

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.,
Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické,
Fakultní nemocnice Brno

Sborník z workshopu
15. 12. 2022



***Staphylococcus aureus* jako
původce infekčních komplikací kůže
a měkkých tkání:
současné a budoucí terapeutické možnosti**



Workshop se konal v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické
Fakultní nemocnice Brno

Pořádají

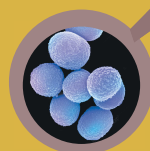
Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání:

současné a budoucí terapeutické možnosti

VUVeL



FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO



15. 12. 2022

Multimediální sál Mendelánie
Muzejní 2, Brno - Zelný trh

Workshop se v koná rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214.

Program

Workshop začíná ve 13:00

Břetislav Lipový

Současný a budoucí management infekčních komplikací u popálených pacientů

Lubomír Janda

Historie enzymové terapie

Lukáš Vacek

Teplotně stabilizované mutanty enzybiotik a jejich antimikrobiální aktivita

Filip Raška

Vývoj animálního modelu: úskalí a jejich řešení

Šárka Kobzová

Terapeutický účinek antimikrobiálních enzymových krytů při léčbě stafylokokové infekce v ranách

Lucy Vojtová

Využití biomateriálů na bázi hydrogelů jako nosičů pro antimikrobiální enzymy

Hosté

Enantis, Jan Herudek

Růstový faktor FGF2-STAB - kandidátní léčivo pro hojení chronických ran

Czechrin, Regina Demlová, Farmakologický ústav LF MU

Expertiza a portfolio činností výzkumné infrastruktury CZECHIN

Jihomoravské inovační centrum (JIC), Veronika Štěpánková,

Pomoc s přenosem inovativních technologií do praxe

Předpokládaný konec prezentací 17:00

Registrace: <https://www.vri.cz/formulare-pro-prihlaseni-na-vuvel-akce/>



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání:
současné a budoucí terapeutické možnosti



Současný a budoucí management infekčních komplikací u popálených pacientů

Břetislav Lipový

Klinika popálenin a plastické chirurgie LF MU a FN Brno

VUVeL

AKADÉMICKÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V
TĚLESNÉ FYZIOLOGII

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Stručný průvodce identifikací členů týmu



Dr. Janda

Nevím

Já



Tohle může
být kdokoliv
(mimo Editu
– Dr. Jeklová)

VUVeL

AKADÉMICKÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V
TĚLESNÉ FYZIOLOGII

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Úvod



- Lokální péče u pacientů s akutní a chronickou ranou zaznamenává dramatický pokrok. Prevalence infekčních komplikací je stále neuspokojivě vysoká.
 - Léčíme pacienty, kteří by v minulosti neměli šanci na přežití
 - Selhání pacientů při konfrontaci s PPMs
 - Nárůst rezistence patogenů
- Infekce kůže a měkkých tkání reprezentuje nejčastější infekční komplikaci vůbec (celosvětově nejúspěšnější patogen je *Staphylococcus aureus*)
 - Nárůst prevalence rezistentních kmenů (MRSA, VRSA, LR-VRSA apod.) a dále kmenů produkujících superantigeny (TSST-1, SSSS, PVL)

VUVeL

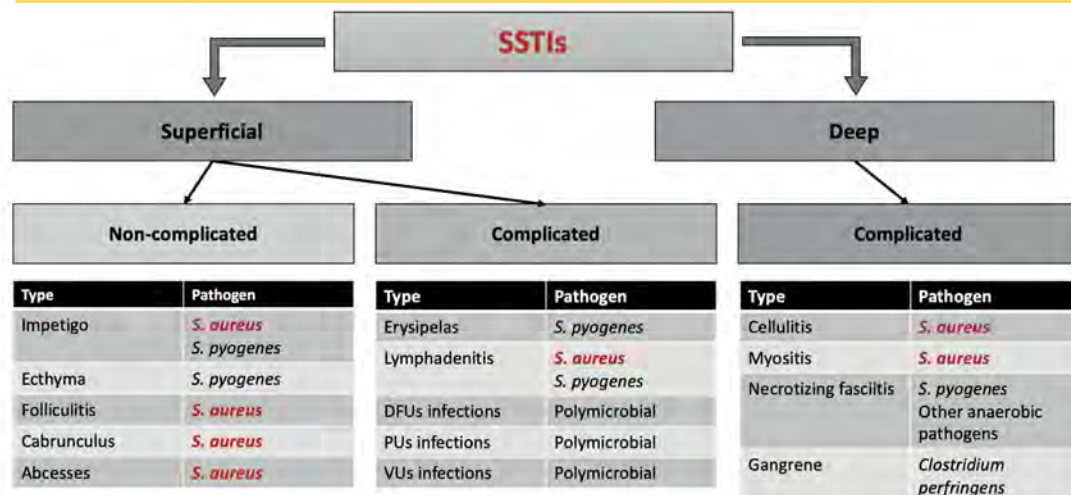
AKADÉMICKÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V
TĚLESNÉ FYZIOLOGII

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání: současné a budoucí terapeutické možnosti



Kobzová Š. et al. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2021

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání: současné a budoucí terapeutické možnosti



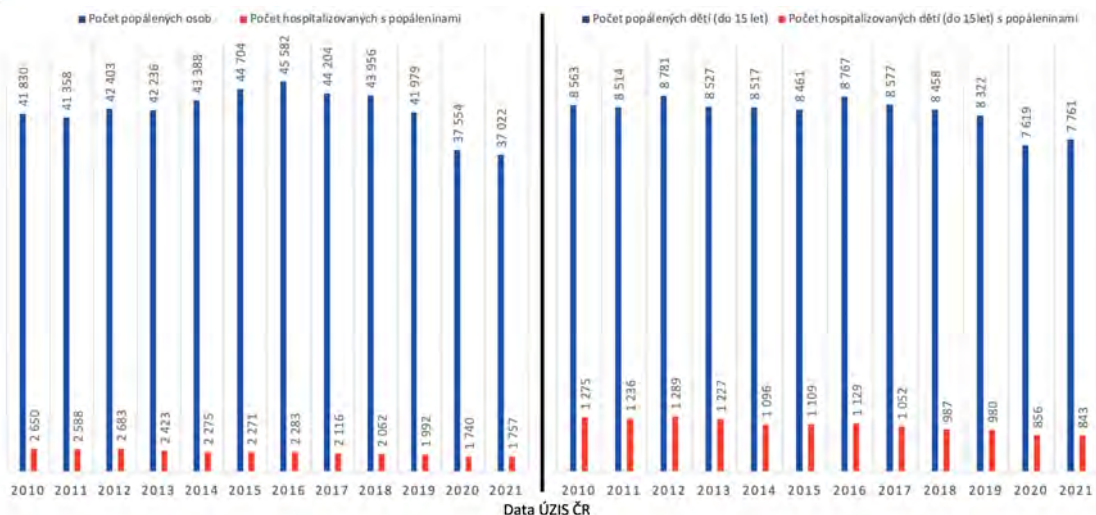
VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Epidemiologie



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Rizikové faktory pro rozvoj infekčních komplikací

Ztráta integrity kožního krytu a přítomnost
nekrózy

Imunosuprese/Imunoparalýza

Příliš vysoký nebo nízký věk

Rozsah poškození nad 20 % TBSA

Invazivní vstupy/mechanická
ventilace/"tracheostomy site infection"

Iatrogenní mutilace (donorská místa)

Další nespecifické rizikové faktory kriticky
nemocných pacientů

Komorbidita



Infekční komplikace

- Těžce a kriticky popálení pacienti jsou každodenně konfrontováni s řadou PPM
- Stejně jako u jiných skupin kriticky nemocných je i u popálených pacientů zaznamenáván nárůst rezistence PPM
- Délka hospitalizace koresponduje s rizikem rozvoje infekčních komplikací a nárůstem rezistence jednotlivých PPM

**Ze všech kriticky nemocných je délka
hospitalizace u těžce popálených
pacientů nejvyšší!**

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



„Burn-wound sepsis continuum“



„Race for the surface“
Gristina AG (1987). Biomaterial-centered infection:
microbial adhesion versus tissue integration. Science 237: 1588-1595.

Kontaminace

Kolonizace

Lokální
infekce

Systémová
infekce

Přestup PPMs z prostoru supraeschariotického přes intraeschariotický prostor do prostoru subeschariotického a dále do hlubších vrstev

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Modely infekčního kontinua u popálených pacientů

Kontaminace	
Kolonizace	
Kritická kolonizace	
Infekce : lokální systémová	
Kolonizace	Nízký počet bakterií (<10 ³ bakterií na gram tkáně) na povrchu, bez známek invaze a systémových příznaků
Lokální infekce	Počet bakterií přes 10 ⁵ bakterií na gram tkáně, lokální známky infektu, systémové příznaky nejsou přítomny
Systémová infekce	Počet bakterií přes 10 ⁵ bakterií na gram tkáně, infekční agens zastiženy také v hlubších strukturách, systémové příznaky jsou přítomny
Celulitida	Erytém a indurace v okolí popálené plochy
Nekrotizující infekce (fasciitida)	Agresivní invazivní infekce s počtem bakterií přes 10 ⁸ bakterií na gram tkáně, vysoká mortalita

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání: současné a budoucí terapeutické možnosti

Infekce popálené plochy

- 1) Kolonizace kožního defektu – bakterie jsou přítomny na povrchu defektu v malém množství, nejsou známky invazivity. <10⁵ bakterií/gram tkáně
- 2) Infekce kožního defektu – bakterie jsou přítomny ve vysoké koncentraci, nejsou známky invazivity. >10⁵ bakterií/gram tkáně
- 3) Invazivní infekce – bakterie jsou přítomny v takovém množství, aby se nešířily pouze horizontálně, ale také vertikálně do hloubky, postihují také primárně nepopálenou tkáň.
- 4) Celulitida – bakterie jsou přítomny ve vysoké koncentraci, prostupují do hlubších tkáňových struktur. Vždy jsou přítomny známky sepse.
- 5) Nekrotizující infekce/fascitiida – agresivní invazivní infekce, rychle se šířící v podkoží způsobující nekrózy.
- 6) Diagnóza
 - Objektivní (kvantitativní biopsie, kvantitativní otisková metoda, kvalitativní stěrová metoda, tkáňová histologie)
 - Subjektivní (bolest, zarudnutí, předčasné odloučení nekrotické tkáně, prohloubení popálené plochy)

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Nekrotická tkáň



Včasné odstranění nekrotické tkáně je základním stavebním kamenem v lokálním přístupu k hlubokým popáleninám (SOC – Standard of care)
Pouze tímto přístupem můžeme eliminovat včasné a pozdní komplikace vycházející s dlouhodobé přítomnosti nekrotéz v oblasti popálené plochy

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Současné možnosti odstranění devitalizované tkáně



VUVeL

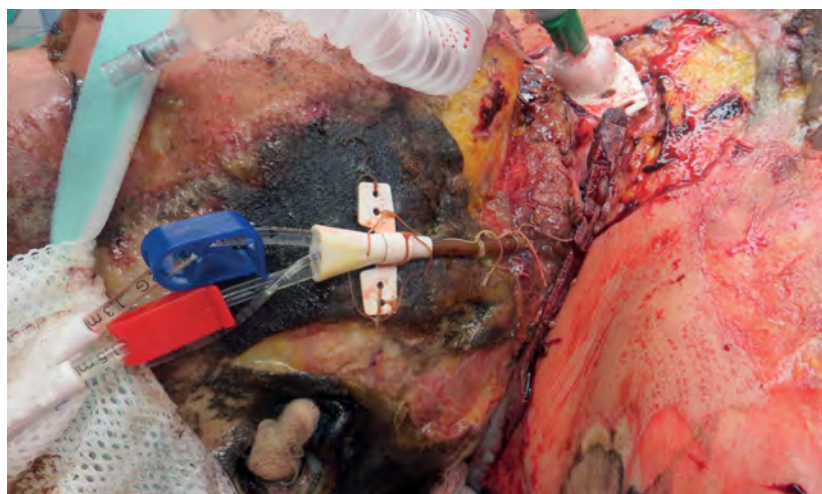
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



„Tracheostomy site infection“



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Infekce popálené plochy (klinické scénáře)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Etiologie infekce popálené plochy



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání: současné a budoucí terapeutické možnosti

Jak na terapii ???



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Antiseptika a jejich význam

- Nárůst rezistence PPM k nejrůznějším antimikrobiálním preparátům
- Redukce rizika rozvoje infekčních komplikací v oblasti porušení kožního kontinua
- SSTI (cSSTI)
- Redukce potřeby celkově podávaných antimikrobiálních preparátů

VUVeL

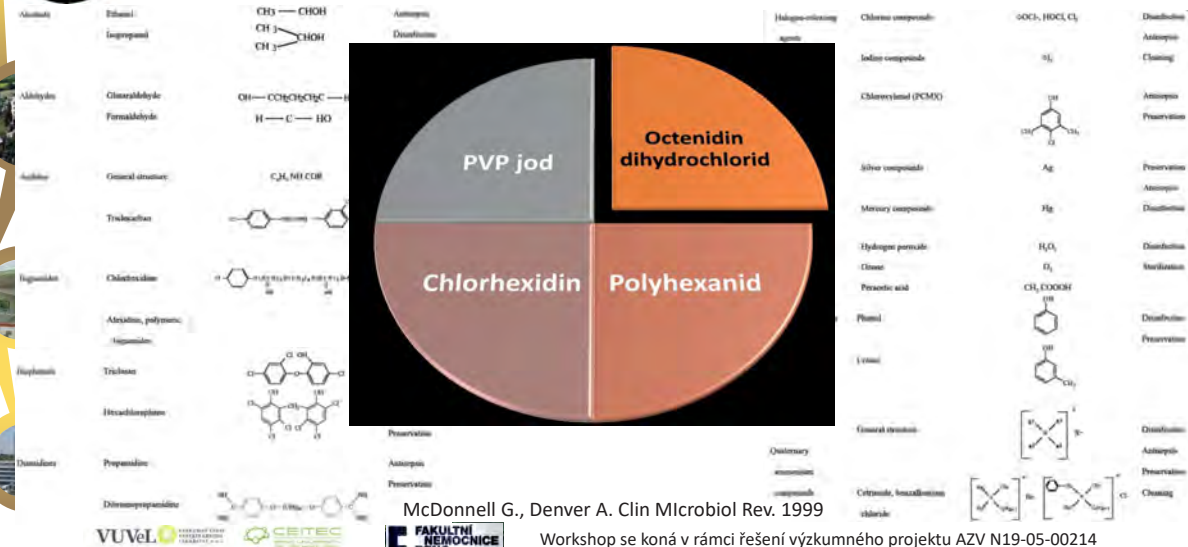
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

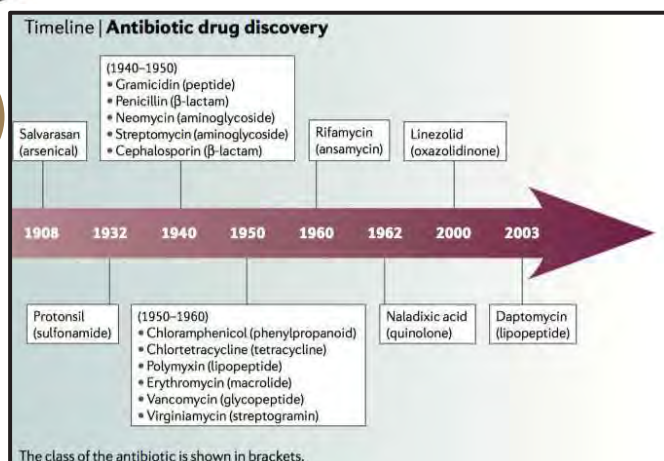
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Spektrum antiseptických a dezinfekčních prostředků



Antibiotika a jejich vývoj



2005 – Doripenem
2005 – Tigecyklin
2010 – Ceftarolin fosamil
2011 – Fidaxomycin
2014 – Dalbavancin
2014 – Ceftolozan + tazobaktam
2014 – Ceftazidim + avibaktam

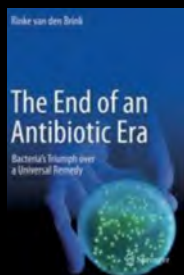
Supernová atb
„Neoglykosid“ Plazomicin (AG)
Delafloxacin (FQ)
Tedizolid (Oxazolidinon)
Eravacyklin, Omadacyklin (TTC)



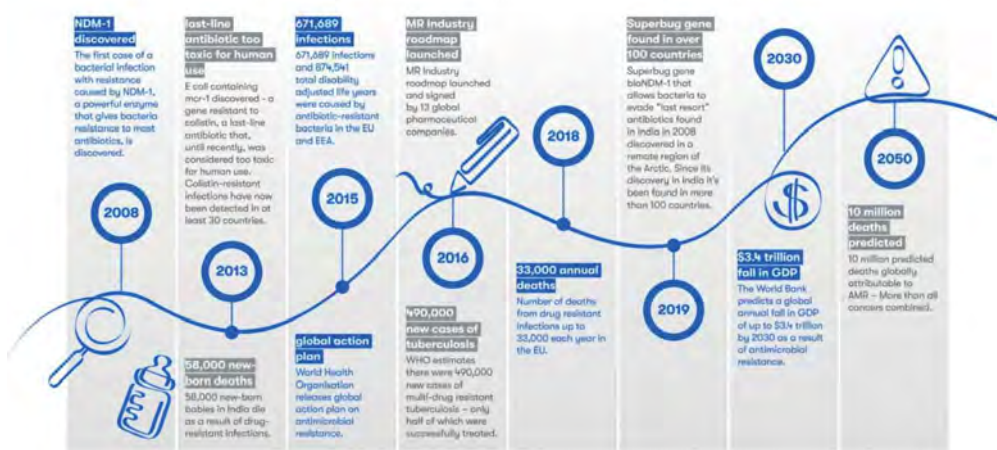
Topical antibiotics

Active substance	Trade name
chloramphenicol	Spersadex comp.
gentamicin	Belogent, Dexa-gentamicin, Garamycin Schwamm, Gentadex, Gentamicin WZF Polfa
tobramycin	Bramitob, Tobi Podhaler, Tobradex, Tobrex
neomycin	Framykoin, Pamycon, Maxitrol, Pimafucort
polymyxin	Polygynax, Maxitrol
fusidic acid	Fucidin, Fucicort
mupirocin	Bactroban
ciprofloxacin	Infalin duo
ofloxacin	Floxal, Ofloxacin unimed
levofloxacin	Ducressa, Oftaquick
moxifloxacin	Vigamox
erythromycin	Aknemycin, Zineryt
clindamycin	Acnatac, Dalacin

PDR, XDR and MDR pathogens Post-antibiotic era???



