

Příprava purifikovaného fága *S. aureus* pro použití ve veterinární praxi (STAF1)

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali dne: 12. 6. 2018

Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc.¹, doc. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D.¹, doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc.¹, Mgr. Martin Benešík, Ph.D.¹, Mgr. Tibor Botka, Ph.D.¹, doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.², doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D.³, MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D.³

¹Masarykova univerzita, Brno; ²Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha; ³Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Úvod

V poslední době je zaznamenán rostoucí trend výskytu multirezistentních kmenů, které představují závažný celosvětový problém (www.efsa.europa.eu). *S. aureus* je často rezistentní i k jiným než beta-laktamovým antibiotikům. Jedná se např. o aminoglykosidy, rifampicin, fluorochinolony, mupirocin (CARBON, 2000). VYLETĚLOVÁ a kol. (2011) zjistili, že kmeny MRSA izolované ze zvířat byly kromě rezistence k meticilinu rezistentní i k tetracyklinu a dále v 84–88 % případů k amoxicilinu, cefoxitinu a cefotaximu. K přenosu rezistence dochází u stafylokoků jak v rámci jednoho druhu a jeho osídlení v prostředí farmy včetně zvířat (WAAGE a kol., 2002), tak i mezidruhově. FORBES a SCHABERG (1983) popisují ve své práci přenos rezistence pomocí mobilních genetických elementů, nejčastěji prostřednictvím plazmidů (např. rezistence ke gentamicinu, erythromycinu a tetracyklinu). BLOEMENDAAL a kol. (2010) potvrdili hypotézu horizontálního přenosu chromozomálních kazet obsahujících gen *mec* z druhu *S. epidermidis* na meticilin citlivý kmen *S. aureus* a vznik MRSA.

Problematika výskytu a narůstající rezistence u stafylokoků, zejména u kmenů *S. aureus*, může být řešena i zavedením fágové terapie, která představuje vhodnou alternativu antibiotikové léčby (MANN, 2008). Výhodou jejich aplikace oproti antibiotikům je velmi malá pravděpodobnost vzniku rezistence, jsou vysoce specifické k cílovému kmeni hostitele, a tím nejsou nebezpečné pro přirozenou mikroflóru pacienta, jsou schopny pomnožit se v místě infekce, proto je možné aplikovat nižší dávky ve srovnání s opakovaným podáváním ATB a použití bakteriofágů nevede ve většině případů k závažným vedlejším účinkům. Navíc vývoj nových terapeuticky využitelných směsí fágů je ve srovnání s vývojem nových léčebných preparátů včetně antibiotik mnohem rychlejší a levnější (SILVER a BOSTIAN, 1993).

1. Cíl metodiky

Cílem metodiky je příprava purifikovaného fága *S. aureus* 812HI a využití jeho lytických vlastností pro jeho přímé použití nebo přípravu následného fágového koktejlu (spray, tinktura apod.) využitelného k podpůrné léčbě stafylokokových infekcí v prostředí chovu zvířat nemléčné produkce (skot, ovce, kozy, prasata) a k ošetření vemene dojeného skotu, ovcí a koz s cílem omezit šíření a přenos rezistentních kmenů *S. aureus*.

Schválení a certifikace metodiky proběhlo zavedením všech principů „Metodiky“ platných pro rok 2018.

2. Vlastní popis metodiky

Složení médií a pufrů:

Standardní médium, masopeptonový bujón (MPB): Nutrient broth 13 g/l, Yeast extract 3 g/l, Pepton 5 g/l, pH 7,4 (Oxoid)

Optimalizované médium: Trypton 5 g/l, Yeast extract 2 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4

Fágový pufr: 50 mM Tris-Cl, 10 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 8

Příprava fágového lyzátu:

