

a RAPD k charakterizaci výše uvedených bakteriálních druhů vyžaduje další ověření.

### Poděkování

Tato práce byla podporována grantem č. 2B08070 poskytnutým MŠMT ČR.

### Literatura

- BOYER S. L., FLECHTNER V. R., JOHANSEN J. R. (2001): Is the 16S-23S rRNA Internal Transcribed Spacer Region a Good Tool for Use in Molecular Systematics and Population Genetics? A Case Study in Cyanobacteria. *Molecular Biology and Evolution*, 18, s. 1057-1069.
- COCOLIN L., INNOCENTE N., BIASUTTI M., COMI G. (2004): The late blowing in cheese: a new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal of Food Microbiology*, 90, s.83-91.
- FINEGOLD S.M., SONG Y. L., LIU C. X. (2002): Taxonomy - General comments and update on taxonomy of clostridia and anaerobic cocci. *Anaerobe*, 8, s. 283-285.
- GARCÍA-MARTÍNEZ J., MARTÍNEZ-MURCIA A. ANTÓN A. I., RODRÍGUEZ-VALERA F. (1996): Comparison of the small 16S to 23S intergenic spacer region (ISR) of the RNA operons of some *Escherichia coli* strains of the ECOR collection and *E. coli* K12. *Journal of Bacteriology*, 178, s. 6374-6377.
- GEVERS D., HUYS G., SWINGS J. (2001): Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205, s. 31-36.
- HERMAN L. M. F., DE BLOCK J. H., WAES, G. M. (1995): A direct PCR detection method for *Clostridium tyrobutyricum* spores in up to 100 milliliters of raw milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 12, s. 4141-4146.
- KŘÍŽOVÁ J., ŠPANOVÁ A., RITTICH B. (2008): RAPD and rep-PCR fingerprinting for characterization of *Bifidobacterium* species. *Folia Microbiologica*, 53, s. 99-104.
- LE BOURHIS A. G., SAUNIER K., DORE J., CARLIER J. P., CHAMBA J. F., POPOFF M. R., THOLOZAN J. L. (2005): Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 1, s. 29-38.
- LE BOURHIS A. G., DORE J., CARLIER J. P., CHAMBA J. F., POPOFF M. R., THOLOZAN J. L. (2007): Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113, s. 154-163.
- NAKANISHI S., KUWAHARA T., NAKAYAMA H., TANAKA M., OHNISHI, Y. (2005): Rapid Species Identification and Partial Strain Differentiation of *Clostridium butyricum* by PCR Usin 16S-23S rDNA Intergenic Space Regions. *Microbiology and Immunology*, 49, s. 613-621.
- PRODĚLALOVÁ J., ŠPANOVÁ A., RITTICH B. (2005): Application of PCR, rep-PCR and RAPD techniques for typing of *Lactococcus lactis* strains. *Folia Microbiologica*, 50, s. 150-154.
- REKHA R., RIZVI M., JAISHREE P. (2006): Designing and validation of genus-specific primers for human gut flora study. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5, s. 505-512. Dostupný z www: <<http://www.ejbiotechnology.info/content/vol9/issue5/full/2/>>.
- SAMBROOK J., RUSSEL, D., W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd edition. Cold Spring Harbor Press. New York..
- SINDEN R. R. (1994): DNA Structure and Function. Academic Press, San Diego, s. 34.
- SONG Y. L., LIU, C. X., MOLITORIS D., TOMZYNSKI T. J., MC TEAGUE M., READ E., FINEGOLD S. M. (2002): Use of 16S-23S rRNA spacer-region (SR)-PCR for identification of intestinal clostridia. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, s. 528-535.
- SONG Y. L. (2005): PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe*, 11, s. 79-91.
- TUMA Š., KUČEROVÁ K., PLOCKOVÁ M. (2008): Isolation of Anticlostridially Active *Lactobacilli* from Semi-hard Cheese. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, s. 324-332.
- VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J. R. (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19, s. 6823-6831.