Antimicrobial resistance dynamics



<https://healthcare-in-europe.com/en/news/global-opportunity-to-tackle-antibiotic-production-waste.html>



Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Five objectives of Global action plan on resistance



- to improve awareness and understanding of antimicrobial resistance through effective communication, education and training
- to strengthen the knowledge and evidence base through surveillance and research
- to reduce the incidence of infection through effective sanitation, hygiene and infection prevention measures
- **to optimize the use of antimicrobial medicines in human and animal health**
- **to develop the economic case for sustainable investment that takes account of the needs of all countries and to increase investment in new medicines, diagnostic tools, vaccines and other interventions**

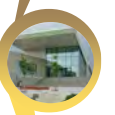
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>



Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Topické alternativy k etablovaným konceptům



ANTIMICROBIAL
PEPTIDES

ANTIMICROBIAL
ENZYMES

PHAGES

VUVeL

CEITEC

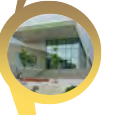
FAKULTNÍ
NEMOČNICE
BRNO

AZV NV19-05-00214 Study of therapeutic application of antibacterial wound dressing for skin and soft tissue infections in epidemiologically relevant strains of *Staphylococcus aureus* - methicillin resistant

AZV NU20-05-00166 New approaches to infected wound healing using hydrogels from Gum Karaya natural resin modified with innovative components targeted at multidrug resistant bacterial strains

AZV NU22-05-00475 Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant Bacterial Strains by Novel Antibacterial Preparations Based on Cathelicidin Antimicrobial Peptides

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



PLOS ONE

RESEARCH ARTICLE

Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in a burn unit of a tertiary care center in Ghana

Nana Ama Amisah^{1,2*}, Lieske van Dam³, Anthony Attard⁴, Ogoke Ware Ampomah¹, Isaac Pratt¹, Cecilia S. Yetteh¹, Tigo B. van der Werf¹, Alexander W. Friedrich³, John W. Rossen¹, Jan Maarten van Dijk¹, Ymkje Stillema¹

¹ Department of Internal Medicine/Infectious Diseases, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands, ² Department of Biotechnology, Noguch Memorial Institute for Medical Research, University of Ghana, Legon, Ghana, ³ Department of Medical Microbiology, University of Groningen, University Medical Center Groningen, Groningen, the Netherlands, ⁴ The Reconstructive Plastic Surgery and Burn Center, Korle Bu Teaching Hospital, Korle Bu, Ghana

* namah@nigugr.nl



Abstract

Background

In developing countries, hospitalized burn victims are at high risk of nosocomial infections caused by *Staphylococcus aureus*. Risk factors include poor infection control practices, prolonged hospitalization and limited capacity for laboratory microbiological analyses. These problems are compounded by widespread use of antibiotics that drives the spread of multi-drug resistant bacteria.

Methods

During the study period (November 2014–June 2015), nasal and invasive *S. aureus* isolates were collected consecutively from patients and healthcare workers (HCWs) within the burn unit of the Reconstructive Plastic Surgery and Burn Center of Korle Bu Teaching Hospital in Ghana. Antibiotic prescription, antibiotic susceptibility and bacterial typing were used to assess antibiotic pressure, antibiotic resistance, and possible transmission events among patients and HCWs.

Results

Eighty *S. aureus* isolates were obtained from 37 of the 62 included burn patients and 13 of the 29 HCWs. At admission, 50% of patients carried or were infected with *S. aureus* including methicillin resistant *S. aureus* (MRSA). Antibiotic use per 100 days of hospitalization was high (91.2 days), indicating high selective pressure for resistant pathogens. MRSA isolates obtained from 11 patients and one HCW belonged to the same spa-type 528 and multi-locus sequence type 250, implying possible transmission events. A mortality rate of 24% was recorded over the time of admission in the burn unit.

Conclusion

This study revealed a high potential for MRSA outbreaks and emergence of resistant pathogens amongst burn patients due to lack of patient screening and extended empirical use of

PLOS ONE
Dermatology Research and Practice
Volume 2015, Article ID e10012, 4 pages
doi:10.1371/journal.pderm.1001012

Research Article

Nosocomial Infections in Burned Patients in Motahari Hospital, Tehran, Iran

Lella Azimi¹, Abbas Motevalian², Amir Morteza Ebrahimi Zadeh Namvar¹, Babak Asghari¹, and Abdolreza Rastegar Lari¹

¹ Antimicrobial Resistance Research Center and Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, P.O. Box 14315-717, Tehran, Iran

² School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, P.O. Box 14315-717, Tehran, Iran

Correspondence should be addressed to Abdolreza Rastegar Lari, larirastegar@tums.ac.ir

Received 11 July 2014; Revised 21 September 2014; Accepted 21 September 2014

Academic Editor: Craig G. Berkhart

Copyright © 2014 Lella Azimi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Burn patients are at high risk of developing nosocomial infection because of their destroyed skin barrier and suppressed immune system, compounded by prolonged hospitalization and invasive therapeutic and diagnostic procedures. Studies on nosocomial infection in burn patients are not well described. The objective of the present study was to identify the causative bacterial of nosocomial infection and to determine the incidence of nosocomial infections and their changing during hospitalization in burned patients admitted to the Motahari Hospital, Tehran, Iran. During the second part of 2010, 164 patients were included in this study. Samples were taken the first 48 hours and the fourth week after admission in Motahari Burn hospital. Isolation and identification of microorganisms was performed using the standard procedure. Of the 164 patients, 717 samples were taken and 812 bacteria were identified. 610 patients were culture positive on day 7 while 34 (17.2%) on 14 days after admission. The bacteria causing infections were 325 *Pseudomonas*, 140 *Acinetobacter*, 132 *Staphylococcus aureus*, and 215 others. The percentage of mortality was 12%. All of patients had at least 1 positive culture with *Pseudomonas* and/or with *Acinetobacter*. Hospitals suggest continuous observation burn infections and increase strategies for antimicrobial resistance control and treatment of infections complications.

Original Article

Prevalence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) in methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from burn wound infections

Rashedul Hasan, Mrityunjay Acharyee, Rashed Noor

Department of Microbiology, Institute of Postgraduate Medical Education, Dhaka, Bangladesh

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOČNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

STAPHYLOCOCCUS AUREUS BURN WOUND INFECTION AMONG PATIENTS ATTENDING YEKATTI 12 HOSPITAL BURN UNIT, ADDIS ABABA, ETHIOPIA

Tigist Alebachew^{1*}, Gizachew Yismaw², Ayelegn Derabe³, Zufan Sisay⁴

ABSTRACT

BACKGROUND: Burns provide a suitable site for bacterial multiplication and are more persistent richer sources of infection than surgical wounds. *Staphylococcus aureus* is one of the most frequently isolated pathogens in both community and hospital practices. The objective of this study was to address the prevalence and antibiotic susceptibility patterns of *S. aureus* isolated from burn wound infections in Yekatti 12 Hospital, Addis Ababa Ethiopia.

METHODS: This study was Cross-sectional, prospective study conducted from March to May 2011. Burn wound pus sample was collected by using convenient sampling method for culture and drug sensitivity tests were performed according to the WHO standards.

RESULTS: Out of 114 patients, bacterial infection was observed in 95 (83.3%) of which, 66 (69.5%) had *S. aureus* infection. Overall prevalence of *S. aureus* isolation was 57.8%. Most of them were sensitive to vancomycin, clindamycin, Kanamycin and Erythromycin, but highly resistant to penicillin G. All isolates were found to be multi drug resistant, and one isolate was resistant to all the tested drugs.

CONCLUSION: The current study is highly important and informative for the high level of multi-drug resistant *S. aureus* isolates in burn patients. Finally, strict consideration for *S. aureus* infection and proper usage of antibiotic policy are recommended in decreasing the incidence and occurrence of multidrug resistant *S. aureus* infections in Yekatti 12 Hospitals.

KEY WORDS: *Staphylococcus aureus*, burn wound infection, drug sensitivity



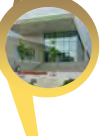
VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOČNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214






Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ajem

Available online at www.elsevier.com/locate/ajem

ELSEVIER

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ajem

Contents lists available at ScienceDirect

American Journal of Emergency Medicine

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/ajem

Case Report

Toxic shock syndrome due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection after a pediatric scald burn

Toxic shock syndrome: causes in people with burn wounds

Toxic shock syndrome (TSS) is a rare complication of colonization or infection by toxin-producing strains of *Staphylococcus aureus* and has often been associated with tampon use. Although methicillin-resistant TSS has declined over recent years, non-menstrual-associated TSS can occur in a variety of conditions including small percentage burns in children. Adults with burns are not normally at risk, but there have been a few reported cases. This article will discuss what factors are involved in the development of TSS in people with burn wounds.

STAPHYLOCOCCAL SCALDED SKIN SYNDROME DUE TO BURN WOUND INFECTION

Farroha A.,^a Frew Q., Jabir S., Dziewulski P.

^a Andrew's Centre for Plastic Surgery and Burns, Broomfield Hospital, Chelmsford, United Kingdom

SUMMARY. Introduction: The staphylococcal scalded skin syndrome is an acute exfoliation of the skin caused by exfoliative toxin A and B. Although *Staphylococcus aureus* is a common cause of burn wound infection, SSSS following burn wound infection is rare. Method: A retrospective review of all SSSS cases admitted to a regional burn service between January 2009 and January 2012 was undertaken. Results: Two cases of SSSS were reported during this time period as occurring following burn injury. The first case was a 17-month-old boy who had been hospitalized for a conservative treatment of 4% scald body surface area (TBSA) mixed depth scald burns. On day four he developed exfoliation of 35% TBSA. The second case was a six-month-old boy who sustained a 1% TBSA scald burn and was managed conservatively in the community by his general practitioner. On day five he developed exfoliation of 40% TBSA. *Staphylococcus aureus* was isolated from the burn wounds in both cases. Conclusion: These two cases show that it is vital for burn surgeons and intensive care specialists to be aware of the possibility of SSSS occurring in patients with burn injuries with its potential devastating effects.

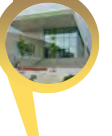
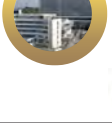
Keywords: staphylococcal scalded skin syndrome; SSSS; *Staphylococcus aureus*; burn; exfoliative toxin.





Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Diagnostika

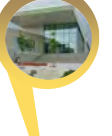
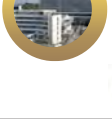
- Kvalitativní hodnocení (stěrová metoda)
- Semikvantitativní hodnocení (otisková metoda)
- QWB (počet CFU/g tkáně)



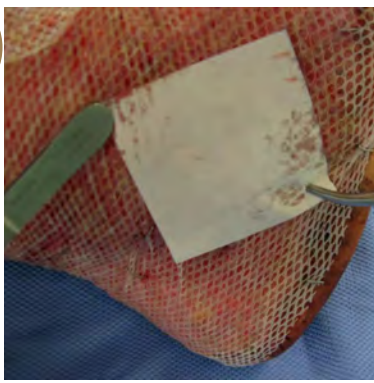
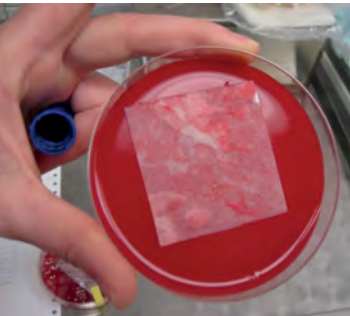


Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



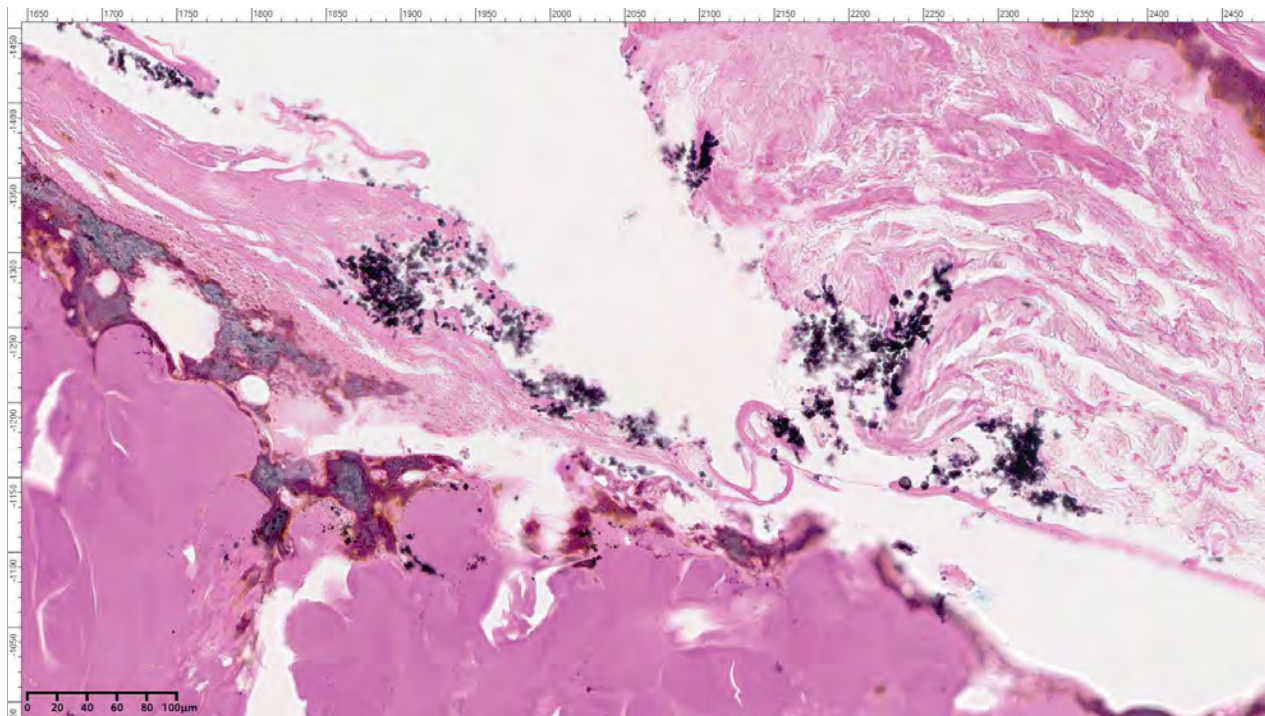
Semikvantitativní metoda hodnocení infekce






Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Manuka med a jeho aplikace





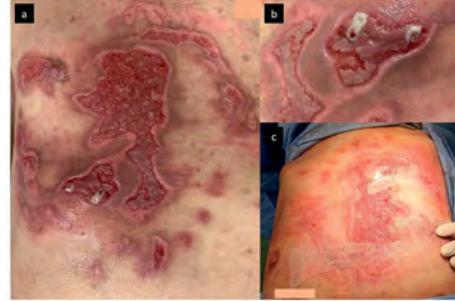
Larvální terapie vs. akcidentální myiasa

microorganisms

MDPI

Review
**Human Infections by *Wohlfahrtiimonas chitiniclastica*:
A Mini-Review and the First Report of a Burn Wound Infection
after Accidental Myiasis in Central Europe**

Martin Hladik ^{1,†}, Beetislav Lipovc ^{1,2}, Yvona Kaloudova ¹, Marketa Hamslanova ³, Ivana Vitkova ⁴,
Tereza Deissova ⁵, Tomas Kempny ¹, Martin Svoboda ^{6,†}, Zdenek Kala ⁵, Pavel Brychta ¹



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Děkuji za pozornost



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.



Sir Alexander Fleming

- V roce 1928 objevil penicilin, který způsobil revoluci v léčení infekčních nemocí.
- Už ale v roce 1922 objevil antibakteriální účinky lysozymu.

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.



Dlouhá cesta k průmyslové výrobě antibiotik?

Moderní průmyslová fermentace



- 1948

Začátky průmyslové fermentace (kyselina citronová, penicilin).

- V 50 letech 20. století.

Začíná průmyslová produkce proteinů, respektive enzymů

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

Proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.



Nebyly enzymy dlouho známy?

Endolysin

LYSIS FROM WITHOUT OF *S. AUREUS* K₁ BY THE COMBINED ACTION OF PHAGE AND VIROLYSIN*

By DORIS J. RALSTON, BEATRICE S. BAER, MIRIAM LIEBERMAN, AND ALBERT P. KRUEGER

(From the Department of Bacteriology, University of California, Berkeley)

(Received for publication, May 23, 1957)

242

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA

BBA 25:199

Lysostafin

PURIFICATION AND PROPERTIES OF LYSOSTAPHIN - A LYTIC AGENT FOR *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

CHARLES A. SCHINDLER* AND VERNON T. SCHUHARDT

Department of Microbiology, University of Texas, Austin, Texas (U.S.A.)

(Received March 24th, 1964)

VUVeL

CEITEC

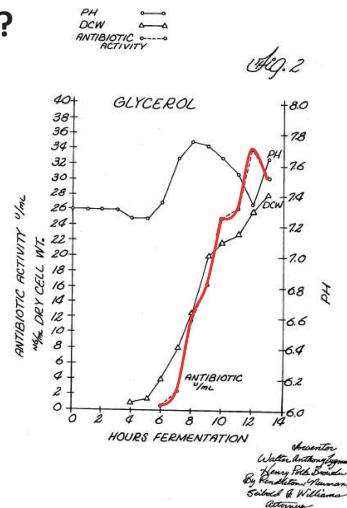
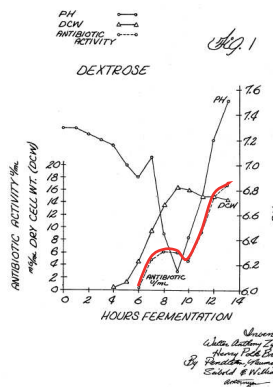
FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie aneb proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.

Nebyla dostatečná produkce lysostafinu?

3,398,056
PROCESS FOR PRODUCING LYSOSTAPHIN
BY FERMENTATION
Walter Anthony Zygmunt and Henry Foltz Browder,
Evansville, Ind., assignors to Mead Johnson & Com-
pany, Evansville, Ind., a corporation of Indiana
Filed July 10, 1964, Ser. No. 381,684
8 Claims (Cl. 195-80)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮCICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie aneb proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.

Nebyl zájem firem vyrábět antibakteriální enzymy?

- Podporovatelem snahy produkovat enzymy k léčbě stafylokokových infekcí byla společnost:
- Mead Johnson & Co., Evansville, Ind.
- Na dobrovolnících, kteří měli persistentní infekci *S. aureus* v nose byly úspěšně zkoušeny nosní kapky (Quickel et al., 1971)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮCICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie aneb proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.