1. Propagační kmen *Staphylococcus aureus* CAPM6630 (Sbírka zoopatogenních mikroorganismů; Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno) kultivujeme na krevním agaru (Labmediaservis, ČR) při 37°C po dobu 18 h. Následně naočkujeme plnou baktetriologickou kličku (1 µl) do 20 ml tryptonového média (Trypton 5 g/l, Yeast extract 2 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4) a kultivujeme staticky při 37 °C po dobu dalších minimálně 18 hodin.
2. Do dvoulitrové Erlenmeyerové baňky připravíme tryptonové médium o objemu 500 ml (tj. 1/4 objemu baňky) a inokulujeme 20 ml připravené kultury z bodu 1.
3. Kultivujeme za intenzivní aerace na třepačce (150 RPM) při 37 °C do OD₆₀₀= 0,3-0,4. Při použití optimalizovaného minimálního média může dojít k prodloužení času kultivace.
4. Po dosažení požadované OD přidáme k rostoucí bakteriální kultuře 50 ml 0,02M CaCl₂ a 50 ml fágového lyzátu o minimálním titru 5×10⁸ (ideálně však 5×10⁹).
5. Pokračujeme v kultivaci za intenzivní aerace při 37 °C do pročeření bakteriální kultury na OD₆₀₀<0,09. Pokud po 3 hodinách nedojde k pročeření, kultura se umístí do lednice a nechá se stát 12 hodin. Po této době by měla být již pročeřená.
6. Takto připravený fágový lyzát se centrifuguje při 6000×g po dobu 30 minut a supernatant se poté přefiltruje přes 0,45 µm filtr s polyethersulfone (PES) membránou.
7. U filtrovaného fágového lyzátu se stanoví titr fága na dvouvrstevném agaru.

Titrace fágového lyzátu:

Stanovení titru fágových částic vychází z ověřeného předpokladu, že z 1 životaschopné fágové částice vyrůstá 1 plaka. Fágový lyzát je třeba ředit, aby se plaky po nárůstu nepřekrývali a šlo je spočítat. Titry se provádí na 3 miskách od každého ředění, aby se odhalila případná chyba v provedení, výsledné počty se zprůměrují. Výsledek se uvádí v PFU/ml (plaque forming units).

1. Připraví se ředící řada fága od neředěného vzorku až po ředění 10^{-9} , nebo dle očekávaného výsledku. Do 900 ml bujónu se přidá 100 ml lyzátu, promíchá se a vymění se špička. Novou špičkou se přenese 100 ml ředěného lyzátu do 900 ml bujónu. Takto se pokračuje až do ředění 10^{-9} .
2. Do zkumavky s 0,7% MP agarem vytemperovaným na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se přidá $100\text{ }\mu\text{l}$ $0,02\text{ M}$ CaCl_2 , $100\text{ }\mu\text{l}$ noční 18h bakteriální kultury a $100\text{ }\mu\text{l}$ příslušného ředění fága. Agar se rovnoměrně vylije na misku s MPA.
3. Z každého ředění se připraví 3 misky a kultivují se dnem vzhůru při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 18 hodin.
4. Z misek na kterých je 20 – 200 pla se počítá výsledný titr fága. Plaky na miskách se spočítají, udělá se průměr z 3 misek.

Titř se spočítá následně: $\text{PFU} = \text{počet plak} \times \text{ředění fága} \times 10$

Purifikace fága pomocí tangenciální průtokové filtrace (TFF):

Pro zkoncentrování fágových částic a odstranění bakteriálních zbytků a růstového média se využívá ultrafiltrace (tangenciální průtoková filtrace) na ultrafiltračních kazetách millipore Pellicon XL 50 s využitím peristaltické pumpy Thermo scientific FH100. Pro fága 812H1 z čeledi *Myoviridae* je vhodné kvůli jeho velikosti používat membránu s porozitou 500 kDa, kdy fág zůstává v retentátu a částice s velikostí nižší než 100 kDa jsou odstraněny. Na ultrafiltrační kazetku připojíme adekvátní silikonové hadičky dle návodu výrobce.