Přijato do tisku 8. 11. 2011

Lektorováno 18. 11. 2011

## VYUŽITÍ SYSTÉMU DIVERSILAB™ PRO DRUHOVOU IDENTIFIKACI BIFIDOBACTERIÍ

Vladimír Dráb, Gabriela Kunová, Lucie Volná

MILCOM a.s., Ke dvoru 12, 16000 Praha 6

v.drab@vum-tabor.cz

### Using DiversiLab™ system for species identification of bifidobacteria

#### Abstrakt

Cílem práce bylo zjištění použitelnosti systému DiversiLab™ pro druhovou identifikaci bifidobakterií pomocí repetitivní PCR s dvěma různými primery AA a (GTG)<sub>5</sub>. Oba primery umožňovaly (při použití rozšířeného Jaccardova algoritmu pro shlukovou analýzu) odlišení 20 různých druhů typových kmenů bifidobakterií. Jako templát byla pro amplifikaci použita jak purifikovaná DNA, tak DNA z hrubých lyzátů buněk. Při použití DNA z hrubých lyzátů buněk je možné zpracovat a identifikovat 25 kmenů v rámci jednoho pracovního dne.

#### Abstract

The aim of this work was to determine the applicability of the instrument DiversiLab™ for species identification of bifidobacteria using repetitive PCR with two different primers, AA and (GTG)<sub>5</sub>. Both primers allowed (with the use of extended Jaccard algorithm for cluster analysis) distinguishing of 20 different species of type strains of bifidobacteria. Both purified DNA so DNA in crude cell lysates can be used as template for amplification. In the case of using DNA from cell lysates, it is possible to process and identify 25 strains within one working day.

#### 1. Úvod

Metoda rep-PCR je typizační metoda, při které se amplifikují úseky DNA oddělené v genomu různými typy repetitivních, např. repetitivní mimogenový (mezerníkový) palindrom, REP - Repetitive Extragenic Palindrome (35-40 bp), konvenční enterobakteriální intergenová repetice, ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Sequence (124-127 bp) a BOX element (154 bp). Uvedené repetice jsou typické pro genomy mnoha bakteriálních druhů a v řadě případů i pro jednotlivé kmeny. Kratší repetice jako (GTG)<sub>5</sub> se také nacházejí v mnoha kopiích v mikrobiálních genomech a byla prokázána jejich použitelnost pro PCR fingerprinting (Versalovic a kol., 1994). Odpovídající protokoly se popisují jako REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR a (GTG)<sub>5</sub>-PCR. Velkou výhodou rep-PCR je, že reprodukovatelné fingerpriny získáme jak při použití purifikované DNA, tak DNA z hrubých lyzátů buněk, narostlých

v živných bujonech nebo ve formě kolonií na plotnách (Woods a kol., 1993). Metoda rep - PCR, v kombinaci s dalšími molekulárně biologickými metodami, byla použita k typizaci různých kmenů bakterií druhu *Lactobacillus johnsonii* (Ventura a Zink, 2002), *Lactobacillus sakei* (Hyytiä-Trees a kol., 1999). K identifikaci některých druhů bakterií rodu *Lactobacillus* a *Enterococcus* bylo ověřováno použití primerů REP1-I, REP2-I a (GTG)5 (Gevers a kol., 2001, Švec a kol., 2005).

Metoda rep-PCR byla automatizována za účelem jejího využití pro typizaci mikrobiálních kmenů v klinických laboratořích. Systém je znám pod obchodním názvem DiversiLab™ a je založen na dělení amplikonů v mikrofluidním čipu, detekci jejich pozice a intenzity fluorescence. Vyhodnocení se provádí pomocí dodaného software (Healy a kol., 2005a). Tento systém byl použit pro charakterizaci kmenů *Staphylococcus aureus* (Shutt a kol., 2005), vankomycin resistantních enterokoků (Pounder a kol., 2006), kvasinek a plísní z rodů *Aspergillus*, *Candida* a *Fusarium* (Hansen a kol., 2008; Healy a kol., 2005b; Wise a kol., 2007). Naše práce byla zaměřena na možnosti využití tohoto systému pro identifikaci bifidobakterií.