Byla perspektiva antibakteriálních enzymů nedostatečná?

- V Letterman Army Medical Center, v Kalifornii zkoušeli léčit stafylokokovou sepsi podáním infúze lysostaphinu.
 - Voják v pokročilém stádiu akutní myeloidní leukémie měl *Stafylokokovou pneumonii*, s mnohačetnými abscesy a celulitidou.
 - Pacient byl léčen methicilinem, cephalotinem a vankomycinem sériově i v kombinaci po dobu třech týdnů.
 - S. aureus* detekovaný ve sputu a z abscesů byl rezistentní na methicillin a cephalotin. Byl však citlivý na gentamycin a vankomycin.
 - Antibiotická léčba byla ukončena 48 h před zkouškou.
 - Pacient dostal intravenosně 500 mg lysostafinu
 - Ještě po 4 h byla v krvi detekována koncentrace lysostaphinu 10 µg/ml.
 - Klinické vzorky jako krev, sput a abscesy byly kulturně negativní.



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮCICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

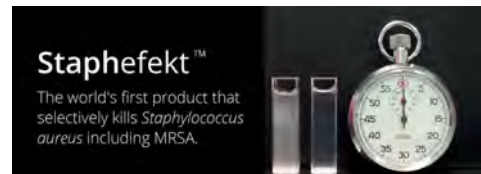
proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.

Bylo složité schválit produkt?

- Společnost Biosynex Corp. vyvinula lysostafinový krém pro nazální dekolonizaci *S. aureus*. V současné době je tento krém v 1–2 fázi klinických studií. Doposud se prokázala bezpečnost i účinnost tohoto krému.
- Patent na topickou kompozici lysostafinu ve farmaceuticky přijatelném nosiči byl podán v roce 2004.
- Na stafylokokové infekce včetně mAb nebo lysostaphinu eviduje tato firma **24 patentů**.
- Staphefekt™, vyvinutý společností Microcos, je prvním endolysinem na světě dostupným pro lidské použití na neporušenou kůži.



(19) **United States**
(12) **Patent Application Publication** (10) Pub. No.: **US 2004/0192581 A1**
Walsh et al. (45) Pub. Date: **Sep. 30, 2004**



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.

Proč se ani po sto letech nedaří uvést na trh enzymový antibakteriální preparát proti *S. aureus*?

- Antibakteriální enzymy (enzybiotika) lehce podléhají denaturaci a degradaci. Je potřeba **zvýšit jejich stabilitu** (termostabilitu) a **vylepšit jejich působení** - biobetter.
- Využít ke stabilizaci enzybiotik **kryt** – zapojit do fungování enzymů **nosičový biomateriál**.
- Většina enzymů funguje *in vitro* bezvadně. Je proto nutné testovat enzymy přímo v ráně a k tomu je potřeba **dobrý animální model**.
- Málo se při aplikacích využívá **synergii enzymů** a antibakteriálních peptidů – používat koktejly enzybiotik.

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

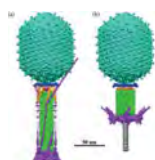
proč se nedaří dostat enzybiotika k pacientům.

Chceme použít koktail enzymů a peptidů

Endolysin



Bakteriofág Φ 812



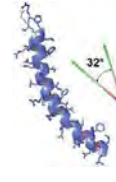
Lysostaphin



S. simulans



Catelicidin



Homo sapiens, Ovis aries, Sus scrofa



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

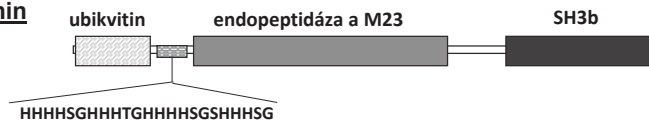
proč se nedaří dostat enzybotika k pacientům.

Maximálně chceme využít rekombinantní technologie

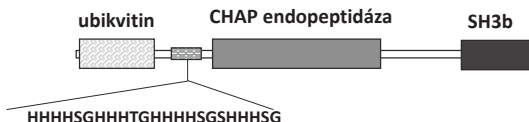
Optimalizace funkčních domén: nahrazení domén novými.

- Ubikvitin zvyšuje 20x expresi lysostaphinu i endolysinu
- His6 nahrazen His14 zlepšuje čištění proteinů

Lysostaphin



Endolysin F1



VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

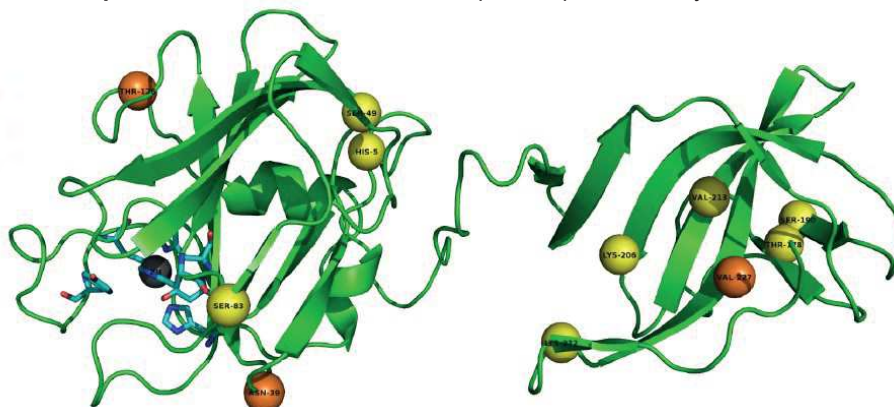
aneb

proč se nedaří dostat enzybotika k pacientům.

Maximálně chceme využít rekombinantní technologie

Optimalizace funkčních domén: zlepšení teplotní stability.

Enantis



Vliv i na trvanlivost enzymů

VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie

aneb

Změna stavu/rozpuštnosti – vliv na sklad

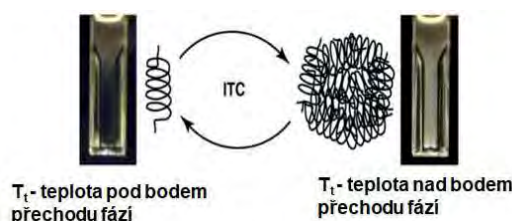
proč se nedaří dostat enzybotika k pacientům.

Maximálně chceme využít rekombinantní technologie

Optimalizace funkčních domén: zlepšení stability vůči proteázám a délce skladování.



ELP-elastinový protein



Protein fúzovaný s ELP při teplotě nižší než T_t
Protein fúzovaný s ELP při teplotě vyšší než T_t

monomerní a rozpustný
začne agregovat - nerozpustný

VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

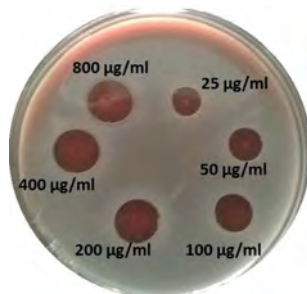
Historie a současnost enzymové terapie aneb proč se nedaří dostat enzybotika k pacientům.

Maximálně chceme využít rekombinantní technologie

Optimalizace funkčních domén: produkce elastinového proteinu v rostlinách.

endopeptidáza a M23

elastin (100 x V-P-G-V-G)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮCnice BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie aneb proč se nedaří dostat enzybotika k pacientům.

„Kick off“ meeting 30. 4. 2019



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮCnice BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

Historie a současnost enzymové terapie aneb proč se nedaří dostat enzybotika k pacientům.

Hlavním navrhovatelem AZV projektu v roce 2014 – byl MUDr. Břetislav Lipový. Pan doktor při podání návrhu neměl ani titul PhD, což bylo jedním z důvodů nepřijetí projektu.

2) Navrhovatel a spolunavrhovatelé, jejich publikační úroveň a potřebné vybavení

Navrhovatel je velmi mladým vědcem a jeho publikační aktivita zatím není příliš vysoká, spolunavrhovatelé mají

doc. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA, LL.M.

Prof. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D. et Ph.D., MBA, LL.M.

Děkuji Vám za pozornost



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮCnice BRNO

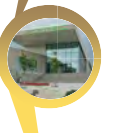
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání:
současné a budoucí terapeutické možnosti



Teplotně stabilizované mutanty enzybiotik a jejich antimikrobiální aktivita



MUNI
MED
VUVeL

CEITEC

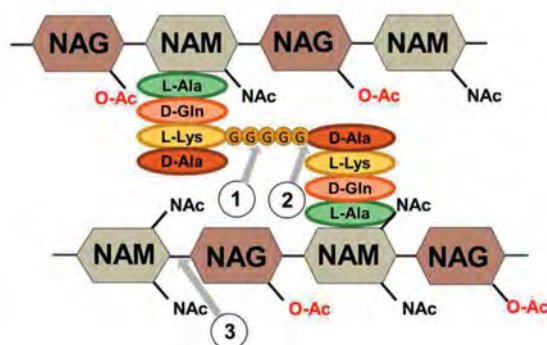
FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Endolysin T1

- rekombinantní **varianta endolysinu** LysF1 (resp. Lys K)
- **štěpení vazby D-Ala–Gly (2)**
- lysostaphin (1)
- lysozym (3)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Metodika přípravy a testování enzymů

- expresní vektor pUbEx15 (*E. coli*)
- enzymy **obsahují** tzv. **histidinovou kotvu** (His-tag) a **ubikvitinovou doménu** pro zlepšení exprese
- **separace afinitní chromatografií** (FPLC, HisTrap)
- **štěpení TEV proteázou** pro odstranění ubikvitinu
- **dialýza** do octanu amonného
- **testování antimikrobiální aktivity** na kmenech **MRSA**:
 - 90 uL bakteriální suspenze (OD600 = 0,2) + 10 uL endolysinu (finální **koncentrace 1,56 až 50 µg/mL**)
 - **kultivace** po dobu **24 hodin**, měření OD každých 5 minut

VUVeL

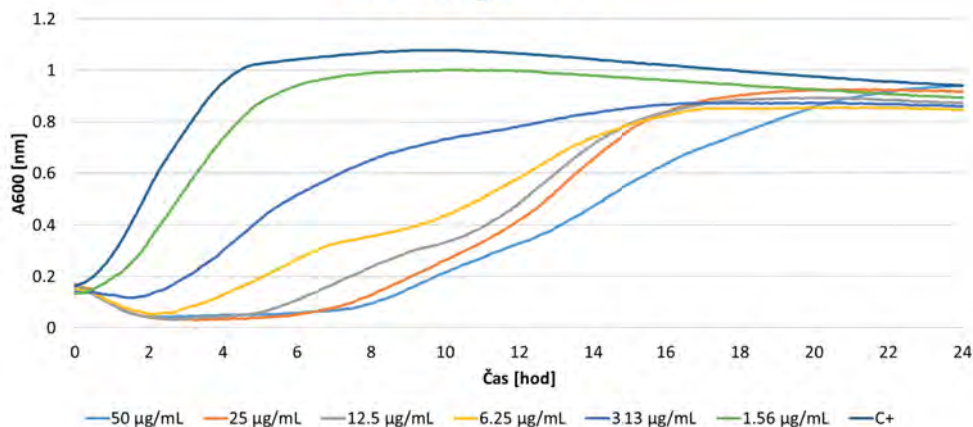
CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Endolysin F1



VUVeL

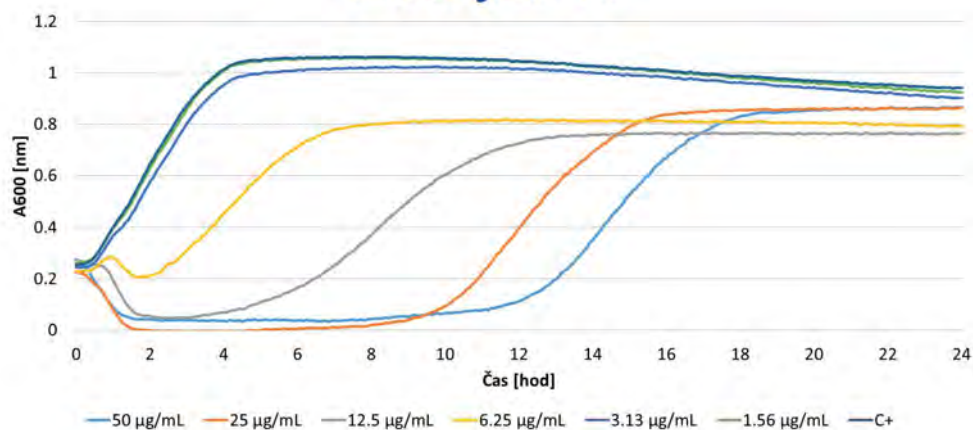
CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮČNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Endolysin T1



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮČNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Další modifikace ve struktuře endolysinu

- další mutace (endolysin T1 základ):
 - dvojnásobné: RL, SI, AP, GP
 - trojnásobné: RL+GP, RL+SI, GP+SI, GP+AP, SI+AP
- řada z nich vykazuje zlepšení stabilitních a antimikrobiálních vlastností

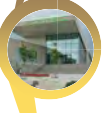


VUVeL

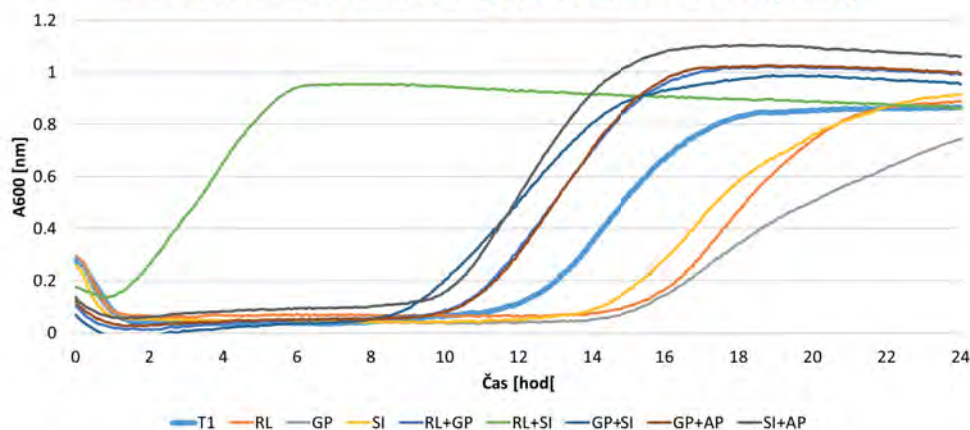
CEITEC

FAKULTNÍ NEMŮČNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Rekombinantní endolysiny (koncentrace 50 µg/mL)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Teplotně stabilizované mutanty endolysinu: závěr

- zavedení mutací ovlivňuje aktivitu endolysinů
- zlepšení teplotní stability vede k **možnosti delšího skladování** a prodloužení použitelnosti enzymu
- některé **mutace pozitivně ovlivňující teplotní stabilitu prodlužují i dobu účinku endolysinů**
- **modifikace** stávajících antimikrobiálních enzymů **mohou přispět k léčbě** rezistentních kmenů patogenů

VUVeL

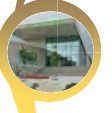
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání: současné a budoucí terapeutické možnosti



Terapeutický účinek antimikrobiálních enzymových krytů při léčbě stafylokokové infekce v ranách prasat

MUNI MED

VUVeL

CEITEC

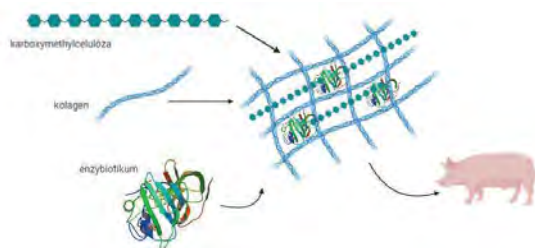
FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Enzybiotika v antimikrobiálním krytí ran

- **polymer** = směs kolagenu (0,5%) a karboxymethylcelulózy (0,7%)
- **lyofilizované kryty** – **polymer + enzymy** v roztoku – lyofilizace
- **hydrogel** – **polymer + enzymy**, aplikace injekční stříkačkou



VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Antimikrobiální aktivita hydrogelu s enzybiotiky



CMC, kol. bez proteinů



CMC, kol. + lysostafin (40 µg/mL)



CMC, kol. + lysostafin (40 µg/mL)

VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

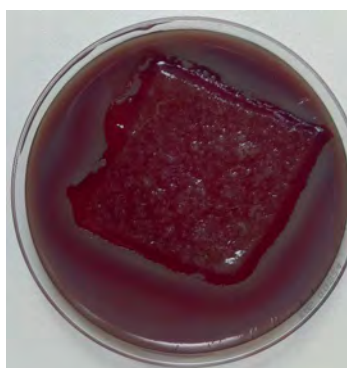
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Antimikrobiální aktivita lyofilizovaných krytů



VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Časové schéma experimentu



- 1. den provedeny defekty, infekce *S. aureus* (1×10^9 – 5×10^{10} CFU/mL)
- 4. den kontrola, odběr vzorků
aplikace enzymatických krytů
- 8. den kontrola, odběr vzorků
aplikace enzymatických krytů
- 11. den kontrola, odběr vzorků
aplikace enzymatických krytů
- 15. den kontrola, odběrem vzorků



VUVeL

FAKULTNÍ VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V OBLASTI
FYZIOLOGIE A PATOLOGIE

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

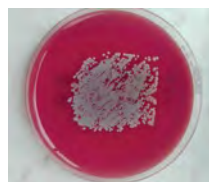
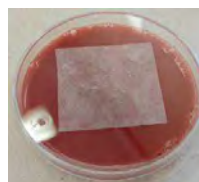
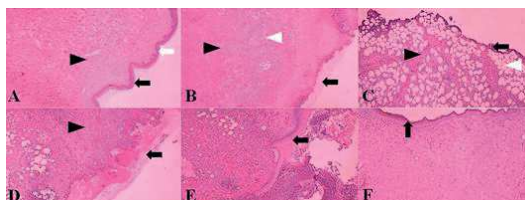
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Odběr vzorků



- mikrobiologie – otisky, biopsie
- sledování **exprese** prozánětlivých cytokinů (RT-PCR)
- histologie
- vyhodnocení fotografií ran



VUVeL

FAKULTNÍ VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V OBLASTI
FYZIOLOGIE A PATOLOGIE

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Další postup



- aplikace 1 x za 3 dny (1 mg/rána) – bez antimikrobiálního efektu
- **nově:** aplikace **5 mg proteinu** na ránu v 2,5 mL hydrogelu
- **každodenní léčba po dobu 7 dnů (poté po 2 resp. 3 dnech)**
- na polovinu ran aplikován zároveň endolysin i lysostaphin (5+5 mg)
- potřeba velkého množství proteinu: kultivace ve **fermentoru**
- výtěžek: až 800 mg z jedné kultivace (4 L)



