

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Vladislav Jakubů**

**2022**

Doktorský studijní program  
Lékařská mikrobiologie

**Ampicilin rezistentní  $\beta$ -laktamáza  
negativní kmeny *Haemophilus influenzae*  
izolované v České republice  
v letech 2010-2018**

Ampicillin-resistant  $\beta$ -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* strains isolated in the Czech Republic in 2010-2018

Mgr. Vladislav Jakubů

Školitel: doc. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.

Hradec Králové, 2022

## **Prohlášení autora**

---

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

**Hradec Králové, 2022**

**Vladislav Jakubů**

## **Poděkování**

Chtěl bych tímto poděkovat především své školitelce doc. MUDr. Heleně Žemličkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a pomoc nejen s vypracováním této práce.

Poděkování patří i všem pracovníkům Národní referenční laboratoře pro antibiotika Státního zdravotního ústavu za pečlivou práci při přípravě vzorků a pomoc s vyhodnocováním získaných dat.

# 1 Obsah

1	Obsah.....	5
2	Seznam použitých zkratek.....	7
2.1	Seznam zkratek kromě aminokyselin.....	7
2.2	Seznam proteinogenních aminokyselin.....	9
3	Souhrn.....	10
3.1	Summary.....	11
4	Úvod.....	12
4.1	<i>Haemophilus influenzae</i> .....	12
4.1.1	Typizace kmenů.....	12
4.1.2	Buněčné struktury.....	12
4.1.3	Patogeneze.....	13
4.1.4	Epidemiologie.....	16
4.2	Ampicilin, léčba hemofilových infekcí.....	17
4.3	$\beta$ -laktamázy TEM a ROB.....	19
4.3.1	ROB-1 $\beta$ -laktamáza.....	20
4.3.2	TEM-1 $\beta$ -laktamáza.....	20
4.4	Přehled možných fenotypů citlivosti k $\beta$ -laktamům u <i>H. influenzae</i> .....	21
4.5	Neenzymatická rezistence.....	22
4.6	PBP3, tvorba peptidoglykanu a buněčné dělení.....	22
4.7	Struktura PBP3.....	26
4.7.1	C-terminální modul.....	29
4.7.2	N-terminální modul.....	31
4.7.3	PBP388–165 subdoména.....	32
4.7.4	Interakce PBP3 s $\beta$ -laktamy.....	33
4.8	Aminokyselinové substituce v PBP3.....	33
5	Cíle práce.....	35
6	Materiály a metody.....	36
6.1	Kmeny.....	36
6.2	Testování citlivosti na $\beta$ -laktamy.....	37
6.3	Testování citlivosti na ostatní antibiotika.....	38
6.4	PCR detekce $\beta$ -laktamáz.....	38
6.5	Detekce mutací v genu <i>ftsI</i> a komparativní analýza.....	39
6.5.1	Real-Time PCR pro detekci mutace N526K.....	39

6.5.2	Sekvenace genu <i>ftsI</i> .....	40
6.5.3	Sekvence bází a aminokyselinová sekvence analyzovaného úseku <i>ftsI</i> .....	42
6.5.4	Komparativní analýza .....	43
6.6	Multi-Locus Sequence Typing (MLST) .....	43
6.6.1	PCR Multi-Locus Sequence Typing .....	43
6.7	Klonální analýza.....	45
6.8	Čištění produktů po amplifikačních reakcích .....	46
6.8.1	Přečištění po první amplifikační reakci.....	46
6.8.2	Přečištění po druhé, sekvenační, amplifikační reakci.....	47
6.9	Vizualizace produktů PCR.....	48
6.10	Extrakce DNA.....	48
7	Výsledky.....	49
7.1	Fenotypová detekce mutací .....	49
7.2	Výsledky vyšetření citlivosti na ostatní antibiotika .....	56
7.3	Diskrepance mezi výsledky vyšetření MIC a diskovou difúzní metodou.....	57
7.4	Aminokyselinové záměny v PBP3.....	58
7.4.1	$\beta$ -laktamázy u rPBP3 a sPBP3 kmenů .....	59
7.4.2	Mutace v genu <i>ftsI</i> .....	59
7.4.3	Vztah mezi aminokyselinovými záměnami a citlivostmi k $\beta$ -laktamům .....	59
7.5	Multi-Locus Sequence Typing a analýza klonálních komplexů.....	60
7.5.1	goeBURST – single locus variant.....	62
7.5.2	goeBURST – Full MLST .....	63
7.5.3	Hierarchical Clustering - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean .....	64
7.5.4	Neighbor-Joining - Studier-Keppler Criterion.....	65
8	Diskuse.....	67
9	Závěry .....	72
9.1	Závěry v bodech: .....	73
10	Literatura.....	74

## 2 Seznam použitých zkratek

### 2.1 Seznam zkratek kromě aminokyselin

μg	mikrogram
μl	mikrolitr
AA	aminokyseliny
AMC	amoxicilin/klavulánová kyselina
AMP	ampicilin
ATCC	American Type Culture Collection
blaROB-1	β-laktamáza ROB-1
blaTEM-1	β-laktamáza TEM-1
BLNAR	β-laktamáza negativní ampicilin rezistentní
BLPAR	β-laktamáza pozitivní ampicilin rezistentní
bp	base pair
BURST	Based Upon Related Sequence Types algorithm
CC	klonální komplex
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CIP	Collection de l'Institut Pasteur
CO <sub>2</sub>	oxid uhličitý
CRX	cefuroxim
CTX	cefotaxim
ČR	Česká republika
CSF	Cerebrospinal fluid
DNA	kyselina deoxyribonukleová (Deoxyribonucleic Acid)
dNTPs	2'-deoxynukleosid 5'-trifosfáty
eBURST	on-line Based Upon Related Sequence Types algorithm
EDTA	ethyldiamintetraoctová kyselina
ESBL	širokospektrá β-laktamáza (Extended Spectrum β-Lactamase)
EtOH	ethylalkohol
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FtsI	transpeptidáza I (synonymum PBP3)
GIT	gastrointestinální trakt
goeBURST	global optimal on-line Based Upon Related Sequence Types

	algorithm
H <sub>2</sub> O	voda
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> typ b
IgA	imunoglobulín A
kbp	kilo base pair
LOS	lipooligosacharidy
MALDI-TOF MS	hmotnostní spektrometrie (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight Mass Spectrometry)
Mbp	mega base pair
MgCl <sub>2</sub>	chlorid hořečnatý
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MIC <sub>50</sub>	Minimum Inhibitory Concentration 50 % testované populace
MIC <sub>90</sub>	Minimum Inhibitory Concentration 90 % testované populace
MLST	Multi-Locus Sequence Typing
ng	nanogram
NaOAc	octan sodný
NRL pro ATB	Národní referenční laboratoř pro antibiotika
PBP3	penicillin-binding-protein 3 (FtsI)
PCR	polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PEN	penicilin
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
PRP	polyribitolfosfát
PubMLST	Public databases for molecular typing and microbial genome diversity
rPBP3	PBP3 s aminokyselinovými záměnami vedoucími k rezistenci k β-laktamům
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
sPBP3	nezměněný PBP3, bez rezistence k β-laktamům
ST	sekvenční typ
SZÚ	Státní zdravotní ústav
Tn	transpozón
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
USA	Spojené státy Americké
β-NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid



## 2.2 Seznam proteinogenních aminokyselin

Název, zkratka a jednopísmenkové označení aminokyseliny

Aminokyseliny s alifatickým postranním řetězcem

- Glycin Gly (G)
- Alanin Ala (A)
- Valin Val (V)
- Leucin Leu (L)
- Isoleucin Ile (I)

S karboxylovou nebo amidovou skupinou na postranním řetězci

- Kyselina asparagová Asp (D)
- Asparagin Asn (N)
- Kyselina glutamová Glu (E)
- Glutamin Gln (Q)

S aminovou skupinou na postranním řetězci (bazické skupiny)

- Arginin Arg (R)
- Lysin Lys (K)

S aromatickým jádrem nebo hydroxylovou skupinou na postranním řetězci

- Histidin His (H)
- Fenyloalanin Phe (F)
- Serin Ser (S)
- Threonin Thr (T)
- Tyrosin Tyr (Y)
- Tryptofan Trp (W)

Se sírou v postranním řetězci

- Methionin Met (M)
- Cystein Cys (C)

Aminokyseliny obsahující sekundární amin

- Prolin Pro (P)

### 3 Souhrn

Podle výsledků pravidelné surveillance rezistence bakteriálních původců infekcí dýchacích cest vzrůstá v České republice počet kmenů *Haemophilus influenzae* s neenzymatickou rezistencí k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. Neenzymatická rezistence je podmíněna mutacemi v genu *ftsI* kódujícím penicilin-vážíci proteiny (PBP3), jejichž důsledkem je snížená schopnost vázat  $\beta$ -laktamová antibiotika. Průkaz tohoto typu rezistence je obtížnější než detekce  $\beta$ -laktamázy, která je u *H. influenzae* stále nejčastější příčinou rezistence k aminopenicilinům.

Analýzou souboru 228 kmenů *H. influenzae* bylo zjištěno, že nejvyšší možný záchyt (99,5 %) izolátů s neenzymatickou rezistencí způsobenou mutacemi v genu *ftsI*, je možno v rutinní praxi dosáhnout při současném vyšetření citlivosti vůči penicilinu, ampicilinu, amoxicilinu a cefuroximu diskovou difúzní metodou dle metodologie EUCAST. V současnosti doporučovanou metodou EUCAST s využitím pouze penicilinu byl záchyt mutací nižší, 95,7 %.

Sekvenační analýza prokázala značnou variabilitu mutací genu *ftsI*. V souboru 228 kmenů bylo zjištěno celkem 37 různých kombinací aminokyselinových záměn, které se vyskytly na 23 pozicích v proteinu PBP3 (V329I, D350N, S357N, A368T, M377I, S385T, A388V, L389F, P393L, A437S, I449V, G490E, I491V, R501L, A502S, A502T, A502V, V511A, R517H, I519L, N526K, A530S a T532S). Nejčastější kombinací (35 %) aminokyselinových záměn byla kombinace D350N, M377I, A502V, N526K. Epidemiologická typizace MLST nenaznačuje klonální rozšíření konkrétního typu/klonu. Celkem bylo zjištěno 74 ST tvořících šest klonálních komplexů (CC) s nalezeným společným předkem, osm CC bez známého předka a 33 singletonů. Nejrozšířenější ST 1034 byl spojen především s kombinací mutací D350N, M377I, A502V, N526K.

### 3.1 Summary

According to the results of regular surveillance of resistance of bacterial pathogens of respiratory tract infections, the number of *Haemophilus influenzae* strains with non-enzymatic resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics is increasing in the Czech Republic. Non-enzymatic resistance is caused by mutations in the *ftsI* gene encoding penicillin-binding protein (PBP3), which result in a reduced ability to bind  $\beta$ -lactam antibiotics. Demonstration of this type of resistance is more difficult than detection of  $\beta$ -lactamase, which is still the most common cause of aminopenicillin resistance in *H. influenzae*.

Analysis of a set of 228 *H. influenzae* strains revealed that the highest possible detection (99.5%) of isolates with non-enzymatic resistance due to mutations in the *ftsI* gene could be achieved in routine practice by simultaneous examination of penicillin, ampicillin, amoxicillin and cefuroxime disc diffusion method according to the EUCAST methodology. The currently recommended EUCAST method using only penicillin had a lower mutation detection rate of 95.7%.

Sequence analysis showed considerable variability in *ftsI* gene mutations. In the set of 228 strains, a total of 37 different combinations of amino acid substitutions were found to occur at 23 positions in the PBP3 protein (V329I, D350N, S357N, A368T, M377I, S385T, A388V, L389F, P393L, A437S, I449V, G490E, I491V, R501, A502V, V511A, R517H, I519L, N526K, A530S and T532S). The most common combination (35%) of amino acid substitutions was the combination D350N, M377I, A502V, N526K. Epidemiological typing did not indicate a spread of particular MLST type/clone. 74 STs were found, forming six clonal complexes (CCs) with a founder (ancestor) found, eight CCs without a founder found, and 33 singletons. The most widespread ST 1034 was associated mainly with a combination of mutations D350N, M377I, A502V, N526K.

## 4 Úvod

### 4.1 *Haemophilus influenzae*

*H. influenzae* je nejvýznamnější zástupce rodu *Haemophilus*, který patří do čeledi *Pasteurellaceae*. Jsou to gramnegativní fakultativně anaerobní, nesporulující kokobacily s velikostí 1 x 0,3 µm. Řadí se mezi kultivačně náročné bakterie vyžadující přídavek suplementů, faktoru X (protoporfyrinu IX - metabolického meziprojektu v biosyntéze heminu) a faktoru V (NAD) do růstových medií. Tyto růstové požadavky se odrazily přímo v názvu bakterie: *Haemophilus* znamená „milující krev“ a odkazuje tak na fakt, že oba faktory potřebné pro růst se nacházejí v erytrocytech [1]. Obohacený čokoládový agar obsahující 5 % lyzované ovčí krve a doplněný potřebnými suplementy pak představuje univerzální médium, které je běžně používané v klinických laboratořích ke kultivaci *Haemophilus* spp. Dalším používaným médiem je Levinthal agar, který nabízí díky své průhlednosti výhodu v tom, že umožňuje detekci iridescence kolonií, vlastnosti, která je často spojována s přítomností polysacharidového pouzdra. Optimální kultivační podmínky se nacházejí v rozmezí 35 – 37 °C v aerobní atmosféře s přídavkem 5 – 7 % CO<sub>2</sub> [2].

#### 4.1.1 Typizace kmenů

Kmeny *H. influenzae* mohou produkovat jeden ze šesti různých kapsulárních polysacharidů nebo mohou být neopouzdrěné. Neopouzdrěné kmeny se označují jako netytovatelné (NTHi). Podle přítomnosti polysacharidového kapsulárního antigenu se pak dělí do 6 odlišných typů, a až f. Další možností podrobnějšího určování kmenů *H. influenzae* je biotypizace, jejímž základem je produkce indolu, ornitindekarboxylázy a ureázy (Tabulka 1). Kmeny kapsulárního typu b obecně spadají do biotypů I a II [3,4].

#### 4.1.2 Buněčné struktury

Buněčné struktury jsou podobné jako u ostatních gramnegativních bakterií. Vnější membrána buněčné stěny představuje interface mezi organismem a lidským hostitelem a spolu s lipooligosacharidy (LOS) obsahuje integrální a povrchové proteiny. Nejvýznamnější jsou pak membránové proteiny P1 až P6. Funkce těchto

proteinů spočívá ve tvorbě porinů (P2, P5) a dále například ve vychytávání hemu (P4). Některé mají vysoce konzervativní strukturu napříč kmeny (P6), jiné se liší kmen od kmene (P1, P2, P5) [5]. Membránové LOS tvoří hlavní složku buněčné stěny (až 4 % suché hmotnosti celého organismu). LOS obsahují klasickou část, lipid A, ale na rozdíl od enterobakterií u nich chybí O postranní řetězec [6]. Složení mastných kyselin buněčné stěny zahrnuje n-tetradekanoát (14:0), 3-hydroxy-tetradekanoát (3-OH-14:0), n-hexadekanoát (16:0) a hexadekanoát (16:1). Genom o velikosti 1,8 Mbp se vyznačuje obsahem G+C od 37 do 45 %. Podle sekvence genomu je druhu *H. influenzae* nejbližší příbuzný *H. aegyptius* vykazující 90% homologii, naopak nejvzdálenější je druh *H. ducreyi* pouze s 18% homologií. Významná je také vnitrodruhová heterogenita, která se u kmenů *H. influenzae* pohybuje od 50 do 100 % [7].

Tabulka 1. Určování biotypů *H. influenzae* podle biochemických vlastností.

Biotyp	indol	ureáza	ornitindekarboxyláza
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

#### 4.1.3 Patogeneze

Mezi virulentními kmeny *H. influenzae*, které jsou vybaveny polysacharidovým pouzdrém, je nejdůležitějším typ b (Hib). U malých dětí může Hib způsobovat infekce závažného charakteru, jako např. bakteriémii, epiglottitidu, pneumonii, nebo meningitidu. Kmeny bez pouzdra jsou tzv. netypovatelné a jsou spojené především s neinvazivními infekcemi respiračního traktu (*otitis media acuta*, *sinusitis acuta*, event. akutní exacerbace chronické bronchitidy). U starších dětí a dospělých osob je *H. influenzae* spojen nejčastěji s neinvazivními infekcemi typu sinusitida (až třetina

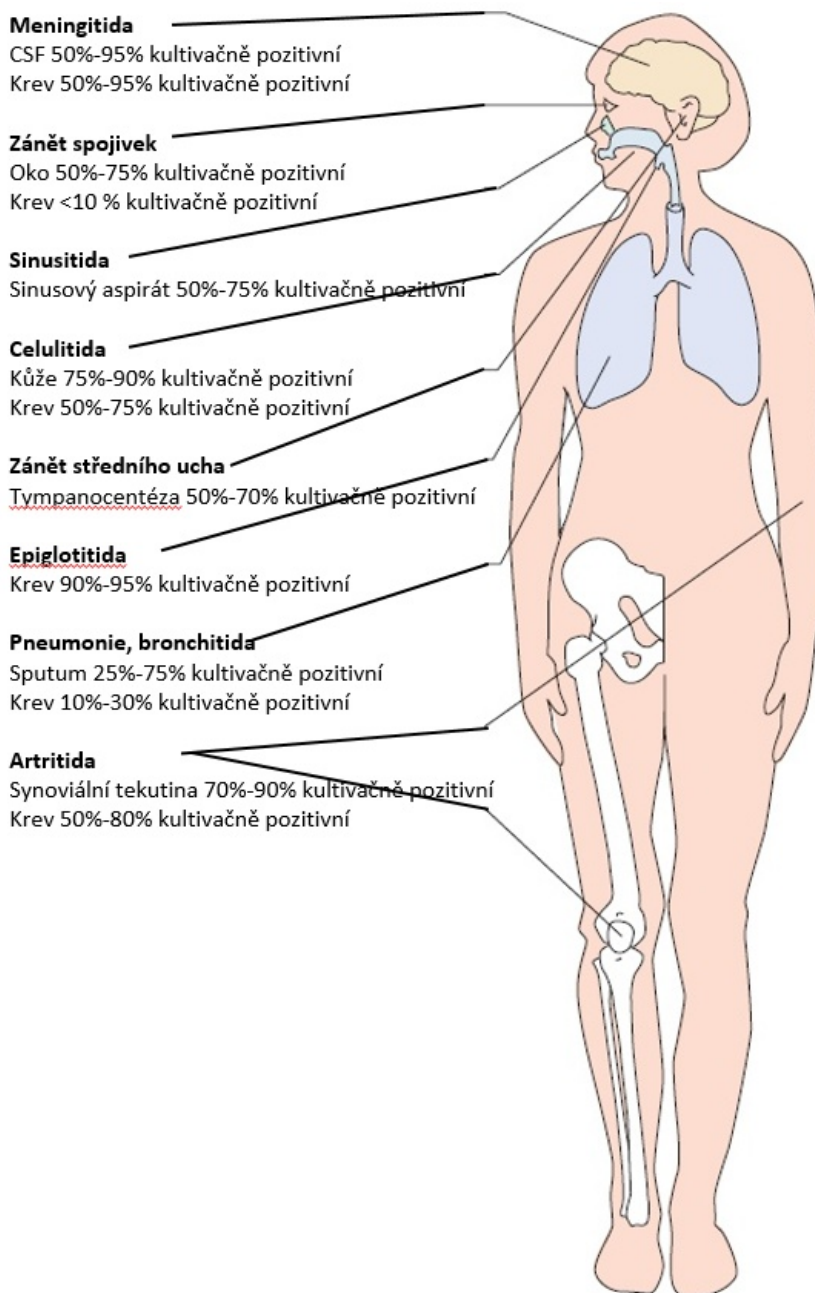
případů) nebo konjunktivitida. Přenášen je kapénkami nebo přímým kontaktem [8,9]. V rozvojových zemích do nedávna patřil mezi významné příčiny dětské mortality způsobené pneumonií [10]. Míra kolonizace nazofaryngu závisí na věku a pohybuje se od 20 % u ročních dětí do 50 % u šestiletých a následně klesá na hodnotu 5 % v dospělosti. U dětí může tvořit v průměru až 1,8 % celkové kultivovatelné mikroflóry nazofaryngu [11,12]. Ve většině případů je nazofaryng kolonizován jedním kmenem po dobu několika týdnů, poté se kmen ztratí a je nahrazen novým kmenem [13].

Patogeneze infekcí dýchacího traktu spočívá v kolonizaci nazofaryngu a pokud koncentrace bakterií překročí kritickou úroveň, šíří se následně nejen do přilehlých míst, ale i do mozkových blan, podkoží, kloubů, pohrudnice, osrdečníku, plic atd (Obrázek 1). Velmi často tomuto šíření předchází poškození mukociliární činnosti, slizniční integrity a funkce neutrofilů díky virové infekci. Anatomické abnormality a oslabená imunita mohou být predispozicemi pro hemofilové systémové infekce. Inkubační doba pro rozvoj infekce zatím není známá [14].

Hlavním faktorem virulence u *H. influenzae* typu b je antifagocytární polysacharidová kapsula, která obsahuje ribózu, ribitol a fosfát (běžně označovaný jako polyribitolfosfát (PRP)). Protilátky namířené proti pouzdru výrazně stimulují bakteriální fagocytózu a komplementem zprostředkovanou baktericidní aktivitu. Tyto protilátky se vyvíjejí v důsledku přirozené infekce, vakcinací purifikovaným PRP nebo pasivním přenosem mateřských protilátek [15].

Vlastní prvotní nespecifická adherence hemofilů na orofaryngeální epiteliální buňky je umožněna pili na povrchu hemofilů. Jako specifické receptory slouží ale sialylované glykosfingolipidy, proto jsou i kmeny bez pilů schopné vazby na epiteliální buňky. Přes sliznice pak prochází převážně intercelulárně, i když intracelulární průnik byl také zaznamenán [15,16]. Průnik do krevního řečiště se děje ze subepiteliální tkáně přímo do kapilár zásobujících epiteliální tkáň. Každý krok v patogenезi je spojen s kombinací exprese několika virulenčních faktorů, mezi které patří některé proteiny P (P2, P5), LOS, pili a IgA proteáza. Některé z těchto virulenčních faktorů jsou zodpovědné za vyvolání imunitní reakce u hostitele [17]. Závažnost systémového onemocnění je pak nepřímou úměrou rychlosti odstraňování bakterií z krve. Přítomnost protilátek, komplementu a fagocytárních buněk určuje clearance bakteriémie a může ovlivnit šíření bakterie v organismu. Riziko meningitidy a epiglotitidy je významně vyšší u pacientů bez anti-PRP protilátek, u pacientů s deplecí komplementu a u pacientů po

splenektomii. Složka lipooligosacharidu lipid A indukuje zánět mozkových blan na zvířecím modelu a může být odpovědná za iniciaci této reakce i u lidí [15,17].



Obrázek 1. Místa možných infekcí způsobených kmeny *H. influenzae*. S příchodem konjugované vakcíny se většina infekcí u dospělých vyskytuje v oblastech sousedících s orofaryngem (tj dýchací cesty, dutiny, uši). Závažné systémové infekce (např. meningitida, epiglottitida) se mohou objevit u neimunních pacientů.

*Upraveno dle Murry, P.R. MEDICAL MICROBIOLOGY, EIGHTH EDITION, Copyright © 2016, Elsevier Inc. All rights reserved.*

#### 4.1.4 Epidemiologie

Epidemiologie hemofilových onemocnění se za posledních 20 let dramaticky změnila. Před zavedením konjugovaných vakcín proti *H. influenzae* typu b se ve Spojených státech u dětí mladších 5 let vyskytlo ročně odhadem 20 000 případů invazivního onemocnění. Typ b byl zodpovědný za více než 95 % všech invazivních hemofilových infekcí. Zavedení plošného očkování proti opouzdřeným kmenům sérotypu b minimalizovalo výskyt závažných hemofilových invazivních onemocnění a dnes jsou tyto infekce vzácnější a jsou nejčastěji způsobené neopouzdřenými netyrovatelnými kmeny [18].

Záněty středouší způsobené těmito organismy jsou primárně dětská onemocnění, ale mohou se objevit i u dospělých. Plicní onemocnění nejčastěji postihuje starší osoby, zejména ty, kteří mají v anamnéze základní chronickou obstrukční plicní nemoc (CHOPN) nebo stavy predisponující k aspiraci (např. alkoholismus, změněný duševní stav). Novorozenci mají nízké riziko infekce kvůli přítomnosti mateřských protilátek získaných prostřednictvím kolostra. Přibližně ve dvou měsících již začnou mateřské protilátky proti pouzdru PRP ubývat a kojenci jsou tak vystaveni vysokému riziku rozvoje invazivního onemocnění *H. influenzae* [18]. Bylo zjištěno, že kmeny biotypu IV, alespoň v době před očkováním Hib, často způsobovaly systémové infekce u novorozenců a také agresivní infekce genitálního traktu u žen po porodu [19].

