

C12Q 1/70 (2006.01)

C12R 1/445 (2006.01)

C12R 1/92 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-181
(22) Přihlášeno: 31.03.2020
(40) Zveřejněno: 13.10.2021
(Věstník č. 41/2021)
(47) Uděleno: 23.11.2022
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 04.01.2023
(Věstník č. 1/2023)

- (56) Relevantní dokumenty:
DVOŘÁČKOVÁ, Milada, et al. Antimicrobial effect of commercial phage preparation Stafal® on biofilm and planktonic forms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Folia microbiologica*, 2019, 64.1: 121-126, E-ISSN: 1874-9356; OTRADOVCOVÁ, Lenka. Izolace a charakterizace mutant polyvalentního stafylokokového bakteriofága účinných proti methicilin-rezistentním kmenům *Staphylococcus aureus* [online]. Bmo, 2012 Diplomová práce. Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta; DVOŘÁČKOVÁ, M., et al. Therapeutic potential of bacteriophages for staphylococcal infections and selected methods for in vitro susceptibility testing of staphylococci. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Společnosti pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti JE Purkyne*, 2020, 69.1: 10-18, ISSN: 1210-7913, 01 Jan 2020; BENEŠÍK, Martin, et al. Comparison of two phages for potencial commercial use—genomes, host spectrum and declaration of nontoxicity. 2017, In 100th Centennial Celebration of Bacteriophage Research, Institut Pasteur, France. 2017, Konferenční abstrakt, In 100th Centennial Celebration of Bacteriophage Research, Institut Pasteur, France. 2017, ID - 1384797, <retrieved 2021-06-17>; BENEŠÍK, Martin, et al. Genomic characterization of newly isolated wide-host-range phages of *Aeromonas salmonicida*. 2019, Article in Proceedings, In Jaroslav Dziadek. 8th International Weigl Conference: HUMAN WELFARE AND INFECTIOUS DISEASES IN A NEW MICROBIOME RESEARCH ERA. 1st ed. Lodz: Grupa Medica s.c., 2019. ISBN 978-83-925769-6-9, <retrieved 2021-06-17>. WO 9957304; KR 100592693B; WO 9406931.

- (73) Majitel patentu:
MB PHARMA s.r.o., Praha 2, Vinohrady, CZ
(72) Původce:
Mgr. Martin Benešik, Ph.D., Strání, CZ
RNDr. Marek Moša, Ph.D., Mečeříž, CZ
(74) Zástupce:
Rott, Růžička & Guttman a spol., Vyskočilova
1566, 140 00 Praha 4, Michle

- (54) Název vynálezu:
**Lyofilizovaná testovací sada ke stanovení
antimikrobiální biologické účinnosti
fágových přípravků na bakterii
*Staphylococcus aureus***

- (57) Anotace:
Lyofilizovaná testovací sada na stanovení biologické antimikrobiální účinnosti fágového lyzátu na bázi mikrotitrační destičky, kde jednotlivé jamky jedné řady obsahují alespoň 50 µl lyzátu jednoho následujícího fága, uloženého ve sbírce mikroorganismů v Mnichově pod číslem DSM 33472, DSM 33473, DSM 33474, DSM 33475, DSM 33476 nebo DSM 33477, nebo jejich kombinaci, a to v desítkovém ředění v koncentracích 1×10^9 až 1×10^2 PFU/ml. Způsob stanovení biologické antimikrobiální účinnosti fágového lyzátu pomocí této lyofilizované testovací sady.

Lyofilizovaná testovací sada ke stanovení antimikrobiální biologické účinnosti fágových přípravků na bakterii *Staphylococcus aureus*

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká testovací sady obsahující lyofilizovaný fágový lyzát působící na bakterie *Staphylococcus aureus*. Sada je vhodná pro velmi citlivé testování antimikrobiální biologické účinnosti fágového lyzátu na patogenní bakterie *S. aureus* přímo u uživatele.