VUVeL

FAKULTNÍ VÝZKUMNÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V OBLASTI
FYZIOLOGIE A PATOLOGIE

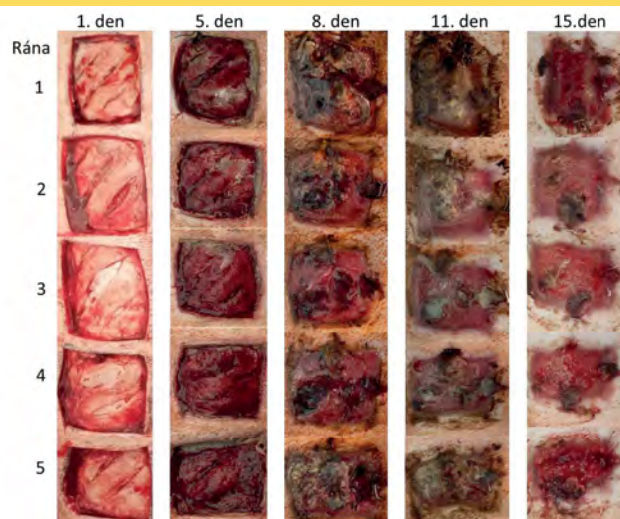
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Vyhodnocení fotografií ran



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Výsledky antimikrobiálního hodnocení



N – neléčené

L – léčené lysostafinem

LE – léčené lysostafin i endolysinem

VUVeL

CEITEC

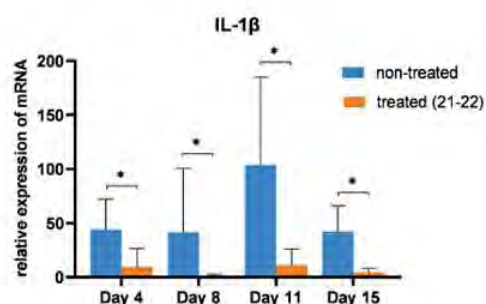
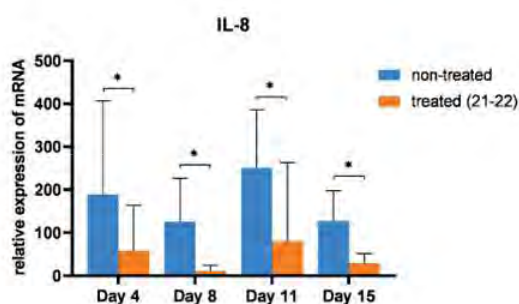
FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Sledování reakce imunitního systému

- IL-1 β , IL-8, TIMP1, MMP1, TGF β 1
- významný rozdíl u všech markerů



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



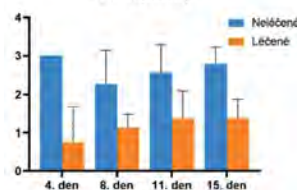
Histologie



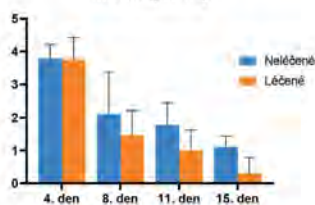
- dr. Makovický
- srovnání neléčených a léčených prasat
- největší rozdíl u nekrózy a edému



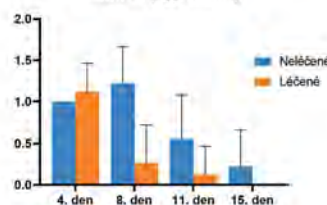
Edém (derma)



Nekróza (derma)



Nekróza (hypoderma)



VUVeL

AKADÉMICKÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V OBLASTI
VETERINÁRNÍHO
LEČENÍ
FAKULTY VĚT. MED.
BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Léčba enzybiotiky: závěr



- **potenciál v léčbě infekcí způsobených rezistentními kmeny bakterií**
- **synergická aktivita v přítomnosti antibiotik**
- komerčně dostupný rekombinantní endolysin je Staphefekt SA.100
 - léčivo vhodné pro topickou aplikaci na kůži, které se specificky zaměřuje na bakterie *S. aureus*, včetně MRSA kmenů
 - Staphefekt SA.100 byl v Evropě registrován jako zdravotnický prostředek 1. třídy.
 - Staphefekt – aplikován **2 x denně, lokálně na neporušenou kůži**
 - krém pro léčbu akné, ekzém, impetigo... (MRSA)



VUVeL

AKADÉMICKÝ ÚSTAV
PRO VÝZKUM V OBLASTI
VETERINÁRNÍHO
LEČENÍ
FAKULTY VĚT. MED.
BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Příprava infekčního animálního modelu

Hlavní motivací pro vytvoření animálního modelu infekce kůže a měkkých tkání epidemiologicky relevantními kmeny *Staphylococcus aureus* bylo jeho následné využití při testování nových antimikrobiálních preparátů.



Příprava infekčního animálního modelu

V průběhu celého experimentu jsme narazili na řadu zásadních překážek, které bylo pro splnění všech cílů nutné postupně překonat.

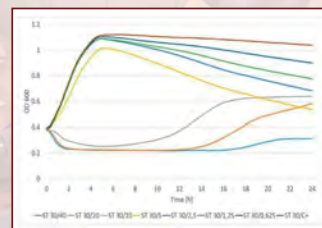
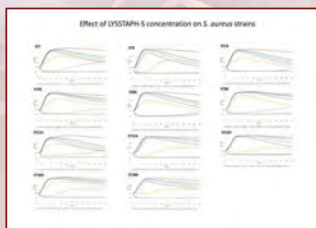
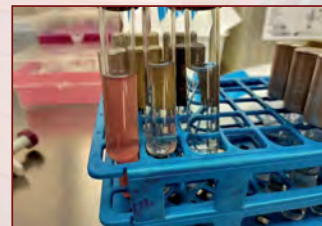
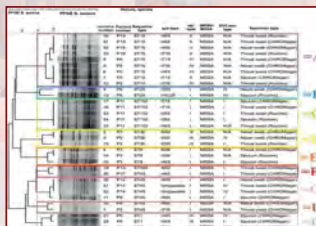


Výběr kmenů *Staphylococcus aureus*

Na základě multilokusové sekvenční typizace epidemiologicky významných lidských a veterinárních kmenů *Staphylococcus aureus* vybráno 16 kandidátních kmenů.

Kultivace kmenů *S. aureus* bez přítomnosti enzybiotik nevykázala žádný významný rozdíl v rychlosti růstu mezi testovanými kandidátními kmeny.

Na základě měření optické hustoty suspenze jednotlivých bakteriálních kmenů v prostředí lysostaphinu a následném srovnání růstových křivek byly vybrány tři kmeny *S. aureus*.



Výběr kmenů *Staphylococcus aureus*

S. aureus NRI/Atb 5921 (MRSA)

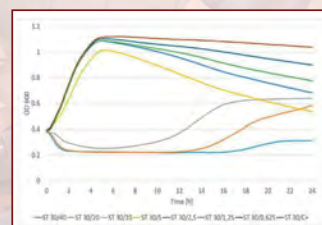
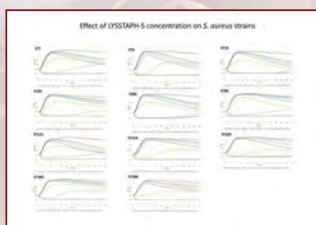
- o izolován z krevního oběhu pacienta s chronickým onemocněním ledvin ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (2005)
- o ST22/SCCmec IV/t020

S. aureus NRI/St 08/192 (MRSA)

- o izolován z kožního abscesu ve Fakultní nemocnici Motol (2008)
- o ST30/SCCmec IV/t019
- o produkující Panton-Valentine leukocidin

S. aureus PS187 (MSSA)

- o slouží jako propagační kmen pro bakteriofága 187 (1955)
- o ST395



Výběr kmenů *Staphylococcus aureus*

S. aureus NRI/Atb 5921 (MRSA)

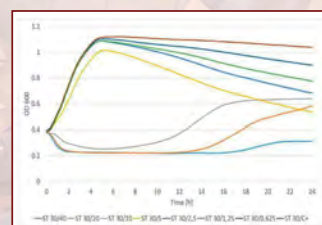
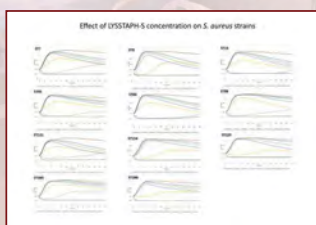
- o izolován z krevního oběhu pacienta s chronickým onemocněním ledvin ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (2005)
- o ST22/SCCmec IV/t020

S. aureus NRI/St 08/192 (MRSA)

- o izolován z kožního abscesu ve Fakultní nemocnici Motol (2008)
- o ST30/SCCmec IV/t019
- o produkující Panton-Valentine leukocidin

S. aureus PS187 (MSSA)

- o slouží jako propagační kmen pro bakteriofága 187 (1955)
- o ST395



Výběr kmenů *Staphylococcus aureus*

S. aureus NRL/Atb 5921 (MRSA)

- o izolován z krevního oběhu pacienta s chronickým onemocněním ledvin ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (2005)

- o ST22/SCCmec IV/020

S. aureus NRL/St 08/192 (MRSA)

- o izolován z kožního abscesu ve Fakultní nemocnici Motol (2008)

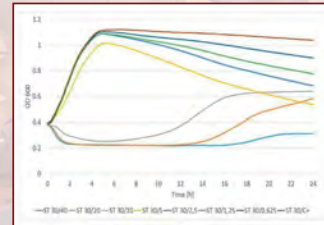
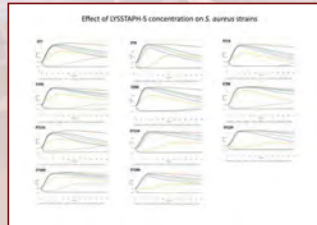
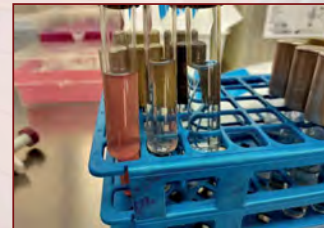
- o ST30/SCCmec IV/019

- o produkující Panton-Valentine leukocidin

S. aureus PS187 (MSSA)

- o slouží jako propagační kmen pro bakteriofága 187 (1955)

- o ST395

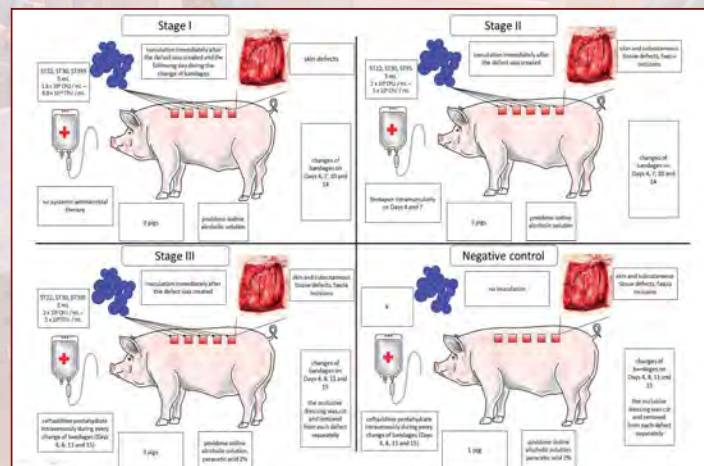


Vývoj konceptu infekčního animálního modelu

Při vývoji infekčního animálního modelu bylo využito celkem 10 prasat.

Experiment byl proveden ve třech po sobě jdoucích fázích za použití tří, tří a čtyř prasat.

Jedno prase nebylo infikováno a posloužilo jako negativní kontrola.

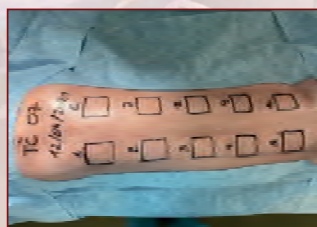
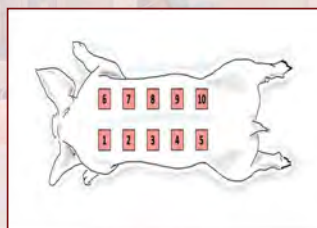


Vývoj konceptu infekčního animálního modelu tvorba defektů (stage I)

Po důsledné antiseptice (alkoholový roztok PVP-jódu) a přípravě operačního pole provedena excize kůže o přesně definovaném rozměru 5 x 5 cm.

Jednotlivé kožní defekty byly od sebe vzdáleny alespoň 2 cm.

U každého prasete bylo vytvořeno 10 takovýchto kožních defektů.



Vývoj konceptu infekčního animálního modelu inokulace a krytí defektů (stage I)



Bakteriální inokulum ($1,8 \times 10^9$ – $6,6 \times 10^{10}$ CFU/mL) aplikováno difúzně do defektů v množství 5 mL.

Bakteriální kmeny aplikovány do ran ihned po chirurgické excizi a následující den při první výměně obvazů.



Rány kryty sterilní gázou, která fixována okluzivní folií. Přiloženo sekundární sterilní krytí mulem, navlečeny elastické oblečky.

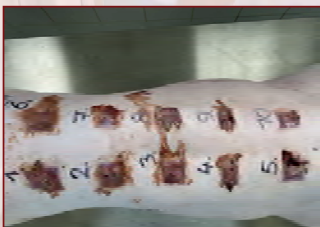


Vývoj konceptu infekčního animálního modelu následné převazy a odběr vzorků (stage I)



Následné převazy realizovány 4., 7., 10. a 14. postinokulační den.

Provedeny otisky z ran k semikvantitativnímu zhodnocení mikrobiální nálože společně s odběrem vzorků tkáně ke kvantitativnímu mikrobiologickému, histopatologickému a molekulárně biologickému hodnocení.



Současně pořízena fotodokumentace všech defektů, která následně sloužila k zaslepenému retrospektivnímu hodnocení klinických lokálních známek zánětu.

Vývoj konceptu infekčního animálního modelu výsledky (stage I)

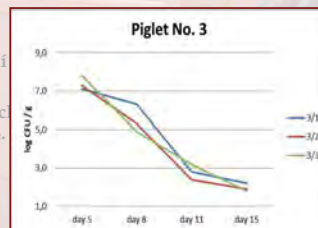
Rozvoj signifikantní ranné infekce během několika dní po inokulaci.

Tato infekce kůže a měkkých tkání byla potvrzena na základě mikrobiologického, histologického, molekulárně biologického i klinického hodnocení již při prvním převazu 4. postinokulační den.

Vývoj konceptu infekčního animálního modelu výsledky (stage I)

Rozvoj signifikantní ranné infekce během několika dní

Tato infekce kůže a měkkých tkání byla potvrzena na základě mikrobiologického i klinického hodnocení již při prvním převazu 4.



KOMPLIKACE

Defekty se začínají spontánně hojit a bakteriálních nálož v nich postupně klesat.

14. postinokulační den mikrobiologicky prokázána směs různých bakteriálních kmenů (dominantně G⁺).



Vývoj konceptu infekčního animálního modelu změny v protokolu (stage I → stage II)

Chirurgicky provedeny defekty pouze kožního krytu, bez podkožní tkáně.

Aplikace inokula v koncentracích $1,8 \times 10^9$ – $6,6 \times 10^{10}$ CFU/mL ihned po vytvoření defektů a při převazu následující den.

Žádná systémová antimikrobiální terapie.



Chirurgicky provedeny defekty kůže i podkožní tkáně až po fascii. Do té provedeny nářezy pro snazší průnik patogenu.

Aplikace inokula v koncentracích 2×10^9 – 5×10^9 CFU/mL se jeví jako dostatečná pro rozvoj infekce. Aplikace pouze jednorázově, ihned po vytvoření defektů (1mL do fasciálních incizí, 4mL difúzně).

Do terapie epiricky nasazen Shotapen (benzathine benzylpenicillin, procaine benzylpenicillin, dihydrostreptomycin sulphate). Podáván intramuskulárně 4. a 7. postinokulační den.



Vývoj konceptu infekčního animálního modelu výsledky (stage II)

Po implementaci těchto změn se již infekce kůže a měkkých tkání s dostatečnou bakteriální náloží daří udržet po potřebnou dobu 14 dní.

Tato infekce kůže a měkkých tkání byla potvrzena na základě mikrobiologického, histologického, molekulárně biologického i klinického hodnocení při převazech 4., 7., 10. i 14. postinokulační den.

Vývoj konceptu infekčního animálního modelu výsledky (stage II)

Po implementaci těchto změn se již infekce k

Tato infekce kůže a měkkých tkání byla potvrzena biologického i klinického hodn

Průběh výsledků	Kód zvířete	Organismus (výsledky škrábání)	Skóre	Organismus (výsledky škrábání)	Skóre
100 (+/-) 100	21-00-22 IKAN 9.6	negativní škrábání	0	negativní škrábání	0
110 (+/-) 100	21-00-22 PLAZIVY 6.7	Staphylococcus aureus	100	Staphylococcus aureus	100
120 (+/-) 100	21-00-22 8-2 PLAZIVY	Pseudomonas aeruginosa	100	Pseudomonas aeruginosa	100
130 (+/-) 100	21-00-22 9-10 MALA BELA	Acinetobacter baumannii	100	Acinetobacter baumannii	100
140 (+/-) 100	21-00-22 8-10 BEMOVZA	Acinetobacter baumannii	100	Acinetobacter baumannii	100
150 (+/-) 100	21-00-22 8-9 VELKA NEPRAVDENA	Acinetobacter baumannii	100	Acinetobacter baumannii	100
160 (+/-) 100	21-00-22 8-8 ZVÝŠENÝ STREŠ	Acinetobacter baumannii	100	Acinetobacter baumannii	100
170 (+/-) 100	21-00-22 8-3 PLAZIVY	Staphylococcus aureus	100	Staphylococcus aureus	100
180 (+/-) 100	21-00-22 9-1 SERA	Staphylococcus aureus	100	Staphylococcus aureus	100
190 (+/-) 100	21-00-22 8-1 ZLADA	Staphylococcus aureus	100	Staphylococcus aureus	100

KOMPLIKACE

Přetrvává nechtěná kontaminace jinými patogenními bakteriemi.

Nyní dominují G⁻ bakterie (*Proteus vulgaris*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*).