První polysacharidové vakcíny proti *H. influenzae* typu b neposkytovaly ochranu pro děti mladší 18 měsíců (populace s největším rizikem onemocnění), protože u nich není ještě dostatečně vyvinuta imunitní odpověď na polysacharidové antigeny. V roce 1987 byly v USA zavedeny vakcíny obsahující purifikované PRP antigeny konjugované s proteinovými nosiči (tj. difterickým toxoidem, tetanovým toxoidem, meningokokovým proteinem vnější membrány). Tento typ vakcíny dokáže navodit protilátkovou odpověď i u dvouměsíčních a starších kojenců. Díky tomu byla systémová onemocnění u dětí mladších 5 let ve Spojených státech prakticky eliminována, v roce 2011 bylo hlášeno pouze 14 případů [20].

Většina infekcí *H. influenzae* typu b se nyní vyskytuje u dětí, které nejsou imunní (kvůli neúplnému očkování nebo špatné odpovědi na vakcínu) a u starších osob s oslabenou imunitou nebo po chirurgickém výkonu. Kromě toho se invazivní onemocnění způsobené ostatními sérotypy opouzdřených kmenů (sérotypy a, c, d, e, f) a neopouzdřenými kmeny nyní stalo mnohem běžnějším než onemocnění



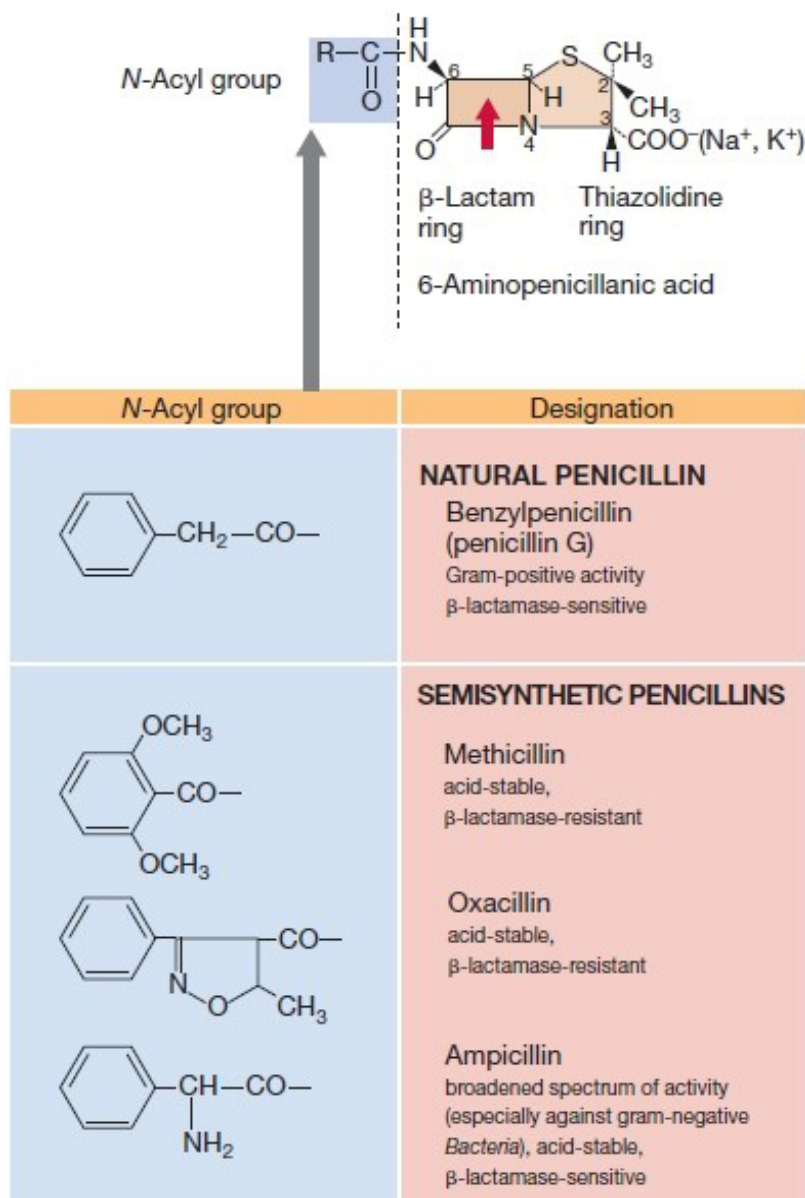
způsobené sérotypem b. V roce 2011 uváděla zpráva amerického Centra pro kontrolu a prevenci nemocí (CDC) výskyt typů u invazivních izolátů za období deseti let následovně: 69,5 % netypovatelných kmenů, 2,2 % jako typ a, 3,6 % jako typ b, 0,3 % jako typ c, 0,3 % jako typ d, 5,7 % jako typ e a 18,3 % jako typ f [21,22]. I v ČR došlo po zavedení očkování proti Hib v roce 2001 k poklesu nemocnosti tímto typem z 1,1/100000 obyvatel na 0,19/100000 obyvatel v roce 2020. Od roku 2009 byl pak nejčastějším původcem závažných onemocnění neopouzdrěný typ (59 %), dále typ f (9 %) a typ e (5 %). Hib ve sledovaném období způsobil 5 % onemocnění [23].

*H. influenzae* typu b zůstává i přes zavedené očkování nejvýznamnějším dětským patogenem v mnoha zemích světa. Odhaduje se, že na přelomu století každý rok docházelo na celém světě u dětí ke třem milionům případů vážných onemocnění a až k 700 000 úmrtí [24].

Počet studií o epidemiologii rPBP3 *H. influenzae* je omezený, a proto je obtížné vyvodit jakýkoli závěr o klinickém významu kmenů s tímto mechanismem rezistence. Dostupnost technologie sekvenování celého genomu (WGS) může zvýšit naše znalosti o genomové struktuře patogenních bakterií a WGS provedené na kmenech *H. influenzae* by mohlo poskytnout pohled na genetickou diverzitu, přítomnost faktorů virulence a determinanty antibiotické rezistence, které zlepšily schopnost určitých klonů *H. influenzae* kolonizovat a perzistovat u citlivých hostitelů.

## 4.2 Ampicilin, léčba hemofilových infekcí

Aminopeniciliny jsou lékem volby u neinvazivních hemofilových infekcí od 60tých let 20 století. Do té doby se k léčbě používal chloramfenikol [9]. Polosyntetický penicilin ampicilin je hydrofilní baktericidní antibiotikum, které špatně proniká přes biologické bariéry. Jeho jádro tvoří molekula benzylpenicilinu, který vzniká kondenzací thiazolidinového kruhu se základním  $\beta$ -laktamovým kruhem. Do postranního řetězce benzylpenicilinu má připojenou aminoskupinu (Obrázek 2) a v důsledku této úpravy se původní spektrum penicilinu rozšířilo o četné gramnegativní bakterie [25].



Obrázek 2. Strukturální chemické vzorce vybraných  $\beta$ -laktamových antibiotik a mechanismus účinku  $\beta$ -laktamáz (červená šipka).

Michael T. Madigan, et al. *Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition*. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.

Ampicilin se velmi omezeně vstřebává z GIT, proto musí být podáván parenterálně. Jeho účinek závisí na době, po kterou je koncentrace antibiotika nad úrovní MIC ( $t > MIC$ ) a jeho distribuční objem přibližně odpovídá objemu extracelulární tekutiny. Na bílkoviny se ho váže 10-20 % a celkem malá část je metabolizována (10 %). Ampicilin, i jeho neaktivní metabolit, je vylučován močí, přičemž velký podíl připadá na tubulární sekreci [26]. Velmi podobné vlastnosti má i amoxicilin, který se

liší pouze přidavkem jedné hydroxylové skupiny na benzenovém jádře. Tato skutečnost má ale za následek velký rozdíl ve vstřebávání z trávicího traktu, kdy u ampicilinu dosahuje cca 40%, zatímco u amoxicilinu cca 80 %. Amoxicilin je tak určen pro perorální léčbu aminopeniciliny [27].

Dávkování ampicilinu je díky vyššímu biologickému poločasu možné v 6 hodinovém intervalu a to v rozsahu 8-12 g/den, u závažných infekcí až 16 g/den. Spektrum účinku aminopenicilinů zahrnuje vybrané grampozitivní bakterie a navíc gramnegativní tyčinky jako jsou *H. influenzae*, salmonely, *Escherichia coli*. V porovnání s penicilinem G je účinnější na *Enterococcus faecalis* a *Listeria monocytogenes*. V kombinacích s inhibitory  $\beta$ -laktamáz (kyselina klavulánová, sulbaktam) je účinný na bakterie produkující základní  $\beta$ -laktamázy (ne ESBL), jako jsou TEM a SHV. K relativně četným nežádoucím účinkům léčby aminopeniciliny patří rozvoj dysmikrobie. K závažným nežádoucím účinkům aminopenicilinů patří klostridiová kolitida a těžké alergické reakce (anafylaxe, toxická epidermální nekrolýza) [28].

### 4.3 $\beta$ -laktamázy TEM a ROB

První kmeny *H. influenzae* rezistentní na ampicilin byly hlášeny v 70. letech 20. století v Evropě a ve Spojených státech [29]. Bylo zjištěno, že mechanismem rezistence je produkce plazmidem zprostředkované  $\beta$ -laktamázy, která je inhibována kyselinou klavulánovou nebo sulbaktamem. Takové kmeny se nazývají  $\beta$ -laktamáza-positivní ampicilin-rezistentní izoláty, BLPAR. Vlastní mechanismus rezistence spočívá ve štěpení molekuly  $\beta$ -laktamu (konkrétně laktonového kruhu) enzymem  $\beta$ -laktamázu. Jednoduchá detekce produkce  $\beta$ -laktamáz je založena na hydrolýze chromogenního cefalosporinu nitrocefínu, další možností je použití metody polymerázové řetězové reakce (PCR) k průkazu přítomnosti genů  $\beta$ -laktamáz. Kmeny produkující  $\beta$ -laktázu mají obvykle vyšší MIC ampicilinu ( $\geq 16\text{mg/l}$ ) a jsou citlivé ke kombinaci ampicilinu či amoxicilinu s inhibitory  $\beta$ -laktamáz. Cefalosporiny druhé i třetí generace zůstávají účinné [29,30]. U *H. influenzae* byly popsány dva různé typy  $\beta$ -laktamáz, TEM-1 a ROB-1, obě z Amblerovy skupiny A [29,30].

#### 4.3.1 ROB-1 $\beta$ -laktamáza

Tato  $\beta$ -laktamáza je známá od roku 1981. Obvykle je nesena na malých plazmidech (4-5 Kbp). ROB-1 patří do laktamáz třídy A a pochází zřejmě ze zvířecích patogenů, rodu *Pasteurella* [31]. U ROB-1 enzymu byly popsány obtíže s detekcí pomocí nitrocefínové metody [32]. Prevalence této  $\beta$ -laktamázy je vyšší pouze v některých světových regionech (USA, Mexiko, Japonsko) a jako vysvětlení se udává vyšší spotřeba cefakloru v těchto zemích. Korelaci mezi rezistencí k cefakloru a výskytem ROB-1 pozitivních izolátů uvádějí například Karlowsky *et al.* [33].

#### 4.3.2 TEM-1 $\beta$ -laktamáza

Druhá, a v celosvětovém měřítku mnohem více rozšířená, je TEM-1  $\beta$ -laktamáza. Kmeny s touto  $\beta$ -laktamázou byly poprvé zaznamenány v roce 1970, ale až v roce 1975 byla charakterizována a potvrzena její role při rezistenci k  $\beta$ -laktamům. Existuje se třemi různými promotory, 60 % kmenů obsahuje promotor Pa/Pb, 20 % Pdel a 20 % Prpt. Méně často se vyskytující promotory jsou odvozené od základního Pa/Pb a to pomocí delece 135 bp (mezi G23 a C157) u Pdel [34] nebo pomocí inserce sekvence 54 bp (u Prpt), která má za následek repetici oblasti 145T až 198A [35]. Díky zvýšené genové expresi mohou vykazovat kmeny s promotorem Pdel vyšší hladinu rezistence k některým  $\beta$ -laktamům. TEM-1 může být nesena na malých (10 kbp) nekonjugativních plazmidech nebo častěji na konjugativních (40 kbp) plazmidech, na kterých jsou obvykle neseny i geny determinující rezistenci k dalším antibiotikům (chloramfenikol, tetracyklin) [36]. Díky schopnosti přenosu hrají tyto konjugativní plazmidy mnohem větší úlohu při šíření rezistence nejen k  $\beta$ -laktamům. TEM-1 byla do hemofilů zřejmě přenesena na Tn2 nebo Tn3 (Obrázek 3) z *Enterobacteriaceae* [37]. V roce 2002 byla u dvou kmenů *H. parainfluenzae* detekována TEM  $\beta$ -laktamáza z rodiny ESBL. Přesto, že mezi druhy *H. influenzae* a *H. parainfluenzae* dochází k výměně konjugativních plazmidů, nebyl naštěstí výskyt ESBL  $\beta$ -laktamáz u *H. influenzae* do dnešní doby prokázán [38].



Obrázek 3. Schéma struktury transpozónu Tn3. Transpozón Tn3 je členem rodiny transpozónů TnA. Centrální oblast obsahuje tři geny (*tnpA*, *tnpR* a *bla*) kódující transpozázu (TnpA), resolvázu (TnpR) a  $\beta$ -laktamázu – propůjčující rezistenci k ampicilinu. Šipkou je označeno místo využívané pro transpoziční replikační proces.

Murry, P.R. *MEDICAL MICROBIOLOGY, EIGHTH EDITION*, Copyright © 2016, Elsevier Inc. All rights reserved.

#### 4.4 Přehled možných fenotypů citlivosti k $\beta$ -laktamům u *H. influenzae*

Podle výsledků vyšetření citlivosti k  $\beta$ -laktamům diskovou difúzní metodou a vyšetření produkce  $\beta$ -laktamázy se u *H. influenzae* vyskytují tyto fenotypy citlivosti:

- a) **Kmeny citlivé**, které vytváří inhibiční zónu  $\geq 12$  mm kolem disku s 1 J benzylpenicilinu a jsou citlivé ke všem  $\beta$ -laktamům.
- b) **Producenti  $\beta$ -laktamázy TEM-1**, rezistentní k penicilinům nechráněným inhibitory  $\beta$ -laktamázy (ampicilinu, amoxicilinu a piperacilinu) a citlivé ke kombinacím těchto antibiotik s inhibitory  $\beta$ -laktamázy.
- c) **Kmeny s neenzymatickou rezistencí**, rezistentní k penicilinu (průměr inhibiční zóny  $< 12$  mm) a neprodukující  $\beta$ -laktamázu. U těchto kmenů je třeba vyšetřit další  $\beta$ -laktamy, neboť jejich citlivost k antibiotikům se v závislosti na typu mutace může lišit od citlivosti k penicilinům až po rezistenci k cefalosporinům 3. generace.
- d) **Producenti  $\beta$ -laktamázy ROB-1**, která se u českých kmenů také vyskytuje, jsou rezistentní k aminopenicilinům a k piperacilinu; špatně však reagují při klasickém průkazu pomocí nitrocefínové metody a mohou být tudíž zaměněny za kmeny s neenzymatickou rezistencí.
- e) **Kmeny s kombinovanou rezistencí** produkují  $\beta$ -laktamázu a současně mají neenzymatickou rezistenci. Tyto kmeny jsou rezistentní k penicilinům nechráněným i chráněným inhibitory  $\beta$ -laktamázy (ampicilinu, amoxicilinu, piperacilinu) a ze stejných důvodů, uvedených v bodě c), je u nich zapotřebí vyšetřit další  $\beta$ -laktamy.

## 4.5 Neenzymatická rezistence

Rezistence na ampicilin u *H. influenzae* způsobená jiným mechanismem rezistence než produkcí  $\beta$ -laktamázy byla popsána v 80. letech [39]. Bylo zjištěno, že za tímto novým mechanismem stojí strukturální změny proteinu vázajícího penicilin (PBP3) kódovaného genem *ftsI* [40]. Izoláty vykazující tento typ rezistence jsou známé jako  $\beta$ -laktamáza negativní ampicilin-rezistentní (BLNAR) nebo rPBP3 a na rozdíl od kmenů produkujících  $\beta$ -laktamázu není jejich snížená citlivost k aminopenicilinům ovlivnitelná inhibitory  $\beta$ -laktamázy. Podle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) je však termín BLNAR nepřesný, protože zahrnuje nejen takto původně označované kmeny s rezistencí k aminopenicilinům a neprodukcí  $\beta$ -laktamázy, ale i kmeny, které mají specifický typ mutace ovlivňující citlivost i k jiným  $\beta$ -laktamům, zejména k některým cefalosporinům [41]. Produktem genu *ftsI* je transpeptidáza FtsI, která se účastní syntézy peptidoglykanu. V genu *ftsI* jsou zejména důležité mutace vedoucí k substitucím aminokyselin (AA) v transpeptidázové oblasti proteinu PBP3 [40].

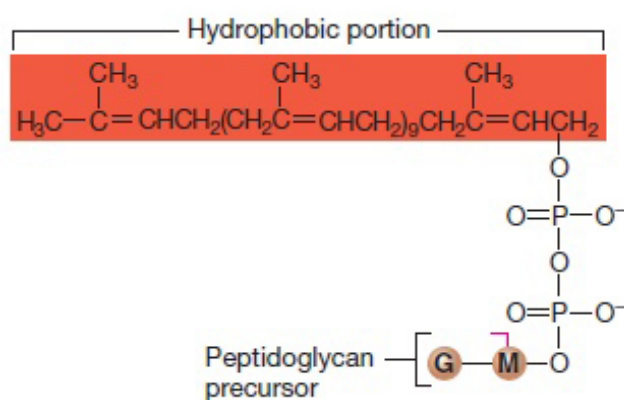
## 4.6 PBP3, tvorba peptidoglykanu a buněčné dělení

Proteiny, na které se váže penicilin a které syntetizují a remodelují peptidoglykan, hlavní složku buněčné stěny bakterií, která dodává buňce její tvar a tuhost, se označují jako PBP (penicillin-binding-protein). PBP jsou nalézány téměř ve všech bakteriích a patří mezi hlavní cíle v antibiotické terapii, zejména pro široce používaná  $\beta$ -laktamová antibiotika. PBP lze dělit do tří tříd, kdy třída A obsahuje enzymy, které se podílí na rozšiřování peptidoglykanové sítě. Tyto enzymy mají kromě transpeptidázové aktivity i aktivitu transglykosylázovou. Inaktivace těchto enzymů působí rozpad buněčné stěny. Část enzymů třídy B má za úlohu především prodlužovat bakteriální buňku do délky. Jsou-li nefunkční, mění se tyčinkovité bakterie v kulovité útvary. Další enzymy této třídy hrají roli při vytváření septa u dělících se buněk, jejich inaktivace vede často k filamentaci. Třída C zahrnuje enzymy, které regulují hustotu peptidoglykanové sítě [42].

PBPs patřících do rodiny acyl-serin transferáz obsahuje *H. influenzae* sedm a jsou rozděleny podle snižující se molekulové hmotnosti. Tyto proteiny jsou také někdy označovány jako PBPs IA, IB, 2, 3A (3B), 4, 5 a 6, a to podle příbuznosti k PBPs *E.coli*.

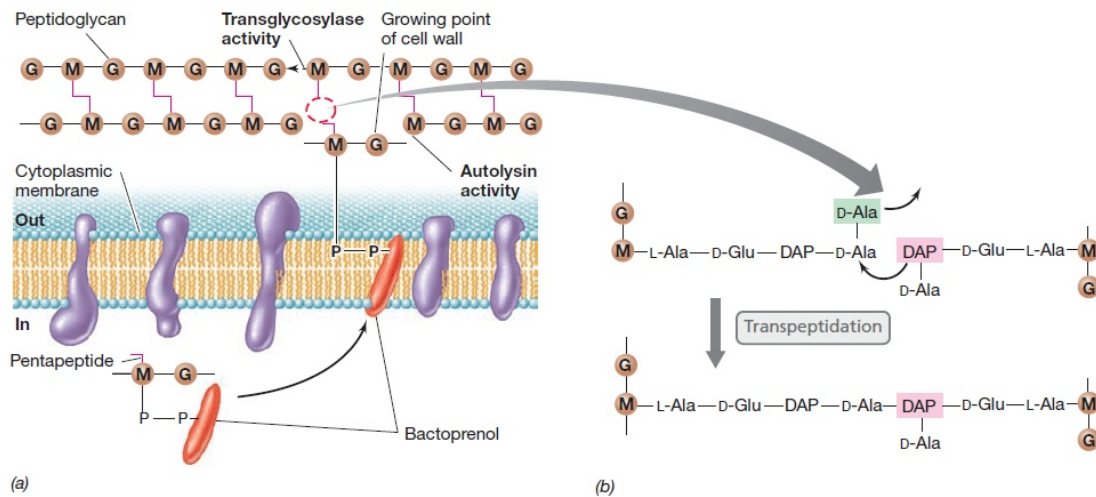
Později se zjistilo, že PBP3A a PBP3B jsou různé formy jednoho proteinu, neboť jsou oba exprimovány z genu *ftsI* [39, 40].

PBP3 patří do třídy PBPs, která se účastní dělení buněk. Během buněčného dělení je peptidoglykan syntetizován periplazmatickou částí makromolekulárního komplexu zvaného divisom. Prekurzory peptidoglykanu jsou transportovány přes cytoplazmatickou membránu do periplazmatického prostoru pomocí baktoprenolu (Obrázek 4, 5). Buněčné dělení je iniciováno polymerací homologu tubulinu FtsZ do kontraktilního kruhu, celého dělení se následně účastní cca 20 proteinů z rodiny FTS a jiných (Obrázek 5, 6, 7 a 8) [43].



Obrázek 4. Bactoprenol (undekaprenol difosfát). Vysoce hydrofobní část molekuly transportuje prekurzory peptidoglykanu buněčné stěny přes cytoplazmatickou membránu. G - N-acetylglukosamin; M - N-acetylmuramová kyselina.

*Michael T. Madigan, et al. Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.*

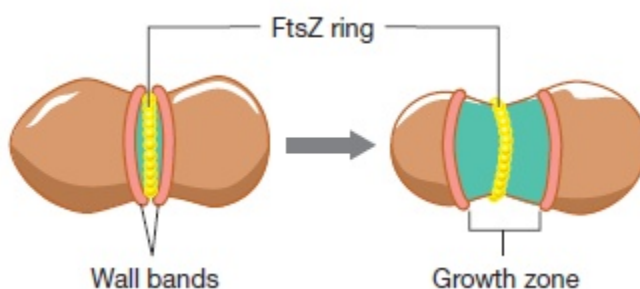


Obrázek 5. Cesta syntézy peptidoglykanu, transpeptidace.

(a) Transport prekurzorů peptidoglykanu přes cytoplazmatickou membránu do místa růstu buněčné stěny. Autolysin rozbíjí glykolytické vazby v existujícím peptidoglykanu, zatímco transglykosyláza syntetizuje peptidoglykan a spojuje starý peptidoglykan s novým.

(b) Transpeptidační reakce, která vede ke konečnému zesíťování dvou glykosidů peptidoglykanových řetězců. Penicilin tuto reakci inhibuje. G - N-acetylglukosamin; M - N-acetylmuramová kyselina.