1. Ultrafiltrační kazetu Pellicon XL 50 (cut off 500 kDa) promyjeme od hydroxidu sodného vodou a ekvilibrujeme kultivačním médiem.
2. Fágový lyzát (500 – 1000 ml) nalijeme do sterilní GL lahve s průchodkou na silikonovou hadičku, která směřuje do peristaltické pumpy a je napojena na ultrafiltrační kazetku do vstupu označeného “feed“.
3. Hadička vedoucí z kazetky pellicon XL50 z výstupu “perm“ je vyvedena do GL lahve s odpadem a hadička z výstupu “ret“ je zavedena přes průchodku zpět do lahve fágovým lyzátem.
4. Po zapojení systému se spustí peristaltická pumpa, kdy je rychlost průtoku nastavena na 40-50 ml/min.
5. Po zkoncentrování lyzátu na $\frac{3}{4}$ původního objemu doplníme na původní objem fágovým pufrem, tento krok provedeme $3\times$.
6. Poté lyzát koncentrujeme na $\frac{1}{2}$ objemu a znovu doplníme na původní objem, tento kro opakujeme $2\times$

7. Lyzát zkoncentrujeme na 1/10 objemu a doplníme fágovým pufrém na ½ původního objemu. Tento krok opakujeme 2x.
8. Pokračujeme v koncentrování do finálního požadovaného objemu. Vzorek se poté přefiltruje přes 0,45 µm filtr s polyethersulfone (PES) membránou. Koncentrace fága se ustanoví titrací na dvouvrstevném agaru a sterilita se ověří výsevem na misku.
9. Uskladnění lyzátu pro následné použití nebo distribuci v lednici při teplotě 4 °C. Maximální doba expirace nebo použitelnosti byla ověřena na 6 měsíců od data výroby.

3. Srovnání novosti postupů

Pro bezpečné použití bakteriofágových přípravků v klinické veterinární praxi je důležité minimalizovat živočišné produkty v kultivačních médiích, ale zároveň zachovat růstové vlastnosti bakterie a fága. K tomuto účelu bylo původní pomnožovací médium, MPB (Nutrient broth 13 g/l, Yeast extract 3 g/l, Pepton 5 g/l, pH 7,4 Oxoid) nahrazeno optimalizovanou tryptonovou půdou (Trypton 5 g/l, Yeast extract 2 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7,4).

Pro bezpečnost finálního přípravku je také nutná detailní charakterizace jak fága, tak hlavně pomnožovacího bakteriálního kmene. Pro přípravu byla využita mutanta fága 812 se širším rozmezím hostitele než původní fága a pro pomnožení byl vybrán kmen *S. aureus* CAPM6630. Genom fága 812h1 o velikosti 142 150 obsahuje 219 predikovaných kódujících sekvencí (CDS) a 3 geny pro tRNA. Jeho genom neobsahuje geny pro faktory virulence, antimikrobiální rezistence, ani geny umožňující lyzogenii či lyzogenní konverzi. Fág 812h1 lyzoval ze souboru 186 meticilin-rezistentních kmenů *S. aureus* 89,25 % z nich, což ve srovnání s fágem 812 představuje rozšíření hostitelského spektra o 33 %. K pomnožení fága sloužil veterinární kmen *Staphylococcus aureus* CAPM6630 (MLST ST6, *spa*-typ t304) bez obsahu profágů a plazmidů, díky čemuž je minimalizována možnost horizontálního přenosu genů do genomu fága 812h1.