Vývoj konceptu infekčního animálního modelu změny v protokolu (stage II → stage III)

Asepsy a antisepsy během chirurgických výkonů i převazů (alkoholový roztok PVP-jódu).

Systémová antimikrobiální terapie Shotapenem.



Důsledná asepsy a antisepsy během chirurgických výkonů i převazů (alkoholový roztok PVP-jódu + 2% kys. peroctová).

Během převazů okluzivní folie naříznuta tak, aby bylo možné její sejmnutí z každého defektu samostatně.

V systémové antimikrobiální terapii Shotapen nahrazen Ceftazidimem (ceftazidime pentahydrát). Podáván intravenózně během chirurgického výkonu i během každého převazu.



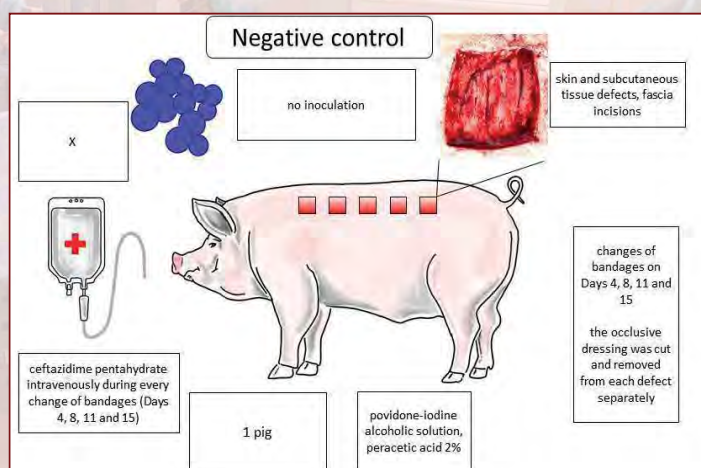
Vývoj konceptu infekčního animálního modelu negativní kontrola (stage III)

Jedno prasce použito jako negativní kontrola.

Sloužilo jako model přirozené kolonizace ran v daných podmínkách.

U tohoto prasce nebyly rány inokulovány žádným patogenem.

Management tvorby defektů a následných převazů byly totožné s ostatními prasaty ze stage III.



Vývoj konceptu infekčního animálního modelu reálná očekávání

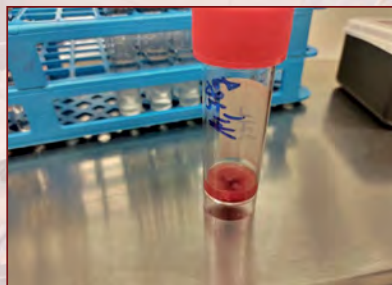
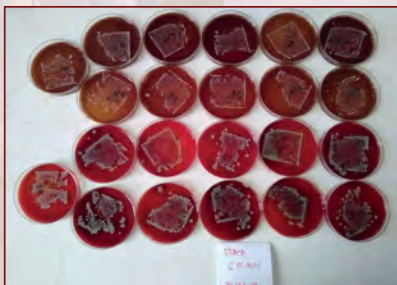


Jsme vůbec schopni navodit infekci kůže a měkkých tkání s izolovaným záchytem
Staphylococcus aureus, bez kontaminace jinými patogeny???

Finální výsledky (stage III) mikrobiologické hodnocení

Identifikace a semikvantitativní hodnocení počtu mikroorganismů z povrchu všech defektů za pomoci nepřímé otiskové metody.

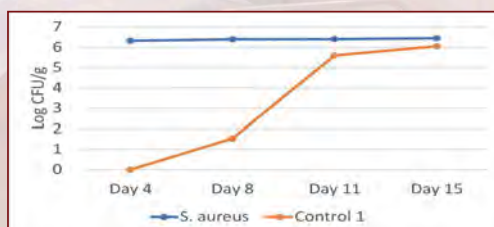
Současně provedeno kvantitativní hodnocení mikrobiální nálože ze vzorků tkání ze spodiny tří náhodně vybraných defektů během každého převazu.



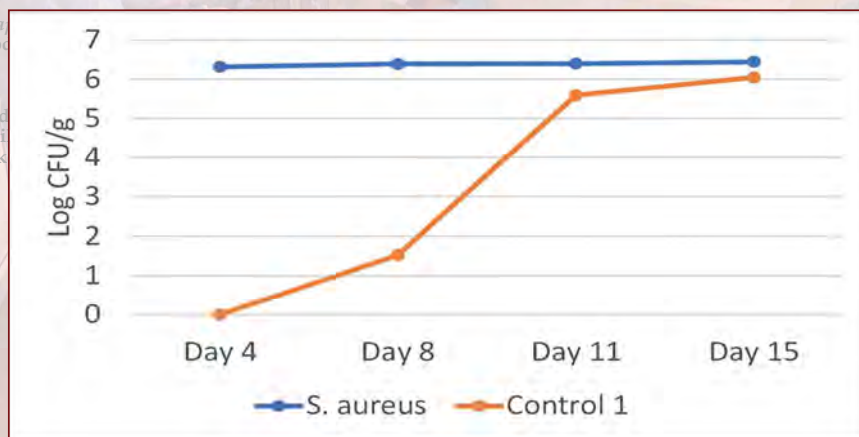
Finální výsledky (stage III) mikrobiologické hodnocení

Staphylococcus aureus v množství $10^2 - 10^3$ CFU / 25 cm² byl prokázán u všech vzorků odebraných otiskovou metodou. Kontaminace *Escherichia coli* a *Staphylococcus chromogenes* byla pozorována pouze u jednoho prasete 4. den po inokulaci. Jejich množství se pohybovalo v množství < 10 CFU / 25 cm².

Výsledky kvantitativního hodnocení mikroorganismů ve vzorcích tkáně odebraných z defektů koreluje s výsledky semikvantitativní metody. Průměrné množství bakterií > 10^6 CFU / g tkáně bylo naměřeno 4. den po inokulaci. Opakovaný odběr tkáně v následujících dnech experimentu ukázal mírný nárůst bakteriální nálože v ranách. Po celou dobu experimentu (15 dní) se průměrné množství patogenu udržovalo > 10^6 CFU / g tkáně.



Finální výsledky (stage III) mikrobiologické hodnocení

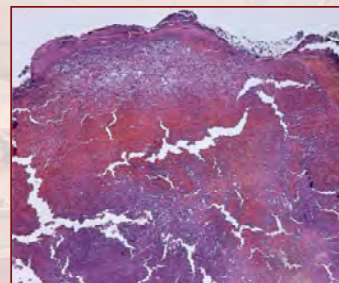


Finální výsledky (stage III) histopatologické hodnocení

Odběr vzorků na histopatologické hodnocení prováděn během každého převazu ze tří náhodně vybraných defektů (okraj spodiny defektů společně s okolní intaktní tkání).

Pro potřeby experimentu bylo vyvinuto individuální klasifikační skóre. Ve všech vzorcích hodnoceny dermis, epidermis, zánět, krusty, otok, reepitelizace, nekróza a fibrotizace.

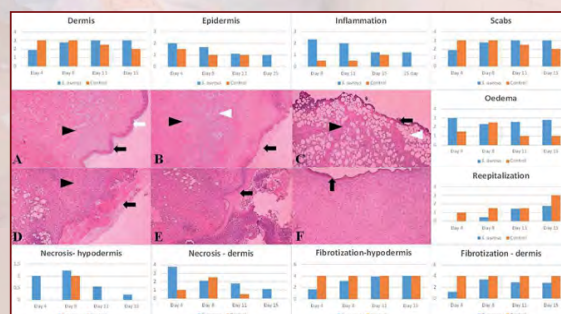
Dermis		Epidermis		Inflammation		Scabs	
Score	KS	Score	KS	Score	KS	Score	KS
0	0	0	0	0	0	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
2	2	2	2	2	2	2	2
3	3	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4
5	5	5	5	5	5	5	5
6	6	6	6	6	6	6	6
7	7	7	7	7	7	7	7
8	8	8	8	8	8	8	8
9	9	9	9	9	9	9	9
10	10	10	10	10	10	10	10
11	11	11	11	11	11	11	11
12	12	12	12	12	12	12	12
13	13	13	13	13	13	13	13
14	14	14	14	14	14	14	14
15	15	15	15	15	15	15	15
16	16	16	16	16	16	16	16
17	17	17	17	17	17	17	17
18	18	18	18	18	18	18	18
19	19	19	19	19	19	19	19
20	20	20	20	20	20	20	20



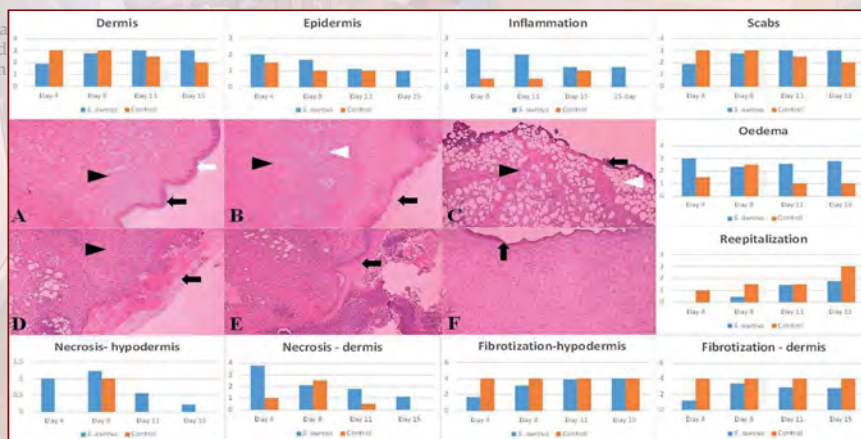
Finální výsledky (stage III) histopatologické hodnocení

Na histopatologických preparátech můžeme v počátečních fázích pozorovat hluboké defekty s nekrotickou spodinou, povrchově soustředěné shluky bakterií s výrazným kulatobuněčným infiltrátem. Postupně se rozvíjí intenzivní proliferace měkkých tkání s tvorbou primitivní vazivové tkáně a strupy v různém stádiu zrání.

V konečné fázi vidíme masivní granulom s pozvolnou progresivní reepitelizací z okrajů defektů.



Finální výsledky (stage III) histopatologické hodnocení



Finální výsledky (stage III) molekulárně biologické hodnocení

Odběr vzorků na molekulárně biologické hodnocení prováděn během každého převazu ze tří náhodně vybraných defektů (okraj spodiny defektů společně s okolní intaktní tkání).

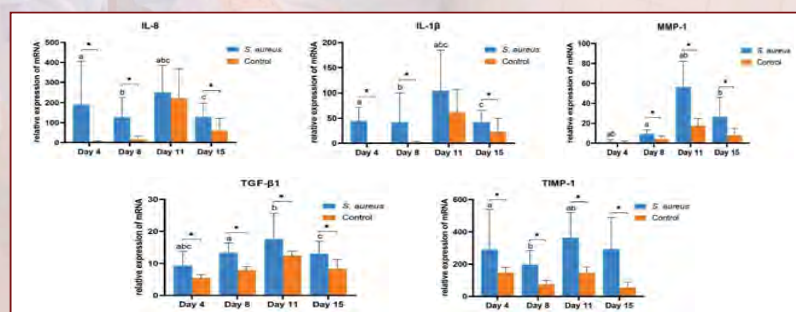
Byla pozorována genová exprese mediátorů zánětu (IL-8, IL-1 β , TGF- β 1) a mediátorů remodelace extracelulární matrix (MMP-1, TIMP-1).

Gene	5'-Forward primer-3'	5'-Reverse primer-3'	Accession number / [18]
IL8	GCGACTGAGAGAGAGAGTGG	CTTCTCTGATCTCAAGG	U04680 / [18]
IL1 β (CCL20)	TGAGAGAACTGAGAGAGAGAGAGAG	TCTTGGAGGTCAGGAGATGGGT	U04680 / [18]
MMP1	GTCACCCCTGACCTTACCA	CAGGATGATCTCCCTGAGAG	U04680 / [18]
TIMP1	CAGGATGATCTCCCTGAGAG	GTCAGGAGGAGCAGAACT	U04680 / [18]
TGF β 1	TAGGCAAGAGAGTCACTC	CAGCTCTGAGAGAGAG	U04680 / [18]
TGF1	TAGGCAAGAGAGTCACTC	CAGCTCTGAGAGAGAG	U04680 / [18]

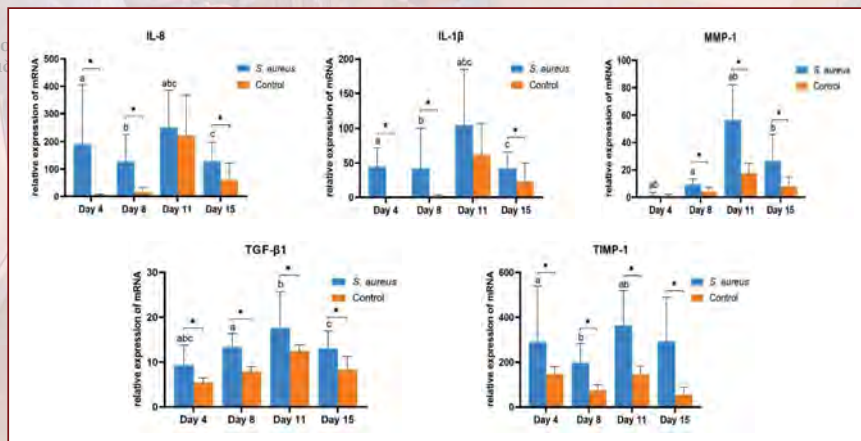


Finální výsledky (stage III) molekulárně biologické hodnocení

Genová exprese mRNA zánětlivých cytokinů IL-8 a IL-1 β byla signifikantně zvýšena 4. a 8. postinokulační den. Současně pozorujeme zvýšenou expresi MMP-1 zejména 11. a 15. postinokulační den. Genová exprese TIMP-1 stejně jako TGF1- β 1 je významně upregulována ve všech kontrolních dnech.



Finální výsledky (stage III) molekulárně biologické hodnocení



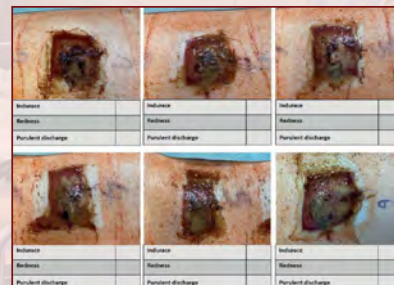
Finální výsledky (stage III) klinické hodnocení lokálních známek zánětu

Fotografie všech defektů retrospektivně hodnoceny osmi klinickými specialisty s bohatými zkušenostmi v oblasti terapie kožních defektů různé etiologie.

Hlavními hodnocenými parametry byly indurace, zarudnutí a purulentní sekrece.

Overall probability of wound infection estimation

Parameters	fla	Mika	Moderate	Severe
Induration	0	1	2	3
Redness	0	1	2	3
Purulent discharge	0	1	2	3



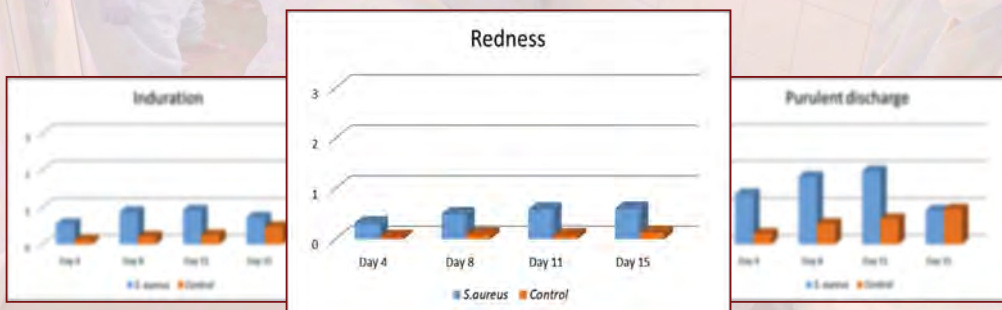
Finální výsledky (stage III) klinické hodnocení lokálních známek zánětu

Indurace spodiny defektů byla po postupném nárůstu nejvíce vyjádřena osmý, potažmo jedenáctý postinokulační den. V této době byla hodnocena jako mírná.



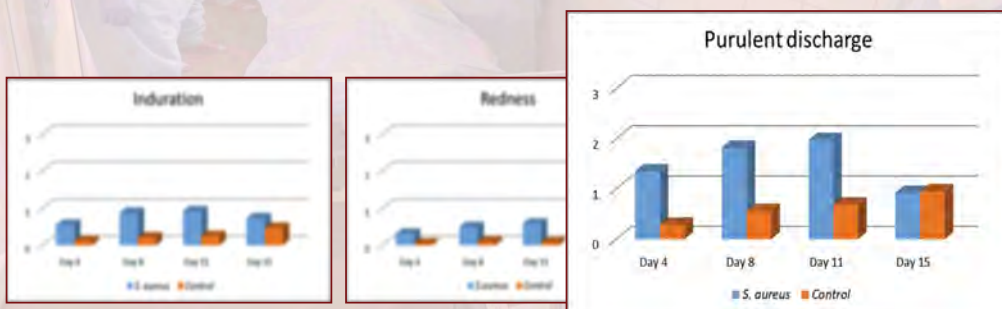
Finální výsledky (stage III) klinické hodnocení lokálních známek zánětu

Zarudnutí v okolí rány bylo nejméně vyjádřenou lokální známkou zánětu. Míra zarudnutí postupem času narůstala, v žádný okamžik se ovšem nedala hodnotit ani jako mírná.



Finální výsledky (stage III) klinické hodnocení lokálních známek zánětu

Nejvíce vyjádřenou lokální známkou infekce byla purulentní sekrece. Nejvíce patrná osmý, potažmo jedenáctý postinokulační den. V této době byla hodnocena jako mírná až střední.



Závěrem...