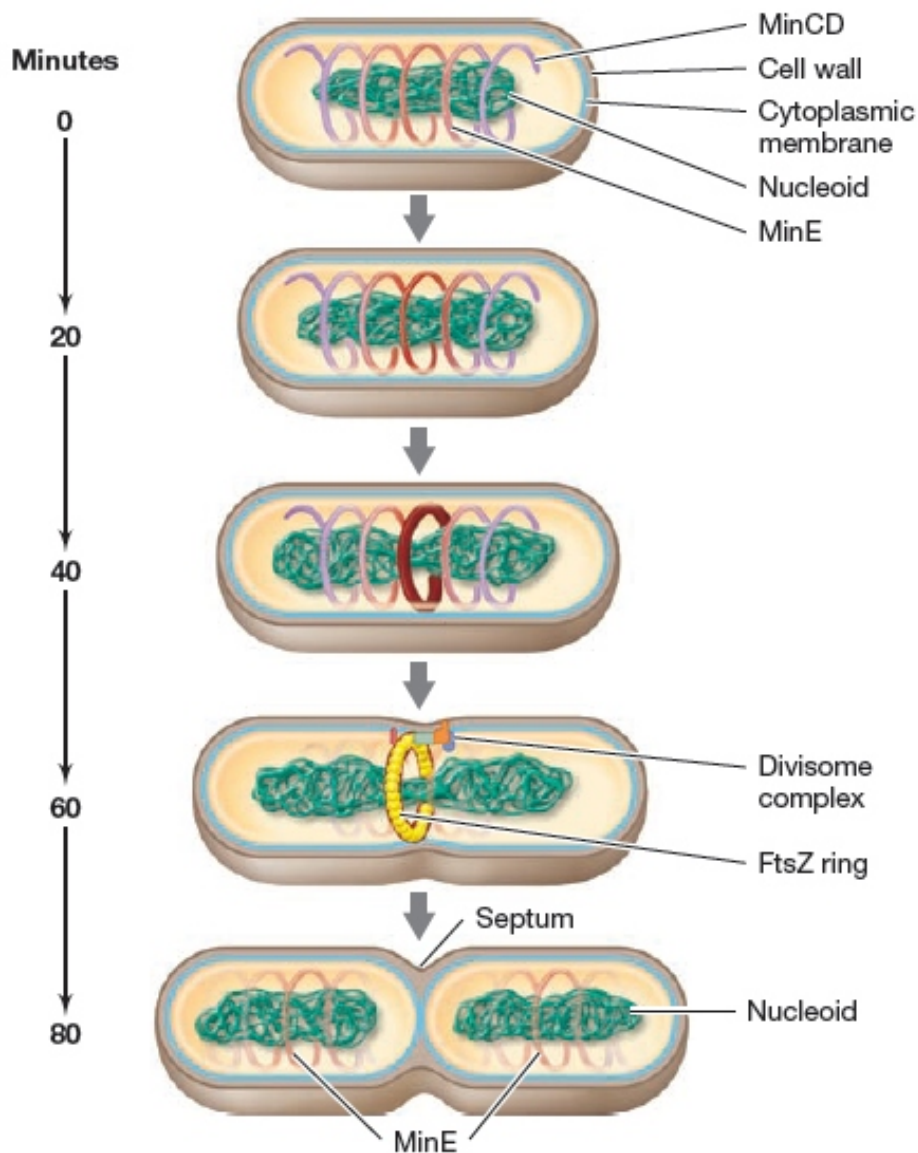
*Michael T. Madigan, et al. Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.*



Obrázek 6. Syntéza buněčné stěny u gramozitivních bakterií - lokalizace syntézy buněčné stěny během buněčného dělení. U koků probíhá syntéza buněčné stěny (znázorněno zeleně) pouze po obvodu z jednoho místa, FtsZ kruhu.

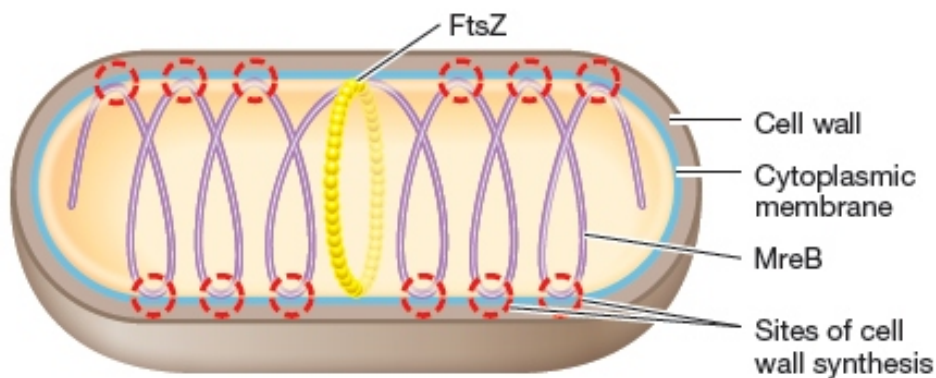
*Michael T. Madigan, et al. Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.*





Obrázek 7. Dělení buněk řízené divizomovým komplexem. Protein MinE řídí tvorbu prstence FtsZ a divizomového komplexu v rovině dělení buněk. Na obrázku je schéma pro buňky *E. coli* rostoucí s rychlostí dělení 80 min.

*Michael T. Madigan, et al. Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.*



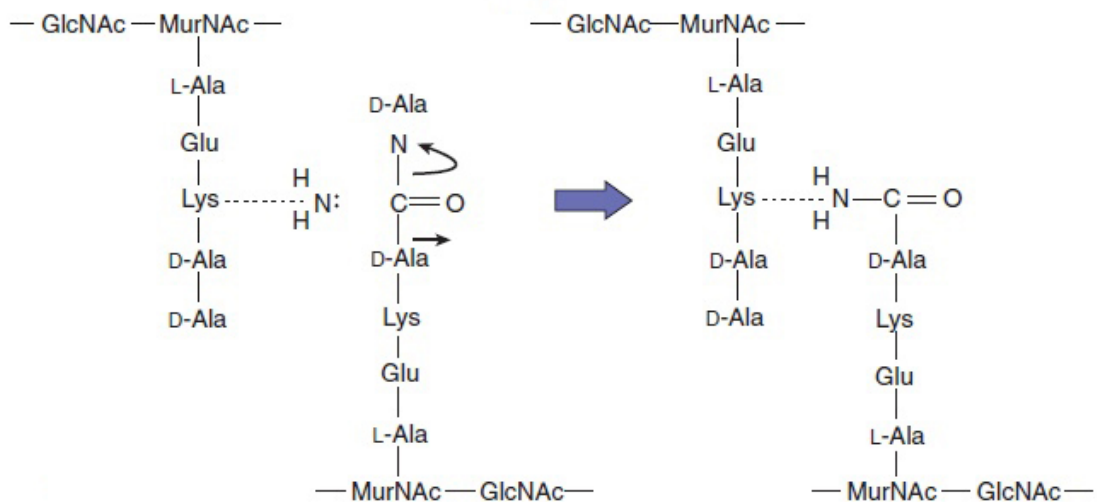
Obrázek 8. Morfologie buněk na začátku buněčného dělení.

Cytoskeletální protein MreB je analogem aktinu, který se vine jako spirála skrze dlouhou osu tyčinkovité buňky a je na několika místech (červené čárkované kroužky) uchycen k cytoplazmatické membráně. Jedná se o místa syntézy nové buněčné stěny.

*Michael T. Madigan, et al. Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.*

#### 4.7 Struktura PBP3

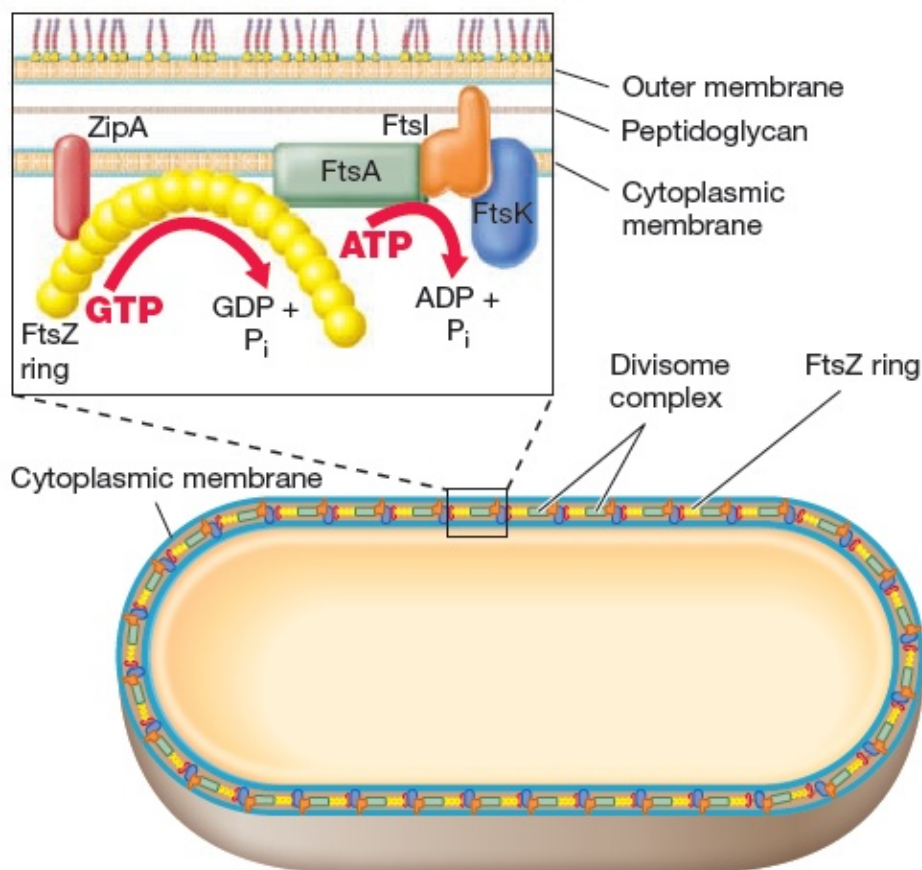
PBP3 (synonymum FtsI) je esenciální protein divisomu katalyzující tvorbu cross-můstek mezi glykanovými řetězci peptidoglykanu (Obrázek 9). Interaguje přímo i s jinými enzymy divisomu svou N-terminální částí, a podílí se na inkorporaci vznikajícího glykanového řetězce do existujícího peptidoglykanu. Jeho transpeptidázová aktivita hydrolyticky odštěpuje z pentapeptidu koncovou aminokyselinu (D-alanin) a zbytek připojí k jinému řetězci (cross-můstek, Obrázek 5b a 9).



Obrázek 9. Transpeptidační reakce zajišťující tvorbu cross-můstek. Jedna peptidová vazba (produkovaná uvnitř buňky) je vyměněna za jinou (mimo buňku) s uvolněním D-alaninu. Enzymy, které katalyzují tuto reakci, se nazývají D-alanin, D-alanin transpeptidázy nebo karboxypeptidázy. Tyto enzymy jsou cílem  $\beta$ -laktamových antibiotik a nazývají se proteiny vázající penicilin (penicillin-binding proteins, PBP). GlcNAc, N-acetylglukosamin; MurNAc, N-acetylmuramová kyselina.

*Murry, P.R. MEDICAL MICROBIOLOGY, EIGHTH EDITION, Copyright © 2016, Elsevier Inc. All rights reserved.*

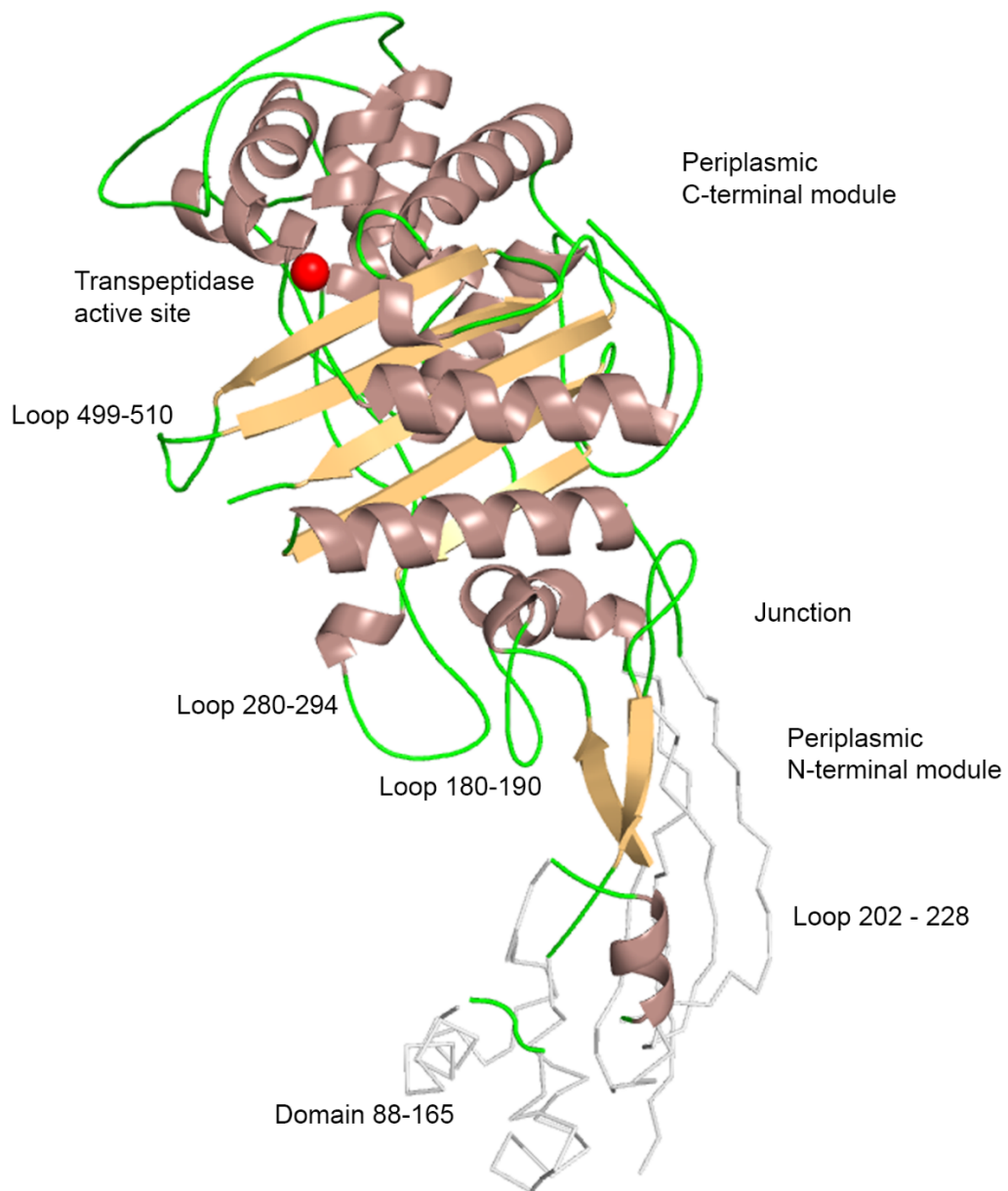
PBP3 také přímo interaguje s FtsK a s FtsA (Obrázek 10) [42,44,45]. Tyto proteiny jsou schopné vytvářet diskretní komplex nezávisle na ostatních proteinech buněčného dělení. Interakce PBP3 s FtsN, FtsW, FtsQ nebo FtsL byly rovněž popsány, ale podrobnosti o struktuře a místě interakce mezi PBP3 a těmito proteiny nejsou zatím známy [44,45,46].



Obrázek 10. FtsZ prsteneček a vzájemné interakce mezi jednotlivými enzymy. Pohled v řezu na buňku ve tvaru tyčky zobrazující kruh molekul FtsZ kolem roviny dělení. Výřez ukazuje uspořádání jednotlivých proteinů divizomu. ZipA je kotva proteinu FtsZ, FtsI je protein biosyntézy peptidoglykanu, FtsK pomáhá při separaci chromozomů a FtsA je ATPáza.

*Michael T. Madigan, et al. Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015 Pearson Education, Inc. All rights reserved.*

Strukturálně se PBP3 dělí na cytoplazmatickou část, která je následována transmembránovým segmentem, N-terminální částí a C-terminální částí, které zasahují do periplazmatického prostoru (Obrázek 11). Gen *ftsI* kóduje protein s 588 aminokyselinovými rezidui, ale proteolytickým štěpením je posttranslačně odstraněno 11 aminokyselin na C-terminální části proteinu [47].

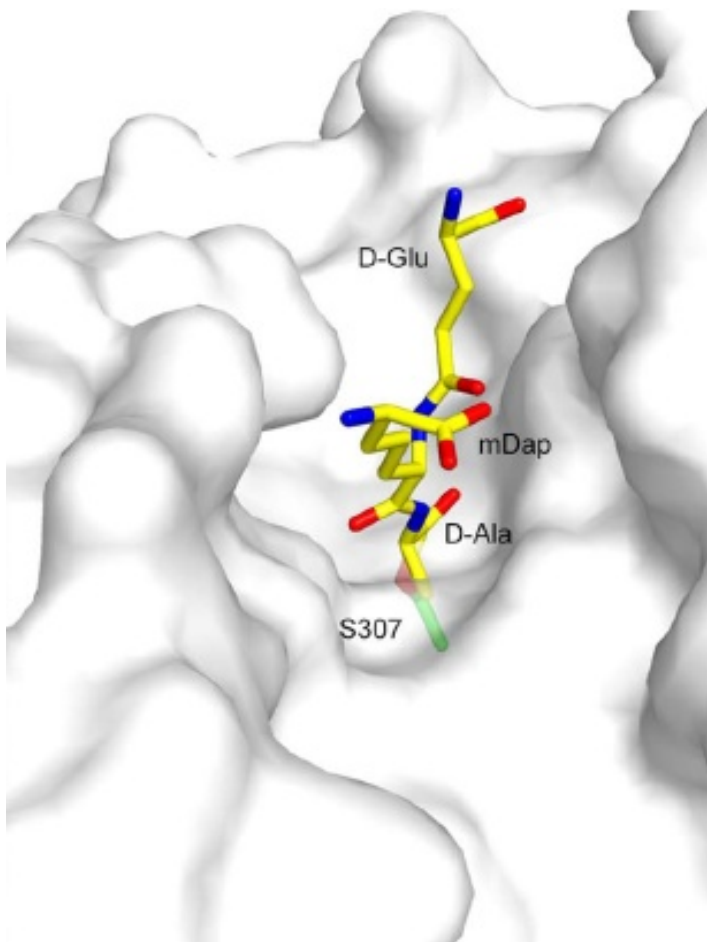


Obrázek 11. Zobrazení krystalové struktury periplazmatické oblasti 57-577 PBP3 druhu *E. coli*. Trasa smyček nedefinovaných v krystalové struktuře je znázorněna šedě. Aktivní centrum je označeno červeně.

(Sauvage, E; et al. doi.org/10.1371/journal.pone.0098042.g001)

#### 4.7.1 C-terminální modul

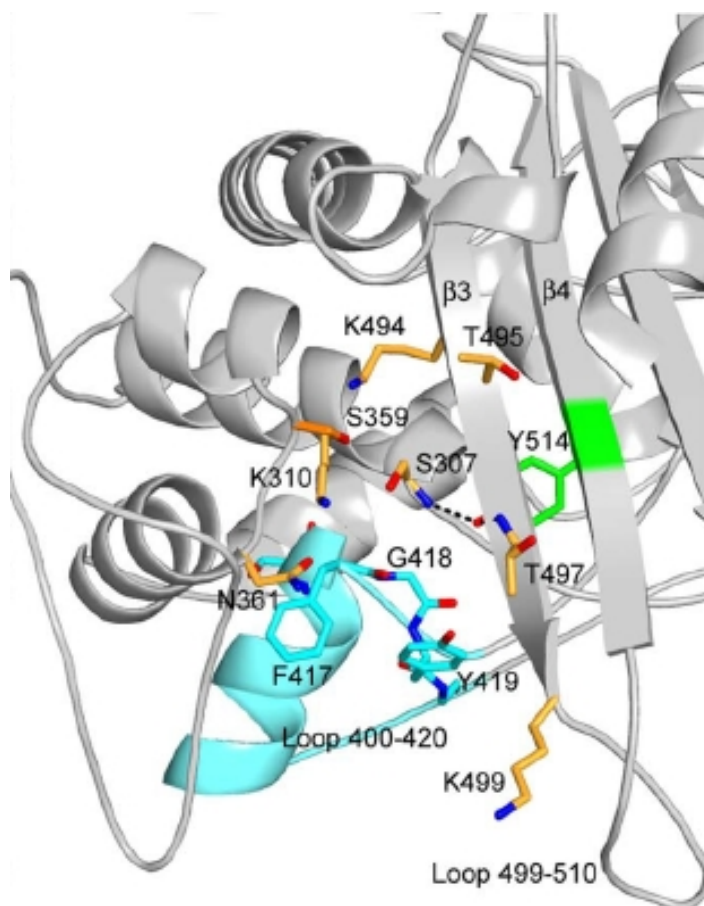
Aktivní místo odpovědné za transpeptidázovou aktivitu PBP3 se nachází v dlouhém žlábků, který může pojmout koncové karboxy zbytky substrátu PBP3 - peptidoglykanového pentapeptidu L-Ala-c-D-Glu-meso-diaminopimelové kyseliny (mDAP)-D-Ala-D-Ala (Obrázek 12).



Obrázek 12. Model molekuly tripeptid D-Glu-mDap-D-Ala v aktivním místě PBP3. Tripeptid (žlutě) je modelován jako acyl-enzym a je navázán na aktivní serin zobrazený zeleně. Atomy dusíku jsou znázorněny modře a atomy kyslíku červeně. (Savage, E; et al. doi:10.1371/journal.pone.0098042.g002)

Transpeptidázová aktivita PBP3 je závislá na osmi zbytcích, Ser307, Lys310, Ser359, Asn361, Lys494, Thr495, Gly496 a Thr497, nalezených s několika výjimkami ve všech penicilin-vázajících enzimech (Obrázek 13) [48].

Serin zde působí jako katalyzátor hydrolytické reakce. Tyto zbytky tvoří tři konzervované sekvenční motivy (Ser-Xaa-Xaa-Lys, Ser-Xaa-Asn a Lys-Thr-Gly-Thr) a jsou také zodpovědné za vazbu  $\beta$ -laktamových antibiotik k aktivnímu místu PBP. Zadní strana aktivního místa PBP3 je tvořena zbytky Phe417-Gly-Tyr-Gly (Obrázek 13). Motiv Tyr/Phe/Ile-Gly-Tyr/Gln-Gly a terciární struktura segmentu 400–420 jsou konzervované v každé třídě PBP [49].



Obrázek 13. Struktura aktivního místa transpeptidázy PBP3. Smyčka 400–420 (zadní strana aktivního místa PBP3 tvořena zbytky Phe417) je znázorněna azurovou barvou. Atomy dusíku jsou znázorněny modře a atomy kyslíku červeně. (Savauge, E; et al. doi:10.1371/journal.pone.0098042.g002)

Asn361 je důležitý pro správné umístění interpeptidické amidové skupiny, která spojuje předposlední D-Ala se zbytkem kyseliny diaminopimelové. Threoninové zbytky motivu Lys-Thr-Gly-Thr by měly sloužit jako kotva pro C-koncovou karboxylátovou skupinu pentapeptidu. Jsou vázané k předposlednímu D-Ala karboxylátu ve struktuře DD-peptidáz v komplexu s peptidovými fragmenty [48].

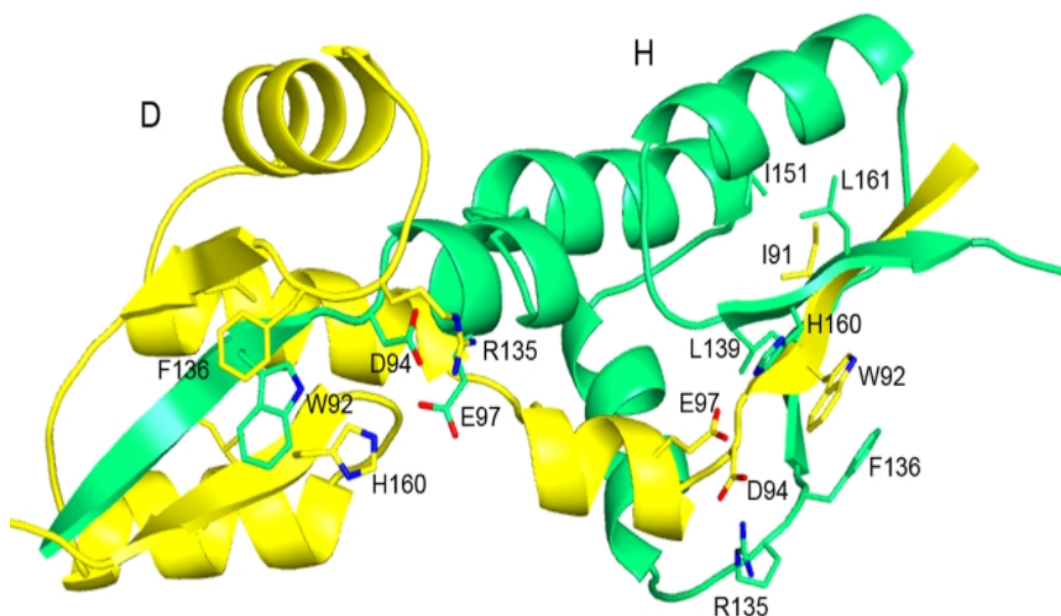
#### 4.7.2 N-terminální modul

N-terminální modul poskytuje tři smyčky (180-190; 202-228; 280-294) a jednu subdoménu (88-165) (Obrázek 11) pro potenciální interakci s jinými proteiny divizomu. Každá ze smyček má svou vlastní strukturu a specifickým způsobem interaguje s ostatními částmi. Zbytky mezi těmito smyčkami a subdoménou tvoří řadu motivů

dobře konzervovaných v primární sekvenci PBP proteinů třídy B. Jednotlivé od sebe oddělené moduly jsou flexibilní ve svém spojení, což je nezbytné k tomu, aby enzym dosáhl svého cíle nebo se dokázal posunout při dělení podél septa [42,48].