Pokud není možnost mít kultivační médium bez živočišných, nebo nevyhovujících komponent, případně najít vhodný pomnožovací kmen, který neprodukuje nežádoucí proteiny, je nutné fágový lyzát purifikovat. Existuje několik postupů purifikace fágových lyzátů a to purifikace v hustotním gradientu chloridu cesného, srážení polyethylenglykolem, purifikace na iontoměničových kolonách za pomoci kapalinové chromatografie a ultrafiltrace (tangenciální průtoková filtrace) (BONILLA, 2016, STVERAKOVA, 2018). Každá z těchto metod má svá specifika a limity. Při purifikaci pomocí centrifugace v gradientu chloridu cesného dochází

k vysokému stupni purifikace, ale tento způsob nelze využít pro větší objemy, které jsou nutné pro průmyslovou produkci. Další možností je purifikace pomocí kapalinové chromatografie na iontoměničových kolonách (ADRIAENSSENS, 2012), kde lze purifikovat větší objemy a lze dojít i k dobrému přečištění produktu. Tato metoda ovšem není univerzální a její optimalizace je časově náročná. Navíc někdy sice dochází k odstranění naprosté většiny zbytků bakterií, ale může se stát, že některé toxiny mohou mít podobný náboj jako fágy a nemusí být zcela odstraněny z finálního produktu. Pro odstranění zbytků kultivačního média a také případných bakteriálních toxinů je nejvhodnější metodou purifikace pomocí tangenciální průtokové filtrace (TFF). Při použití ultrafiltrační kazety s "cut off" 500 kDa dochází k odstranění velkých proteinů, tedy i bakteriálních toxinů, ale fágy zůstávají v koncentrátu. Tato metoda je vhodná jak díky své velkoobjemové kapacitě, tak kvůli odstranění bakteriálních toxinů (BONILLA, 2016, STVERAKOVA, 2018).

4. Popis uplatnění

Efektivní léčba a prevence bakteriálních infekcí nepředstavují jen významný ekonomický přínos, ale především se zde jedná o tolik potřebné snížení spotřeby antibiotik v zemědělské prvovýrobě a tím omezení rozvoje antibiotické rezistence bakteriálních kmenů. Metodika může být uplatněna pro přímé použití nebo výrobu alternativních léčivých přípravků využitelných následně v chovech hospodářských zvířat, a to pro zlepšení a udržení zdravotního stavu stáda a pro zamezení ekonomických ztrát. Bude přínosná pro zefektivnění léčby bakteriálních infekcí, která povede k redukci rizik a výskytu kmenů *S. aureus* rezistentních k antibiotikům a ke zlepšení a zajištění zdraví a welfare zvířat, zdravého chovu, udržitelné produkce v chovech zvířat s cílem redukce bakteriálních infekcí a spotřeby antibiotik.

Lze konstatovat, že cílovou skupinu uživatelů metodiky představují jednak kromě chovatelů hospodářských zvířat, také komerční laboratoře se zaměřením na aplikovanou mikrobiologii, klinická veterinární i humánní diagnostika, výzkumné ústavy, vysoké školy apod.

Konkrétním uživatelem Metodiky je Bentley Czech, s.r.o. jako producent finálního přípravku a ZD Jeseník jako konečný uživatel přípravku, jejichž zájem je doložen smlouvou o uplatnění metodiky.

5. Ekonomické aspekty

Odhad nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice

Odhad nákladů pro laboratorní zavedení metodiky je pro uživatele disponujícího laboratorním vybavením pro mikrobiologii poměrně nízký, a to i za předpokladu užití popsání vybavení.

Lze jej tak odhadnout na cca 150 tis. Kč, včetně laboratorního zavedení metodiky. Pro průmyslovou výrobu purifikovaného fágového lyzátu jsou však náklady vyšší z důvodu dedikovaného vybavení pro výrobu většího množství purifikovaného lyzátu, zavedení příslušných postupů QC pro výrobu i výstupní kontrolu samotného výrobku, laboratorní kapacity a nutných lidských zdrojů. Za předpokladu výroby 3 l purifikovaného přípravku týdně je nutno počítat s polovičním úvazkem (laborant, QC manager). Náklady pro zavedení metodiky v tomto případě lze odhadnout na min. 500 tis. Kč.