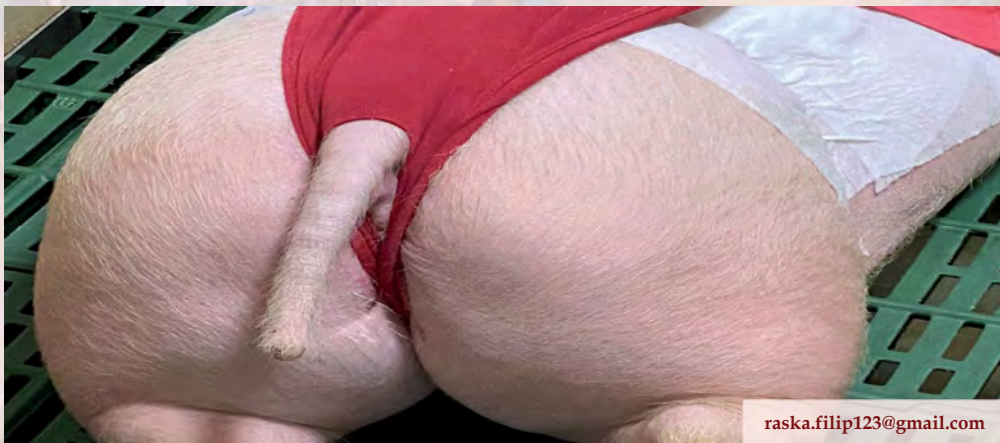
Úspěšně se nám podařilo vytvořit animální model infekce kůže a měkkých tkání způsobené epidemiologicky relevantními kmeny *Staphylococcus aureus* (včetně MRSA), bez signifikantní kontaminace jinými patogeny.

Závěrem...

Za hlavní body reprodukovatelnosti modelu můžeme považovat:

- o Bakteriální inokulum *Staphylococcus aureus* v koncentracích 2×10^9 – 5×10^9 CFU/ml bylo dostatečné k vyvolání infekce kůže a měkkých tkání, nebyla potřeba žádná imunosupresivní terapie.
- o Pro usnadnění rozvoje infekce byly vytvořeny defekty kůže a podkoží v plné tloušťce s několika nářezy svalové fascie.
- o Převazy defektů byly prováděny 4., 8., 11. a 15. den po inokulaci.
- o Při tvorbě defektů i při následných převazech bylo nutné důsledně dodržovat zásady asepse a antiseptiky, jako antiseptika používaná alkoholový roztok PVP-jódu a 2% kys. peroctová.
- o Jednotlivé defekty kryty sterilní gázou a okluzivní folií, její nařáznutí během převazů umožnilo individuální sejmnutí obvazů z každé rány.
- o Systémové podávání antimikrobiálních preparátů (ceftazidim pentahydrát) bylo nutné k potlačení kontaminace ran jinými patogenními mikroorganismy.

Děkuji za pozornost...



raska.filip123@gmail.com



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání:
současné a budoucí terapeutické možnosti



Terapeutický účinek antimikrobiálních enzymových krytů při léčbě stafylokokové infekce v ranách prasat



MUNI
MED
VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

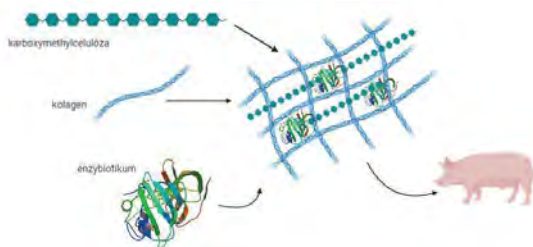
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Enzybiotika v antimikrobiálním krytí ran



- **polymer** = směs kolagenu (0,5%) a karboxymethylcelulózy (0,7%)
- **lyofilizované kryty** – polymer + **enzymy** v roztoku – lyofilizace
- **hydrogel** – polymer + **enzymy**, aplikace injekční stříkačkou



VUVeL

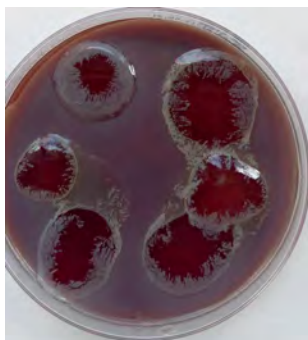
CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Antimikrobiální aktivita hydrogelu s enzybiotiky



CMC, kol. bez proteinů



CMC, kol. + lysostafin (40 µg/mL)



CMC, kol. + lysostafin (40 µg/mL)

VUVeL

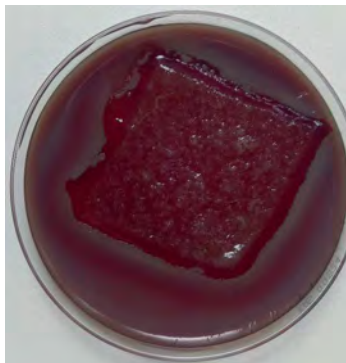
CEITEC

FAKULTNÍ
NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Antimikrobiální aktivita lyofilizovaných krytů



VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Časové schéma experimentu

- 1. den provedeny defekty, infekce *S. aureus* (1×10^9 - 5×10^{10} CFU/mL)
- 4. den kontrola, odběr vzorků
aplikace enzymatických krytů
- 8. den kontrola, odběr vzorků
aplikace enzymatických krytů
- 11. den kontrola, odběr vzorků
aplikace enzymatických krytů
- 15. den kontrola, odběrem vzorků



VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

CEITEC

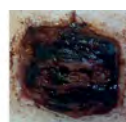
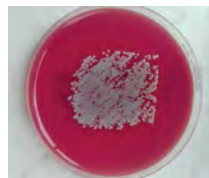
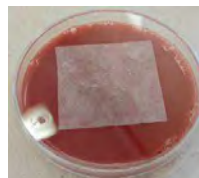
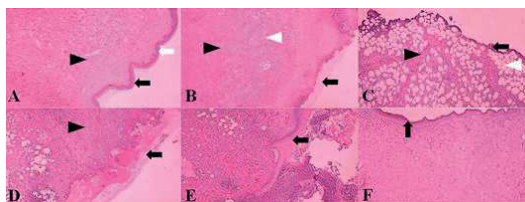
FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Odběr vzorků

- mikrobiologie – otisky, biopsie
- sledování exprese prozánětlivých cytokinů (RT-PCR)
- histologie
- vyhodnocení fotografií ran



VUVeL

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

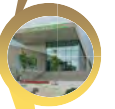
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Další postup



- aplikace 1 x za 3 dny (1 mg/rána) – bez antimikrobiálního efektu
- **nově:** aplikace **5 mg proteinu** na ránu v 2,5 mL hydrogelu
- **každodenní léčba po dobu 7 dnů (poté po 2 resp. 3 dnech)**
- na polovinu ran aplikován zároveň endolysin i lysostaphin (5+5 mg)
- potřeba velkého množství proteinu: kultivace ve **fermentoru**
- výtěžek: až 800 mg z jedné kultivace (4 L)

VUVeL

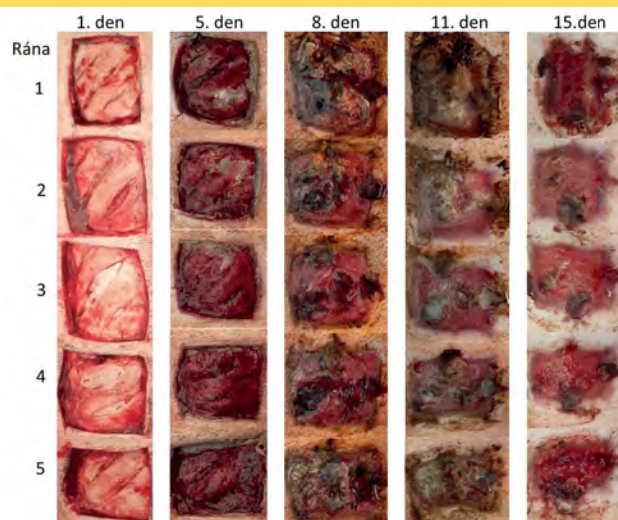
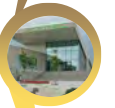
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Vyhodnocení fotografií ran



VUVeL

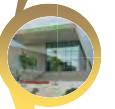
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Výsledky antimikrobiálního hodnocení



N – neléčené

L – léčené lysostafinem

LE – léčené lysostafin i endolysinem

VUVeL

CEITEC

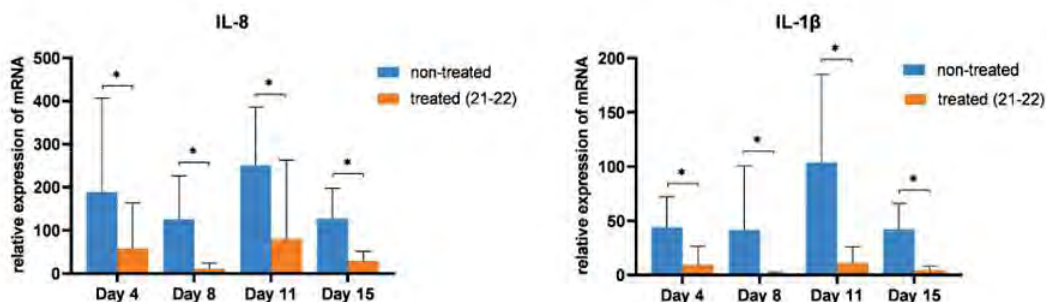
FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Sledování reakce imunitního systému

- IL-1 β , IL-8, TIMP1, MMP1, TGF β 1
- významný rozdíl u všech markerů



VUVeL

CEITEC

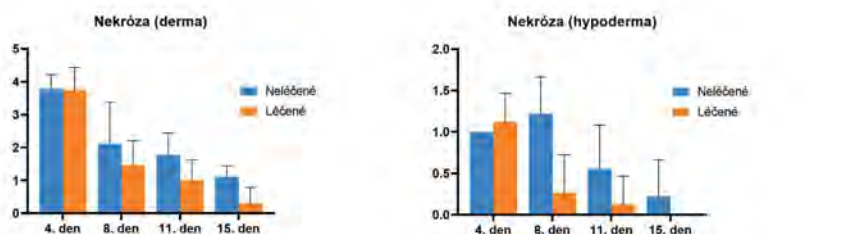
FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Histologie

- dr. Makovický
- srovnání neléčených a léčených prasat
- největší rozdíl u nekrózy a edému



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Léčba enzybiotiky: závěr

- potenciál v léčbě infekcí způsobených rezistentními kmeny bakterií
- synergická aktivita v přítomnosti antibiotik
- komerčně dostupný rekombinantní endolysin je Staphsekt SA.100
 - léčivo vhodné pro topickou aplikaci na kůži, které se specificky zaměřuje na bakterie *S. aureus*, včetně MRSA kmenů
 - Staphsekt SA.100 byl v Evropě registrován jako zdravotnický prostředek 1. třídy.
 - Staphsekt – aplikován **2 x denně, lokálně na neporušenou kůži**
 - krém pro léčbu akné, ekzém, impetigo... (MRSA)

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



Staphylococcus aureus jako původce infekčních komplikací kůže a měkkých tkání:
současné a budoucí terapeutické možnosti



Využití biomateriálů na bázi hydrogelů jako nosičů pro antimikrobiální enzymy

Doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.

Ing. Katarína Kacvinská

<http://biomaterials.ceitec.cz/>



VUVeL

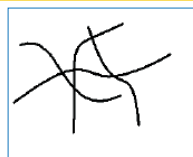
CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214



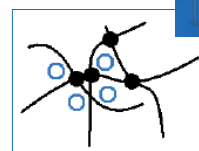
Hydrogely = polymerní sítě



Polymerní řetězce



Polymerní síť



Hydrogel



- 3D struktura
- Ve vodě botná
- Řízeno vlivy
 - Fyzikální: pH, T, porozita, morfologie, příprava - technologie
 - Chemické: M_n , deriváty, funkční skupiny (OH, COOH, NH₂)

https://pubs.rsc.org/image/article/2019/tb/c8tb02331j/c8tb02331j-f3_hi-res

VUVeL

CEITEC

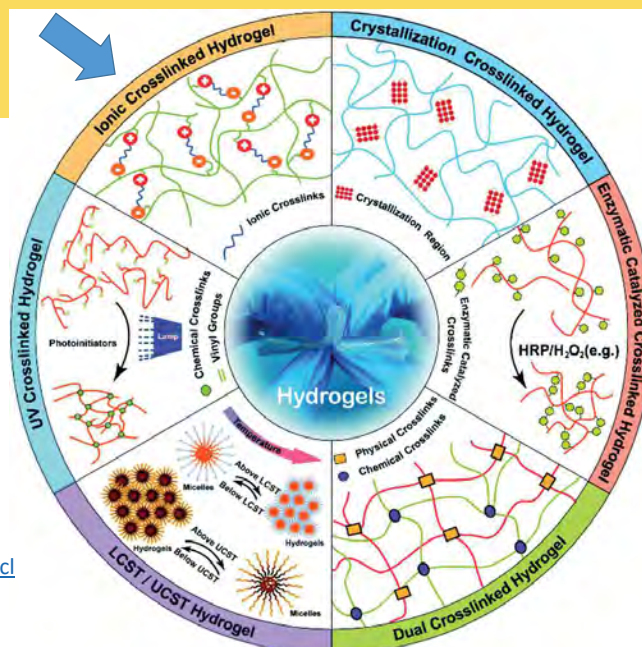
FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

2



Příprava hydrogelů – techniky síťování



Weikang Hu a spol.: Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater Sci.* 2019 26;7(3):843-855

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/bm/c8bm01246f>

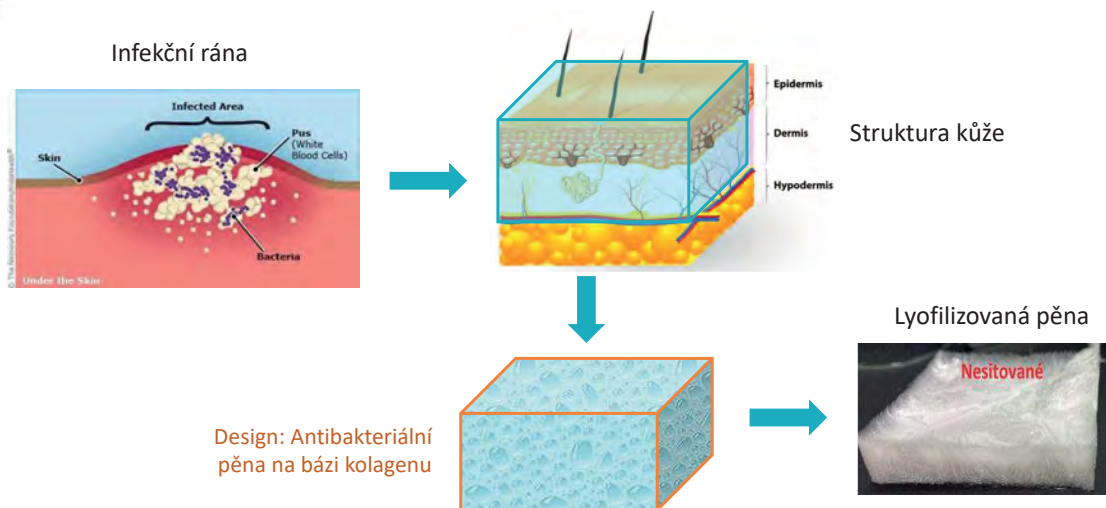
VUVeL

CEITEC

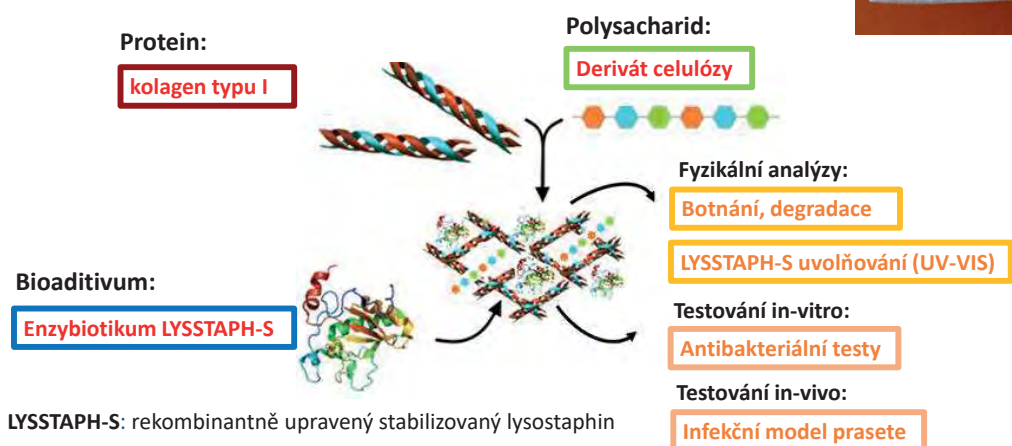
FAKULTNÍ NEMOCNICE
BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

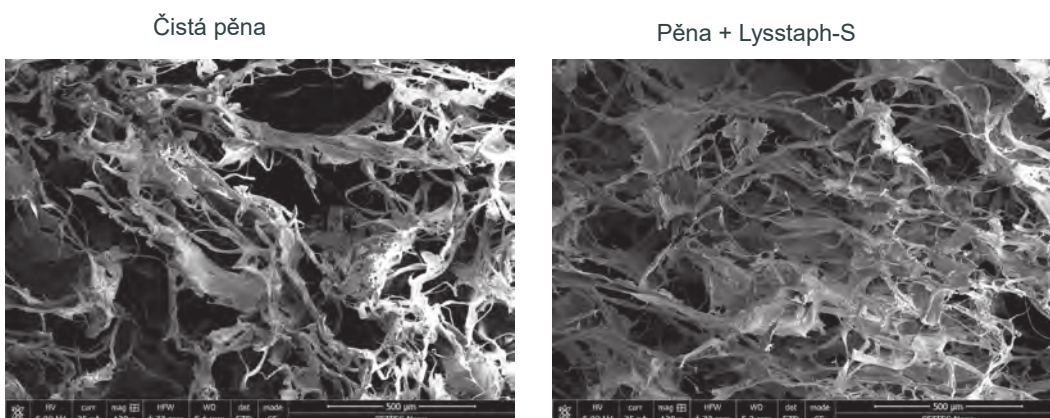
3



Složení pěnového nosiče (kryogel)



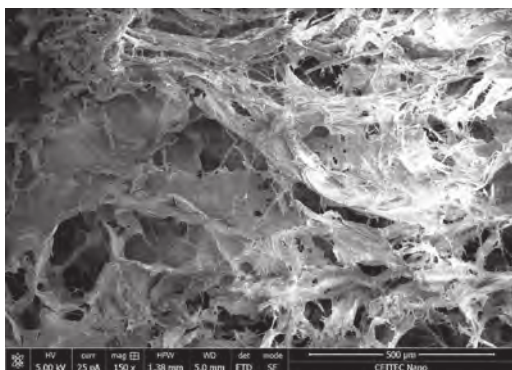
Morfologie pěn (SEM)



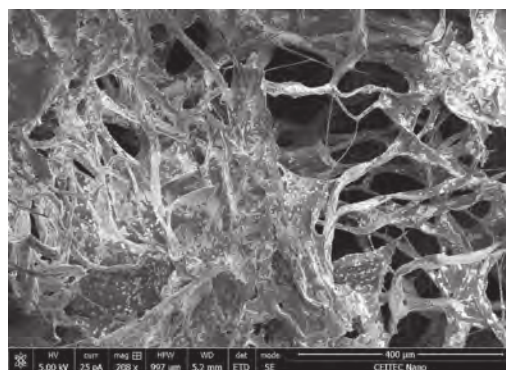
Morfologie pěn se solí PBS/NaCl (SEM)



Čistá pěna: + sůl PBS/NaCl



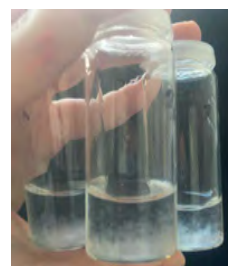
Pěna + sůl PBS/NaCl + Lysstaph-S



Hydrolytická stabilita



- nosič + fyziologický roztok = inkubátor (37°C)



Závěr: soli snižují stabilitu nesíťovaných vzorků

Antibakteriální účinnost pěn s LYSSTAPH-S na SA



- Krevní agar + *S. aureus* kmen 244(ST 8) + pěny s LYSSTAPH-S (1 – 6 konc.)