## 2. Materiál a metody

### 2.1. Chemikálie a bakteriální kultury.

Komponenty pro PCR byly dodány firmou bioMérieux (Marcy L'Étoile, Francie) nebo Top-Bio (Praha, ČR), AmpliTaqpolymerasa a pufr (s 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>) byly od firmy Applied Biosystems (Carlsbad, USA). DNA standard byl také součástí dodávaného kitu (bioMérieux Ref 270 678). Chemikálie používané pro přípravu pufrů a gelů byly čistoty p.a. nebo pro molekulární biologii a pocházely z běžných komerčních zdrojů (Sigma-Aldrich, SERVA). Pro optimalizaci metody byla použita DNA izolovaná z typových nebo referenčních kmenů, které byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM), Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms (LMG), Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen (DSM) a Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM).

### 2.2. Kultivace buněk a izolace DNA.

Kultivace bifidobakterií byla prováděna v MRSC bujónu (Merck 1.10661 + 2g/l NaHCO<sub>3</sub>) při optimální teplotě jednotlivých kmenů z kultur uchovávaných při -70 °C v kultivačním bujónu s 15 % glycerolu. Pro snížení redox potenciálu prostředí byl přidáván L-cystein hydrochlorid na výslednou koncentraci 0,05 % (m/v). Po obnovení (inoku-



Obr. 1 Separace DNA pomocí mikrofluidního analyzáru.

lum 10 %) byly kmeny jedenkrát přeočkovány a kultivovány za optimálních podmínek do začátku stacionární fáze. Na izolaci DNA byl odebrán 1-2 ml kultury a skladován při -20 °C. DNA typových kmenů byla následně izolována pomocí komerčního kitu DNeasy Blood&TissueKit (QIAGEN, Hilden, Německo). Pro zvýšení výtěžku DNA byl modifikován pracovní postup zařazením kroků zvyšujících lyzi mikrobiálních buněk (teplotní šok 2 x (-70 °C, 10 min.; +56 °C, 20 min.)). Koncentrace izolované DNA byla stanovena pomocí fluorimetrického stanovení na přístroji Qubit s využitím kitu Quant-iT dsDNA HS Assay podle doporučení výrobce (Invitrogen, Carlsbad, USA) a standardizována na 25 ng/μl TE pufr. Hrubé lyzáty buněk byly připraveny z 1 ml kultury (čerstvé nebo skladované při -20 °C). Po dvojnásobném promytí odstředěných buněk sterilní PCR vodou (18MΩ) byl sediment lyzován 100 μl alkalického lyzačního roztoku (0,05M NaOH + 0,25% SDS), povařen 30 minut při 94 °C a rychle zchlazen, aby se zabránilo opětné renaturaci. Nakonec byly vzorky ředěny 50krát a 400krát PCR-vodou a skladovány při -20 °C do doby analýzy. Těsně před pipetováním do PCR směsi byly vzorky opět povařeny 5 min při 94 °C.