#### 4.7.3 PBP<sub>388-165</sub> subdoména

PBP<sub>388-165</sub> subdoména zřejmě hraje stěžejní roli v interakci mezi proteiny. Osm molekul (řetězců A – H) v asymetrické jednotce je organizováno ve čtyřech párech, přičemž v každém páru je 18 N-koncových zbytků. Zbytky představují helix a  $\beta$ -vlákno, které se vkládá mezi dvě  $\beta$ -vlákna druhé molekuly za vzniku tří vláknového  $\beta$ -listu. Interakce mezi těmito molekulami jsou četné a zahrnují mnoho vodíkových vazeb, solné můstky a hydrofobní klastry (Obrázek 14). Prostřednictvím této domény se zřejmě odehrávají nejen interakce s proteiny PBP1b, FtsN nebo FtsW, ale i se subkomplexem proteinů FtsQ/FtsL/FtsB. Bylo dokázáno, že tato doména není esenciální pro vazbu peptidoglykanu, jejím účelem je interakce s ostatními enzymy divizionu [42,44,48].



Obrázek 14. Detail PBP<sub>388-165</sub> subdomény se znázorněnými interakcemi mezi zbytky z řetězců D (žlutě) a H (zeleně). Atomy dusíku jsou znázorněny modře a atomy kyslíku červeně.

(Savage, E; et al. doi:10.1371/journal.pone.0098042.g004)



#### 4.7.4 Interakce PBP3 s $\beta$ -laktamy

Počítačové modelování ukázalo, jak aminokyselinové záměny ovlivňují interakci  $\beta$ -laktamů s PBP3. U AA záměny S357N se předpokládá, že postranní řetězec asparaginu vytváří sterickou bariéru se sousedním valinem v poloze 362, což změní orientaci smyčky V362-P366. Jelikož tato smyčka sousedí s aktivním místem PBP, změna v poloze může omezit přístup některým  $\beta$ -laktamům [50].

Pomocí studií mutagenese genů *dacA* a *dacB*, kódujících geny PBP4 a PBP5, bylo prokázáno, že vliv na rezistenci k  $\beta$ -laktamům mají pouze změny v proteinu PBP3 [40,50].

### 4.8 Aminokyselinové substituce v PBP3

Důsledkem AA substitucí je snížená afinita vazby aminopenicilinů a cefalosporinů na PBP. Afinita  $\beta$ -laktamů k PBP3 proteinu *H. influenzae* je ovlivněna pouze mutacemi (AA substitucemi) v blízkosti funkčně nezbytných vysoce konzervovaných aminokyselinových motivů, které jsou na pozicích 327 (motiv S327-T-V329; serin-threonin-valin), 379 (motiv S379-S-N381; serin-serin-asparagin) a 512 (motiv K512-T-G514; lysin-threonin-glycin) [40,51,52,53]. Kmeny *H. influenzae* s rPBP3 jsou klasifikovány do tří základních genotypových skupin podle přítomnosti specifických AA substitucí [40]. Skupina I obsahuje substituci argininu za histidin v poloze 517 (R517H) a skupina II nese substituci asparaginu za lysin v poloze 526 (N526K). Skupina III navíc obsahuje mutace v blízkosti motivu S379S-S-N381, zejména S385T. Skupinu II dále dělí někteří autoři na další podkategorie podle přítomnosti dalších specifických mutací. Dle našich poznatků je takovéto členění na podskupiny zbytečné, protože podskupiny nejsou definovány žádnými společnými vlastnostmi, jen přítomností určité kombinace AA záměn. S dalšími nově objevenými AA záměnami by tak mohly vznikat další podskupiny. Kmeny v našem projektu by se pak členily do mnoha podskupin, což by bylo nepřehledné a zbytečné. V žádné publikaci totiž nebylo detekováno tolik AA záměn (a jejich kombinací) jako v našem projektu.

Skupiny I a II se vyznačují nízkou rezistencí vůči  $\beta$ -laktamům, zatímco izoláty skupiny III mají vysoký stupeň rezistence vůči  $\beta$ -laktamům, včetně cefalosporinů druhé

generace (cefuroxim) a dokonce i třetí generace (cefotaxim, ceftriaxon) a karbapenemům [40,51,52].

Genotyp sPBP3 neobsahuje substituci N526K ani R517H a obsahuje pouze mutace v genu *ftsI*, které nevedou k rezistenci na  $\beta$ -laktamy. Právě poloha mutací zřejmě určuje, ke kterým  $\beta$ -laktamům a do jaké míry bude kmen rezistentní.

Produkce  $\beta$ -laktamázy zůstává v Evropě převládajícím mechanismem rezistence [51,52,53]. Podíl izolátů BLPAR byl v posledních desetiletích relativně stabilní, avšak vzrůstající incidence rPBP3 vzbuzuje v Evropě obavy. Oba mechanismy rezistence, enzymatický i neenzymatický, se vyskytují i společně [52,53]. Byly popsány další mechanismy rezistence, např. nadměrná exprese efluxní pumpy AcrAB způsobená mutacemi regulačního genu *acrR* [54]. Ze studií provedených z různých částí světa vyplývá, že nejčastějšími rPBP3 kmeny jsou izoláty ze skupiny II [55,56,57,58].

## 5 Cíle práce

Při testování citlivosti mohou některé kmeny *H. influenzae* s neenzymatickou rezistencí uniknout pozornosti, protože mohou být k aminopenicilinům citlivé. Pro ověření možností fenotypové detekce kmenů rPBP3 v rutinní praxi diskovou difúzní metodou s vybranými  $\beta$ -laktamy byly mikrobiologické laboratoře v ČR vyzvány k zasílání kmenů *H. influenzae* s podezřením na neenzymatickou rezistenci do Národní referenční laboratoře pro antibiotika (NRL pro ATB). Přestože se v názvu disertační práce píše jen o  $\beta$ -laktamáza negativních kmenech, byly do projektu zařazeny všechny kmeny s neenzymatickou rezistencí, to znamená i ty, které produkovaly  $\beta$ -laktamázu.

U získaných izolátů byla nejdříve stanovena citlivost na vybraná antibiotika. Následně byl sekvenován gen *ftsI* a v návaznosti na získané sekvence byla provedena komparativní analýza za účelem zjištění jednotlivých aminokyselinových substitucí a dále bylo pomocí typizační metody MLST zjišťováno, zda má šíření kmenů rPBP3 v ČR klonální charakter.

## 6 Materiály a metody

### 6.1 Kmeny

V letech 2010 až 2018 bylo do NRL pro ATB (SZÚ Praha, ČR) zasláno 228 kmenů *H. influenzae* s domnělou neenzymatickou rezistencí k  $\beta$ -laktamům (2010–2014: n = 33 kmenů, 2015: n = 41, 2016: n = 68, 2017: n = 71 a 2018: n = 16). Kmeny byly izolovány ze sputa (n = 104), výtěru z nosu (n = 31), krve (n = 23), výtěru z krku (n = 21), ucha (n = 17), mozkomíšního moku (n = 8), punkce (n = 6), výtěru oka (n = 3), výtěru z pochvy (n = 2). Původ 13 kmenů nebyl znám. 137 kmenů bylo izolováno od mužů, 91 izolát byl od žen. Do věkové kategorie 0 – 6 let patřilo 52 kmenů, do věkové kategorie 7 – 19 let 21 kmen, 20 – 60 let 64 kmenů a nad 60 let 91 kmen. Kmeny byly zaslány z 39 laboratoří ze všech 14 krajů ČR; Hlavní město Praha - 53 kmenů, Středočeský kraj - 18, Jihočeský kraj - 33, Plzeňský kraj – 19, Karlovarský kraj – 7, Ústecký kraj – 3, Liberecký kraj – 2, Královéhradecký kraj – 26, Pardubický kraj – 3, Kraj Vysočina – 4, Jihomoravský kraj – 18, Olomoucký kraj – 27, Moravskoslezský kraj – 15 a Zlínský kraj – 1.

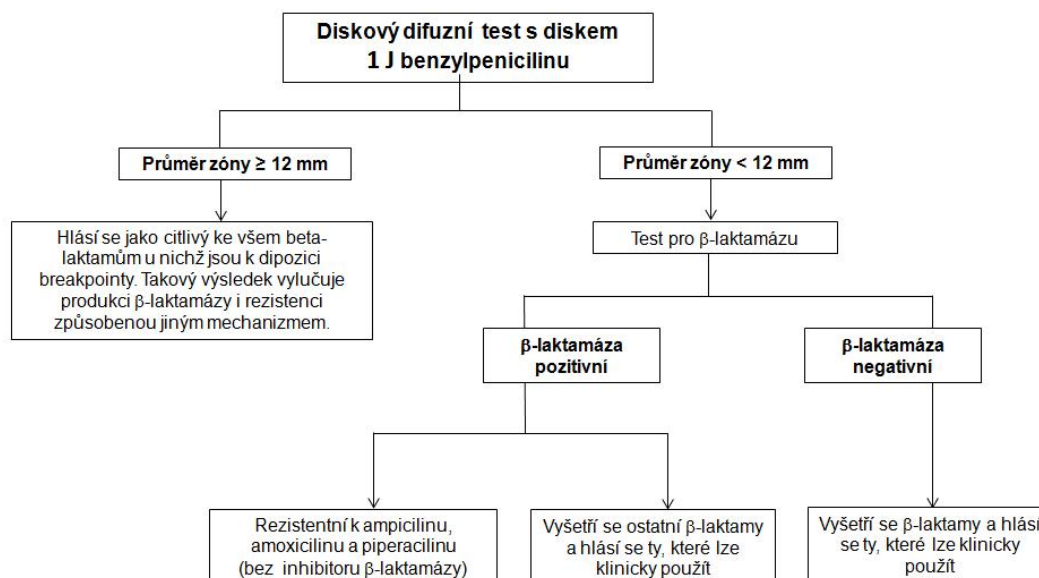
Při zasílání do NRL ATB se laboratoře řídily doporučením EUCAST (Obrázek 15) [41] a vybíraly kmeny, které:

- 1) kolem disku s 1 J penicilinu vytvářely inhibiční zónu < 12 mm a neprodukovaly  $\beta$ -laktamázu.
- 2) měly negativní skrínigový test s penicilinem, ale naopak vykazovaly rezistenci k dalším  $\beta$ -laktamům, např. k cefuroximu.
- 3) produkovaly  $\beta$ -laktamázu, ale byly rezistentní i k antibiotikům rezistentním k účinkům hemofilové  $\beta$ -laktamázy (amoxicilin/klavulánová kyselina, cefuroxim).

Získané kmeny byly naočkovány na Levinthal agar (Oxoid, Česká republika) a inkubovány přes noc při  $35 \pm 1$  °C a 5 % CO<sub>2</sub>. Identifikace byla provedena pomocí MALDI-TOF MS (Microflex, Bruker Daltonics, Německo), dle návodu od výrobce. Úspěšnost identifikace kmenů *H. influenzae* metodou MALDI-TOF MS se pohybuje nad 98 % [59].

Z celkového počtu 228 kmenů byla neenzymatická rezistence potvrzena níže popsanými metodami u 216 kmenů. Tyto kmeny se obecně označují jako rPBP3 na rozdíl od kmenů bez neenzymatické rezistence, které se označují jako sPBP3 (neobsahují R517H nebo N526K). V našem souboru kmenů bylo jako sPBP3 určeno

12 kmenů, tyto kmeny byly laboratořemi interpretovány jako kmeny s neenzymatickou rezistencí.



Obrázek 15. Algoritmus screeningu rezistence k  $\beta$ -laktamům u *H. influenzae* dle EUCAST

## 6.2 Testování citlivosti na $\beta$ -laktamy

V NRL pro ATB se testovala diskovou difúzní metodou citlivost na penicilin (1 J), cefuroxim (30  $\mu$ g), ampicilin (2  $\mu$ g) a amoxicilin/kyselinu klavulánovou (2/1  $\mu$ g). Minimální inhibiční koncentrace (MIC) cefotaximu (SIGMA) a ampicilinu (ADATAB) byla stanovena mikrodiluční bujónovou metodou. Jak metoda diskové difúze, tak mikrodiluční metoda byly prováděny podle metodiky EUCAST (Tabulka 2) [41]. Interpretace výsledků testování citlivosti byla provedena podle doporučení směrnic EUCAST, verze 10.0. Hraniční hodnoty pro rezistenci byly stanoveny následovně: disková difúzní metoda - penicilin (<12 mm), ampicilin (<18 mm), amoxicilin/kyselina klavulánová (<15 mm) a cefuroxim (<25 mm); MIC - ampicilin >1 mg/l, cefotaxim >0,125 mg/l.

Pro kontrolu kvality provedených metod vyšetření citlivosti byly použity kmeny *H. influenzae* ATCC 49766 a ATCC 49247. Produkce  $\beta$ -laktamázy byla testována nitrocefínovou metodou [60]. Kmeny  $\beta$ -laktamáza negativní byly fenotypově definovány jako rPBP3 při rezistenci na alespoň jedno z  $\beta$ -laktamových antibiotik. Kmeny pozitivní na  $\beta$ -laktamázu byly definovány jako rPBP3, pokud byly rezistentní na

amoxicilin/kyselinu klavulánovou nebo cefuroxim. Během studie byly kmeny uchovávány při -80 °C v 70 % séroglycerinovém bujónu.

Tabulka 2. Podmínky pro vyšetření citlivosti *H. influenzae* k  $\beta$ -laktamům diskovou difúzní metodou [41].

Půda	Krevní agar + 5% defibrinovaná koňská krev + 20 mg/l $\beta$ -NAD (Oxoid)
Objem inokula	2 – 5 ml ve fyziologickém roztoku
Příprava inokula	Přímá metoda roztěrem kolonií z kultury narostlé na Levinthal agaru přes noc
Koncentrace inokula	0,5 dle McFarlandova zákalu
Disky	penicilin (1 J), ampicilin (2 $\mu$ g), amoxicilin/kyselina klavulánová (2/1 $\mu$ g), cefuroxim (30 $\mu$ g), Oxoid
Inkubace	35 °C $\pm$ 1 °C, v atmosféře 5 % CO <sub>2</sub> po 18 $\pm$ 2 h
Odečítání	Průměr inhibiční zóny od okrajů nevykazujících růst

### 6.3 Testování citlivosti na ostatní antibiotika

V rámci stanovení citlivosti na  $\beta$ -laktamová antibiotika bylo mikrodiluční metodou, podle metodiky EUCAST [41], provedeno stanovení MIC doplňkových antibiotik: ciprofloxacinu, tetracyklinu, chloramfenikolu a trimetoprim-sulfametoxazolu. Interpretace výsledků testování citlivosti byla provedena podle doporučení směrnic EUCAST, verze 10.0. Hraniční hodnoty pro rezistenci byly stanoveny následovně: ciprofloxacin >0,06 mg/l; tetracyklin >2 mg/l; chloramfenikol >2 mg/l a trimetoprim-sulfametoxazol >1 mg/l.

### 6.4 PCR detekce $\beta$ -laktamáz

Ověření produkce  $\beta$ -laktamázy bylo provedeno pomocí PCR detekce bla<sub>TEM-1</sub> a bla<sub>ROB-1</sub> [35]. Kmeny *H. influenzae* CIP 107112 a CIP 104278 byly použity jako pozitivní kontroly pro detekci genů bla<sub>TEM-1</sub> a bla<sub>ROB-1</sub>, v daném pořadí.

- sekvence primerů (ve směru 5' - 3'):
  - a. bla<sub>TEM-1</sub>: primer F: TGG GTG CAC GAG TGG GTT AC  
primer R: TTA TCC GCC TCC ATC CAG TC
  - b. bla<sub>ROB-1</sub>: primer F: ATC AGC CAC ACA AGC CAC CT  
primer R: GTT TGC GAT TTG GTA TGC GA
- PCR: MasterMix (BioRad); primer R + primer F, voda (Sigma) + 1 µl templátové DNA; na 1 vzorek: 12,5 µl MM (Mastermix), 0,5 µl primer F (pracovní roztok 10 µM), 0,5 µl primer R (pracovní roztok 10 µM), 10,5 µl vody, koncentrace primerů F i R = 0,3125 µM
  - Protokol pro běh PCR: 98 °C – 2 min; 30 cyklů:
    1. 95 °C po dobu 10s (denaturace)
    2. 53 °C, 30s (annealing)
    3. 72 °C, 30s (elongace)
- Vizualizace produktů PCR (viz kapitola 6.9)

## 6.5 Detekce mutací v genu *ftsI* a komparativní analýza

### 6.5.1 Real-Time PCR pro detekci mutace N526K

Na začátku studie byly zaslané kmeny podrobovány dvěma PCR na přítomnost/nepřítomnost mutace v genu *ftsI*, která vede k AA záměně N526K, která se dle literárních zdrojů [61] měla u kmenů vyskytovat. Dvě současné Real-Time PCR (RT-PCR, přístroj BioRad CFX96) byly designované na použití bez sond s barvivem Sybr® Green:

- a. RT-PCR pro gen bez mutace vedoucí k AA záměně
  - b. RT-PCR pro detekci mutace vedoucí k záměně N526K
- sekvence primerů (ve směru 5' - 3'):
    - a. **PBP-3 (bez mutace):**  
primer F: ACG GTA TTG AGG GCA TTG AG  
primer R: GCA GTA AAT GCC ACA TAC TTA
    - b. **PBP-3\_N526K:**  
primer F: ACG GTA TTG AGG GCA TTG AG  
primer R-1(N526K-G): GCA GTA AAT GCC ACA TAT CTC  
primer R-2(N526K-A): GCA GTA AAT GCC ACA TAT GTT

- Protokol pro běh RT-PCR: 95 °C 5min; 34 cyklů:
  1. 95 °C po dobu 30s
  2. 55 °C, 30s
  3. 72 °C, 3 min, čtení vzorků

Vyhodnocení RT-PCR:

- a. Kmeny neobsahující mutaci N526K mají pozitivní první amplifikační reakci a negativní druhou. Výsledky u kmenů s mutací jsou opačné.
- b. Při negativě obou detekčních amplifikačních reakcí je pravděpodobné, že se jedná o jinou mutaci.
- c. Pozitivní výsledek u obou amplifikací znamená chybu v postupu a RT-PCR je třeba zopakovat

Výše uvedeným postupem bylo získáváno stále více nekonzistentních výsledků, které nekorespondovaly s fenotypem rezistence. Proto bylo rozhodnuto o změně postupu k detekci AA záměn, viz sekce 6.5.2.

### 6.5.2 Sekvence genu *ftsI*

Pro další postup bylo rozhodnuto všechny kmeny (i již vyšetřené) osekvenovat v oblasti 977–1597 bp genu *ftsI* (fragment 621 bp), aby se ověřila přítomnost mutací v oblasti transpeptidázové domény PBP3 dle údajů publikovaných v PubMLST [62]:

*První amplifikační reakce, ve které je získán 705 bp dlouhý amplikon:*

- sekvence primerů (ve směru 5' - 3'):
  - a. primer *ftsI1F* (cílová sekvence *ftsI* - 936-960\*):  
**GTTTCCAGTCACGACGTTGTAGTTAATGCGTAACCGTGCAATTAC**
  - b. primer *ftsI1R* (cílová sekvence *ftsI* – 1640-1617\*):  
**TTGTGAGCGGATAACAATTTACCACTAATGCATAACGAGGATC**

\* Číslování nukleotidů se vztahuje k číslování sekvence *ftsI* *H.*

*influenzae* Rd KW20 (ATCC 51907), accession number L42023. Zeleně je označena cílová sekvence pro sekvenační primery.



- PCR mix (na jednu reakci):
  - H<sub>2</sub>O - 31,2 µl
  - dNTPs (každý 5 µM) - 2 µl
  - MgCl<sub>2</sub> (25 mM) - 5 µl
  - ftsI1F (10 µM) - 2 µl
  - ftsI1R (10 µM) - 2 µl
  - High-fidelity Taq polymerase – 0,3 µl
  - 10 X pufr - 5 µl
  - DNA extract - 5 µl
- PCR program: 3 min, 94 °C (denaturace), následováno:
  - 10 cyklů: 30 sec, 94 °C; 30 sec, 50°C; 40 sec, 72 °C
  - 30 cyklů: 30 sec, 94 °C; 30 sec, 60°C; 40 sec, 72 °C
  - 5 minut 72 °C

*Purifikace produktu první PCR:*

- K čištění amplikonů byl použit kit ROCHE (viz kapitola 6.8.1.).

*Druhá, sekvenační, amplifikační reakce:*

- sekvence primerů (ve směru 5´ - 3´):
  - primer seqftsI1F:  
GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
  - primer seqftsI1R:  
TTGTGAGCGGATAACAATTTC
- PCR forward a reverse sekvenační reakce (na jednu reakci):
  - H<sub>2</sub>O - 7,8 µl
  - SeqftsF nebo SeqftsR (1 µM) - 3,2 µl
  - 5X pufr - 3 µl
  - BigDye v3.1\* - 2 µl
  - 4 µl purifikovaného prvního PCR produktu (minimálně 20 ng DNA)
  - \* BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit

Pro klasické PCR amplifikační reakce byl používán přístroj BioRad DYAD.

- PCR program: 1 min, 96 °C (denaturace), následuje 25 cyklů:
  1. 10 sec, 96 °C
  2. 5 sec, 50 °C
  3. 1 min, 60 °C

*Purifikace produktu sekvenační PCR:*

- K čištění amplikonů byl použit postup uvedený v kapitole 6.8.2.

### 6.5.3 Sekvence bází a aminokyselinová sekvence analyzovaného úseku *ftsI*

Kompletní analyzovaná sekvence včetně primerů *ftsI1F* a *ftsI1R*, žlutou barvou je zvýrazněna analyzovaná sekvence:

**GTTAATGCGTAACCGTGCAATTAC**CGATACTTTTGAGCCA**GGTTCTACGGT**  
**AAAACCTTTCGTTGTTTAAACCGCACTTCAACGAGGTGTAGTTAAACGAGAT**  
**GAAATTATTGATACTACGTCCTTTAAATTAAGCGGTAAAGAAATTGTGGACG**  
**TTGCACCACGTGCTCAGCAAACCTTTAGACGAGATTTTAATGAACTCTAGTAA**  
**CCGTGGTGTAAGTCGTCTTGCATTACGTATGCCACCTAGTGCATTAATGGA**  
**AACTTATCAAAATGCAGGTTTAAAGTAAACCGACAGATTTAGGCTTGATCGG**  
**AGAGCAAGTTGGGATTTTGAATGCAAATCGTAAACGCTGGGCAGATATTGA**  
**GCGTGCAACAGTCGCTTATGGTTATGGTATTACTGCGACACCTTTACAAAT**  
**TGCTCGTGCCTATGCAACCCTTGGTAGTTTCGGTGTTTATCGTCCGCTTTC**  
**TATCACTAAAGTTGATCCGCCAGTTATTGGGAAACGGGTTTTCTCTGAAA**  
**AAATAACTAAAGATATTGTGGGAATTTTAGAGAAAGTAGCAATTA AAAATAA**  
**ACGCGCAATGGTGGAAGGCTACCGTGTCTGGCGTAAAAACAGGTACGGCAC**  
**GTAAGATTGAAAATGGACATTATGTAAATAAGTATGTGGCATTACTGCGG**  
**GTATTGCACCAATTAGTGATCCTCGTTATGCATTAGTGGT**

Níže je uvedena 207 AA dlouhá peptidová sekvence odvozená z 621 bp fragmentu:

**326G****STV**KPFVVLALQRGVVVKRDEIIDTTSFKLSGKEIVDVAPRAQQLDEI  
 LMN**SSN**RGVSRLALRMPPSALMETYQNAGLSKPTDLGLIGEQVGILNANRKRWADI  
 ERATVAYGYGITATPLQIARAYATLGSFGVYRPLSITKVDPPVIGKRVFSEKITKDIVGI  
 LEKVAIKNKRAMVEGYRVGV**KTG**TARKIENGHYVNKYVAFT**532**

Zeleně jsou vyznačeny konzervované motivy (viz kapitola 4.12) na pozicích 327 (motiv S327-T-V; serin-threonin-valin), 379 (S379-S-N; serin-serin-asparagin) a 512 (K512-T-G; lysin-threonin-glycin).

#### 6.5.4 Komparativní analýza

Získaná nukleotidová sekvence byla přeložena na aminokyselinovou (AA) sekvenci v programu Bionumerics 7.6.2 (Applied Maths, Gent, Východní Flandry, Belgie) a porovnána s AA sekvencí (pozice 326–532) nemutovaného referenčního kmene *H. influenzae* ATCC 51907 (GenBank accession number L42023) [63]. Porovnání bylo provedeno v programu Bionumerics, kdy program porovnává sekvenci bází, označuje silent i missense mutace a vypisuje jaká AA se díky missense mutaci změnila, a v jakou AA se změnila. Druhou využívanou možností bylo porovnávání AA sekvencí v excelu, kdy změněné AA byly automaticky označeny díky využití funkce If (podmínka ano/ne).