Pěny bez soli PBS/NaCl (reference)



Foams se solí PBS/NaCl (1mM/5mM)



Inkubace při 37°C /18 h



In vitro biokompatibilitní testy pěn

SpringerLink (IF = 5,044, Q1, TOP1)

Original Research | Published: 09 August 2022

Porous cellulose-collagen scaffolds for soft tissue regeneration: influence of cellulose derivatives on mechanical properties and compatibility with adipose-derived stem cells

Katarina Kacivinská, Martina Trávníčková, Lucie Vojtová, Kristýna Hliněná, Julia Palotová, Mária Tíránková &

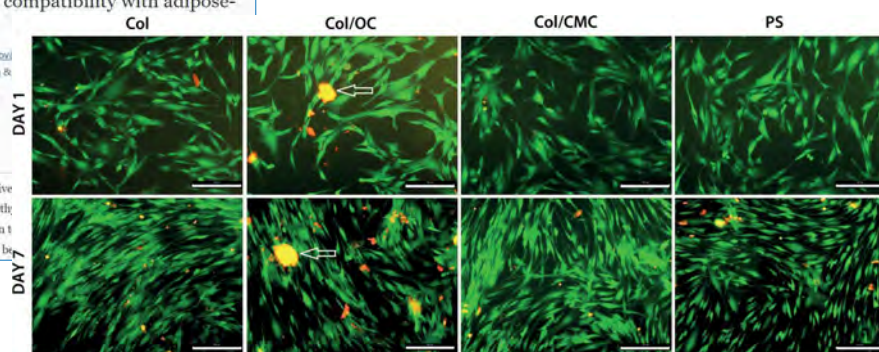
Cellulose 29, 8329–8351 (2022) | [Cite this article](#)

217 Accesses | Metrics

Abstract

This study compares two types of bioresorbable cellulose (OC) and sodium salt of carboxymethyl cellulose (CMC) would be preferable as an implant material in terms of its biological properties, and also in terms of its bi-

Live/Dead assay hADSCs buněk kultivovaných ve výluzích pěn po dobu 1 a 7 dní
(živé – zelené, mrtvé – červené, zbytky pěn – žlutě)



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

10



In vivo infekční model – použití pěn s LYSSTAPH-S

Vytvoření defektu + infekce



Použití pěn s LYSSTAPH-S



Hojení infekčních defektů



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

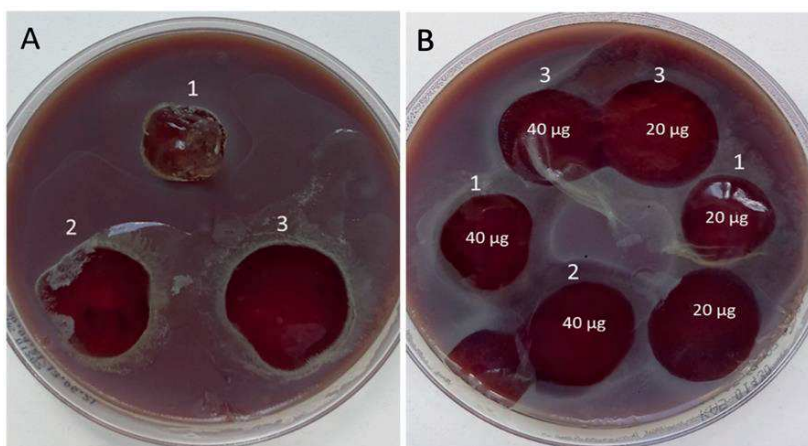
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

11



Hydrogely + LYSSTAPH-S: Platelet lysis assay

Staphylococcus aureus ST 395



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

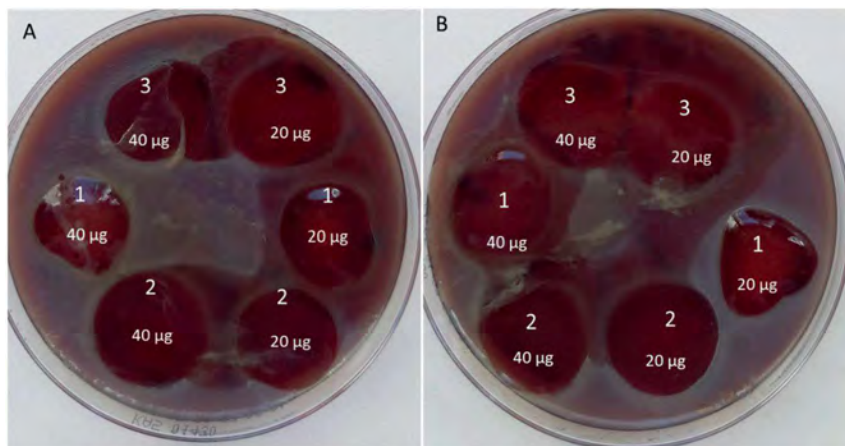
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

12



Hydrogely + LYSSTAPH-S: Platelet lysis assay

Staphylococcus aureus ST 30



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

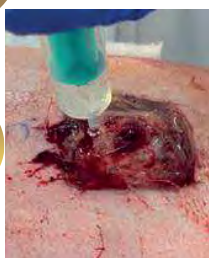
Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

13



Hojení *in vivo* – kombinace LYSSTAPH-S a Endolysinu

t = 0 dní - aplikace



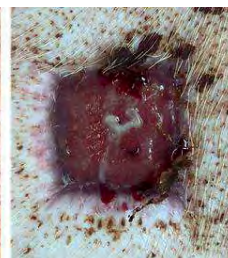
t = 4 dny



t = 7 dní



t = 11 dní



VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

14



• Lucy Vojtová

Lucy.Vojtova@ceitec.vutbr.cz

• Katarína Kacvinská

• Jana Dorazilová

• Jana Brtníková

<http://biomaterials.ceitec.cz/>



MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ
ČESKÉ REPUBLIKY

CEITEC
BIOMATERIALS



Poděkování celému týmu projektu AZV – enzybiotika!!!

VUVeL

CEITEC

FAKULTNÍ NEMOCNICE BRNO

Workshop se koná v rámci řešení výzkumného projektu AZV N19-05-00214

15



Růstový faktor FGF2-STAB - kandidátní léčivo pro hojení chronických ran

Jan Herudek

Enantis s.r.o.

- Biotechnologická firma založená v roce 2006
- Spin-off Masarykovy univerzity
- Proteinové inženýrství
 - Zvyšování stability proteinů
 - Zvyšování biologické aktivity proteinů
- Hlavním zaměřením jsou růstové faktory



Stabilizace růstových faktorů proteinovým inženýrstvím

Běžný protein



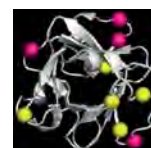
$T_m = 54^\circ\text{C}$



Teplota tání
zvýšená o 19°C



Stabilizovaný protein



$T_m = 73^\circ\text{C}$

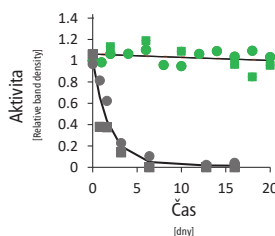
Molekula	Indikace	Stav
FGF2-STAB	Chronické rány	Preklinická studie efektivity
FGF10-STAB	Regenerace plic (ARDS)	Vývoj formulace

Růstový faktor FGF2

- Fibroblastový růstový faktor (Fibroblast Growth Factor 2)
- Klíčová role v proliferaci a diferenciaci buněk
- Stimuluje migraci fibroblastů a angiogenezi
- Účastní se hojení ran a re-epitelizace tkání
- FGF2 wild-type je málo stabilní

FGF2-STAB

- Stabilizovaná forma FGF2 proteinovým inženýrstvím
- 50x delší poločas života proteinu oproti FGF2 divokého typu
- Rekombinantní protein vyráběný expresí v *E. coli*
- Patentovaný



FGF2-STAB
 $t_{1/2} > 20$ dní

FGF2 wild-type
 $t_{1/2} = 10$ hodin

Využití FGF2-STAB



Výzkum a vývoj
Kultivace kmenových buněk



Kultivované maso
Náhrada živočišné produkce masa



Kosmetika
Regenerace kůže



Farmacie
Léčba špatně se hojících ran

Léčba špatně se hojících ran

Chronické rány, které se špatně hojí

- Diabetická noha, popáleniny
- Pooperační rány, amputace

Komplexní léčba

- Chirurgické odstranění neživé tkáně
- Hydratující a tlaková krytí
- Antibiotika k potlačení infekce
- Růstové faktory



Proč stabilizované růstové faktory?

Snížená proliferace buněk a angiogeneze v chronických ranách

- Podání exogenních růstových faktorů

Zvýšená proteolytická aktivita v chronických ranách

- Růstové faktory divokého typu jsou málo stabilní
 - FGF2-STAB jako nové, kandidátní léčivo
 - Stabilnější než současně dostupné růstové faktory

FGF2-STAB Sprej pro hojení chronických ran

- Stimuluje přirozený proces hojení
- Vyšší stabilita proteinu v ráně
- Méně častá administrace a převazy
- Bezbolestná, topická aplikace pomocí spreje
- Neobsahuje toxická aditiva



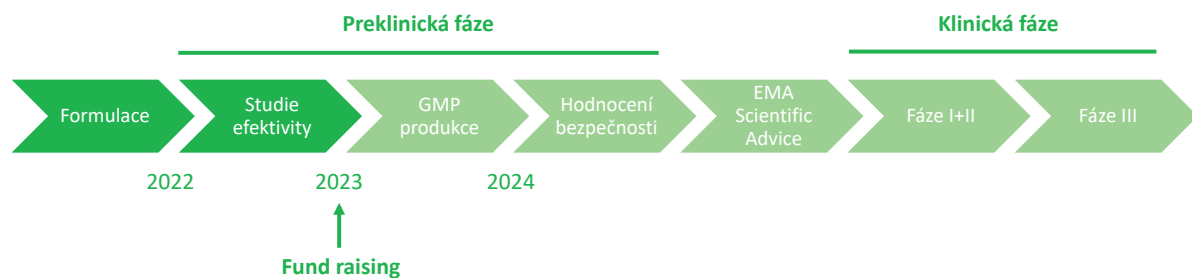
- FGF2-STAB musí projít schvalovacím procesem pro nová léčiva

Legislativní specifika FGF2-STAB

- Rekombinantní protein produkováný v *E. coli*
- Modifikovaný protein mutagenézí
- Růstový faktor (riziko karcinogenicity)

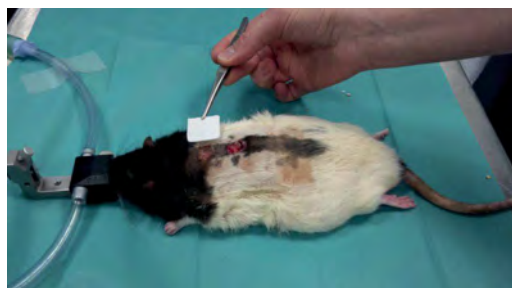


Vývoj FGF2-STAB



I. Preklinické hodnocení účinnosti

- Diabetický potkan, chirurgicky vytvořená rána (5 cm²)
- Aplikace FGF2-STAB sprejem na ránu
- Nalezení efektivní dávky (0.25 a 2.5 µg/cm² + kontrola)
- Délka studie 29 dnů (polovina zvířat usmrcena po 15 dnech)



I. Preklinické hodnocení účinnosti

Sledované parametry

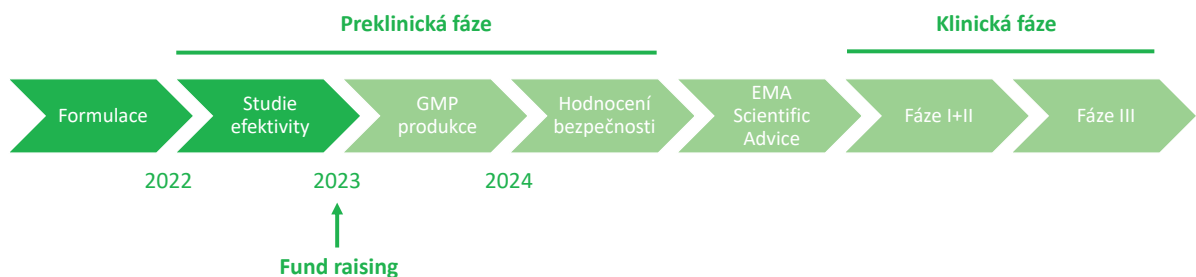
1. Rychlost uzavírání rány v čase
2. Histologie
3. Expres pro-hojivých genů (RT-qPCR)

Vyhodnocení studie Q1/Q2 2023

II. Preklinické hodnocení bezpečnosti

- 2 zvířecí modely (potkan + prase/pes) v GLP kvalitě
- FGF2-STAB v GMP kvalitě
- Studie bezpečné dávky
- Testy chronické toxicity (opakované podání)
- Toxikokinetika
- Farmakokinetika

Vývoj FGF2-STAB



Poděkování



MUDr. Jiří Deml

MUDr. Jana Vinklerová, Ph.D., MBA

Mgr. Edita Plevová



doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D.



Prof. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA, LL.M.

Expertíza a portfolio činností výzkumné infrastruktury CZECRIN

Regina Demlová, Farmakologický ústav LF MU



www.czecrin.cz



... towards patient-oriented medicine!



KDO/ KDE JSME

- CZECRIN je **akademickou infrastrukturou** podporující realizaci primárně **nekomerčního klinického výzkumu** v České republice
- Jako český uzel Evropské sítě infrastruktur klinického výzkumu **ECRIN-ERIC** zásadním způsobem přispívá k zapojení akademických institucí do mezinárodních projektů klinického výzkumu
- CZECRIN disponuje unikátní sítí zahrnující většinu významných klinických pracovišť s orientací na klinický výzkum a poskytuje **znalostní, vývojové, výrobní a implementační kapacity v oblasti výzkumu a vývoje léčiv a zdravotnických prostředků**; nastavuje **kvalitu procesů** dat s ohledem na aplikaci FAIR principů a je rovněž centrem pro kultivaci a **edukaci** v oblasti KS

www.czecrin.cz



... towards patient-oriented medicine!

CZECRIN IDENTITA



www.czecrin.cz

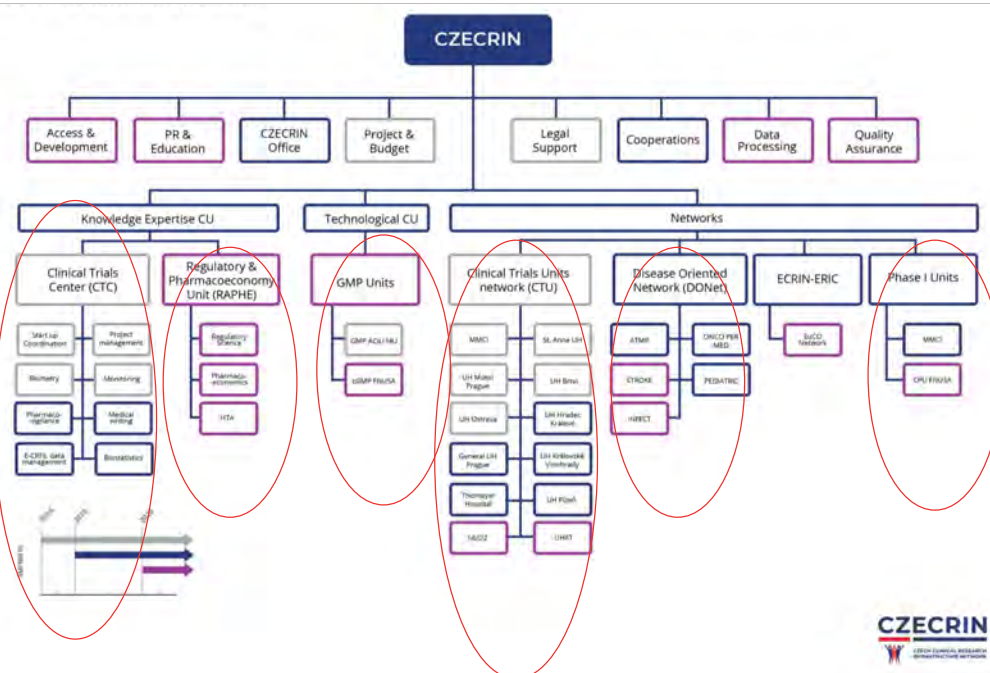
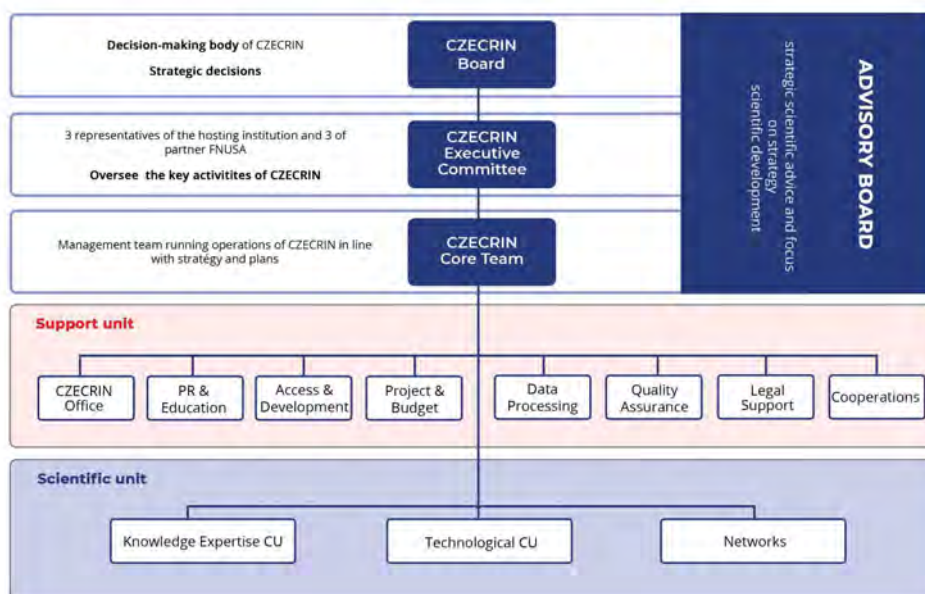
VZNIK

- CZECRIN byl založen rozhodnutím Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (MŠMT) v březnu 2014 na základě spolupráce mezi Masarykovou univerzitou (MU, hostitelská instituce) a Fakultní nemocnicí u Sv. Anny v Brně (FNUSA, partnerská instituce) tvořící celonárodní vědeckou síť
- Od ledna 2018 je ČR plným členem evropské sítě ECRIN-ERIC



www.czecrin.cz

CZECRIN GOVERNANCE STRUCTURE

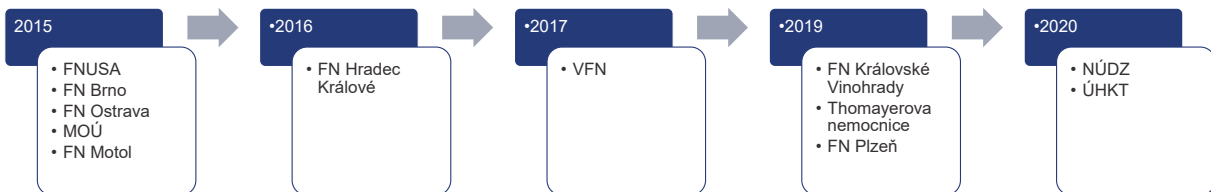


NÁRODNÍ NETWORK

- Síť center klinického výzkumu (Clinical Trial Units = CTU) pokrývá celé území ČR
- Zahrnuje většinu univerzitních nemocnic a představuje síť kontaktních a podpůrných jednotek propojujících klinická pracoviště s dalšími sítěmi a kapacitami CZECRIN



Přístupování nemocnic do CZECRIN National Network CTU do roku 2022



FNUSA – Spolupříjemcem projektu, od roku 2013 koordinuje CZECRIN National Network CTU. Od roku 2023 plánujeme zapojení dalších 2 nemocnic.