Odhad ekonomického přínosu

Přímí uživatelé výsledků (chovatelé) z oblasti zemědělství využijí výsledky projektu k odstranění ekonomické zátěže v podobě více nákladů, což se pozitivně odrazí na konkurenceschopnosti těchto subjektů a tím nárůstu jejich tržeb. Při rozšíření stafylokokých infekcí v prvovýrobě mléka lze ekonomický přínos pro konkrétního uživatele výsledků metodiky (chovatele) odhadnout a s ohledem na vyluku mléka s podezřením na mastitidní infekci mléčné žlázy, náklady na léčbu a veterinárního lékaře až na částku cca 150 tis. Kč ročně pro podnik s chovem cca 300 ks krav.

Při implementaci a zavedení rutinního výrobního postupu tak, jak je popsáno v kapitole 5. (odhad nákladů), je při určení finální ceny produktu – purifikovaného fágového lyzátu – nutno počítat s vyšší vstupních investic a s náklady spojenými s výrobou. Jedná se nepochybně o výrobek s vysokou přidanou hodnotou a vysokými nároky na výrobní QC management, na druhé straně se jedná o výrobek, který by měl být alternativou pro antibiotickou léčbu stafylokokových infekcí, kde jsou ve vysoké míře používána antibiotická léčiva vyráběná v obrovských množstvích průmyslově. Vzhledem k provedeným pokusům se stabilitou fágového lyzátu a jeho účinností proti různým patogenům, je nutné také uvažovat nevýhody pro spotřebitele spojené se skladováním a aplikací lyzátu, případně přípravků s jeho obsahem. Jako konkurenceschopná, vzhledem k nákladům, předpokládanému objemu výroby u uživatele metodiky a výše uvedenému, se tak jeví cena cca 5500 Kč či ekvivalent v cizí měně pro 1 l purifikovaného fágového lyzátu.

Ekonomický přínos pro uživatele metodiky zabývajících se výrobou popsaného přípravku by tak bylo možné odhadnout na cca 100 – 150 tis. Kč ročně při pesimistickém objemu výroby 3 l purifikovaného lyzátu týdně. Tento odhad je možné navýšit objemem výroby (do vyhovujícího množství lidských a laboratorních zdrojů), případně produkcí výrobků s obsahem fágového lyzátu, určených pro konkrétní praktický účel v zemědělské praxi, s vyšší přidanou hodnotou a nižšími výrobními náklady.

6. Seznam použité literatury

- ADRIAENSSENS E. M., LEHMAN S. M., VANDERSTEEGEN K., VANDENHEUVEL D., PHILIPPE D. L., CORNELISSEN A., CLOKIE M. R., GARCÍA A. J., DE PROFT M., MAES M., LAVIGNE R. (2012): CIM(®) monolithic anion-exchange chromatography as a useful alternative to CsCl gradient purification of bacteriophage particles. *Virology*, 434(2):265-70.
- BLOEMENDAAL A. L. A, BROUWER E. C., FLUIT A. C. (2010): Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *Plos ONE*, 5: 1–5. DOI: 10.1371/journal.pone.0011841.
- BONILLA N., ROJAS M. I., NETTO FLORES CRUZ G., HUNG S. H., ROHWER F., BARR J. J. (2016): Phage on tap-a quick and efficient protocol for the preparation of bacteriophage laboratory stocks. *PeerJ*, 4, e2261. <http://doi.org/10.7717/peerj.2261>.
- CARBON C. (2000): MRSA and MRSE: is there an answer? *Clin. Microbiol. and Inf.*, 6: 17–22.
- BLOEMENDAAL A. L. A, BROUWER E. C., FLUIT A. C. (2010): Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *Plos ONE*, 5: 1–5. DOI: 10.1371/journal.pone.0011841.
- SILVER L. L., BOSTIAN K. A. (1993): Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37 (3): 377-383.
- STVERAKOVA D., SEDO O., BENESIK M., ZDRAHAL Z., DOSKAR J., PANTUCEK R. (2018): Rapid Identification of Intact Staphylococcal Bacteriophages Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Viruses*, 2018 Apr; 10(4): 176.
- VYLETĚLOVÁ M., HANUŠ O., KARPIŠKOVÁ R., ŠŤÁSTKOVÁ Z. (2011): Occurrence and antimicrobial sensitivity in staphylococci isolated from goat, sheep and cow's milk. *Acta. univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 3: 209-214.
- WAAGE S., BJORLAND J., CAUGANT D. A., OPPEGAARD H., TOLLERSRUD T., MORK T., AARESTRUP F. M. (2002): Spread of *Staphylococcus aureus* resistant to penicillin and tetracycline within and between dairy herds. *Epidemiol. Inf.*, 129: 193–202.