#### Tisková oprava:

### Vliv způsobu dojení a fáze laktace na technologické parametry ovčího mléka a kvalitu výrobku

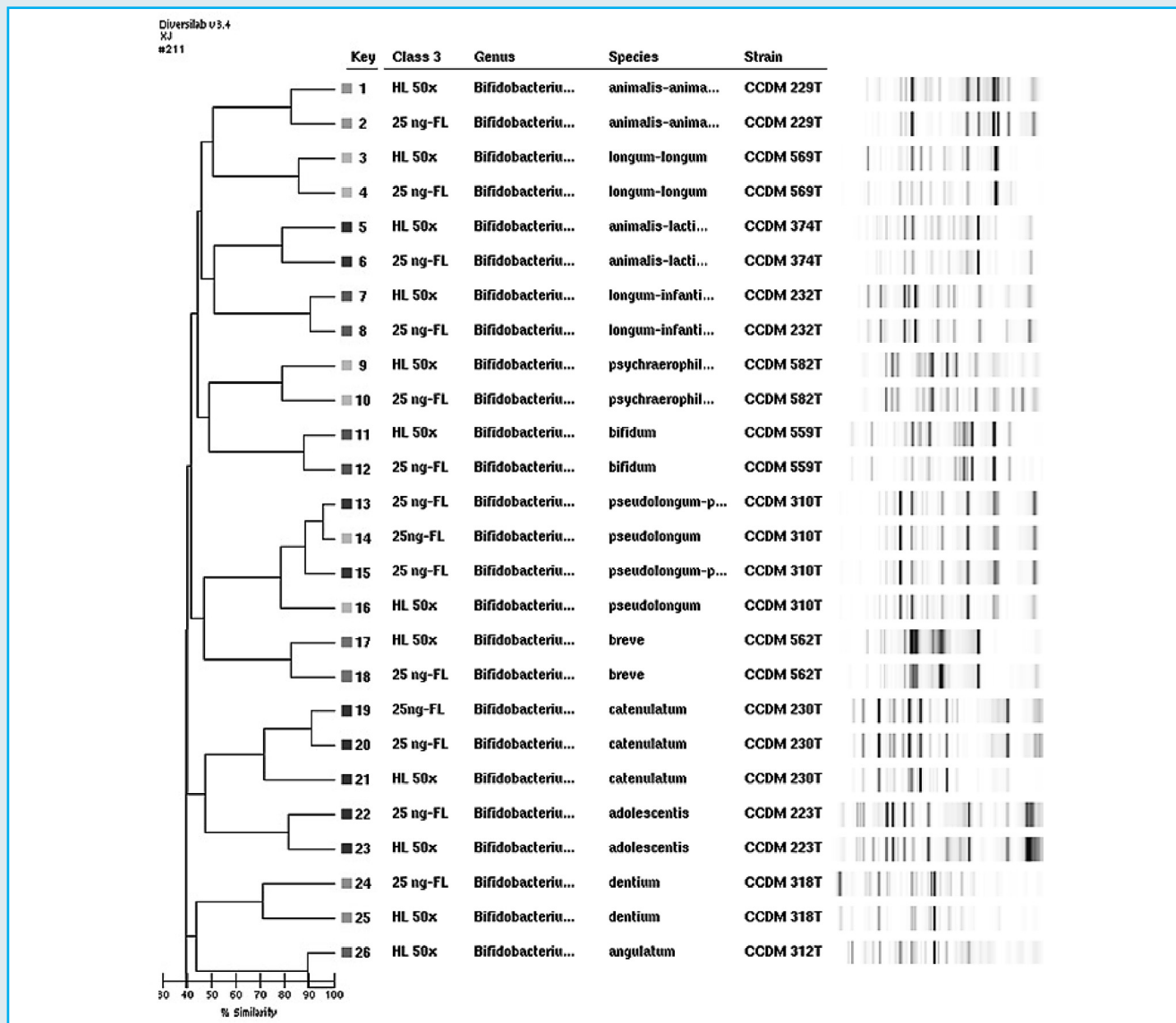
(Švejcarová M., Elich O., Pechačová M., Malá G.)

Mlékařské listy 128, str. I-IV

#### Poděkování

Práce byla podporována prostředky projektu MZe QH72286 a výzkumným záměrem MŠMT ČR MSM 2672286101.