DISEASE ORIENTED NETWORKS

- Napříč jednotlivými diagnózami a medicínskými obory jsou v souladu se strategií CZECRIN, nejnovějšími trendy a vědeckými poznatky definovány **prioritní oblasti klinického výzkumu**
- V těchto oblastech/výzkumných směrech jsou pod vedením renomovaných klinických expertů budovány oborově orientované sítě (DONet) spolupracujících zdravotnických pracovišť a zapojených lékařů spolupracujících s koordinátory klinických studií CZECRIN
- Sítě sdružené v DONet sdílejí podpůrné a odborné kapacity CZECRIN a úzce spolupracují s ostatními sítěmi

Annex 1: CZECRIN main services

Where the research idea and investigators come from?

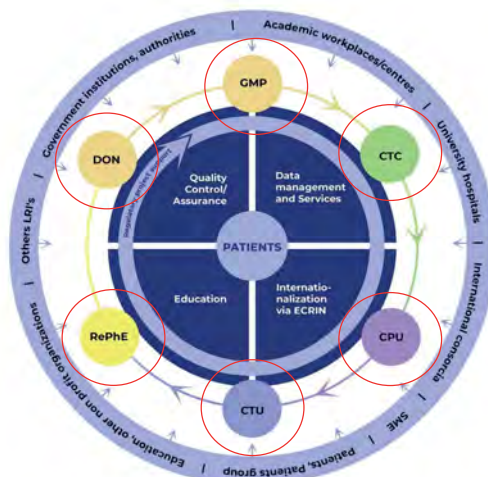
Where can be the investigational medicinal product developed and manufactured?

How to ensure the regulatory and legislative requirements for clinical research?

Where can be realized the phase I trials with healthy volunteers?

How to get direct access to clinical trial participants and local ECs?

Where to find regulatory advice and pharmacoeconomic assessment?



DONet CZECRIN
STROKE
ONCOLOGY
RARE/ PEDIATRICS
INFECTOLOGY
ATMP

CZECRIN clinical trials

... towards patient-oriented

2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
RCC_DC CZECH-ICIT	MEMMAT TIGER	Dauno Double PNET 5	POEM Fluoroc holin KDO_D C1311	GabaNeuBol Disulfiram Ependymoma STOPRHEA ReNETA EuroHYP VISION-DMD CPU001 RIMINI	DISCHARGE SECURE FAIRPARK II CPU002 GASTRO-PET CELLMIN	NISCI PrOof TENSION PopART SEOTP DESFODEL GlioART CD133 MSC-MU RASMIR	Protarget Prosperity TDM-TKI PD-MIND Far-RMS Classic Umbrella 2DERM HALF Ponderosa Prague-23 KDO-2	ROTCLOT TICAF M.A.R.S. PSIKET Psilo-Palio GliOMET TTV GaDOTATOC LiREM AcT JAK-SPARE1 Pona-CELL EWALL Blin-CELL HATC-19 Solidarity CZAR-1 ETAPA

CZECRIN – national

CZECRIN – international

ECRIN – H2020

www.czecrin.cz



... towards patient-oriented medicine!

CZECRIN Clinical trials/studies Initiated each respective year / user category

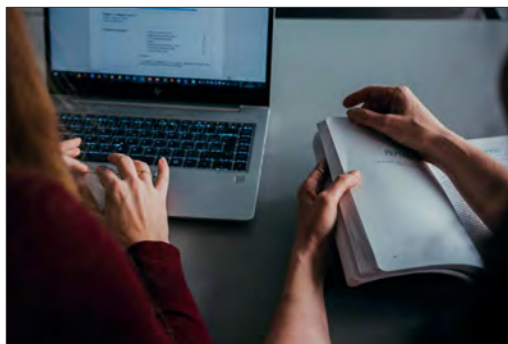
User Category	2014-2015	2016	2017	2018	2019	2020 ^{*/}
University Hospital	9	11	14	28	37	90
Internat. Consortia	1	3	7	12	21	30
Academic Center	0	3	6	8	18	21
SME	0	0	0	1	3	8
Other LRI	0	0	1	1	1	4
Gov/authority/WHO	0	0	0	0	0	2
TOTAL	10	17	28	50	80	125

* / until October 2020

www.czecrin.cz

SPOLUPRÁCE

- Nabízíme svou expertízu a komplexní služby pro realizaci klinického výzkumu v České republice
- Spuštěním nových webových stránek jsme usnadnili přístup ke spolupráci na realizaci klinického výzkumu
- Nové stránky nabízí také komplexní informace o expertíze CZECRIN a tím podávají také jasnou informaci o tom, jak může CZECRIN pomoci v realizaci konkrétního projektu
- www.czecrin.cz





Jihomoravské inovační centrum

**Pomoc s přenosem
inovativních technologií
do praxe**

www.jic.cz



jihomoravský kraj



**MASARYKOVA
UNIVERZITA**



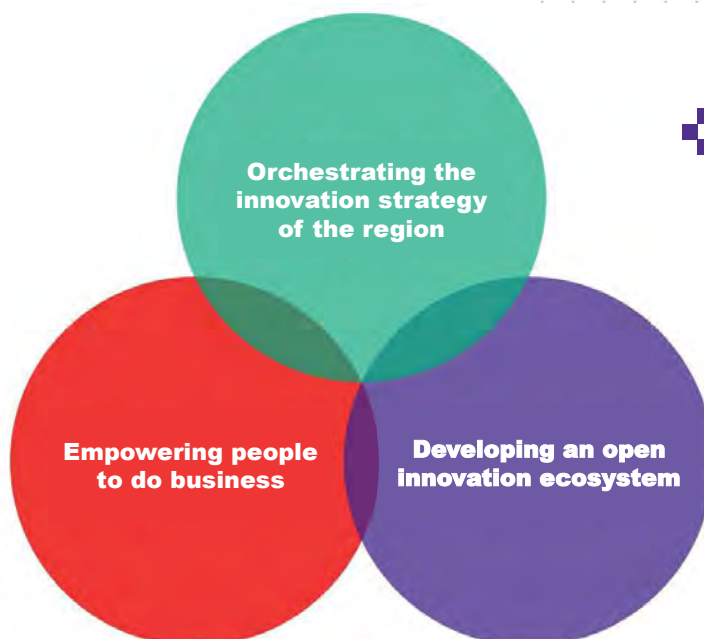
Our founders

B | R | N | O

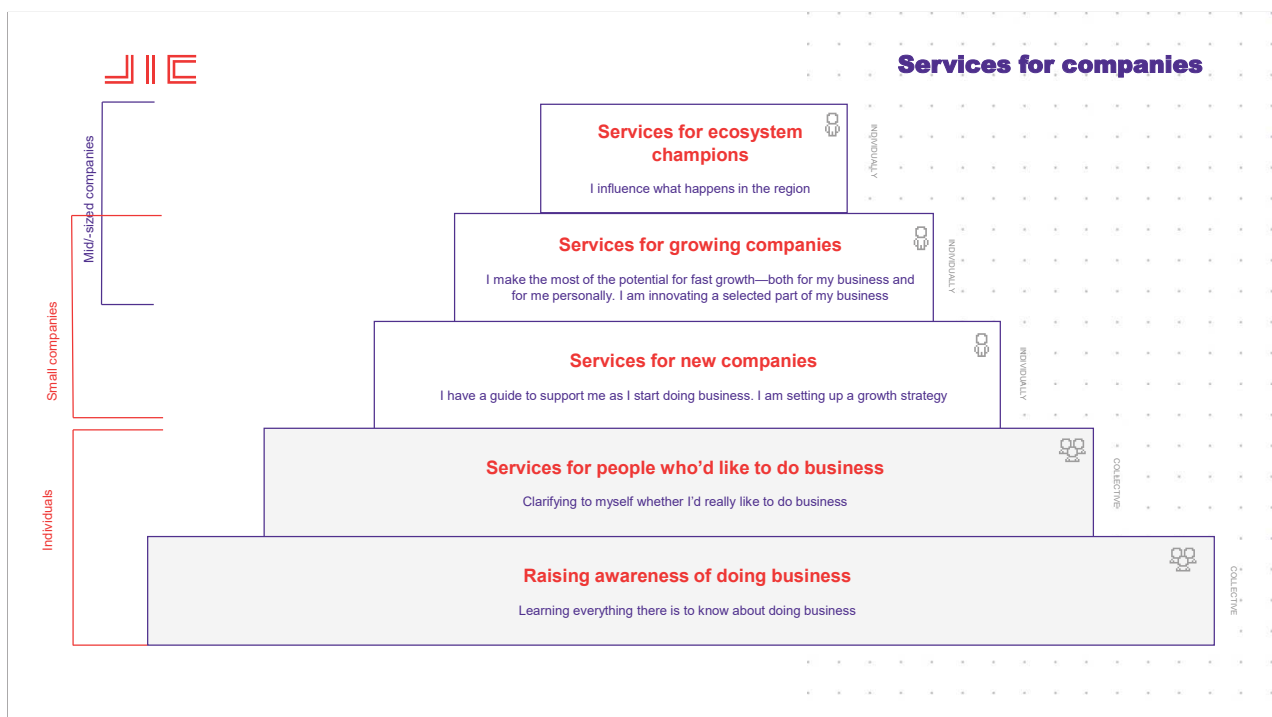
MENDELU



JIC's role



We empower people as they develop businesses that can change the world



	1,264	219
	students	early-stage startups
In 2021, JIC supported:	242	464
	start-ups / small and mid-sized companies	members of the JIC+ community



The most successful companies of #brnoregion



JIC empowered



Scaleups from #brnoregion empowered by JIC



Our staff





COLLECTIVE



KUMST

Údolní 495/19
Brno-střed
602 00



JIC INBIT

Kamenice 34
Brno-Bohunice
625 00



JIC INMEC

Purkyňova 127
Brno-Medlánky
612 00



JIC INTECH

U Vodárny 2
Brno-Žabovřesky
616 00

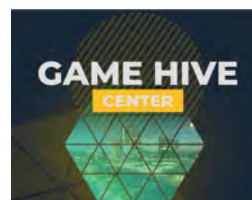
KUMST

brno**ai**

[FAB] BRNO
[FAB] experience



intemac



JIC envisions an open
innovation ecosystem that
is home to globally successful
entrepreneurs

**and inspires
the world!**



Innovation ecosystem

Veřejné instituce

Vzdělávání a výzkum

Neziskové organizace



Firmy



Supporting entrepreneurial minds with good ideas



- Entrepreneurial skill development
- Business consulting and mentoring
- Investment and grant funding
- Connection with other entrepreneurs
- Coworking, offices, laboratories, FabLab

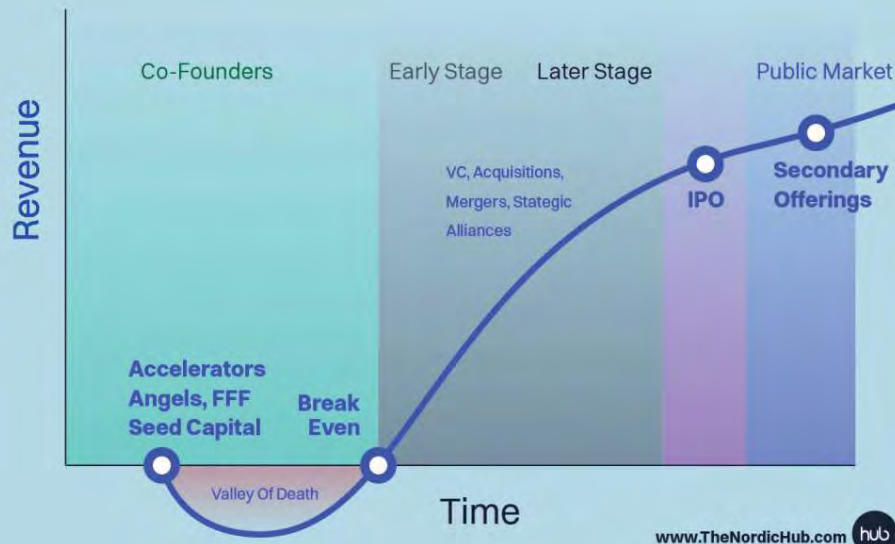
JIC empowers entrepreneurs



JIC empowers entrepreneurs

- ✓ Is there a sufficient addressable market
- ✓ How your product solves customers' problems
- ✓ Why customers should buy from you and not from the competitor
- ✓ Where to raise capital to fund the development
- ✓ How to attract investors
- ✓ How to recruit and hire top people
- ✓ How to split equity among founders
- ✓ What are the terms of the agreement with the university

Startup Lifecycle



Funding

GRANTS

- Horizon Europe (EIC Accelerator)
- Prototype and Verify (Prototypuj a ověřuj) program
- ESA BIC Brno

INVESTORS

- How to find investors for your business
- Feedback to your pitch deck
- JIC Ventures fund



JIC empowers entrepreneurs

Prototypuj a ověřuj

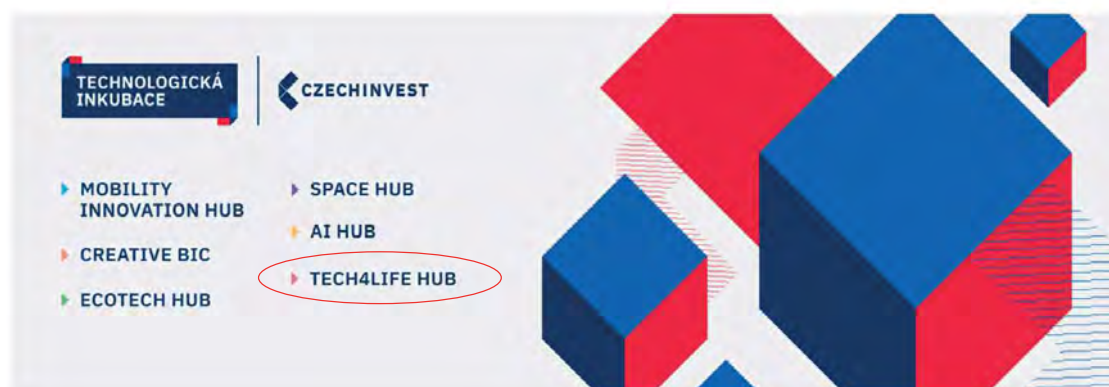
Stojíte na počátku procesu tvorby prototypu, ale potýkáte se s nedostatkem finančních zdrojů? Přihlaste se do programu „Prototypuj a ověřuj“, který vyhlášíme společně s městem Brnem. Získat můžete až 800 tisíc korun!

Aktuální výzva uzavřena. Přihlaste se k odběru newsletteru a informace o otevření další výzvy vám včas pošleme.

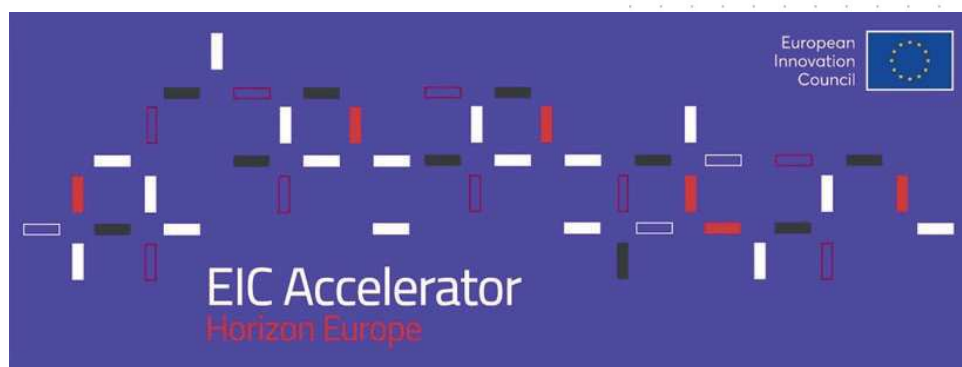


JIC Ventures

Podporujeme nadějně founders s vizí a potenciálem. Investujeme do nich nejen peníze, ale i čas a know-how. Díky zhodnocení investice získáváme prostředky pro podporu dalších firem.



výběr, investice, inkubace, školení



JIC
empowers
entrepreneurs

www.jic.cz