### 6.6 Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

K popisu populační struktury kmenů rPBP3 se dají využít různé typizační metody, jako je pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), Multiple-Locus Variable Number Tandem-Repeat Analysis (MLVA) nebo Multi-locus Sequence Typing (MLST). Metoda MLST, založená na alelickém profilu housekeeping genů, je dobře zavedenou metodou i pro typizaci bakterií *H. influenzae* [64] a je díky produkci objektivních a jednoznačných dat nejvhodnější k celorepublikové surveillance infekcí způsobených těmito kmeny. U metody MLST se sekvenuje přibližně 450 bp dlouhý vnitřní fragment sedmi housekeeping genů (*H. influenzae*: *adk*, *atpG*, *frdB*, *fuck*, *mdh*, *pgi* a *recA*). Podle sekvence se alelám jednotlivých genů přiděluje číslo a kombinací těchto alelických profilů se získává výsledný sekvenční typ (ST) [62].

#### 6.6.1 PCR Multi-Locus Sequence Typing

MLST byla provedena u všech 228 kmenů. Amplifikační reakce probíhala s použitím primerů (Tabulka 3) a programů popsanych níže. Čísla alel a sekvenčních typů byla přiřazena pomocí programu Bionumerics 7.6.2 a volně přístupné webové stránky (Veřejná databáze pro molekulární typizaci a diverzitu mikrobiálního genomu, <https://pubmlst.org/organisms/haemophilus-influenzae>).

Tabulka 3. Primery použité u sedmi housekeeping genů pro MLST u *H. influenzae*

Lokus	Protein	Sekvence primerů (5'-3')		Délka sekvenovaného fragmentu (bp)
<i>adk</i>	Adenylate kinase	up	GGTGCACCGGGTGCAGGTAA	477
		dn	CCTAAGATTTTATCTAACTC	
<i>atpG</i>	ATP synthase F1 subunit gamma	up	ATGGCAGGTGCAAAGAGAT	447
		dn	TTGTACAACAGGCTTTTGCG	
<i>frdB</i>	Fumarate reductase iron-sulfur protein	up	CTTATCGTTG GTCTTGCCGT	489
		dn	TTGGCACTTTCCACTTTTCC	
<i>fucK</i>	Fuculokinase	up	ACCACTTTCGGCGTGGATGG	345
		dn	AAGATTTCC CAGGTGCCAGA	
<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	up	TCATTGTATGATATTGCCCC	405
		dn	ACTTCTGTACCTGCATTTTG	
<i>pgi</i>	Glucose-6-phosphate isomerase	up	GGTGAAAAAAT CAATCGTAC	468
		dn	ATTGAAAGACCAATAGCTGA	
<i>recA</i>	RecA protein	up	ATGGCAACTCAAGAAGAAAA	426
		dn	TTACCA AACATCACGCCTAT	

*První amplifikační reakce:*

- sekvence primerů (ve směru 5' - 3'): viz Tabulka 3
- PCR mix (na jednu reakci):
  - H<sub>2</sub>O - 20 µl
  - primer up (10 µM) - 1 µl
  - primer dn (10 µM) - 1 µl
  - master mix – 25 µl
  - DNA extrakt - 3 µl
- PCR program: 4 min, 95 °C, následováno
  - a. 30 cyklů:
    1. 30 sec, 95 °C
    2. 30 sec, 55 °C
    3. 1 min, 72 °C
  - b. 10 min, 72 °C

*Purifikace produktu první PCR:*

- K čištění ampliconů byl použit kit ROCHE (viz kapitola 6.8.1.).

#### *Druhá, sekvenační, amplifikační reakce:*

- sekvence primerů (ve směru 5' - 3'): viz Tabulka 3
- PCR forward a reverse sekvenační reakce (na jednu reakci):
  - H<sub>2</sub>O - 3 μl
  - Seqfts F nebo Seqfts R (1 μM) - 1 μl
  - 5X pufr - 1 μl
  - BigDye v3.1\* - 2 μl
  - 3 μl purifikovaného prvního PCR produktu (minimálně 20 ng DNA)
  - \* BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing kit
- PCR program: 4 min, 95 °C (denaturace), následováno:
  - a. 30 cyklů:
    1. 30 sec, 95 °C
    2. 30 sec, 55 °C
    3. 1 min, 72 °C
  - b. 10 min, 72 °C

#### *Purifikace produktu sekvenační PCR:*

- K čištění ampliconů byl použit postup uvedený v kapitole 6.8.2.

## 6.7 Klonální analýza

Typizace populace do klonálních komplexů byla založena na datech pocházejících z MLST a byla provedena algoritmem goeBURST (global optimal on-line Based Upon Related Sequence Types algorithm) [65], který implementuje obecná pravidla BURST. Pro výpočty a vizualizaci dat byl použit program PHYLOViZ (<https://www.phyloviz.net>), který pracuje právě na základě goeBURST. Algoritmus BURST obecně vyhodnocuje genetickou vzdálenost mezi kmeny pomocí párové matice vzdáleností založených na alelických profilech. Princip klastrování BURST spočívá ve spojení kmenů s omezeným počtem neshod v alelických profilech do jednoho klonálního komplexu. Klonální komplex byl definován jako skupina ST, které mají alespoň šest alel (ze sedmi) společných s jiným členem definované skupiny [64].

Bylo použito výchozí nastavení programu pro čtyři populační MLST analýzy:

1) goeBURST: je Java implementace pravidel algoritmu BURST navržená Meatsem *et al.* [64] využívající grafický matroidní přístup, který zajišťuje optimální řešení pro umístění vazeb mezi sekvenačními typy (ST).

a) goeBURST level 1 – single locus variant: algoritmus se snaží na podkladě rozdílu v alelických variantách zařadit ST do klonálních komplexů.

b) goeBURST – Full MLST: algoritmus se snaží na podkladě alelických variant dát do vzájemného epidemiologického vztahu všechny analyzované ST

2) Hierarchical Clustering - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA): metoda neváženého párování s aritmetickým průměrem je jednoduchá aglomerativní hierarchická shluková metoda, kdy se nejprve shlukují páry sobě nejpodobnější, které se následně shlukují až do konečné sítě.

4) Neighbor-Joining (Studier-Keppeler Criterion): jedná se o metodu shlukování zdola nahoru (aglomerativní) pro vytváření fylogenetických stromů. Algoritmus vyžaduje znalost vzdálenosti mezi každým párem sekvenačních typů.

## 6.8 Čištění produktů po amplifikačních reakcích

### 6.8.1 Přečištění po první amplifikační reakci

a. Na přečištění malého počtu amplikonů byl použit kit High Pure PCR product Purification Kit, ROCHE. Bylo postupováno dle návodu výrobce.

b. Na přečištění velkého počtu vzorků (až 96) byl použit návod pro přečištění 96ti jamkové mikrotitrační destičky + kit Wizard® SV96 PCR Clean-Up System, Promega:

- Sušení + přečištění: vakuová aparatura (Promega)
- Roztok MBS protřepat, multikanálovou pipetou napipetovat 50 µl do jamek, promíchat 2-3x, a po 50 µl dát do destičky s filtry, která se zapojí do vakuové aparatury Promega, inkubace 1 minutu, odsávání 30s
- Proplach 80 % etanolem (EtOH): 200 µl, inkubace s EtOH 1 minuta, vakuum 30 sekund. 3x EtOH promytí

- Na závěr přečištění destičku s filtry rázně oklepat na utěrku
- Eluční aparatura: destička s filtry a produktem + mikrotitrační destička
- Sigma voda, 100  $\mu$ l na jamku. Inkubace 1 minuta, vakuum 1-2 minuty
- Po odsátí mikrotitrační destičku s produktem zalepit nebo ihned provést sekvenační amplifikační reakci

### 6.8.2 Přečištění po druhé, sekvenační, amplifikační reakci

- Chemikálie – octan sodný (NaOAc), EDTA, 100 % etanol (EtOH), formamid
- Do každé jamky přidat 42  $\mu$ l směsi NaOAc + EDTA + EtOH - promíchávání – musí být přítomen zákal
- Destičku přelepit fólií a otočit 4x dnem vzhůru (promíchání)
- Inkubace v mrazáku (-20 °C) – 1 hodina
- Centrifugace (centrifuga Universal 32R, Hettich) zalepené destičky – 1 hodina / 4000 rpm
- Po centrifugaci odlepit fólii z destičky, destičku překlopit na filtrační papír, poté překlopit na nový filtrační papír a vložit do centrifugy dnem vzhůru, 1 min / 500 rpm – dojde k odstranění zbytku tekutiny
- Připravit 70% EtOH
- Do každé jamky napipetovat 60  $\mu$ l 70% EtOH, přelepit fólií, centrifugace 30min / 3500 rpm
- Po centrifugaci vylít obsah na filtrační papír, destičku centrifugovat 1 min / 500 rpm dnem vzhůru na filtračním papíru – dojde k odstranění zbytku tekutiny
- Destičku vysušit v exikátoru – cca 25 minut
- Napipetovat 10  $\mu$ l formamidu do každé jamky
- Destičku přelepit fólií, inkubovat ve tmě přes noc v chladničce
- Po inkubaci sekvenovat nebo uložit do mrazáku (-20 °C)

## 6.9 Vizualizace produktů PCR

Vizualizace produktů klasických PCR probíhala v 1,5% agarózovém gelu (SeaKem® LE Agarose, Lonza) s přidavkem barviva Midori Green Advance (NIPPON Genetics). Pro elektroforetické dělení produktů byla použita aparatura CS Cleaver, Scientific Ltd, s dělicím napětím 5 V/cm. K vizualizaci byl použit dokumentační systém s UV světlem Infinity, Vilber Lourmat.

## 6.10 Extrakce DNA

DNA byla izolována z čisté kultury rostoucí 24h v 36 °C na Levinthal agaru v mikroaerofilním prostředí za přítomnosti 5 % CO<sub>2</sub>. Postup izolace byl proveden dle návodu izolačního kitu (GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit, Sigma)



## 7 Výsledky

Výsledky fenotypových i genotypových analýz jsou většinou prezentované za celý soubor měření / kmenů. Rozdělením souboru kmenů na části, které by se logicky nabízely (skupiny rPBP3 I, II a III nebo epidemiologické členění ženy/muži, materiál atd.), nebyly získány výsledky odlišné od analýz celého souboru kmenů. U výsledků, u kterých se jedná o hodnocení nějaké specifické podskupiny, je tato skutečnost vždy uvedena. V těchto případech se také jedná o větší podskupinu kmenů se statisticky dostatečným počtem zástupců v dané podskupině (např. kmeny produkující  $\beta$ -laktamázu, kmeny nejpočetněji zastoupeného sekvenčního typu, kmeny obsahující nejčastější kombinaci aminokyselinových záměn, atd).

### 7.1 Fenotypová detekce mutací

V NRL ATB bylo v letech 2010 až 2018 vyšetřeno celkem 228 izolátů *H. influenzae*. 32 (14,0 %) kmenů bylo pozitivních na gen  $\beta$ -laktamázy bla<sub>TEM-1</sub> a jeden (0,4 %) na gen bla<sub>ROB-1</sub>. Kmen produkující ROB-1  $\beta$ -laktamázu byl citlivý k penicilinu a detekce  $\beta$ -laktamázy nitrocefinovou metodou byla negativní. Izoláty byly klasifikovány do všech čtyř skupin PBP3 (rPBP I, II, III a sPBP). Patnáct kmenů (6,6 %) patřilo do rPBP3 skupiny I a 175 kmenů (76,8 %) do rPBP3 skupiny II. Většina kmenů v těchto skupinách byla rezistentní, ale existovaly také kmeny citlivé na různé  $\beta$ -laktamy (Tabulka 4 a 5). Pro označení kmene jako citlivého/rezistentního k ampicilinu byla rozhodující hodnota minimální inhibiční koncentrace (MIC), nikoliv velikost inhibiční zóny při testování diskovou difúzní metodou. Všechny kmeny (n = 26, 11,4 %) ze skupiny III rPBP3 byly rezistentní k ampicilinu (rozmezí MIC 2-16 mg/l) a 88,5 % (n = 23) kmenů vykazovalo rezistenci k cefotaximu. Rozmezí MIC cefotaximu u rPBP3 skupiny III bylo 0,125-2 mg/l. Pouze 12 (5,3 %) izolátů bylo přiřazeno ke skupině sPBP3. U tří kmenů v této skupině však byla zjištěna rezistence k cefuroximu. Jednotlivé kombinace záměn AA u kmenů rPBP3 skupiny I a II vykazovaly různé úrovně rezistence k ampicilinu, které často kolísaly od citlivých po rezistentní i v rámci dané kombinace, viz Tabulka 4 a 5. Hodnota MIC<sub>50</sub> překročila breakpoint ampicilinu (>1 mg/l) u 17 kombinací a breakpoint MIC<sub>90</sub> byl překročen u 19 z 22 kombinací zjištěných u  $\beta$ -laktamáza negativních kmenů rPBP3 skupin I a II (Tabulka 4 a 5).

Tabulka 4. Tabulka uvádí kombinace substitucí (seskupených do skupin rezistence) zjištěné v této studii, rozsah citlivosti k antibiotikům a výsledky MLST typizace  $\beta$ -laktamáza negativních klinických izolátů *H. influenzae*.

		$\beta$ -laktamáza negativní							
		Rozmezí naměřených hodnot						MLST	
PBP3 skupiny	AA záměny a jejich kombinace	N	MIC AMP (mg / l)	MIC CTX (mg / l)	PEN (mm)	AMC (mm)	CRX (mm)	AMP MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub> (mg / l)	ST / CC * a
sPBP3 skupina I (n = 7)	A502S	1	1	0.06	12	15	26	1/1	1218/1218
	D350N	6	0.25 - 1	0.016 - 0.03	12 - 16	17 - 21	26 - 28	0.25/0.5	124 (5), 145/11
rPBP3 skupina I (n = 13)	A502V, R517H	13	1 - 4	0.03 - 0.125	6 - 19	12 - 19	14 - 27	2/4	1218/1218 (11), <b>1840</b> /1218, <b>1841</b> /1218
rPBP3 skupina II (n=160)	A368T, A502T, N526K	2	1 - 4	0.06	6 - 11	17	20 - 23	1/4	950, <b>1825</b>
	A502T, N526K	1	2	0.125	6	13	21	2	12
	A502V, N526K	5	1 - 2	0.03 - 0.06	6 - 11	11 - 15	21 - 25	2/2	142 (2), 411/422 (3)
	D350N, A437S, A502V, N526K	6	1 - 4	0.03 - 0.06	6 - 11	9 - 16	15 - 23	2/4	196 (5), <b>1837</b>
	D350N, A437S, G490E, N526K, A530S	1	4	0.06	6	7	21	1	390
	D350N, A502T, N526K	8	1 - 4	0.06 - 0.125	6 - 11	10 - 14	6 - 21	2/4	183 (2), 1362, <b>1820</b> , 1025 (4)
	D350N, A502V, N526K	1	4	0.06	10	14	22	4	122
	D350N, G490E, A502V, N526K	1	2	0.03	9	15	21	2	<b>2457</b>
	D350N, G490E, N526K, A530S	18	0.25 - 4	0.008 - 0.06	6 - 11	10 - 18	17 - 25	2/4	107 (14), 159/1218, 201, 203, 425
	D350N, I449V, N526K	1	1	0.03	12	16	24	1	152

	D350N, M377I, A502V, N526K	74	0.25 - 16	0.016 - 0.125	6 - 12	6 - 20	11 - 29	2/8	14/14 (13), 98, 124, 136/367 (2), 165 (6), 203 (3), 262, 367/367 (2), 422/422, 1034/14 (47), 1206/14 (2), 1218/1218
	D350N, M377I, G490E, A502V, N526K	6	1	0.03 - 0.06	6 - 11	10 - 14	18 - 21	1/1	33, 556, 834, 844 (3)
	D350N, M377I, I491V, A502V, N526K	1	4	0.125	6	10	18	4	1034/14
	D350N, S357N, A502V, N526K	1	2	0.125	9	12	17	2	<b>1822/422</b>
	G490E, N526K, A530S	1	2	0.125	9	12	19	2	1858/1218
	G490E; A502V; N526K	1	2	0.06	10	14	17	2	85
	I449V, N526K	17	1 - 4	0.03 - 0.06	6 - 10	9 - 15	15 - 27	2/4	57, 253 (4), 390, 396/396 (7), 687/396, 695/396, 1202/396, <b>2458</b>
	M377I, I449V, N526K	5	1 - 4	0.06 - 0.25	6	6 - 14	12 - 19	4/4	11/11 (3), <b>1826/11, 2032/11</b>
	N526K	3	0.5 - 4	0.03 - 0.06	8 - 11	13 - 17	19 - 27	1/4	34 (3),
	N526K, A530S	5	1 - 4	0.06 - 0.125	6 - 11	12 - 17	17 - 25	2/4	<b>2459</b> , 142 (4)
	R501L, N526K	2	1	0.06	6 - 8	12 - 13	19 - 24	1/1	196 (2)
	D350N, M377I, S385T, L389F, I519L, N526K	1	4	0.5	6	6	6	4	<b>2044</b>
	D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, G490E, N526K, A530S	2	4 - 8	0.5	6	6 - 12	6 - 12	4/8	107, 1859
	D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, N526K	2	4 - 16	1	6	6	6	4/16	472 (2)
	D350N, S357N, M377I, S385T, R517H, T532S	5	2 - 8	0.125 - 1	6 - 11	8 - 15	6 - 21	4/8	57, 155 (2), 1857, 2031/367
rPBP3 skupina III (n=15)									

D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, R517H, T532S	3	16	1 - 2	6	6 - 11	6 - 17	16/16	142, 264, <b>2043</b>
M377I, S385T, L389F, R517H	1	8	1	6	6	6	8/8	142
V329I, D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, N526K	1	8	2	6	13	15	8/8	1609

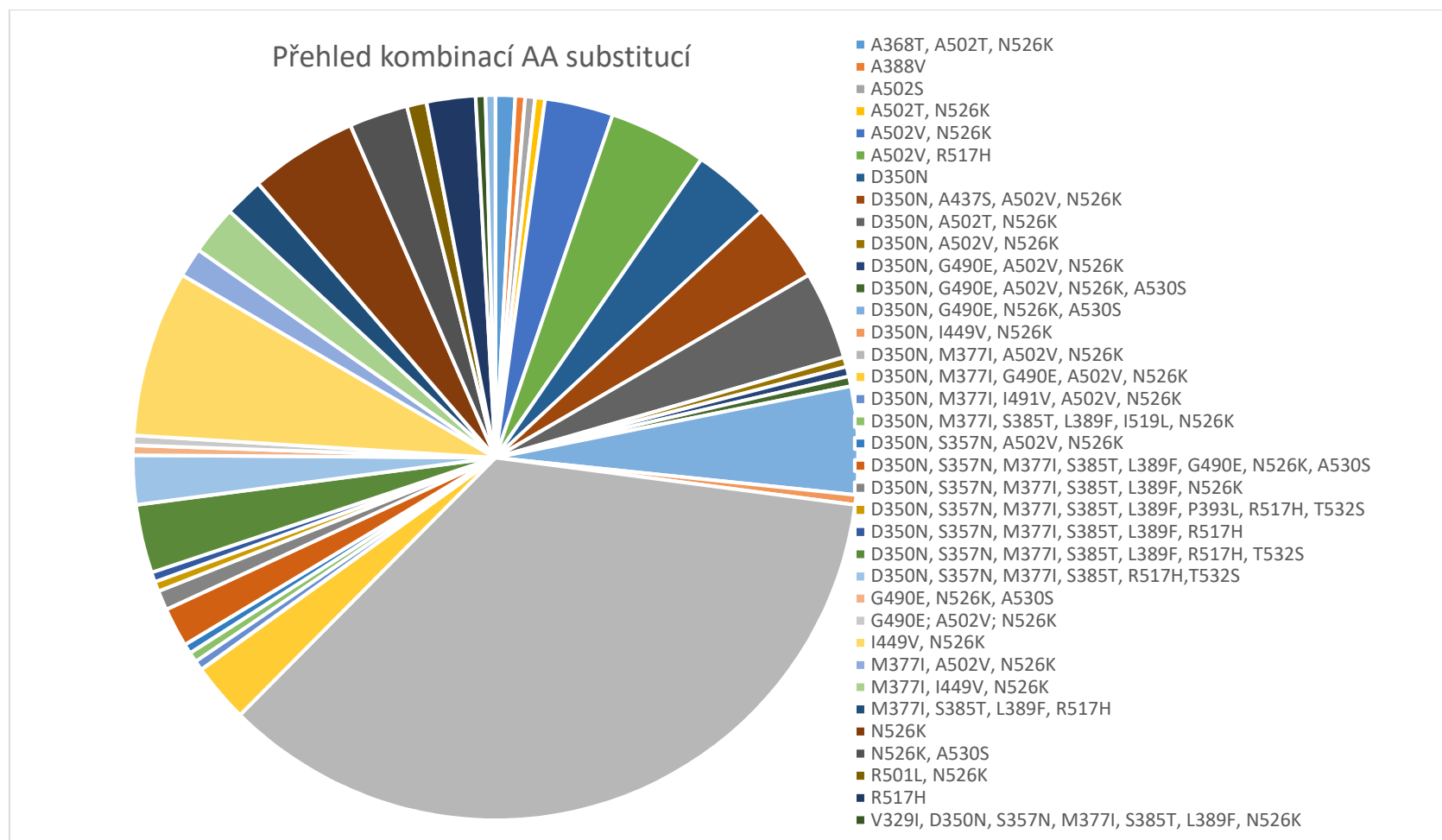
N - počet kmenů; ST – sekvenční typ; CC - klonální komplex; MIC - minimální inhibiční koncentrace; AMP - ampicilin; AMC - amoxicilin/kyselina klavulánová; CRX - cefuroxim; CTX - cefotaxim; PEN - penicilin; <sup>a</sup> - počet kmenů ST v závorce (pouze pokud je počet větší než 1); \* - CC je uveden pouze u komplexů s nalezeným předkem; ST bez uvedeného CC patří mezi singletony nebo bez předka; **tučně** - nově popsané ST; *kurzívou* – rezistentní hodnoty.

Tabulka 5. Tabulka uvádí kombinace substitucí (seskupených do skupin rezistence) zjištěné v této studii, rozsah citlivosti k antibiotikům a výsledky MLST typizace  $\beta$ -laktamáza pozitivních klinických izolátů *H. influenzae*.

		$\beta$ -laktamáza pozitivní				
		N	Rozmezí naměřených hodnot			MLST
PBP3 skupiny	AA záměny a jejich kombinace			MIC CTX (mg / L)	AMC (mm)	CRX (mm)
sPBP3 (n = 5)	V511A	1	0.06	11	23	426
	D350N	3	0.016	15 - 16	21 - 29	388 (3)
	A388V	1	0.03	17	27	401
rPBP3 skupina I (n = 2)	A502V, R517H	2 <sup>b</sup>	0.016 - 0.06	13 - 19	23 - 31	146, 1218/1218
rPBP3 skupina II (n=15)	A502V, N526K	2	0.03 - 0.06	10 - 14	21 - 23	34, 411/422
	D350N, A437S, A502V, N526K	2	0.03 - 0.06	10 - 13	17 - 23	836 (2)
	D350N, A502T, N526K	1	0.06	9	19	1860/396
	D350N, G490E, A502V, N526K, A530S	1	0.25	6	12	836
	D350N, M377I, A502V, N526K	6	0.03 - 0.125	6 - 14	15 - 23	165 (5), 1206/14
	M377I, A502V, N526K	3	0.03 - 0.06	11 - 15	19 - 20	165 (3)
rPBP3 skupina III (n=11)	D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, G490E, N526K, A530S	2	0.5	6 - 16	8 - 16	107 (2)
	D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, P393L, R517H, T532S	1	1	6	6	388
	D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, R517H	1	1	12	16	422/422

D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, R517H, T532S	6	1 - 2	6 - 12	6	3/367, 103/11 (2), 160, 1521, <b>1824</b>
M377I, S385T, L389F, R517H	1	1	6	6	<b>1836</b>

N - počet kmenů; ST – sekvenční typ; CC - klonální komplex; MIC - minimální inhibiční koncentrace; AMC - amoxicilin/kyselina klavulánová; CRX - cefuroxim; CTX - cefotaxim; <sup>a</sup> - počet kmenů ST v závorce (pouze pokud je počet větší než 1); <sup>b</sup> - jeden kmen obsahoval  $\beta$ -laktamázu ROB<sup>1</sup>; \* - CC je uveden pouze u komplexů s nalezeným předkem; ST bez uvedeného CC patří mezi singletony nebo bez předka; **tučně** - nově popsané ST; *kurzívou* – rezistentní hodnoty.



Graf 1. Přehled kombinací AA substitucí zjištěných v této studii u 228 klinických izolátů *H. influenzae*. Graf zobrazuje celkové zastoupení kombinací bez ohledu na produkci  $\beta$ -laktamázy. Nejčastěji detekovanou kombinací byla D350N, M377I, A502V, N526K (35 %).