**Obr. 2** Shluková analýza rep-PCR fingerprintů typových kmenů rodu *Bifidobacterium* s primerem AA (*DiversiLab™ Bifidobacteriumkit 270604, BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie*)



### 2.3. rep-PCR pro rod *Bifidobacterium* s využitím *DiversiLab™ Bifidobacterium* kitu

Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení - rep-PCR MM1 18,0 µl, 10x reakční pufr GeneAmp (AppliedBiosystems, Carlsbad, USA) 2,5 µl; primer mix AA (bioMérieux, Marcy L' Etoile, Francie; Ref 270 604) 2,0 µl; DMSO 0,5 µl, AmpliTaq DNA Polymerase (5 U/µl) 0,5 µl a DNA templát (25 ng/µl, hrubý lyzát buněk ředěný 50x - HL 50x) 2 µl. Amplifikace probíhala za podmínek: 94 °C/30 s - denaturace DNA, 65 °C/30 s - hybridizace primerů, 70 °C/90 s - syntéza DNA řetězce. Amplifikace proběhla v 35 cyklech. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/120 s, v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 70 °C prodloužena na 180 s. Poté byla reakční směs ochlazena na 10 °C.

### 2.4 rep-PCR pro rod *Bifidobacterium* s využitím primeru (GTG)5 (Gevers a kol., 2001)

Při amplifikaci byla použita směs o následujícím složení - PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, Praha, ČR) 14,5 µl, 10x zelený pufr

(Top-Bio) 2,5 µl; primer (GTG)5 (10 pM/ µl, Genери-Biotech, Hradec Králové; ČR) 2,5 µl; dNTP (Fermentas) 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1,5 µl, polymerasaCombiTaq (1U/ µl, Top-Bio) a DNA templát (25 ng/µl, hrubý lyzát buněk ředěný 50x nebo 400x - HL 50x, 400x) 2 µl. Amplifikace probíhala za podmínek: 94 °C/60 s - denaturace DNA, 50 °C/60 s - hybridizace primerů, 72 °C/240 s - syntéza DNA řetězce. Amplifikace proběhla v 35 cyklech. Před prvním cyklem byla směs zahřívána při 94 °C/420 s, v posledním cyklu byla syntéza řetězce při 72 °C prodloužena na 420 s. Poté byla reakční směs ochlazena na 10 °C.

### 2.5. Analýza amplikonů pomocí přístroje *DiversiLab™*, vyhodnocení výsledků.

Analýza amplikonů byla prováděna podle doporučení výrobce (bioMérieux, Marcy L' Etoile, Francie) na přístroji *DiversiLab™* (obr. 1), jehož základem je Bioanalyser 2100 firmy Agilent. Amplikony byly nanášeny na DNA čipy (bioMérieux, Ref 270 680) a elektroforeticky separovány podle velikosti. Vyhodnocení výsledků bylo

prováděno pomocí software DiversiLab™ (bioMérieux) s využitím shlukové analýzy (extended Jaccard).