10

Dosavadní stav techniky

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou častým původcem onemocnění lidí i zvířat. V posledních letech jsou velkým problémem v humánní medicíně i veterinárním prostředí. Podle světové zdravotnické organizace (WHO) v souvislosti s bakteriemi rezistentními k antibiotikům zemře ročně v zemích EU 33 000 lidí. Podle současných odhadů WHO, bude v roce 2050 počet úmrtí kvůli infekcím způsobených bakteriemi rezistentními k antibiotikům vyšší než počet úmrtí způsobených rakovinným onemocněním. V rámci řešení antibiotické krize je nutné přijít s novými antimikrobiálními látkami, ale také se zcela jiným přístupem k léčbě a diagnostice bakteriálních původců onemocnění (Duval et al., 2019).

Kromě jiných možných antimikrobiálních látek jsou jednou z možností bakteriofágy a jejich použití proti bakteriím. Takzvaná fágová terapie není ničím novým a v současnosti se dostává stále více do středu zájmu lékařů a vědeckých týmů, právě v souvislosti s rezistencí bakterií k antibiotikům (Lin et al., 2017). Princip fágové terapie byl popsán již velmi dávno, ale až s rozvojem moderních mikrobiologických a molekulárně biologických metod, popisujících jak fágy, tak patogenní bakterie může být bezpečně a rychle zavedena do praxe. Ovšem přístup k léčbě bakteriálních infekcí pomocí fágů se diametrálně liší od antibiotik. Zatímco antibiotika bývají často širokospektrální a působí napříč bakteriálními rody a druhy, fágy jsou často velmi specifické a působí na konkrétní bakteriální rod, druh, případně pouze specifické bakteriální kmeny. Zatímco antibiotika lze aplikovat bez detailní znalosti bakteriálního původce onemocnění, u léčby fágy je nutná diagnostika bakterií. Detailní diagnostika se u antibiotické léčby praktikuje, až když nezaberou silná antibiotika a je třeba zjistit, zda je k některému antibiotiku bakterie senzitivní. U fágů a mixu fágů je důležitá taková diagnostika hned před začátkem léčby fágem. Jelikož se liší mechanismus působení fágů a antibiotik, je nutné modifikovat rychlé diagnostické metody podle potřeb fágové terapie.

Existuje několik lékopisných metod pro testování účinnosti antimikrobiálních látek, které jsou již rutinou v mikrobiologických laboratořích. Jedná se o difúzní metodu, kdy se antibiotikum z disku uvolňuje do okolí a eliminuje růst bakterie v přítomnosti antibiotika. Účinnost se pak sleduje dle velikosti inhibiční zóny kolem disku. V případě rezistence bakterie k antibiotiku rezistentní zóna nevzniká. Tato metoda však není dobře aplikovatelná na bakteriofágy, jelikož jsou mnohem větší než antibiotika, proto nedifundují do prostředí tak rychle.

45

Další metodou je minimální inhibiční koncentrace (MIC), kdy se stanovuje koncentrace antibiotika, která inhibuje viditelný bakteriální růst (Andrews, 2002). Posuzuje se pouhou vizuální kontrolou a není potřebný spektrofotometr. Zde se určuje minimální koncentrace antibiotika, které inhibuje růst bakterie. Koncentrace (CFU) bakterie musí být pro test jasně definována. Na obdobné bázi se určuje minimální baktericidní koncentrace (MBC), což je koncentrace, která zabrání růstu bakterií v médiu. Pro tyto metody jsou definované postupy Státním zdravotním ústavem, které využívají diagnostická pracoviště v nemocnicích a jiných institucích. Pro stanovení antimikrobiální biologické účinnosti fágových lyzátů však žádné oficiálně schválené metody neexistují a výsledky testování v jednotlivých laboratořích se tak mohou značně lišit. Metodou, která se snad blíží určení MIC u antibiotik, je tzv. Appelmanův test používaný od roku 1921

55

(Merabishvili et al., 2014), který se ovšem liší od stanovení MIC, tedy výsledky obou testů nelze k sobě vztáhnout. Navíc testování biologické účinnosti fágů je většinou záležitostí několika specializovaných pracovišť, která s fágy pracují. Od izolace patogenní bakterie, transportu do specializovaného zařízení a celá zpětná vazba zpět k pacientovi tak zabere velmi dlouhý časový úsek, než kdyby byla biologická aktivita testována přímo v zařízení, kde se nachází pacient.