Citlivost detekce mutací v genu *ftsI* pro jednotlivé antibiotické disky (Obrázek 16) se pohybovala od 84,6 % (amoxicilin/kyselina klavulanová) do 92,6 % (cefuroxim), 95,7 % (ampicilin) a 95,7 % (penicilin) (Tabulka 6) a byla kalkulována jako poměr počtu  $\beta$ -laktamáza negativních rPBP3 kmenů rezistentních k danému antibiotiku k součtu  $\beta$ -laktamáza negativních kmenů ze skupin rPBP3 I, II a III (n = 188). Celková senzitivita detekce mutací (99,5 %) (Tabulka 6) byla vypočítána jako poměr z počtu  $\beta$ -laktamáza negativních kmenů rezistentních alespoň k jednomu z testovaných  $\beta$ -laktamových antibiotik (n = 187) k součtu  $\beta$ -laktamáza negativních kmenů ze skupin rPBP3 I, II a III (n = 188).

Tabulka 6. Senzitivita detekce mutací genu *ftsI* u 228 kmenů *H. influenzae* vybranými antibiotiky, vyšetřeny diskovou difúzní metodou, EUCAST v 10.0

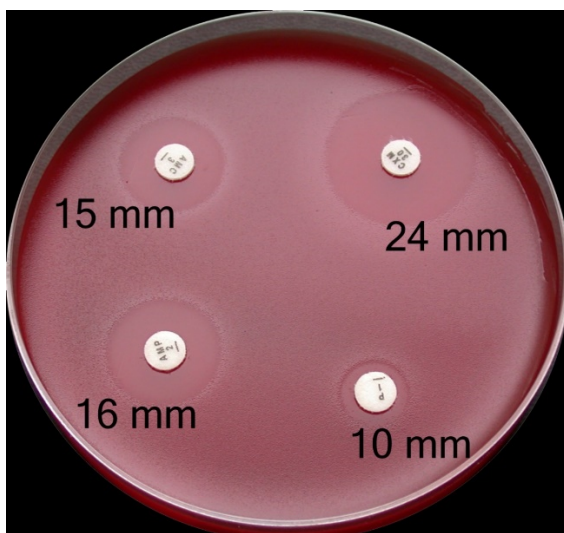
Antibiotikum	Obsah disku	Breakpoint (mm) pro rezistentní kmeny	Senzitivita detekce mutací
penicilin	1 J	< 12 mm	95,7 %
ampicilin	2 $\mu$ g	< 18 mm	95,7 %
amoxicilin/kyselina klavulánová	2/1 $\mu$ g	< 15 mm	84,6 %
cefuroxim	30 $\mu$ g	< 25 mm	92,6 %
penicilin+ampicilin+amoxicilin/kys. klavulánová+cefuroxim <sup>1</sup>			99,5 %

<sup>1</sup> obsah disků a breakpointy jsou uvedeny u jednotlivých disků

## 7.2 Výsledky vyšetření citlivosti na ostatní antibiotika

K ciprofloxacinu bylo rezistentních sedm kmenů (3,1 %), k tetracyklinu pět kmenů (2,2 %), k chloramfenikolu čtyři kmeny (1,8 %) a ke trimetoprim-sulfametoxazolu 96 kmenů (42,1 %). Jeden kmen produkující  $\beta$ -laktamázu TEM-1, sekvenčního typu 1521 a s kombinací mutací D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, R517H, T532S byl označen jako multirezistentní, byla u něj prokázána rezistence ke všem vyšetřeným antibiotikům.





Obrázek 16. Foto diskové difúzní metody klinického kmene B0037174 z našeho souboru kmenů *H. influenzae*. Na obrázku jsou patrné disky s antibiotiky, v pořadí (od shora doprava) amoxicilin/klavulanová kyselina, cefuroxim, ampicilin, penicilin. U tohoto kmene byla hraniční hodnota pro rozlišení citlivého/rezistentního kmene překročena u cefuroximu, ampicilinu a penicilinu.

### 7.3 Diskrepance mezi výsledky vyšetření MIC a diskovou difúzní metodou

Z důvodu porovnání výsledků získaných pomocí bujónové mikrodiluční metody (MIC) a diskové difúzní metody byl ampicilin testován oběma výše zmíněnými metodami. Výsledná interpretace (citlivý / rezistentní) by se samozřejmě měla u obou metod shodovat. Z dostupných literárních údajů [66,67] ale vyplývá, že u kmenů BLNAR bývají ve výsledných interpretacích nalézané větší diskrepance, než jsou meze statistických odchylek. V našem souboru 228 měření (228 MIC a 228 disková difúzní metoda) bylo pomocí diskové difúzní metody 214 kmenů interpretováno jako rezistentní, vyšetření MIC detekovalo rezistenci u 179 kmenů. Shoda obou metod v rezistenci nastala u 173 kmenů (75,9 %), šest kmenů bylo pomocí MIC rezistentních, diskovou difúzí byly určeny jako citlivé. Naopak 41 kmen stanovený diskovou metodou jako rezistentní byl pomocí MIC interpretován jako citlivý. Z tohoto 41 kmene mělo 37 kmenů hodnotu MIC 1 mg/l, což je přesně hraniční hodnota pro rezistenci (tři kmene s MIC 0,5 mg/l a jeden s 0,25 mg/l). 36 kmenů spadalo do rPBP skupiny II. U této

skupiny kmenů bylo dále detekováno 26 různých ST (MLST viz níže, Sekce 7.5), takže mají velmi malou epidemiologickou souvislost.

#### 7.4 Aminokyselinové záměny v PBP3

Studie začala s PCR detekcí záměny N526K, protože dle literatury [61] mělo jít o nejrozšířenější typ mutace. S přibývajícimi kmeny s negativním výsledkem PCR ale BLNAR fenotypem bylo od PCR skrínungu upuštěno a všechny kmeny byly sekvenovány. PCR dobře detekovala mutaci N526K pouze v případě, kdy se vyskytla samostatně, v kombinacích s jinými mutacemi již klesala spolehlivost PCR záchytu.

Komparativní analýza 228 osekvenovaných izolátů odhalila 23 různých AA substitucí: V329I, D350N, S357N, A368T, M377I, S385T, A388V, L389F, P393L, A437S, I449V, G490E, I491V, R501L, A502S, A502T, A502V, V511A, R517H, I519L, N526K, A530S, a T532S. Ve studii bylo nalezeno celkem 37 možných kombinací těchto AA substitucí (Tabulka 4 a 5, Graf 1). Záměny se vyskytovaly převážně v kombinacích od dvou až do osmi záměn ( $n = 213$ ), pouze 15 kmenů obsahovalo pět různých jedno-aminokyselinových substitucí. Tři kmeny s jedno-aminokyselinovou substitucí, N526K, patřily do skupiny II a 12 kmenů obsahujících různé záměny (A502S, V511A, D350N a A388V) patřilo do genotypu sPBP3. Nejčastější byla kombinace čtyř substitucí (D350N, M377I, A502V a N526K), kterou neslo 35 % kmenů ( $n = 80$ ) a z nich šest kmenů zároveň produkovalo TEM-1. Tato kombinace trvale převládala napříč časovými obdobími, 2010–2014: 33,3 %, 2015: 31,7 %, 2016: 33,8 %, 2017: 39,4 % a 2018: 25 %. Substitute N526K byla nalezena v kombinaci (25x) nebo samostatně u 184 kmenů (80,7 %). Druhá základní substitute, R517H, byla nalezena v šesti kombinacích (33 kmenů, 14,5 %). Substitute N526K a R517H nebyly nalezeny společně v žádné kombinaci. Pokud se v PBP3 nacházela více jak jedna AA záměna, byla v kombinacích vždy přítomna substitute N526K nebo R517H. Kromě základní mutace N526K nebo R517H měly všechny kmeny skupiny III ( $n = 26$ ) také mutace S385T, M377I a další (Tabulka 4 a 5).

Níže (červeně) jsou označeny pozice s nalezenými záměnami v 207 AA dlouhé peptidové sekvenci odvozené z 621 bp fragmentu genu *ftsI*. V pozici 502 byly nalezeny celkem tři záměny. Zeleně jsou vyznačeny konzervované motivy (viz kapitola 4.12) na pozicích 327, 379 a 512:

326G**STV**KPFVVLTA**L**Q**R**GVV**V**KRDEI**I**DTTSFKLS**S**SGKEIVDVAPRA**A**QQTLDEI  
LM**N**SS**N**RGV**S**R**L**AL**R**MP**P**SALMETYQNAGLSKPTDLGLIGEQVGILNANRKRWADI  
ERATV**A**YGYGITATPLQ**I**ARAYATLG**S**FGVYRPLSITKVDPPVIGKRVFSEKITKDIV**G**  
LEKVAIKNK**R**AMVEGYRVG**V**KTGT**A**R**K**IENGHYV**N**KYVA**F**T**I**532

#### 7.4.1 $\beta$ -laktamázy u rPBP3 a sPBP3 kmenů

Z 228 vyšetřených kmenů bylo 32 kmenů pozitivních na bla<sub>TEM-1</sub> a 1 kmen na bla<sub>ROB-1</sub>. Z 12 kmenů sPBP3 produkovalo  $\beta$ -laktamázu TEM-1 pět kmenů. Z 15 kmenů skupiny I produkoval jeden kmen  $\beta$ -laktamázu TEM-1 a jeden ROB-1. Ve skupině II, kam patřilo celkem 175 kmenů s 23 různými kombinacemi AA záměn, produkovalo  $\beta$ -laktamázu TEM-1 15 kmenů. Největší poměrné zastoupení v produkci  $\beta$ -laktamázy TEM-1 měla rPBP3 skupina III, 42,3 % (Tabulka 5).

#### 7.4.2 Mutace v genu *ftsI*

V jednotlivých tripletech se vyskytovala většinou jedna mutace, ať už silent nebo missense, která způsobuje AA záměnu. Výjimkou je záměna glycinu na kyselinu glutamovou v pozici 490, kdy v 16 případech z celkem 25 výskytů byl triplet dané AA zasažen mutacemi ve druhé i třetí pozici současně (šlo o kmeny různých ST i s různými kombinacemi záměn). Vyšetřované kmeny často obsahovaly i mnoho silent mutací v genu pro PBP3. Byl detekován kmen, který kromě kombinace záměn D350N, M377I, A502V, N526K, obsahoval dokonce dalších 35 silent mutací.

#### 7.4.3 Vztah mezi aminokyselinovými záměnami a citlivostmi k $\beta$ -laktamům

Z průměrů inhibičních zón se nedá, až na výjimky, usuzovat na přítomnost konkrétních AA záměn či jejich kombinací. Rozsah naměřených hodnot byl často velmi široký (Tabulka 7). Jako příklad lze použít nejčastěji se vyskytující kombinaci záměn D350N, M377I, A502V, N526K, kdy je v Tabulce 7 uveden rozsah naměřených hodnot inhibičních zón u jednotlivých  $\beta$ -laktamů a MIC ampicilinu. Pouze u několika kmenů citlivost korelovala s AA záměnami, i když ne na 100 %. Jednalo se o kmeny obsahující

kombinaci záměn A502V, R517H, které byly často citlivé k penicilinu a rezistentní k cefuroximu.

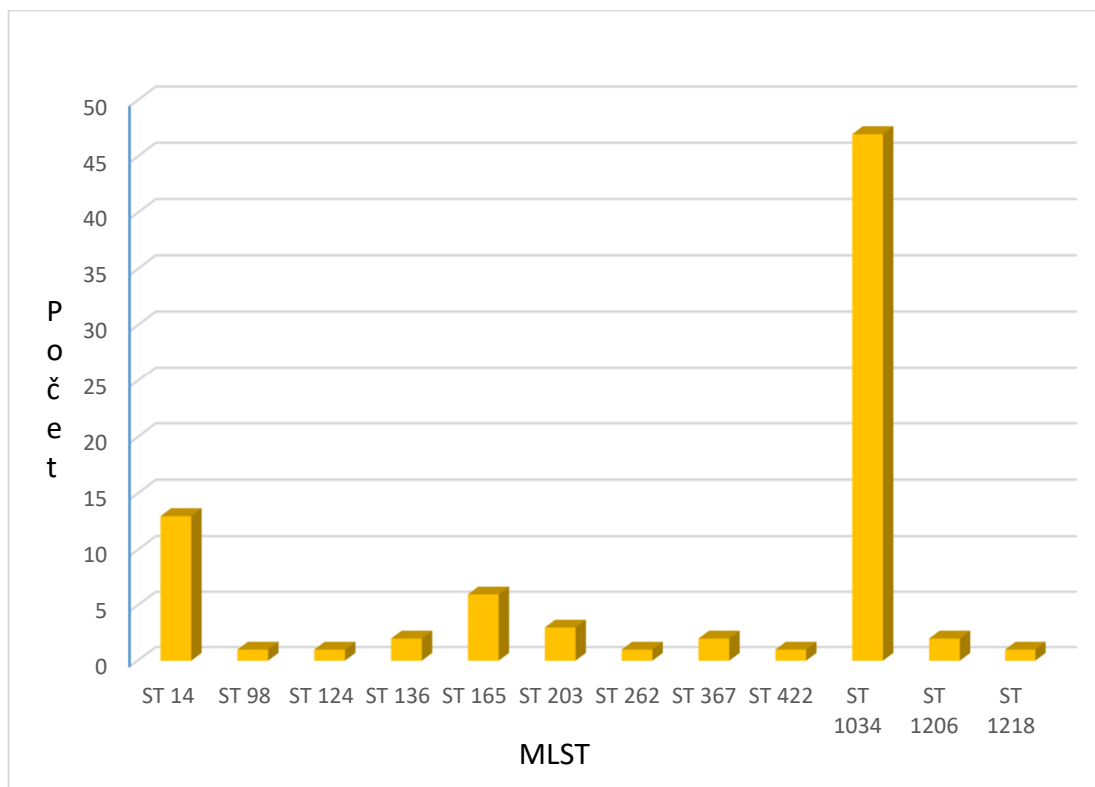
Tabulka 7. Příklad rozsahu naměřených hodnot inhibičních zón jednotlivých  $\beta$ -laktamů a MIC ampicilinu. V tabulce jsou uvedeny rozsahy naměřené u kombinace AA substitucí D350N, M377I, A502V, N526K.

Antibiotikum	Obsah disku	Rozmezí hodnot (mm)	Rozmezí hodnot (mg/l)	% kmenů v citlivé oblasti
penicilin	1 J	6 - 12		1,3
ampicilin	2 $\mu$ g	6 - 20		3
ampicilin MIC			0,25 - 16	11,3
amoxicilin/kyselina klavulánová	2/1 $\mu$ g	6 - 20		5
cefuroxim	30 $\mu$ g	11 - 29		5

## 7.5 Multi-Locus Sequence Typing a analýza klonálních komplexů

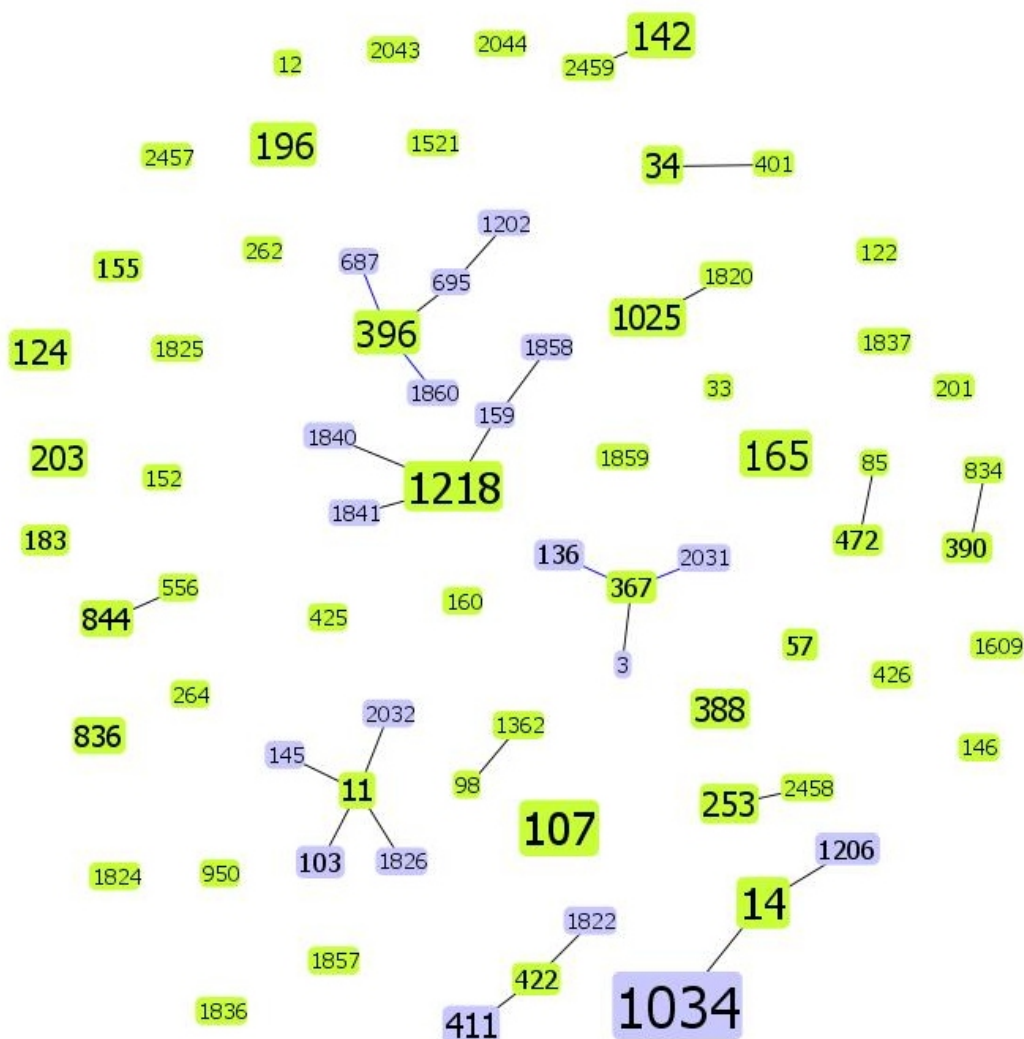
Ve sbírce 228 kmenů bylo stanoveno celkem 74 různých ST, včetně 15 nových ST: ST 1820, ST 1822, ST 1824, ST 1825, ST 1826, ST 1836, ST 1837, ST 1840, ST 1841, ST 2032, ST 2043, ST 2044, ST 2457, ST 2458 a ST 2459, viz tabulky 4 a 5. U vybraných nových ST bylo také detekováno šest nových alel: *aptG* (alela 138, ST 2458), *frdB* (197, ST 2044), *mdh* (285, ST 1825; 303, ST 2043 a 325, ST 2457) a *pgi* (272, ST 1826). Devět nových ST byly nové kombinace již známých alel. Ve čtyřech ST dosáhl počet kmenů 10 nebo více: ST 1034 (n = 49, 21,5 %), ST 103 (n = 17, 7,5 %), ST 14 (n = 13, 5,7 %) a ST 1218 (n = 13, 5,7 %). Od roku 2014 je dominantní ST 1034 (31,6 %), s oscilací incidence v následujících letech mezi 15–28 %. Výsledky všech čtyř použitých populačních analýz, goeBURST – level 1 – single locus variant; goeBURST – Full MLST; MLST-Hierarchical Clustering UPGMA a MLST - Neighbor-Joining Studier-Keppler Criterion, ukazují na velkou epidemiologickou různorodost kmenů a na velmi nízkou příbuznost kmenů obsahujících AA záměny R517H a N526K. Vzájemná fylogenetická vzdálenost mezi jednotlivými ST je znázorněna na Obrázku 17, 18, 19 a 20. U kmenů (n = 80) s nejčastější kombinací záměn (D350N, M377I,

A502V a N526K) bylo identifikováno 12 různých ST, z nichž dominoval ST 1034 (n = 47; 58,8 %) (Graf 2). Klonální analýza počítaná jako *single locus variant of alleles* (algoritmus BURST) odhalila šest klonálních komplexů (CC) se společným ST předkem (celkem 113 kmenů), osm CC bez nalezeného společného ST předka (obsahující pouze 2 ST; n = 36) a 33 singletonů (n = 79), Obrázek 18. CC s nalezeným ST předkem byly: CC 11 (n = 8, ST 11, ST 103, ST 145, ST 1826 a ST 2032), CC 14 (n = 64, ST 14, ST 1034 a ST 1206), CC 367 (n = 6, ST 3, ST 136, ST 367 a ST 2031), CC 396 (n = 11, ST 396, ST 687, ST 695, ST 1202 a ST 1860), CC 422 (n = 7, ST 411, ST 422 a ST1822) a CC 1218 (n = 17, ST 159, ST 1218, ST 1840, ST 1841 a ST 1858).



Graf 2. Zastoupení jednotlivých ST u nejčastější kombinace AA záměn D350N, M377I, A502V, N526K (n = 80). U této kombinace bylo celkem nalezeno 12 různých ST, dominoval ST 1034 (n = 47). Tyto ST patřily do pěti klonálních komplexů (CC 14, CC 367, CC 422, CC 1218 a CC 98/1362) a jednoho singletonu.

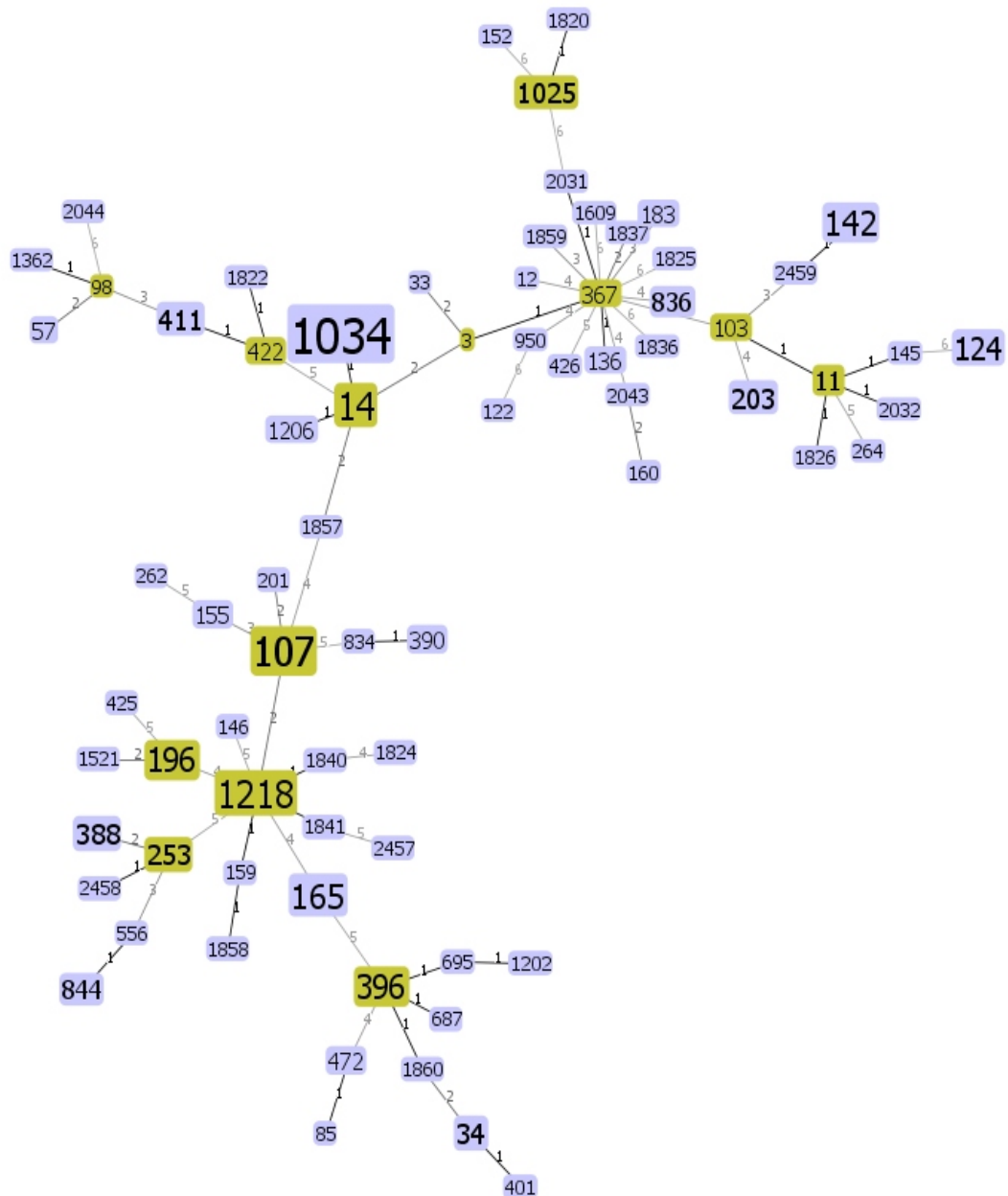
### 7.5.1 goeBURST – single locus variant



Obrázek 18. Výsledek analýzy MLST goeBURST – level 1 u 228 kmenů *H. influenzae*. Čísla korespondují s ST. Všechny údaje byly generovány (vypočítány a vizualizovány) pomocí PHYLOViZ 2.0 ([www.phyloviz.net](http://www.phyloviz.net)). Klonální analýza, počítaná jako *single locus variant of alleles* (algoritmus goeBURST), odhalila šest klonálních komplexů (CC) s nalezeným původním ST (komplexy s fialově označenými ST, kde prostřední, zeleně označené ST je původní, od kterého jsou fialové ST odvozené; celkem 113 kmenů), osm CC bez nalezeného původního ST (obsahující pouze 2 spojené ST; n = 36) a 33 singletonů (n = 79).