### 3. Výsledky a diskuse

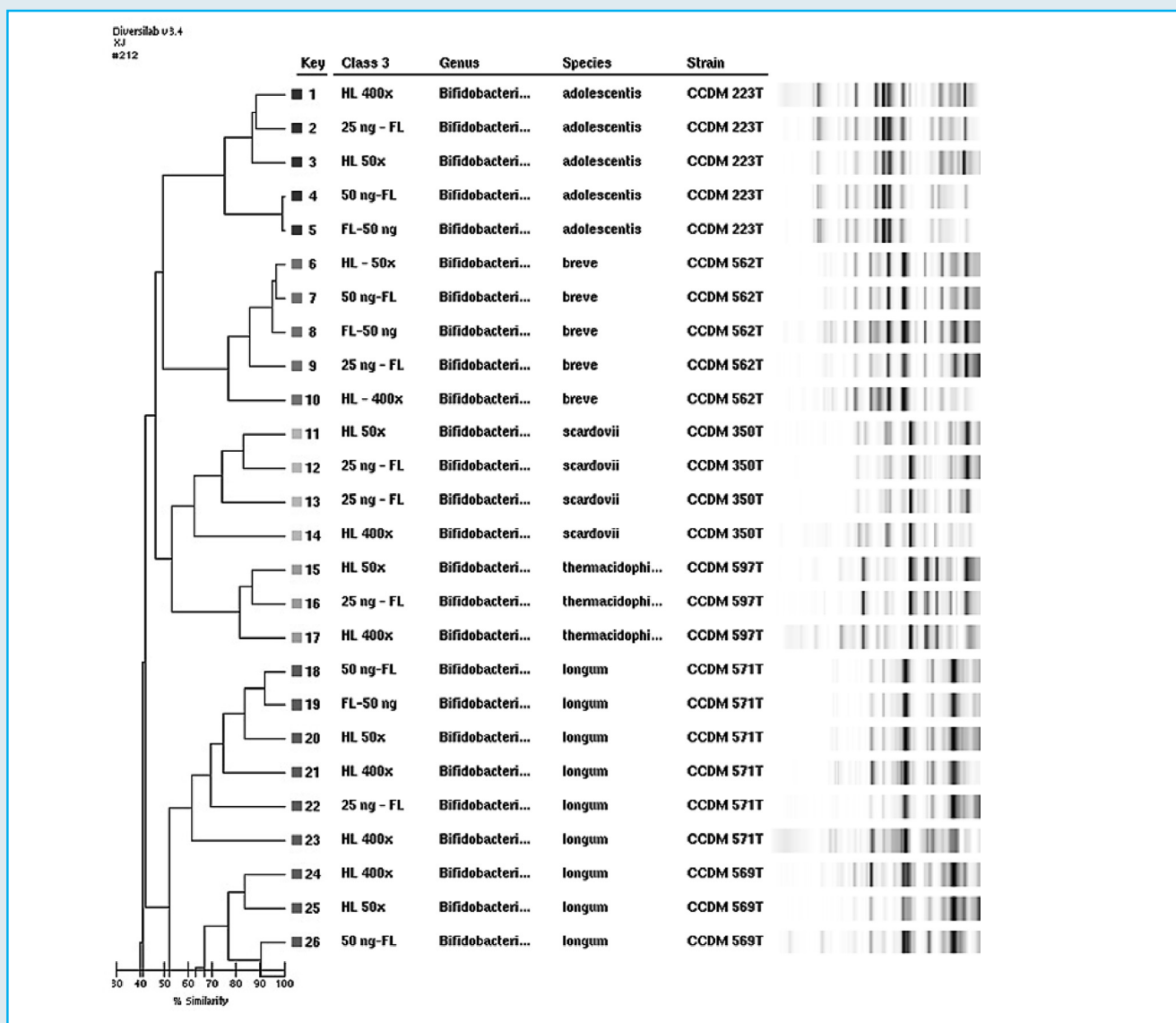
Částečné výsledky shlukové analýzy repetitivní PCR s primery AA pro typové kmeny bifidobakterií jsou uvedeny na obr. 2. Software DiversiLab™ umožňuje 3 různé metody vyhodnocení, které preferují více intenzitu bandů nebo jejich pozici. Nejlepší výsledky byly dosaženy při použití metody extended Jaccard, kdy shluková analýza umožnila oddělení všech testovaných druhů a poddruhů bifidobakterií. Ve všech případech amplikony získané s purifikovanou DNA (50 ng/PCR směs) a s DNA z hrubých lyzátů (50x) stejného kmene tvořily jeden shluk s vyšší než 70 % podobností profilů i v případě opakovaných analýz. Pokles podobnosti profilů u některých analyzovaných kmenů byl způsoben rozdíly v intenzitě nebo v přítomnosti malých či velkých fragmentů mezi profily získanými amplifikací purifikované DNA a DNA z hrubých lyzátů buněk.