7. Seznam publikací, které předcházely metodice

Jimp

VARGA M, PANTŮČEK R, RŮŽIČKOVÁ V, DOŠKAŘ J. Molecular characterisation of a new efficiently transducing bacteriophage identified in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of General Virology* 2016; 97(1):258-268.

KLIMEŠOVÁ M, MANGA I, NEJESCHLEBOVÁ L, HORÁČEK J, PONÍŽIL A, VONDRUŠKOVÁ E. Occurrence of *Staphylococcus aureus* in cattle, sheep, goat, and pig rearing in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*, 2017, 86: 3–10.

TEGEGNE HA, KOLÁČKOVÁ I, KARPÍŠKOVÁ R. Diversity of livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2017, 10 (9): 929-931.

BOTKA T, RŮŽIČKOVÁ V, SVOBODOVÁ K, PANTŮČEK R, PETRÁŠ P, ČEJKOVÁ D, DOŠKAŘ J. Two highly divergent lineages of exfoliative toxin B-encoding plasmids revealed in impetigo strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2017, 307: 291–296.

Jrec

KOLÁČKOVÁ, I., GELBÍČOVÁ, T., KLIMEŠOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ R. Metcilin rezistentní *Staphylococcus aureus* u jatečných zvířat v ČR. *Veterinářství*, 2016, 66 (12): 907-910.

KLIMEŠOVÁ M, HANUŠ O, NEJESCHLEBOVÁ L, VONDRUŠKOVÁ E. Koaguláza-negativní stafylokoky v nosní sliznici krav. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 2017,164, 28 (5): 1-4.

D

DOSKAR J, VARGA M, KOLACKOVA I, KARPISKOVA R, MASLANOVA I, RUZICKOVA V, PANTUCEK R. Comparison of the lytic effect of staphylococcal polyvalent bacteriophages on *Staphylococcus aureus* strains from veterinary settings. *Journal of Targeting Infectious Diseases*, Vol 1, No 1 (2016). doi: 10.18143/JTID/2016/V1/I1. Abstract from Phage Therapy World Congress 2016, 2.-3.6. 2016, Paris.

O – ostatní

BENEŠÍK M., PANTŮČEK R. Nové přístupy ve fágové terapii. Seminář Československé společnosti mikrobiologické, Regionální pobočka v Brně, Mikrobiologický ústav LF MU a FN u svaté Anny v Brně 14. 5. 2015.

PANTŮČEK R. Naděje léčby stafylokoků jménem bakteriofág. Seminář Československé společnosti mikrobiologické a Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS J. E. Purkyně, Praha, 24.9.2015.

DOŠKAŘ J., VARGA M., ZOUHAROVÁ M., BOŠTÍK J., MOŠA M., BENEŠÍK M., PANTŮČEK R. Mechanisms of insensitivity of *Staphylococcus aureus* strains to Twort-like bacteriophages. Bacteriophages as tools for therapy, prophylaxis and diagnostics, Abstract Book p. 39, October 19-21, 2015, Eliava Biopreparations Ltd., Tbilisi, Georgia.