Existuje několik metod, jak stanovit účinnost bakteriofágů na konkrétní danou bakterii. Jde o plakovou plotnovou metodu, kdy se jednotlivá ředění fága vykapávají na rostoucí bakteriální kulturu ve dvouvrstvém agaru a tím se stanovuje koncentrace bakteriofágů, tzv. plaque forming unit (PFU) (Anderson et al., 2011). Fágy se mohou na kulturu v příslušném ředění vykat, nebo jsou přidány přímo do agaru k bakteriální kultuře. Na základě počtu plak a příslušného ředění se tak počítá koncentrace životaschopných fágů, obsažených v 1 ml lyzátu. Někdy se mohou počty lišit na základě použitého růstového média, titrační bakterie atd. Tato metoda poskytne výsledek, který určí počet životaschopných fágů, ale podává jen částečnou informaci o míře antimikrobiální biologické účinnosti fága na bakterii. Pouze ze srovnání nakapání fága na více kmenů lze usoudit, jak je fág účinný. Tato metoda je však náročná na materiál, zahrnuje více kroků, v kterých lze udělat chybu, a je nutné ji na každém pracovišti optimalizovat. Ke stanovení počtu bakterií se dají použít i jiné metody jako qPCR atd., ovšem ty nepodávají informaci o tom, kolik fágů je schopných pomnožit se na hostitelské bakterii (Anderson et al., 2011).

Firmy, laboratoře a sbírky mikroorganismů často vlastní velmi specifické fágy a jejich proškolený personál zná metodiky k určení citlivosti bakterií. V takovém případě pacient či zdravotnické zařízení musí odebrat patogenní, často rezistentní bakterii a zaslat ji na testování. Jelikož nemusí fungovat specifické fágy uložené u jednoho zdroje, bakterii je vhodné rozeslat na testování na více míst. To neumožňuje rychlou a efektivní diagnostiku citlivosti bakterie k fágům. Vzhledem k velké dynamice vzniku rezistence bakterií k antibiotikům je nutná rychlá metodika na určení citlivosti bakterií k jiným antimikrobiálním látkám, kterými mohou být také bakteriofágy. Taková metodika prozatím v diagnostických laboratořích chybí a nikde nejsou dostupné fágy k testování s metodou, která by se dala rutinně využít právě v diagnostických laboratořích, nebo přímo tam, kde byly patogenní bakterie izolovány. To může být řešeno dobrým proškolením personálu nebo vhodnou testovací sadou, která půjde použít kdekoli.

Bakteriofágy, stejně jako jiný biologický materiál, nejsou v tekuté formě často dlouhodobě stabilní. Z tohoto důvodu je nutné hledat jiné varianty prodloužení expirace, tzn. použitelnosti fágových preparátů nebo jako v tomto případě testovací sady, která obsahuje fágy. Jednou z možností, jak zvýšit stabilitu fágů je lyofilizace, která obecně u proteinů a biologického materiálu zabraňuje degradaci a tím prodlužuje stabilitu.

Podstata vynálezu

Výše zmíněné nedostatky eliminuje test na určení biologické účinnosti fágů působících proti bakterii *S. aureus*. Lyofilizované fágy jsou obsažené v mikrotitrační destičce v různých koncentracích. Do jamek s lyofilizátem je přidáno růstové médium, pufr nebo voda o objemu 50 až 100 μ l a do těchto koncentračních řad jsou přidány bakterie o přesně dané koncentraci, podobným postupem, jenž je popsán pro aplikaci při stanovení MIC, které jsou pro diagnostické laboratoře rutinní.