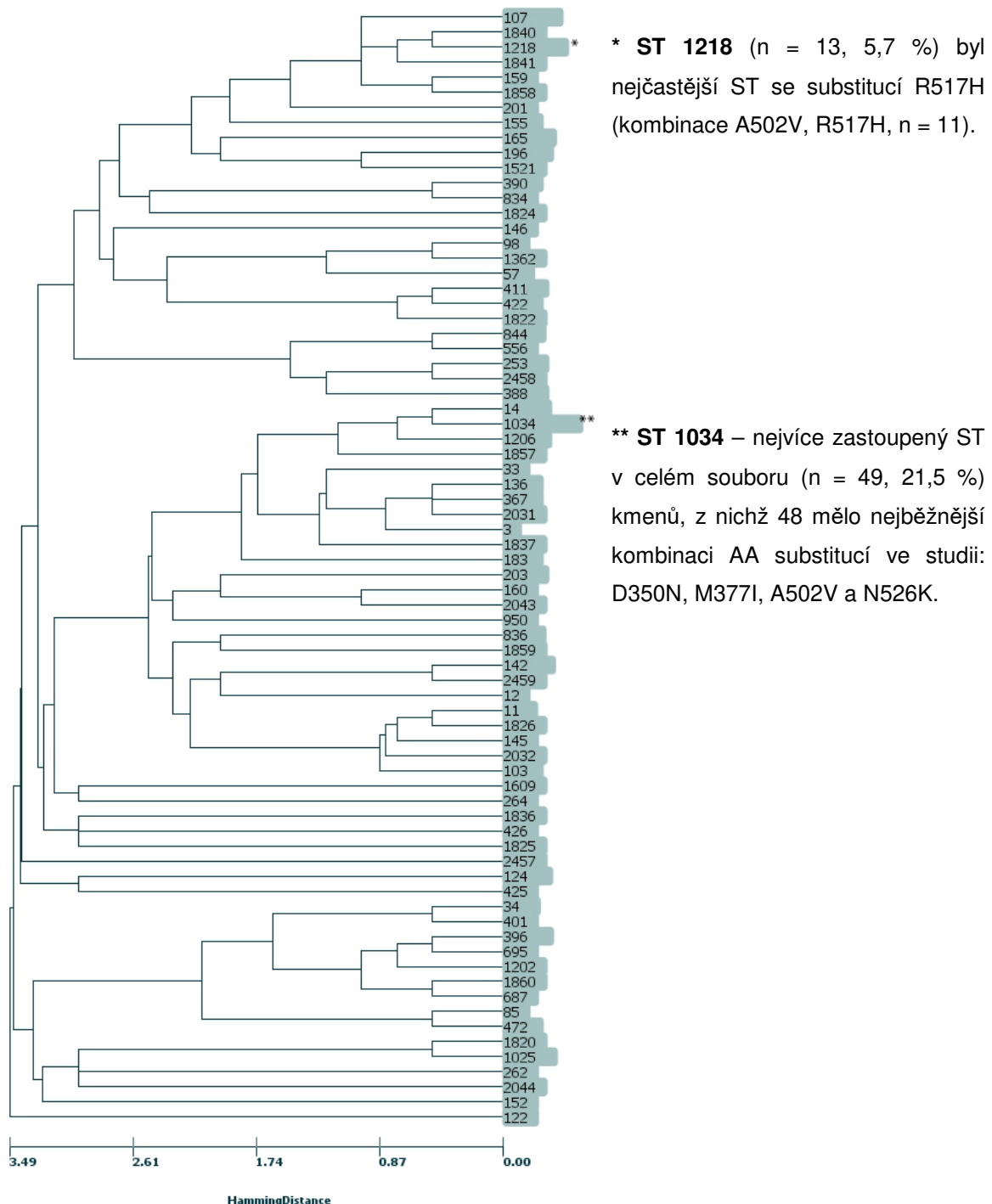
Téměř shodné výsledky byly získány u kalkulace a vizualizace při implementaci pravidel *double locus variant of alleles* a dokonce i *triple locus variant of alleles*. Protože je klonální komplex definován jako skupina ST, které mají alespoň šest alel (ze sedmi) společných s jiným členem definované skupiny (tzn – single locus variant), je detailně uvedena jen tato varianta.

## 7.5.2 goeBURST – Full MLST



Obrázek 19. Výsledek analýzy MLST goeBURST – Full MLST u 228 kmenů *H. influenzae*. Čísla korespondují s ST. Všechny údaje byly generovány (vypočítány a vizualizovány) pomocí PHYLOViZ 2.0 ([www.phyloviz.net](http://www.phyloviz.net)). Algoritmus goeBURST – Full MLST se snaží dát do vzájemného epidemiologického vztahu všechny analyzované ST. Z analýzy je patrné velké rozvětvení značící malou vzájemnou příbuznost kmenů. Čísla mezi jednotlivými ST udávají počet odlišných alel mezi danými ST. Ještě při kalkulaci *quadruple locus variant of alleles* se soubor kmenů rozpadá na 19 distinktních skupin a singletonů. Až při použití maximálního možného počtu alelických variant (6 odlišných alel) algoritmus BURST propojil celou populaci.

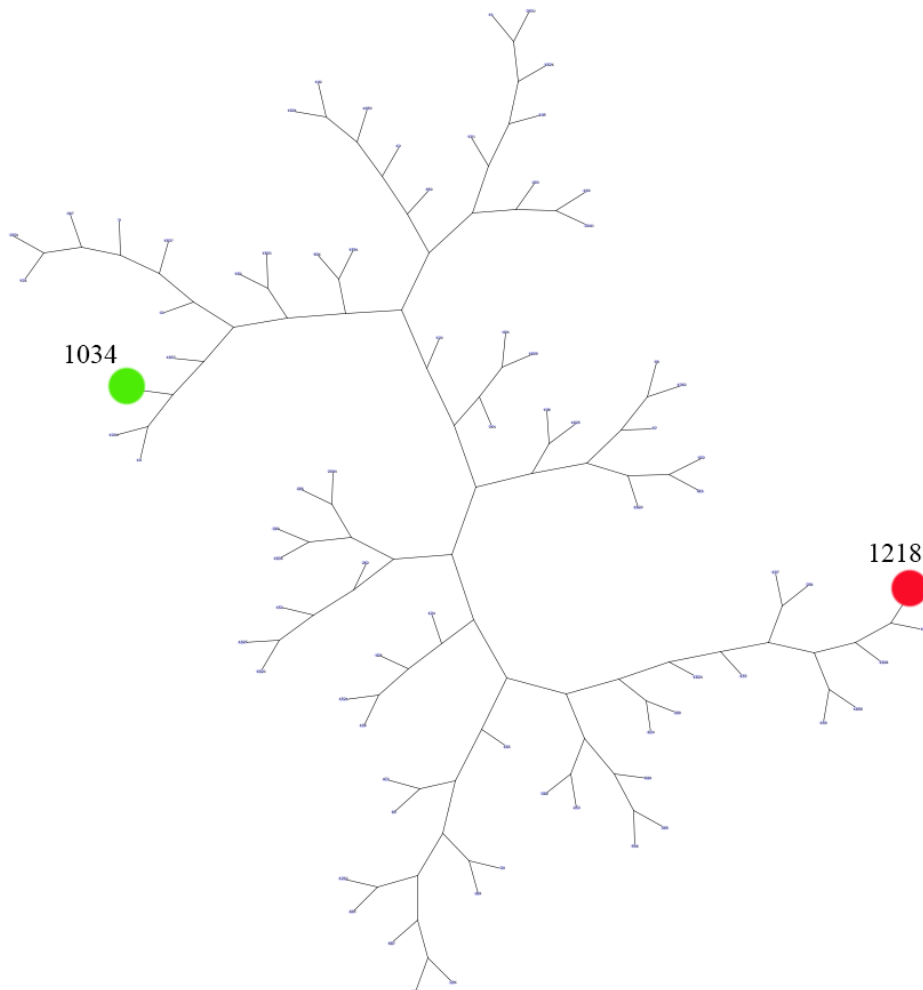
### 7.5.3 Hierarchical Clustering - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean



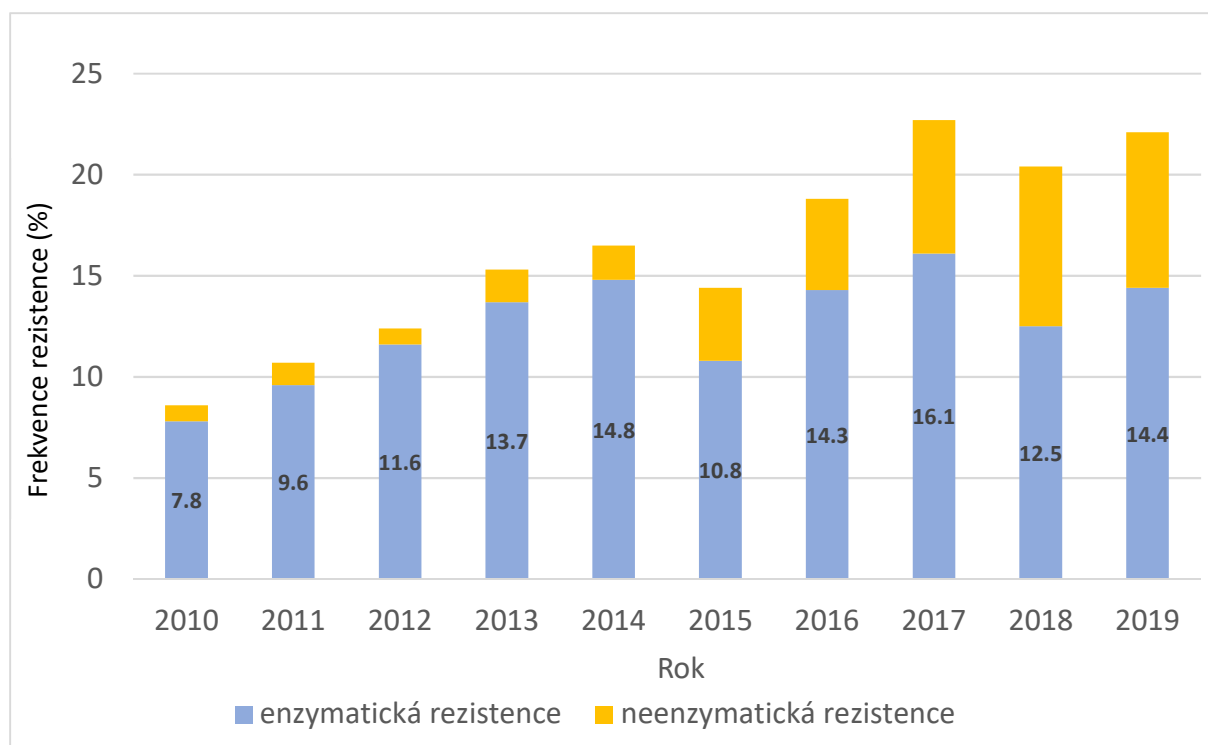
Obrázek 17. Výsledek analýzy MLST-Hierarchical Clustering (metoda UPGMA, vzdálenost měřítka: 150; výška měřítka: 16; mezní práh: 3,49) 228 kmenů *H. influenzae*. Čísla korespondují s ST. Všechny údaje byly generovány (vypočítány a vizualizovány) pomocí PHYLOViZ 2.0 ([www.phyloviz.net](http://www.phyloviz.net)). Fylogenetická vzdálenost jednotlivých ST naznačuje široký původ a malý vzájemný vztah mezi kmeny rPBP3 skupiny I, skupiny II, skupiny III a sPBP.



#### 7.5.4 Neighbor-Joining - Studier-Keppler Criterion



Obrázek 20. Výsledek analýzy MLST - Neighbor-Joining Studier-Keppler Criterion u 228 kmenů *H. influenzae*. Čísla korespondují s ST. Všechny údaje byly generovány (vypočítány a vizualizovány) pomocí PHYLOViZ 2.0 ([www.phyloviz.net](http://www.phyloviz.net)). Algoritmus Neighbor-Joining Studier-Keppler Criterion se snaží dát do vzájemného epidemiologického vztahu všechny analyzované ST. Z analýzy je patrné velké rozvětvení značící malou epidemiologickou příbuznost kmenů. Ze všech použitých epidemiologických analýz tento algoritmus nejlépe ilustruje velkou fylogenetickou vzdálenost dvou hlavních ST, které jsou na obrázku pro lepší přehlednost zvýrazněné. ST 1218 ( $n = 13$ , 5,7 %) byl nejčastější ST se substitucí R517H (kombinace A502V, R517H,  $n = 11$ ). ST 1034 – nejvíce zastoupený ST v celém souboru ( $n = 49$ , 21,5 %) kmenů, z nichž 48 mělo nejběžnější kombinaci AA substitucí ve studii: D350N, M377I, A502V a N526K. Z analýzy je patrná velice nízká vzájemná příbuznost kmenů se zvýrazněnými ST.



Graf 3. Trend rezistence k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům u *H. influenzae* v letech 2010-2019 a podíl enzymatického a neenzymatického mechanismu rezistence v České republice. Graf vychází z údajů surveillance rezistence k ampicilinu a amoxicilinu/kyselině klavulánové u *H. influenzae* způsobujících infekce dýchacích cest (<http://www.szu.cz/respiracni-studie-atb-rezistence>).

Data ([https://apps.szu.cz/rp/respiracni\\_patogeny.php](https://apps.szu.cz/rp/respiracni_patogeny.php)) jsou každoročně shromažďována Národní referenční laboratoří pro antibiotika, Státní zdravotní ústav, Praha, Česká republika.

## 8 Diskuse

Údaje ze surveillance antibiotické rezistence u *H. influenzae* způsobující infekce dýchacích cest (akutní sinusitida, akutní *otitis media* a komunitní pneumonie), které každoročně shromažďuje NRL pro ATB, ukazují rostoucí trend (Graf 3) u kmenů *H. influenzae* s neenzymatickou rezistencí na  $\beta$ -laktamová antibiotika v ČR [68]. Od roku 2010 došlo k celkovému nárůstu rezistence vůči ampicilinu u *H. influenzae* z 8,6 % v roce 2010 na 22,1 % v roce 2019. Ve stejném období vzrostl podíl kmenů rPBP3 z 0,8 % na 7,7 %. Zatímco míra BLPAR je téměř konstantní, podíl kmenů rPBP3 se od roku 2010 zvýšil 10krát [68]. V prvních letech sledování byl výskyt kmenů rPBP3 vzácný; od roku 2014 se prevalence zvýšila na maximum v roce 2017 (71 kmen). Postupně byly kmeny rPBP3 izolovány z celé ČR. V rámci celého časového úseku studie měly všechny správní kraje ČR zastoupení mezi izolovanými kmeny.

Rozdělení kmenů podle věkových kategorií odráží obecné pravidlo, že nejvyšší prevalence onemocnění bývá u lidí v seniorském věku a mezi malými dětmi. Také u závažných infekcí způsobených *H. influenzae*, kterých bylo v letech 2009-2020 v ČR evidováno 258, byla největší věkově specifická nemocnost hlášena u dětí do jednoho roku a u osob nad 65 let [23].

Bylo prokázáno, že expozice cefuroximu má stimulační účinek na zvýšení výskytu rPBP3 kmenů *H. influenzae* ve srovnání s amoxicilinem/kyselinou klavulánovou [69,70]. V České republice vzrostl výskyt kmenů *H. influenzae* rPBP3 ve stejném období, kdy se spotřeba cefuroximu zdvojnásobila ze 1,2 definovaných denních dávek [DDD] na 1000 obyvatel v roce 2010 na 2,3 DDD na 1000 obyvatel v roce 2017 [71].

Disertační práce je první komplexní prací v České republice, která se zabývá výskytem rPBP3 u kmenů *H. influenzae*. Je zaměřena na popis fenotypové detekce kmenů rPBP3, jejich klonální distribuci a také podrobnou analýzu AA substitucí a jejich kombinací v PBP3.

Senzitivita detekce neenzymatické rezistence jednotlivými  $\beta$ -laktamovými antibiotiky byla stanovena pomocí analýzy všech 228 kmenů. Nejvyšší citlivost detekce kmenů rPBP3 prokázal screeningový test s 1 J penicilinu (95,7 %). To je v souladu s EUCAST a například i s výsledky autorů Aguirre-Quiñonero *et al.* [72]. Stejnou citlivost (95,7 %) ale prokázal i test s ampicilinem (2  $\mu$ g). Screening s penicilinem a ampicilinem při společném testování diskovou difúzní metodou lze doporučit pro detekci kmenů s

mutacemi v PBP3. Tento screening dosahuje kombinované citlivosti 98,9 %. Pouze dva (0,9 %) kmeny rPBP  $\beta$ -laktamáza negativní (AA kombinace A502V, R517H) byly citlivé na penicilin i ampicilin.

Byly zaznamenány rozdíly ve výsledcích testování citlivosti na ampicilin mezi metodou MIC a metodou diskové difúze, stejně, jak ukázaly výsledky i jiných studií [66,67]. Definice  $\beta$ -laktamové rezistence u *H. influenzae* je spojena s hodnotami MIC. Na rozdíl od produkce  $\beta$ -laktamázy je chromozomálně kódovaná rezistence spojena s postupným a méně výrazným zvýšením MIC, která se často pohybuje kolem hodnoty breakpointu a tím se interpretace vyšetření citlivosti stává obtížnou, protože opakovaná stanovení MIC se od sebe mohou lišit o  $\pm 1$  hodnotu dvojnásobně řadě koncentrační řady [66]. V závislosti na použité metodice existují rozdíly v procentech shody mezi metodami. Metodika CLSI [73] udává hodnotu breakpointu ampicilinu 2 mg/l. Při takto nastavené hodnotě je dle autorů Barry *et al.* [67] shoda mezi MIC a diskovou difúzní metodou prováděnou na médiích různých výrobců dokonce jen 12 – 44 %. Metodika EUCAST [41] udává hraniční hodnotu u ampicilinu pro rezistenci 1 mg/l, která již lépe detekuje kmeny BLNAR, přesto z našeho souboru měření vyplynula shoda MIC s diskovou difúzní metodou pouze ve výši 75,9 %. Data z Tabulky 7 pak ilustrují konkrétní případ, kdy u kombinace substitucí D350N, M377I, A502V a N526K je uvedeno srovnání detekce rezistence pomocí diskové difúzní metody a MIC ampicilinu.

Počáteční využití screeningu N526K [61] pomocí PCR detekce se ukázalo jako nedostatečné pro záchyt kmenů se změněnými PBP3, protože neodráželo fenotypovou detekci rPBP3. Bylo rozhodnuto přejít k sekvenování oblasti 977–1597 bp genu *ftsI* [62], převodu získané sekvence bazí do sekvence aminokyselin a následné komparativní analýze se sekvencí nemutovaného kontrolního kmene.

Provedená srovnávací analýza odhalila v naší sbírce 228 kmenů 37 kombinací a 23 různých AA substitucí v proteinu PBP3. Tato čísla jsou vyšší než v podobných studiích [72,74,75], pravděpodobně kvůli našemu většímu počtu kmenů nebo delšímu sledovanému časovému období. Substituce N526K, nejčastěji nalézaná substituce na světě [40,55,56,76], byla nejběžnější substitucí také v naší studii. Nejčastější kombinace substitucí v testovaném souboru byla D350N, M377I, A502V a N526K, kterou mělo 35 % ( $n = 80$ ) kmenů. Výše zmíněná kombinace byla velmi často nalezena i v některých dalších zemích [72,74]. Největší počet zaznamenaných AA substitucí v

jednom kmeni byl osm a vyskytl se u pěti kmenů, u kterých jsou přídavné mutace v okolí 379S-S-N381 motivu a tyto kmeny jsou rezistentní k cefotaximu.

Vzhledem k velkému počtu AA substitucí a jejich kombinací není možné určit konkrétní příspěvek každé substituce k  $\beta$ -laktamové rezistenci. Jako příklad lze uvést unikátní substituci V329I, která se jako jediná ze všech 23 nalezených substitucí nachází přímo v oblasti vysoce konzervovaného AA motivu (S327-T-V329). Tato substituce byla popsána pouze v jediné publikaci [77]. V naší sbírce je V329I přítomna u jediného kmene, který je rezistentní k cefotaximu (MIC 1 mg/l), s kombinací AA substitucí V329I, D350N, S357N, M377I, S385T, L389F a N526K. Pro MIC cefotaximu 1 mg/l postačují ale jen záměny S385T a M377I [76,78]. Jak je vidět, dokonce ani mutace zasahující přímo do konzervovaného motivu neuděluje kmenu vyšší MIC k cefotaximu, než které je dosaženo u kmenů bez této záměny.

Druhou nejčastěji se vyskytující záměnou je D350N, která byla přítomná v 19 kombinacích i samostatně (celkem 151 kmenů, 66,2 %). Tato substituce je nejčastější např. v Austrálii [58]. Z osmi kmenů nesoucích samotnou substituci D350N bylo pět citlivých na všechny testované  $\beta$ -laktamy. Její přínos k hodnotě rezistence je tudíž diskutabilní. Co je doopravdy příčinou rezistence u zbylých tří kmenů s touto záměnou je nejasné. To samé platí i pro AA záměnu A388V vyskytující se samostatně u jednoho kmene. Daný kmen produkoval  $\beta$ -laktamázu, ale byl citlivý k amoxicilin/klavulanátu i k cefuroximu. Někteří autoři [75,79] uvádějí, že tyto substituce spolu s A368T a R510L nemají žádný vliv na rezistenci. Pozice A502 je nejvariabilnější pozicí s ohledem na počet AA záměn v proteinu PBP3. Na této pozici byly nalezeny tři různé substituce, A502S, A502T a A502V. Substituce na pozici A502 jsou dále třetí nejčastější záměnou (nalezeny v 16 kombinacích nebo samostatně, celkem u 134 kmenů, 58,8 %). Podle Skaare [55] a Tristam [79] uděluje záměna A502V rezistenci k  $\beta$ -laktamům v nízkém stupni. Záměny v této pozici ale zřejmě také nebudou mít velký přínos k rezistenci. Lze to vyvodit z faktu, že v našem souboru kmenů byl nalezen jeden kmen s jedinou AA záměnou (A502S), který byl citlivý na všechny  $\beta$ -laktamy.

V našem studijním souboru bylo 26 kmenů rPBP skupiny III, se substitucemi M377I, S385T a N526K nebo R517H nalezenými ve všech těchto kmenech. Substituce S385T společně s N526K nebo R517H jsou dle dostupné literatury nezbytné pro rezistenci na cefalosporiny 3. generace [40,76,78]. Byla ale nalezena jedna kombinace záměn, u které tento předpoklad neplatil: tři z pěti kmenů s kombinacemi D350N, S357N, M377I, S385T, R517H a T532S byly citlivé na cefalosporiny 3. generace (MIC

cefotaximu 0,125 mg/l). Naproti tomu kmeny rezistentní k cefotaximu byly nalezeny ve skupině II v kombinacích D350N, G490E, A502V, N526K, A530S (jeden kmen s produkcí  $\beta$ -laktamázy) a M377I, I449V, N526K (dva z pěti kmenů se stejnou kombinací AA substituce bez produkce  $\beta$ -laktamázy). Kmeny rPBP3 rezistentní k cefotaximu se vyskytují již od 90. let 20. století zejména v některých asijských regionech [76,80,81]. V evropských zemích byl výskyt až do roku 2008 velmi vzácný a první klonální šíření bylo popsáno z Norska [82], v ČR byly první takové kmeny zachyceny v roce 2015 [83].