Částečné výsledky shlukové analýzy repetitivní PCR s primerem (GTG)5 pro typové kmeny bifidobakterií jsou uvedeny na obr. 3. V případě tohoto primeru byly u některých kmenů testovány dvě koncentrace purifikované DNA (50 a 100 ng/PCR směs) a dvě koncentrace hrubých lyzátů (ředění 50x a 400 x). Pro vyhodnocení profilů (fingerprintů) byla použita metoda extended Jaccard, která dávala z dostupných metod nejlepší výsledky. Ve všech případech tvořily amplikony získané po amplifikaci purifikované DNA a DNA z hrubých lyzátů buněk stejného typového kmene jeden shluk s vyšší než 60 % podobností. Jako optimální se jevílo použití 2 µl purifikované DNA o koncentraci 25 ng/µl nebo 50 x ředěných hrubých lyzátů.

### Závěr

Získané výsledky dokazují použitelnost metody rep-PCR s primery AA nebo (GTG)5 pro rozlišení typových kmenů bifidobakterií 20 různých druhů. Z hlediska rozlišení jednotlivých typových kmenů byly výsledky obou testovaných

**Obr. 3** Shluková analýza rep-PCR fingerprintů typových kmenů rodu *Bifidobacterium* s primerem(GTG)5



metod srovnatelné. Nevýhodou první testované metody je vysoká cena potřebných komponent pro PCR, která se pohybuje ve výši 1000 Kč/vzorek. Velkou výhodou metody je možnost použití hrubých lyzátů buněk pro analýzu, což umožňuje získat výsledek identifikace neznámého kmene během jednoho pracovního dne (identifikace 24-26 neznámých izolátů během 8 h). Obě vytvořené databáze jsou průběžně doplňovány o další typové kmeny a jsou v současné době rutinně využívány pro typizaci izolovaných kmenů bifidobakterií ve Sbírce mlékařenských mikroorganismů Laktoflora (CCDM).

### Poděkování

Tato práce vznikla díky finanční podpoře MŠMT v rámci projektu 2B08068.

### Literatura

- GEYERS D., HUYS G., SWINGS J. (2001): Applicability of rep-PCR finger printing for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 205, s. 31-36.
- HANSEN D., HEALY M., REECE K., SMITH CH., WOODS G. L. (2008): Repetitive-Sequence-Based PCR Using the DiversiLab System for Identification of *Aspergillus* Species. *J ClinMicrobiol.* 46, s. 1835-1839.
- HEALY M., HUONG J., BITTNER T., LISING M., FRYE S., RAZA S., SCHROCK R., MANRY J., RENWICK A., NIETO R., WOODS CH., VERSALOVIC J., LUPSKI J.R. (2005a): Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J.Clin.Microbiol.*, 43 s. 199-207.
- HEALY M., REECE K., WALTON D., HUONG J., FRYE S., RAAD II., KONTOYIANNIS D.P (2005b): Use of the DiversiLab System for species and strain differentiation of *Fusarium* species isolates. *J ClinMicrobiol.*, 43, s. 5278-80.
- HYTTIÄ-TREES E., LYHS U., KORKEALA H., BJÖRKROTH J. (1999): Characterization of rosy slime-producing *Lactobacillus sakei* using repetitive element sequence-based PCR. *Int.J.FoodMicrobiol.*, 50, s. 215-219.
- POUNDER J.I., SHUTTCH.K., SCHAECHER B.J., WOODS G.L. (2006): Clinical evaluation of repetitive sequence-based polymerase chain reaction using the DiversiLab System for strain typing of vancomycin-resistant enterococci. *Diag. Microbiol. Inf. Dis.*, 54, s. 183-187.
- SHUTTCH.K., POUNDER J.I., PAGE S.R., SCHAECHER B.J., WOODS G.L. (2005): Clinical evaluation of the DiversiLab microbial typing system using repetitive-sequence-based PCR for characterization of *Staphylococcus aureus* strains. *J.Clin. Microbiol.*, 43, s. 1187-1192.
- ŠVEC P., VANCANNEZT M., SEMAN M., SNAUWAERT C., LEFEBVRE K., SEDLAČEK I., SWINGS J. (2005): Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiol.Lett.*, 247, s. 59-63.
- VENTURA M., ZINK R. (2002): Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 217, s. 141 - 154.
- VERSALOVIC J., SCHNEIDER M., DE BRUIJN F.J., LUPSKI J.R. (1994): Genomic finger printing of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Meth Cell Mol Biol.*, 5, s. 25-40.
- WISE M.G., HEALY M., REECE K., SMITH R., WALTON D., DUTCH W., RENWICK A., HUONG J., YOUNG S., TARRAND J., KONTOYIANNIS D. P. (2007): Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J. Med. Microbiol.*, 56, s. 778-87.
- WOODS C.R., VERSALOVIC J., KOEUTH T., LUPSKI J.R. (1993): Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *J.Clin.Microbiol.*, 31, s. 1927-1931.