Popis provedení vynálezu

Lze připravit 96jamkovou mikrotitrační destičku, kde v každé číslem označené řadě bude od A do H ředění fága od 10^9 (jamka A) do 10^2 (jamka H). Tyto koncentrace se mohou lišit, maximálně mohou být však nižší o jeden řád. Tento pokles může být způsoben ztrátou titru při lyofilizaci. Každá šarže sady však bude testována na pokles titru a přesná hodnota titru bude deklarována pro

každou šarži. Testovací sada bude obsahovat také zkumavku s lyofilizovanou bakterií, která bude senzitivní k fágům/fágům obsaženým v testovací sadě. Tato bakterie bude připravena a testována stejným způsobem jako klinický testovaný izolát a bude sloužit jako pozitivní kontrola. Destičky s lyofilizovanými fágovými lyzáty je možné skladovat v teplotě od 0 °C do 25 °C. Při nevhodném skladování může být ovlivněna aktivita, z důvodu degradace fágů.

Směsi fága a bakterie jsou pak kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 15 až 20 hodin a poté jsou vyhodnoceny výsledky právě podobně jako u MIC. Pokud je bakterie k fágu senzitivní, nedochází k zakalení vzorku u ředění až -4. Pokud je bakterie k fágu rezistentní, zůstanou všechny nebo většina jamek zakalených. U neředěného vzorku často nedochází k zákalu, to je způsobeno tím, že fág ve velké koncentraci (v řádu 10^9) inhibuje růst, i když není schopen se na bakterii pomnožit. Až když je čirý vzorek při koncentraci v řádu 10^7 (ředění na -2), lze s určitostí prohlásit, že bakterie je k fágu senzitivní. Výsledky této metody pak mohou být porovnány s působením antibiotik, jelikož byly stanoveny podobnou metodikou a mohou být k sobě vzájemně vztaženy.

Základem pro přípravu testovací sady je fágový lyzát působící proti bakteriím *S. aureus* a to konkrétně fágy MB 401, MB 402, MB 403, MB SA2, MB SA3, MB SA5 (tabulka 1) o koncentraci (titru) 1×10^9 až 1×10^{10} . Lyzát je rozředěn následovně v desítkovém ředění a rozdělen v daném množství do jedné řady mikrotitrační destičky.

Bakteriofag	Čeleď	% G+C	Velikost genomu [kbp]
MB 401	<i>Myoviridae</i>	30	179
MB 402	<i>Myoviridae</i>	30,3	140
MB 403	<i>Myoviridae</i>	30,2	142
MB SA2	<i>Podoviridae</i>	29,1	18
MB SA3	<i>Myoviridae</i>	30,3	146
MB SA5	<i>Myoviridae</i>	30,3	146

Tabulka 1: Bakteriofágy použité v testovací sadě na stanovení biologické účinnosti fágových lyzátů. „% G+C“ uvádí obsah guaninu a cytosinu.

Příprava zásobních lyzátů:

1. Do sterilní 50 ml zkumavky číslo 1 odměříme 50 ml fágového lyzátu o minimální koncentraci 1×10^9 až 1×10^{10} .

2. Do dalších 7 zkumavek (číslo 2 až 8) sterilně odměříme 45 ml tekutého sterilního SA média (Trypton 5g/l, Yeast extract 2 g/l, NaCl 5g/l).

3. Ze zkumavky číslo 1 sterilně přeneseme do zkumavky číslo 2 přesný objem 5 ml lyzátu a zkumavku číslo 2 důkladně promícháme (obrázek 1).

4. Ze zkumavky číslo 2 přeneseme sterilně do zkumavky číslo 3 přesný objem 5 ml lyzátu a zkumavku číslo 3 důkladně promícháme. Postupujeme stejným způsobem až po zkumavku číslo 8. Ve zkumavkách 1 až 7 je ve výsledku 45 ml lyzátu a ve zkumavce číslo 8 je 50 ml nejředěnějšího lyzátu.

Příprava destičky ze zásobních lyzátů

Jedna řada jamek mikrotitrační destičky obsahuje vždy jeden kmen fága v ředěních lišících se o jeden řád v řádech od 10^9 až 10^2 jdoucí za sebou vedle sebe sestupně od nejvyššího po nejnižší ředění (od jamky A v destičce po jamku H).