KLIMEŠOVÁ M, HANUŠ O, NEJESCHLEBOVÁ L, NEJESCHLEBOVÁ H. Occurrence of resistant *Staphylococcus* spp. strains in animal rearing. In proceedings, The IRES – 97th International conference on Food Microbiology and Food Safety (ICFMFS) 25. – 26. 6. 2017, Hanoi (Vietnam), p. 1-3, ISBN 978-93-86083-34-0.

DOŠKAŘ J, BOTKA, T, BENEŠÍK M, KARPÍŠKOVÁ R, RŮŽIČKOVÁ V, KOLÁČKOVÁ I, PANTŮČEK R. Collection of staphylococcal polyvalent bacteriophages suitable for phage therapy exhibiting broad lytic host-range on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. In abstract book 15th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 13. - 21. 7. 2017, Singapore, p. 32.

MAŠLAŇOVÁ I, ZEMAN M, INDRÁKOVÁ A., J. DOŠKAŘ J, PANTŮČEK R. Characterization of novel *Staphylococcus sciuri* bacteriophages participating in interspecies plasmid transduction, and packaging *mecA* gene. In abstract book 1st German Phage Symposium, 8.- 13. 10. 2017, Hohenheim (Germany), p. 66.

DOŠKAŘ J, BOTKA T, KARPÍŠKOVÁ R, KOLÁČKOVÁ I, MAŠLAŇOVÁ I, RŮŽIČKOVÁ V, PANTŮČEK R. Spontaneous mutants of staphylococcal polyvalent bacteriophages with broad lytic host-range on *Staphylococcus aureus* strains are suitable for phage therapy. In abstract book 1st German Phage Symposium, 8.- 13. 10. 2017, Hohenheim (Germany), p. 87.

PANTŮČEK R, MAŠLAŇOVÁ I, STRÍBRNÁ S, DOŠKAŘ J. High-frequency plasmid transduction to phage-insensitive recipient strains of *Staphylococcus aureus*. In abstract book 1st German Phage Symposium, 8.- 13. 10. 2017, Hohenheim (Germany), p. 65.

MAŠLAŇOVÁ I, INDRÁKOVÁ A., ZEMAN M, J. DOŠKAŘ J, PANTŮČEK R. Interspecies plasmid transduction mediated by a *Staphylococcus sciuri* phage. In abstract book Centennial Celebration of Bacteriophage Research, 24.- 26. 4. 2017, Institut Pasteur Paris (France), p. 108.

MAŠLAŇOVÁ I, PANTŮČEK R., JARKOVSKÝ J., ŠIBOROVÁ M., DOŠKAŘ J. Comparative analysis of antimicrobial resistance gene packaging frequencies of staphylococcal

Twort-like viruses propagated on various host strains. In abstract book Centennial Celebration of Bacteriophage Research, 24.- 26. 4. 2017, Institut Pasteur Paris (France), p. 148.

8. Dedikace na projekt

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu Ministerstva zemědělství ČR NAZV KUS QJ1510216.

9. Ostatní

Odkaz na CM

http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/cm_staf1_2018.pdf

ISBN 978-80-904348-4-4

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky

Prof. RNDr. Jiří Doškař, CSc., doc. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D., doc. RNDr. Vladislava Růžičková, CSc., Mgr. Martin Benešík, Ph.D., Mgr. Tibor Botka, Ph.D. - 70 %
doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D. - 20 %
doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D. - 10 %

Jména oponentů a organizace, která vydala osvědčení

- 1) Odborník z daného oboru: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav hygieny a technologie mléka, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno: vorloval@vfu.cz
- 2) Pracovník státní správy: MVDr. Jiří Hlaváček, SVS ČR, Slezská 7, 120 56 Praha 2: j.hlavacek@svscr.cz