrtnite)

Deň	Izba 1- lôž.	Izba 2- lôž. (za 1lôžko)	obed klasické jedlo	večera
	40 Euro	20 Euro		
22.05.2017			/	7 Euro
23.05.2017			7 Euro	7 Euro
24.05.2017		/	7 Euro	/

Chcem byť ubytovaný/á s: .....

Mám záujem o vjazd môjho vozidla do areálu hotela áno  nie

Ak áno ŠPZ: .....

Účastnícky poplatok: 15 EURO, hradí sa pri registrácii  
Aktívny účastník – prvý autor: účastnícky poplatok 0 EURO

V cene účastníckeho poplatku je zahrnuté: účasť na prednáškach, vystavenie certifikátu o účasti na podujatí a zborník súhrnov prednášok a posterov v elektronickej forme.

Rezerváciu ubytovania a stravovanie zabezpečuje organizátor podujatia v hoteli ATRIUM v Novom Smokovci na základe spätného doručenia tejto záväznej prihlášky.

Ubytovanie a stravovanie uhradí účastník pri registrácii.

Účastník, ktorý stornuje svoju prihlášku po 15.5.2017, je povinný uhradiť náklady spojené so záväzne objednanými a nečerpanými službami (ubytovanie, stravovanie).

#### Kontakt

RNDr. Daniela Lacková, PhD.

vedecký sekretár SSSKM SLS

e-mail : [lackova@hpl.sk](mailto:lackova@hpl.sk)

Termín na zasielanie prihlášok : pasívna účasť do 10. mája 2017  
aktívna účasť do 15. apríla 2017  
(súhrny do zborníka do 1. mája 2017)

Podujatie bude zaradené do kontinuálneho celoživotného vzdelávania zdravotníckych pracovníkov v prílušných stavovských organizáciách.



### **Pokyny pre autorov:**

Správy klinickej mikrobiológie uverejňujú pôvodné práce, prehľadové články, metodické postupy, diskusné príspevky a pod. so zameraním na problematiku lekárskej a klinickej mikrobiológie. Všetky práce sú recenzované oponentom.

Príspevok píšete v elektronickej forme a zasielajte do redakcie e-mailom. Píšete v slovenskom, českom, alebo anglickom jazyku. Pôvodné práce a prehľadové články by nemali presahovať rozsah najviac pätnásť normovaných strán formátu A4 ( typ písma Times New Roman, veľkosť 12, 30 riadkov). Rukopis môže obsahovať fotografie, prehľadné grafy a obrázky v čiernobielym a aj vo farebnom prevedení. Príspevky majú mať obvyklú štruktúru (súhrn, úvod, materiál a metódy, výsledky, diskusia, závery a zoznam použitej literatúry). Citácie musia spĺňať požiadavky CSN 010197. Texty majú byť písané jasne, stručne, štylisticky aj jazykovo správne. Cudzíe slová musia byť uvádzané v zhode so slovníkom cudzích slov. Za jazykovú úpravu textu zodpovedá autor. V nadpise autor uvedie plný názov pracoviska, z ktorého práca pochádza. Ak má práca viacerých autorov z viacerých pracovísk, uvedú sa všetci autori a všetky pracoviská. Pokiaľ pri pôvodných prácach vedúci pracoviska nie je autorom, ani spoluautorom práce, redakcia môže vyžiadať jeho súhlas s uverejnením textu (imprimatur).

Príspevky posielajte na adresu predsedu redakčnej rady alebo technického redaktora v jednom výtlačku výlučne v elektronickej forme. Uveďte telefonický a e-mailový kontakt na toho z autorov, kto bude komunikovať s redakciou. Všetky uverejnené príspevky sú nehonorované.

## SPRÁVY KLINICKEJ MIKROBIOLÓGIE

Vydávajú :

Slovenská spoločnosť klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej spoločnosti a  
Sekcia klinickej mikrobiológie Slovenskej lekárskej komory

ako informačný bulletin pre svojich členov.

Redakčná rada :

RNDr. Jaroslav Bojňanský, Bratislava

[bojnansky@hpl.sk](mailto:bojnansky@hpl.sk)

RNDr. V. Boldiš, PhD.

[boldiš@hpl.sk](mailto:boldiš@hpl.sk)

MUDr. Juraj Hanzen , Bratislava

[hanzen@hpl.sk](mailto:hanzen@hpl.sk)

prof. MVDr. V. Kmeť, DrSc., Košice

[kmetv@saske.sk](mailto:kmetv@saske.sk),

doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., Bratislava

[niks.m@gmx.at](mailto:niks.m@gmx.at)

RNDr. L. Slobodníková, CSc., Bratislava

[livia.slobodnikova@fmed.uniba.sk](mailto:livia.slobodnikova@fmed.uniba.sk)

Doc. RNDr. Danica Staneková, CSc., Bratislava

[danica.stanekova@szu.sk](mailto:danica.stanekova@szu.sk)

MUDr. V. Takáčová, Košice

[viktoria.takacova@unlp.sk](mailto:viktoria.takacova@unlp.sk)

Čestný člen:

MUDr. Anna Petrovičová, CSc., Bratislava

[anna.petrovicova@szu.sk](mailto:anna.petrovicova@szu.sk)

Vedúci redaktor :

doc. MUDr. Milan Nikš, CSc., Bratislava

Technický redaktor:

RNDr. Jaroslav Bojňanský, Bratislava

Adresa redakcie :

Ústav mikrobiológie SZU,

Limbová 12, 833 03 Bratislava