1. Z 50 ml zkumavky obsahující fagy o koncentraci 1×10^9 přeneseme 100 ml lyzátu do jamky A na destičce. Dalších 100 μ l lyzátu nižšího ředění desítkové řady (1×10^8) přeneseme do následující jamky v řadě č. 1.

2. Obdobně postupujeme až zaplníme všechny jamky v řadě (sloupci) č. 1 v mikrotitrační destičce. (obrázek 2).

3. Podobně můžeme připravit v rámci mikrotitrační destičky ostatní řady (2 až 12), kde může být obsaženo až 12 různých fágů, nebo testováno 12 vzorků bakterií (obrázek 2).

4. Mikrotitrační destička se umístí do lyofilizátoru a po proběhnuté lyofilizaci se stanoví titr v jednotlivých jamkách u náhodně vybraných destiček z jedné šarže.

Dva druhy bakterie (citlivá 1137 a méně citlivá-rezistentní SA A 4609 FNO) *S. aureus* bylo zaočkováno do 10 ml média a bylo kultivováno při 37 °C po dobu 18 až 24 hodin. Z takto narostlé kultury připravíme inokulum pro testování biologické účinnosti fágů. Noční kultura se nařadí na hodnotu zákalu 1 McFarland a 2 ml tohoto ředění se doplní do 20 ml médiem/fyziologickým roztokem. Tato suspenze se nalije na sterilní Petriho misku. Do suspenze se namočí sterilní špičky na multikanálové pipetě a po smočení se přenesou a omočí v mikrozkuvkách stripu nebo rozpuštěném lyofilizátu v mikrotitrační destičce. Ta se nechá kultivovat při 37 °C po dobu 12 až 18 hodin ideálně za mírného třepání. Na základě zákalu v jednotlivých jamkách destičky se poté vyhodnocuje výsledek (tabulka 2). Z výsledků je vidět patrný rozdíl v citlivosti bakterie 1137 a méně citlivého/rezistentního kmene SA A 4609 FNO.

Testování citlivé bakterie												
MB401	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
MB402	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
MB403	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
MBSA2	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
Testování mírně rezistentní bakterie												
MB401	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
MB402	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
MB403	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0
MBSA2	K-	KS	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0

Tabulka 2: testování senzitivní a rezistentní bakterie na ředění fágů MB 401, MB 402, MB 403 a MB SA2. Čísla označují ředění, K- je kontrola růstu bakterie a KS je kontrola sterility práce a lyzátu ve stripech.  je označena lyze,  velmi mírný zákal a  zákal.

Úložky fágů jsou uloženy ve sbírce organismů v Mnichově (DSMZ) dle Budapešťské smlouvy pod čísly: *S. aureus bacteriophage* MB401 = DSM 33472, *S. aureus bacteriophage* MB402 = DSM 33473, *S. aureus bacteriophage* MB403 = DSM 33474, *S. aureus bacteriophage* MBSA2 = DSM 33475, *S. aureus bacteriophage* MBSA3 = DSM 33476, *S. aureus bacteriophage* MBSA5 = DSM 33477.

Objasnění výkresů

Obrázek 1: Příklad ředění fágových lyzátu v jamkách jedné řady mikrotitrační destičky.

Obrázek 2: Příklad mikrotitrační destičky obsahující 6 kmenů fágů (tabulka 1) v různých ředěních.

Obrázek 3: Příklady výsledků testu biologické účinnosti fágových lyzátu. V případě nejistoty (může být rezistentní i senzitivní) je dobré dotestovat nakapáním.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

5

Do jamek mikrotitrační destičky pipetujeme 100 µl vhodného kultivačního média a necháme fagy rozpustit. Izolovanou kulturu bakterie *S. aureus* zaočkujeme do 10 ml média a necháme růst při 37 °C po dobu 18 až 24 hodin. Z takto narostlé kultury připravíme inokulum pro testování biologické účinnosti fágů. Noční kultura se naředí na hodnotu zákalu 1 McFarland a 2 ml tohoto ředění se doplní do 20 ml médiem/fyziologickým roztokem. Tato suspenze se nalije na sterilní Petriho misku. Do suspenze se namočí sterilní špičky na multikanálové pipetě a po smočení se přenesou a omočí v jamkách mikrotitrační destičky s rozpuštěným lyofilizátem. Destička se nechá kultivovat při 37 °C po dobu 12 až 18 hodin za mírného třepání, aby docházelo ke vzdušnění kultury. Na základě zákalu v jednotlivých zkumavkách se poté vyhodnocuje výsledek (obrázek 3). Pro přesnost výsledků je dobré provádět testování biologické účinnosti ve 3 paralelních experimentech.