Přijato do tisku 8. 11. 2011

Lektorováno 21. 11. 2011

## MLÉKAŘSTVÍ A LABORATORNÍ SYSTÉM KONTROLY KVALITY MLÉKA A KONTROLY UŽITKOVOSTI KRAV V LITVĚ - PIENO TYRIMAI

**K. Šustová, M. Jůzl, T. Lužová** - Mendlova univerzita Brno  
**O. Hanuš, M. Vyletělová** - Agrovýzkum s.r.o. Rapotín  
**Eva Samková** - JČU České Budějovice  
**P. Roubal, O. Elich, M. Švejcarová** - VÚM Praha



evropský  
sociální  
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,  
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání  
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

V rámci řešení projektu MŠMT č. CZ.1.07/2.3.00/09.0081 "Komplexní vzdělávání lidských zdrojů v mlékařství" navštívili řešitelé a lektori tohoto projektu na podzim 2011 ve dvou termínech špičkové zahraniční laboratorní mlékařské pracoviště - Pieno Tyrimai v Kaunasu, Litva.

Program školení na Pieno Tyrimai a odborné diskuze na dalších pracovištích zabývajících se kontrolou, výzkumem a výukou mlékařské problematiky:

- 1) Systém testování kvality a složení mléka v Litvě, organizace testování a mléčné laboratoře (odborná diskuse);
- 2) Exkurze na Litevské univerzitě zdravotních věd a Veterinární akademii;
- 3) Návštěva experimentální a výukové farmy dojníc Veterinární akademie;
- 4) Technické zajištění mléčné laboratoře a systém kontroly kvality práce, dohledatelnost měření;
- 5) Návštěva a exkurze Národního ústavu potravinových a veterinárních rizik ve Vilniusu;
- 6) Studium referenčních mlékařských analytických metod (RIL, T, B, L, STP, Urea, PSB, CPM, patogeny mastitid) - principy a zajištění kvality, nejistoty výsledků, kontrolní systém kvality v laboratoři;
- 7) Exkurze a návštěva Technické univerzity v Kaunasu (experimentální pracoviště mlékařské technologie);
- 8) Studium rutinních mlékařských analytických metod (RIL, T, B, L, STP, Urea, PSB, CPM) - principy a zajištění kvality, nejistoty výsledků, kontrolní systém kvality v laboratoři;
- 9) Exkurze a návštěva závodu Kaunaských mlékáren, závod Mléčné hvězdy Kaunas (technologie a produkty).

### Litva v kostce

Státní zřízení: republika, od r. 2004 členem EU

Hlavní město: Vilnius

Měna: 1 litas (LTL) = cca 7 Kč

Rozloha: 65000 km<sup>2</sup>