Příklad 2

Izolovanou kulturu bakterie *S. aureus* zaočkujeme do 10 ml média a necháme růst při 37 °C po dobu 18 až 24 hodin. Do jamek mikrotitrační destičky pipetujeme 100 µl vhodného kultivačního média a necháme fagy rozpustit. Z narostlé bakteriální kultury připravíme inokulum pro testování biologické účinnosti fágů tímto způsobem. Do 5 ml média (nebo fyziologického roztoku) přidáme 5 µl noční kultury. Objem 100 µl této suspenze se pak přenesou do jamek mikrotitrační destičky obsahujících rozpuštěné lyofilizované fagy. Destička se nechá kultivovat při 37 °C po dobu 12 až 18 hodin. Na základě zákalu v jednotlivých jamkách se poté vyhodnocuje výsledek (obrázek 3). Pro přesnost výsledků je dobré provádět testování biologické účinnosti ve 3 paralelních experimentech.

Příklad 3

Izolovanou kulturu bakterie *S. aureus* zaočkujeme do 10 ml média a necháme růst při 37 °C do zákalu 0,5 McFarland. Z takto narostlé kultury připravíme inokulum pro testování biologické účinnosti fágů tímto způsobem. Objem 2 ml tohoto ředění se doplní do 20 ml médiem/fyziologickým roztokem. Tato suspenze se nalije na sterilní Petriho misku. Do suspenze se namočí sterilní špičky na multikanálové pipetě a po smočení se přenesou a omočí v jamkách mikrotitrační destičky. Dříve než připravíme kulturu bakterie je nutné rozpustit lyofilizát v jamkách mikrotitrační destičky ve 100 µl vhodného média. Destička se nechá kultivovat při 37 °C po dobu 12 až 18 hodin. Na základě zákalu v jednotlivých zkumavkách se poté vyhodnocuje výsledek (obrázek 3). Pro přesnost výsledků je dobré provádět testování biologické účinnosti ve 3 paralelních experimentech.

Průmyslová využitelnost

45

Destička s různými druhy fágů (tabulka 1) bude uchovávána v lednici a v případě, že u pacienta nezabere léčba antibiotiky, otestuje se bakteriální kmen na citlivost k bakteriofágům přímo v zařízení, které bakterii izolovalo a identifikovalo.

Literatura

50

Anderson, B., Rashid, M. H., Carter, C., Pasternack, G., Rajanna, C., Revazishvili, T., Dean, T., Senecal, A., & Sulakvelidze, A. (2011). Enumeration of bacteriophage particles. *Bacteriophage*. <https://doi.org/10.4161/bact.1.2.15456>.

55

- Andrews, J. M. (2002). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf083>.
- 5 Duval, R. E., Grare, M., & Demoré, B. (2019). Fight against antimicrobial resistance: We always need new antibacterials but for right bacteria. In *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules24173152>.
- 10 Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. <https://doi.org/10.4292/wjgpt.v8.i3.162>.
- 15 Merabishvili, M., Vandenheuvel, D., Kropinski, A. M., Mast, J., De Vos, D., Verbeken, G., Noben, J. P., Lavigne, R., Vaneechoutte, M., & Pimay, J. P. (2014). Characterization of newly isolated lytic bacteriophages active against *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104853>.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Lyofilizovaná testovací sada na stanovení biologické antimikrobiální účinnosti fágového lyzátu, **vyznačující se tím**, že jednotlivé jamky jedné řady mikrotitrační destičky obsahují alespoň 50 µl lyzátu jednoho následujícího fága, uloženého ve sbírce mikroorganismů v Mnichově pod číslem DSM 33472, DSM 33473, DSM 33474, DSM 33475, DSM 33476 nebo DSM 33477, nebo jejich kombinaci, a to v desítkovém ředění v koncentracích 1×10^9 až 1×10^2 PFU/ml.

2. Testovací sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že v jednotlivých jamkách mikrotitrační destičky dále obsahuje CaCl_2 o koncentraci 0,1 až 1 mmol/l.

3. Testovací sada podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje fágový lyzát v jednotkovém ředění v rámci jednoho řádu: 1×10^9 až 9×10^9 , 1×10^8 až 9×10^8 , 1×10^7 až 9×10^7 , 1×10^6 až 9×10^6 , 1×10^5 až 9×10^5 , 1×10^4 až 9×10^4 PFU/ml.

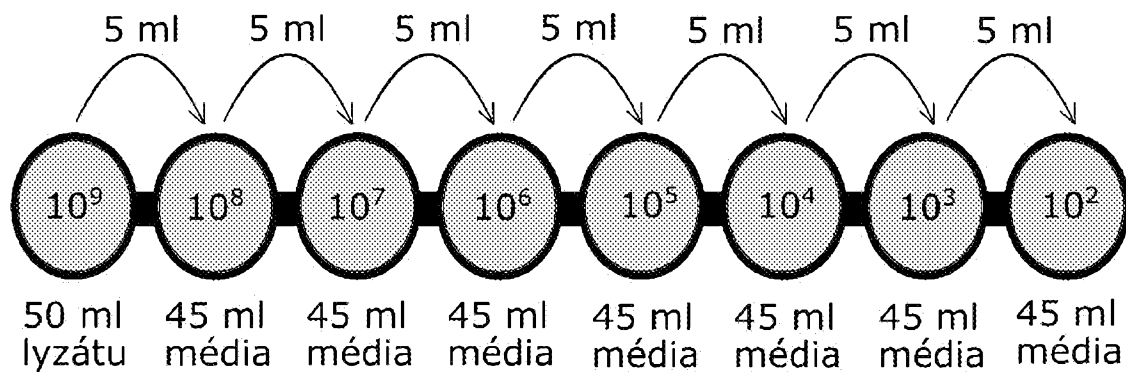
4. Testovací sada podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že je stabilní při teplotě 0 až 25 °C.

5. Testovací sada podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje bakterii *Staphylococcus aureus*.

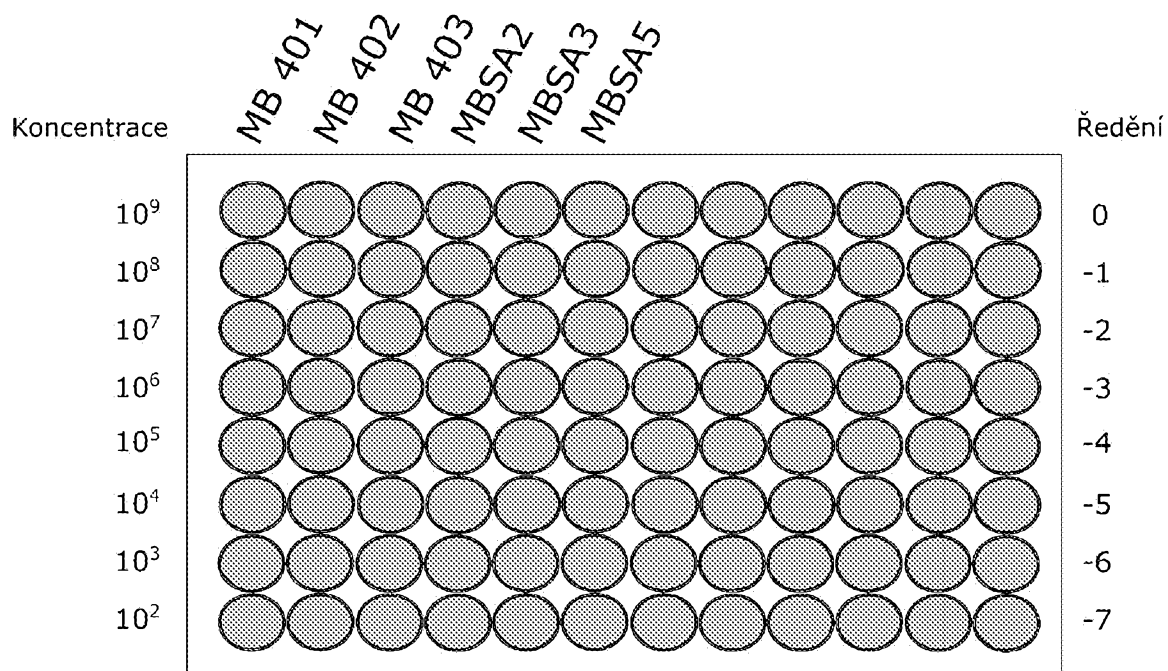
6. Způsob stanovení biologické antimikrobiální účinnosti fágového lyzátu, **vyznačující se tím**, že se testovaná bakterie inkubuje v jednotkovém ředění s lyofilizovanou testovací sadou, kde jednotlivé jamky jedné řady mikrotitrační destičky obsahují alespoň 50 µl lyzátu jednoho následujícího fága, uloženého ve sbírce mikroorganismů v Mnichově pod číslem DSM 33472, DSM 33473, DSM 33474, DSM 33475, DSM 33476 nebo DSM 33477, nebo jejich kombinaci, a to v desítkovém ředění v koncentracích 1×10^9 až 1×10^2 PFU/ml, a na základě zákalu v použitém ředění je pouhým okem vyhodnotitelná citlivost testované bakterie.

2 výkresy

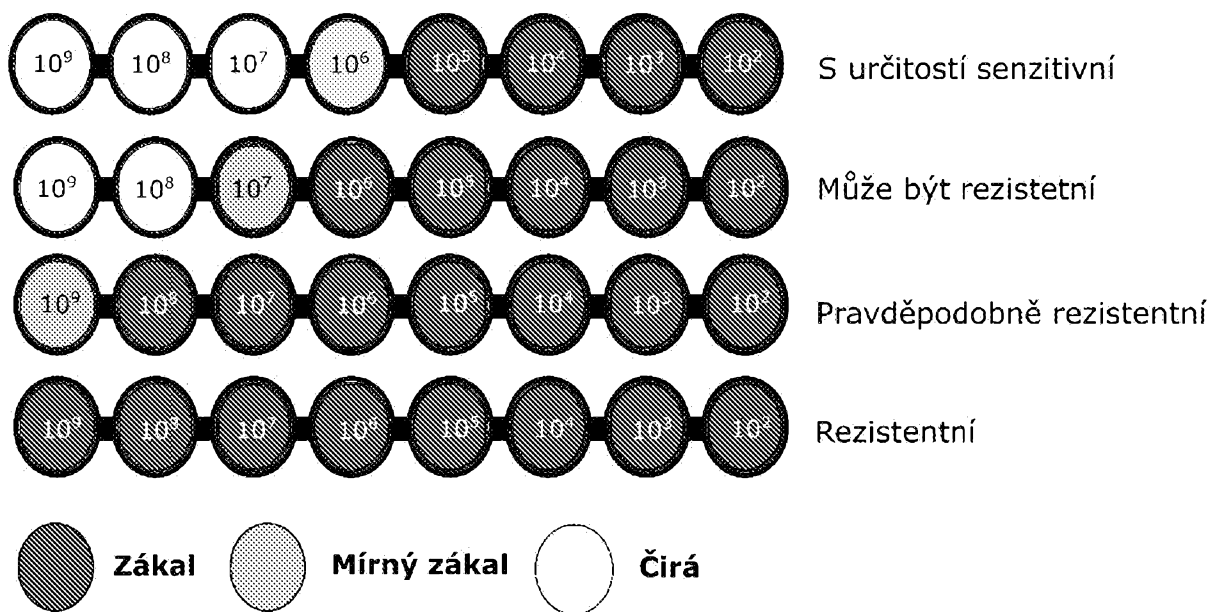
Ředění zásobních lyzátů



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3