Pro zjištění epidemiologické souvislosti kmenů byla použita metoda MLST. Opouzdřené typy *H. influenzae* na základě analýzy sedmi housekeeping genů spadají dle literárních zdrojů pouze do několika klonálních komplexů (CC), zatímco netypizovatelné kmeny vykazují vysoký stupeň diverzity. Existuje dokonce i souvislost mezi určitými sekvenční typy (ST) a specifickou kolonizací sliznic nebo dokonce typem infekce [70,84]. Následné klonálně fylogenetické analýzy ukázaly velikou heterogenitu populace českých rPBP3 *H. influenzae*. Podobně fragmentovaná populace byla hlášena např. z Norska, Španělska, Itálie a Japonska [85,86,87,88,89]. I při porovnání fylogenetické vzdálenosti mezi jednotlivými skupinami rPBP3 vykázaly všechny MLST analýzy nízkou příbuznost mezi kmeny rPBP3 skupin I, II a III, reprezentovanými ST 1218 a ST 1034. ST 1218 převládá ve skupině I ( $n = 12/15$ ) a nevyskytoval se u kmenů ze skupin II a III. ST 1034 prevaluje v České republice a naopak ST 1218 byl zjištěn jako dominantní v Japonsku [89]. Ani kmeny izolované z krve ( $n = 25$ ), ani kmeny produkující  $\beta$ -laktamázu ( $n = 33$ ), netvořily homogenní skupiny, spadaly do 15ti, respektive 19ti různých ST. Kmeny rezistentní k cefotaximu ( $n = 26$ ) byly izolovány převážně od cizinců nebo se jednalo o importované kmeny. U této skupiny kmenů tak není překvapením velká diverzita, patřily do 15ti různých ST. Pouze u 20 % kmenů zaslaných z 19 laboratoří reprezentujících deset regionů ČR se dá hovořit o klonálním a téměř celorepublikovém rozšíření. Jedná se o 49 kmenů ST1034 s kombinací AA záměn D350N, M377I, A502V, N526K.

Naše studie má určitá omezení. Klonální experimenty k potvrzení přínosu jednotlivých AA substitucí k  $\beta$ -laktamové rezistenci nebyly provedeny a mohou být předmětem dalších studií. Podle Thegerströma [90] i uměle zaklonované mutace jiné než ty, které byly zjištěny v této studii, snižovaly citlivost k aminopenicilinům. To naznačuje, že rozsah mutací vedoucích k rezistenci je široký a že se mohou nadále vyskytovat nové AA substituce. Experimenty k detekci dalších domnělých mechanismů

rezistence, které by mohly mít vliv na citlivost na  $\beta$ -laktamy, nebyly provedeny. Velkou otázkou je, jak velký vliv na výslednou hodnotu citlivosti mohou mít tyto domnělé/přidružené mechanismy rezistence, jako je nadměrná exprese efluxní pumpy AcrAB [54]. Tento mechanismus by mohl vysvětlit výskyt širokého rozmezí citlivostí i v rámci jedné AA kombinace [72]. Naše nepublikovaná data ukazují, že mutace v AcrR represoru efluxní pumpy AcrAB mohou vést k rezistenci dokonce i v nepřítomnosti AA substitucí v PBP3.

## 9 Závěry

Závěrem lze říci, že nalezené kombinace AA substitucí a heterogenních populací kmenů rPBP jsou v souladu s některými výsledky uváděnými ostatními zahraničními autory. Byly nalezeny kmeny s N526K a kmeny s R517H a nejběžnější kombinací AA substitucí je D350N, M377I, A502V a N526K. V České republice se podíl kmenů rPBP mezi kmeny rezistentními na ampicilin neustále zvyšuje [68]. Alarmující je také nárůst počtu kmenů rezistentních na cefotaxim. Rostoucí prevalenci kmenů rPBP3 lze vysvětlit zvýšenou spotřebou cefuroximu, ale také vznikem genotypu rPBP3 *H. influenzae* s vyšší klinickou významností.

Fenotypová detekce kmenů BLNAR je obtížná, a proto lze předpokládat, že skutečný výskyt tohoto typu rezistence může být vyšší. Dosavadní pozorování skutečně naznačují, že nalezené mutace nemusí být vždy fenotypově vyjádřeny a rutinní testování citlivosti na aminopeniciliny spolehlivě nerozlišuje kmeny BLNAR od citlivých populací. Ke špatnému rozlišení BLNAR od citlivých populací přispívá i to, že mnoho kmenů vytváří kolem disků inhibiční zóny s nejasnými okraji a mnohdy lze na plotně pozorovat i několik inhibičních zón kolem jednoho disku. To může vést k nesprávně změřeným hodnotám a k chybnému zařazení kmene jako BLNAR negativní či naopak jako BLNAR pozitivní. Je proto nanejvýš vhodné pokračovat ve sledování antibiotické rezistence na národní úrovni a naučit klinické laboratoře spolehlivě rozpoznávat kmeny rPBP v klinických vzorcích. Pro maximální spolehlivost fenotypové detekce všech známých typů mutací genu *ftsI* musí být všechna čtyři  $\beta$ -laktamová antibiotika testována současně pomocí diskové difúzní metody. Pro rutinní vyhledávání kmenů s mutacemi v PBP3 v klinické praxi lze v rámci zachování rozumných finančních nákladů doporučit jako screening použití pouze dvou disků, penicilinu (1 J) a ampicilinu (2  $\mu$ g). Tento screening dosahuje kombinované senzitivity 98,9 %.



## 9.1 Závěry v bodech:

1. Nalezena široká škála aminokyselinových záměn, celkem 23 různých AA substitucí: V329I, D350N, S357N, A368T, M377I, S385T, A388V, L389F, P393L, A437S, I449V, G490E, I491V, R501L, A502S, A502T, A502V, V511A, R517H, I519L, N526K, A530S, a T532S.
2. Záměny byly u kmenů převážně v kombinacích, celkem ve 37.
3. Nejčastější byla kombinace čtyř substitucí D350N, M377I, A502V a N526K, celkem u 80 kmenů
4. Nejasný příspěvek jednotlivých AA záměn k úrovni rezistence je zřejmě také ovlivněn možnými jinými mechanismy rezistence.
5. Analýzy založené na MLST odhalily malou vzájemnou epidemiologickou souvislost mezi všemi kmeny.
6. Klonálním šířením je možný nazvat pouze výskyt 47 kmenů s kombinací substitucí D350N, M377I, A502V a N526K, které spadaly do jednoho ST 1034 a klonálního komplexu CC 14.
7. Velká fylogenetická vzdálenost mezi kmeny obsahujícími dvě základní AA záměny, R517H a N526K.
8. Nejlepší předpoklady pro odhalení kmenů s neenzymatickým mechanismem rezistence pomocí finančně nenáročné diskové difúzní metody má antibiotikum penicilin společně s ampicilinem (obě 95,7 % senzitivita)
9. Relativně velké procento (10,1 %) kmenů rezistentních k cefalosporinům třetí generace mezi zachycenými kmeny.
10. Pro lepší celkovou detekci a pro lepší shodu mezi výsledky MIC a diskové difúzní metody u kmenů s neenzymatickou rezistencí by muselo dojít k úpravě EUCAST breakpointů testovaných  $\beta$ -laktamových antibiotik.

## 10 Literatura

1. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S.; Wood, W.B. The *Haemophilus-Bordetella* group. In *Microbiology*, 3<sup>rd</sup> ed.; Harper & Row Publishers:New York, USA, 1980, s 792-800.
2. McLinn, S.E.; Nelson, J.D.; Haltalin, K.C. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*. 1970, *Pediatrics* 45, 827–838.
3. Doern, G.V.; Chapin, K.C. Determination of biotypes of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* a comparison of methods and a description of a new biotype (VIII) of *H. parainfluenzae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1987, 7, 269–272.
4. Oberhofer, T.R.; Back, A.E. Biotypes of *Haemophilus* encountered in clinical laboratories. *J Clin Microbiol.* 1979, 10, 168–174.
5. Murphy, T.F.; Dudas, K.C.; Mylotte, J.M.; Apicella, M.A. A subtyping system for nontypeable *Haemophilus influenzae* based on outer-membrane proteins. *J. Infect. Dis.* 1983, 147, 838-846.
6. Flesher, A.R.; Insel, R.A. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* 1978, 138, 719-730.
7. Kilian, M. *Haemophilus*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed.; Murray, P.R.; Tenenbaum, E.; Tenenbaum, J.H.; Tenenbaum, M.L.; Tenenbaum, M.A.; ASM Press:Washington, DC, USA, 2008, s 636–648.
8. Jordens, J.Z.; Slack, M.P.E. *Haemophilus influenzae*: Then and now. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1995, 14, 935–948.
9. Niederman, M.S.; Mandell, L.A.; Anzueto, A.; Bass, J.B.; Broughton, W.A.; et al. Guidelines for the management of adults with community acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2001, 163, 1730–1754.
10. Monto, A.S. Acute respiratory infection in children of developing countries: challenge of the 1990's. *Rev. Infect. Dis.* 1989, 11, 498-505.
11. Kuklinska, D.; Kilian, M. Relative proportions of *Haemophilus* species in the throat of healthy children and adults. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 1984, 3, 249-252.
12. Zemlickova, H.; Urbaskova, P.; Adamkova, V.; Motlova, J.; Lebedova, V.; Prochazka, B. Characteristics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and *Staphylococcus aureus* isolated from

- the nasopharynx of healthy children attending day-care centres in the Czech Republic. *Epidemiol Infect.* 2006, *134*, 1179-1187.
13. Trottier, S.; Stenberg, K.; Svamborg-Eden, C. Turnover of nontypeable *Haemophilus influenzae* in the nasopharynges of healthy children. *J. Clin. Microbiol.* 1989, *27*, 2175-2179.
  14. St. Geme, J.W. Nontypeable *Haemophilus influenzae* disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect. Agents Dis.* III. 1993, *2*, 1-16.
  15. Farley, M.M.; Stephens, D.S.; Kaplan, S.L.; Mason, E.O. Pilus and non-pilus mediated interaction of *Haemophilus influenzae* type b with human erythrocytes and human nasopharyngeal mucosa. *J. Infect. Dis.* 1990, *161*, 274-280.
  16. Fakih, M.G.; Murphy, T.F.; Pattoli, M.A.; Berenson, C.S. Specific binding of *Haemophilus influenzae* to minor gangliosides of human respiratory epithelial cells. *Infect. Immun.* 1997, *65*, 1695-1700.
  17. Rubin, L.G.; Moxon, E.R. Pathogenesis of bloodstream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 1983, *41*, 280-284.
  18. Agrawal, A.; Murphy, T. F. *Haemophilus influenzae* infections in the *H. influenzae* type b conjugate vaccine era. *Journal of clinical microbiology.* 2011, *49*(11), 3728–3732.
  19. Quentin, R.; Musser, J.M.; Mellouet, M.; Sizaret, P.Y.; Selander, R.K.; Goudeau, A. Typing of urogenital, maternal, and neonatal isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in correlation with clinical source of isolation and evidence for a genital specificity of *H. influenzae* biotype IV. *J Clin Microbiol.* 1989, *27*, 2286–2294.
  20. Davis, S.; Feikin, D.; Johnson, H. The effect of *Haemophilus influenzae* type B and pneumococcal conjugate vaccines on childhood meningitis mortality: a systematic review. *BMC Public Health.* 2013, *13*, 3–21.
  21. MacNeil, J.R.; Cohn, A.C.; Farley, M.; Mair, R.; Baumbach, J.; et al. Current epidemiology and trends in invasive *Haemophilus influenzae* disease--United States, 1989–2008. *Clin Infect Dis.* 2011, *53*, 1230–1236.
  22. Dworkin, M.; Park, L.; Borchardt, S. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in persons >65 years old. *Clin Infect Dis* 2007, *44*, 810–816.

23. Lebedová, V.; Šebestová, H.; Musílek, M.; Vlach, J.; Křížová, P. Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v období 2009-2020. *Zprávy CEM*. 2021, 30(5), 149-156.
24. Peltola, H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev*. 2000, 13, 302–317.
25. Vardanyan, R.S.; Hruby, V.J. 32 - Antibiotics. In *Synthesis of Essential Drugs*. 1<sup>st</sup> ed. Vardanyan, R.S., Hruby, V.J., Eds.; Elsevier. 2006, s 425-498.
26. Reese, R.E.; Betts, R.F.; Gumustop, B. *Handbook of Antibiotics*. 3<sup>rd</sup> ed.; Lippincott Williams & Wilkins:Philadelphia, USA, 2000.
27. Drusano, G. L.; Craig, W. A. Relevance of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the selection of antibiotics for respiratory tract infections. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 1997, 9 Suppl 3, 38–44.
28. Grayson, M.L. *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*, 6<sup>th</sup> ed.; CRC Press, 2010, Volume 1.
29. Medeiros, A.A.; O'Brien, T.F. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type B possessing a TEMtype beta-lactamase but little permeability barrier to ampicillin. *Lancet* 1975, 1, 716–719.
30. Rubin, L.G.; Medeiros, A.A.; Yolken, R.H.; Moxon, E.R. Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. *Lancet* 1981, 2, 1008–1010.
31. Medeiros, A. A.; Levesque, R.; Jacoby, G.A. An animal source for the ROB-1 beta-lactamase of *Haemophilus influenzae* type b. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1986, 29, 212–215.
32. Bell, S. M.; Hardy, M. J.; Pham, J. N.; Jimenez, A. S.; Gatus, B. J. Resistance of *Haemophilus influenzae* type b to ampicillin mediated by ROB-1 beta-lactamase. *The Medical journal of Australia*, 1993, 159(11-12), 834.
33. Karlowsky, J. A.; Verma, G.; Zhanel, G.G.; Hoban, D.J. Presence of ROB-1 beta-lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2000, 45, 871–875.

34. Tristram, S. G.; Hawes, R.; Souprounov, J. Variation in selected regions of blaTEM genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, *56*, 481–484.
35. Tristram, S.; Nichols, S. A multiplex PCR for beta-lactamase genes of *Haemophilus influenzae* and description of a new blaTEM promoter variant. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005, *58*, 183–185.
36. Laufs, R.; Riess, F. C.; Jahn, G.; Fock, R.; Kaulfers, P.M. Origin of *Haemophilus influenzae* R factors. *J. Bacteriol.* 1981, *147*, 563–568.
37. Leaves, N. I.; Dimopoulou, I.; Hayes, I.; Kerridge, S.; Falla, T.; Secka, O.; Adegbola, R.A.; Slack, M.P.; Peto, T.E.; Crook, D.W. Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2000, *45*, 599–604.
38. Pitout, M.; MacDonald, K.; Musgrave, H.; Lindique, C.; Forward, K.; Hiltz, M.; Davidson, R. Characterization of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) activity in *Haemophilus influenzae*, abstr. C2-645, p. 96. Abstr. 42nd *Intersci. Conf. Antimicrob. Chemother.* 2002, San Diego, CA, 2002. American Society for Microbiology, Washington, DC.
39. Mendelman, P. M.; Chaffin, D. O.; Kalaitzoglou, G. Penicillin binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990, *25*, 525–534.
40. Ubukata, K.; Shibasaki, Y.; Yamamoto, K.; Chiba, N.; Hasegawa, K.; Takeuchi, Y.; Sunakawa, K.; Inoue, M.; Konno, M. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactam resistance in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, *45*, 1693–1699.
41. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 10.0, 2020. Dostupné online: <http://www.eucast.org>.
42. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M.; Ayala, J.A.; Charlier, P. The penicillinbinding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* 2008, *32*, 234–258.
43. Margolin, W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005, *6*, 862–871.

44. Fraipont, C.; Alexeeva, S.; Wolf, B.; van der Ploeg, R.; Schloesser, M.; et al. The integral membrane FtsW protein and peptidoglycan synthase PBP3 form a subcomplex in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2011, *157*, 251–259.
45. Karimova, G.; Dautin, N.; Ladant, D. Interaction network among *Escherichia coli* membrane proteins involved in cell division as revealed by bacterial two-hybrid analysis. *J Bacteriol*. 2005, *187*, 2233–2243.
46. Bertsche, U.; Kast, T.; Wolf, B.; Fraipont, C.; Aarsman, ME.; et al. Interaction between two murein (peptidoglycan) synthases, PBP3 and PBP1B, in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2006, *61*, 675–690.
47. Nagasawa, H.; Sakagami, Y.; Suzuki, A.; Suzuki, H.; Hara, H.; et al. Determination of the cleavage site involved in C-terminal processing of penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1989, *171*, 5890–5893.
48. Sauvage, E.; Derouaux, A.; Fraipont, C.; Joris, M.; Herman R.I.; et al. Crystal Structure of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) from *Escherichia coli*. *PLOS ONE*. 2014, *9/5*, e98042.
49. Ghuysen, J.M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol*. 1991, *45*, 37–67.
50. Straker, K.; Wootton, M.; Simm, A. M.; Bennett, P. M.; MacGowan A. P.; Walsh, T. R. Cefuroxime resistance in non-beta-lactamase *Haemophilus influenzae* is linked to mutations in *ftsI*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003, *51*, 523–530.
51. Osaki, Y.; Sanbongi, M.; Ishikawa, H.; Kataoka, T.; Suzuki, K. Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* beta-lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2005, *49*, 2834–2839.
52. Matic, V.; Bozdogan, B.; Jacobs, M.R.; Ubukata, K.; Appelbaum, P.C. Contribution of beta-lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in beta-lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother*. 2003, *52*, 1018–1021.
53. Dabernat, H.; Delmas, C.; Seguy, M.; Pelissier, R.; Faucon, G.; Bennamani, S.; Pasquier, C. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid

- substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002, *46*, 2208–2218.
54. Kaczmarek, F.S.; Gootz, T.D.; Dib-Hajj, F.; Shang, W.; Hallowell, S.; Cronan, M. Genetic and molecular characterization of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, *48*, 1630–1639.
  55. Skaare, D.; Allum, A.G.; Anthonisen, I.L.; Jenkins, A.; Lia, A.; Strand, L.; Tveten, Y.; Kristiansen, B.E. Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein-mediated beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010, *16*, 1117–1124.
  56. Resman, F.; Ristovski, M.; Forsgren, A.; Kaijser, B.; Kronvall, G.; Medstrand, P.; Melander, E.; Odenholt, I.; Riesbeck, K. Increase of beta-lactam-resistant invasive *Haemophilus influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, *56*, 4408–4415.
  57. Dabernat, H.; Delmas, C. Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001–2008: A retrospective database analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012, *31*, 2745–2753.
  58. Witherden, E.A.; Montgomery, J.; Henderson, B.; Tristram, S.G. Prevalence and genotypic characteristics of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in Australia. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, *66*, 1013–1015.
  59. Frickmann, H.; Christner, M.; Donat, M.; Berger, A.; Essig, A.; Podbielski, A.; Hagen, R.M.; Poppert, S. Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOFMS) platforms. *PLoS One.* 2013, *8*, e63222.
  60. Montgomery, K.; Raymundo, L.; Drew, W.L. Chromogenic cephalosporin spot test to detect  $\beta$ -lactamase in clinically significant bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1979; *9*, 205–207.
  61. Witherden, E.A.; Kunde, D.; Tristram, G. PCR screening for the N526K substitution in isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, *68*(10), 2255–2258.

62. Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity. Dostupné online: [https://pubmlst.org/static/organisms/haemophilus-influenzae/ftsI\\_sequencing\\_protocol\\_v3\\_01-02-2014.pdf](https://pubmlst.org/static/organisms/haemophilus-influenzae/ftsI_sequencing_protocol_v3_01-02-2014.pdf).
63. Fleischmann, R.D.; Adams, M.D.; White, O.; Clayton, R.A.; Kirkness, E.F.; Kerlavage, A.R.; Bult, C.J.; Tomb, J.F.; Dougherty, B.A.; Merrick, J.M.; et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 1995, *269*, 496–512.
64. Meats, E.; Feil, E.J.; Stringer, S.; Cody, A.J.; Goldstein, R.; Kroll, J.S.; Popovic, T.; Spratt, B.G. Characterization of Encapsulated and Noncapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 2003, *41*, 1623–1636.
65. Francisco, A.P.; Bugalho, M.; Ramirez, M.; Carriço, J.A. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach. *BMC Bioinform.* 2009, *10*, 152–167.
66. Nørskov-Lauritsen, N.; Ridderberg, W.; Erikstrup, L.T.; Fuursted, K. Evaluation of disk diffusion methods to detect low-level  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *APMIS.* 2011, *119*, 385–392.
67. Barry, A.L.; Fuchs, P.C.; Brown, S.D. Identification of  $\beta$ -Lactamase-Negative, Ampicillin-Resistant Strains of *Haemophilus influenzae* with Four Methods and Eight Media. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, *45*, 1585–1588.
68. Respirační Patogeny. Dostupné online: [https://apps.szu.cz/rp/respiracni\\_patogeny.php](https://apps.szu.cz/rp/respiracni_patogeny.php)
69. Gonzalez, N.; Aguilar, L.; Alou, L.; Giménez, M.J.; Sevillano, D.; et al. Influence of different resistant traits on the competitive growth of *Haemophilus influenzae* in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different betalactams: an in vitro pharmacodynamic approach. *J Antimicrob Chemother.* 2009, *63*, 1215–1222.
70. Pinto, M.; Gonzalez-Diaz, A.; Machado, M.P.; et al. Insights into the population structure and pangenome of *Haemophilus influenzae*. *Infect Gen Evol.* 2019, *67*, 126-135.
71. Spotřeby a náklady na ATB používaná v humánní medicíně v ČR 2008-2016 a jejich základní vyhodnocení podle metodiky ECDC. Dostupné online: [https://www.cls.cz/dokumenty/ATB\\_ECDC.pdf](https://www.cls.cz/dokumenty/ATB_ECDC.pdf)



72. Aguirre-Quiñonero, A.; Pérez del Molino, I.C.; García de la Fuente, C.; Sanjuán, M.C.; Agüero, J.; Martínez-Martínez, L. Phenotypic detection of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* with altered penicillin-binding protein 3. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018, *37*, 1475–1480.
73. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
74. Schotte, L.; Wautier, M.; Martiny, D.; Piérard, D.; Depypere, M. Detection of beta-lactamase-negative ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* in Belgium. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2019, *93*, 243–249.
75. Barbosa, A.R.; Giufre, M.; Cerquetti, M.; Bajanca-Lavado, M.P. Polymorphism in *ftsI* gene and beta-lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: Clonal dissemination of beta-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *J. Antimicrob. Chemother.* 2011, *66*, 788–796.
76. Mizoguchi, A.; Hitomi, S. Cefotaxime-non-susceptibility of *Haemophilus influenzae* induced by additional amino acid substitutions of G555E and Y557H in altered penicillin-binding protein 3. *J. Infect. Chemother.* 2019, *25*, 509–513.
77. Kishii, K.; Chiba, N.; Morozumi, M.; Hamano-Hasegawa, K.; Kurokawa, I.; Masaki, J.; Ubukata, K. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. *J. Infect. Chemother.* 2010, *16*, 87–93.
78. Garcia-Cobos, S.; Campos, J.; Lazaro, E.; Roman, F.; Cercenado, E.; Garcia-Rey, C.; Perez-Vazquez, M.; Oteo, J.; Abajo, F.d. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: Recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, *51*, 2564–2573.
79. Tristram, S.; Jacobs, M.R.; Appelbaum, P.C. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, *20*, 368–389.
80. Ubukata, K.; Chiba, N.; Morozumi, M.; Iwata, S.; Sunakawa, K. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000–2011. *J. Infect. Chemother.* 2013, *19*, 34–41.

81. Park, C.; Kim, K.H.; Shin, N.Y.; Byun, J.H.; Kwon, E.Y.; Lee, J.W.; Kwon, H.J.; Choi, E.Y.; Lee, D.G.; Sohn, W.Y.; et al. Genetic diversity of the *ftsI* gene in beta-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and beta-lactamaseproducing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. *Microb. Drug Resist.* 2013, *19*, 224–230.
82. Skaare, D.; Anthonisen, I.L.; Kahlmeter, G.; Matuschek, E.; Natås, O.B.; Steinbakk, M.; Sundsfjord, A.; Kristiansen, B.E. Emergence of clonally related multidrug resistant *Haemophilus influenzae* with penicillin-binding protein 3-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins, Norway, 2006 to 2013. *Eurosurveillance.* 2014, *19*, 20986.
83. Jakubů, V.; Urbášková, P.; Žemličková, H. First detection of cefotaxime-resistant strains of *Haemophilus influenzae*. *Zpr. Cent. Epidemiol. Mikrobiol.* 2015, *24*, 387–388.
84. LaCross, N.C.; Marrs, C.F.; Gilsdorf, J.R. Population structure of non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Gen Evol.* 2013, *14*, 125-136.
85. Skaare, D.; Anthonisen, I.L.; Caugant, D.A.; Jenkins, A.; Steinbakk, M.; Strand, L.; Sundsfjord, A.; Tveten, Y.; Kristiansen, B.E. Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: A powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC Microbiol.* 2014, *14*, 131–147.
86. Giufrè, M.; Fabiani, M.; Cardines, R.; Riccardo, F.; Caporali, M.G.; D’Ancona, F.; Pezzotti, P.; Cerquetti, M. Increasing trend in invasive non-typeable *Haemophilus influenzae* disease and molecular characterization of the isolates, Italy, 2012–2016. *Vaccine.* 2018, *36*, 6615–6622.
87. García-Cobos, S.; Arroyo, M.; Pérez-Vázquez, M.; Aracil, B.; Lara, N.; Oteo, J.; Cercenado, E.; Campos, J. Isolates of b-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing invasive infections in Spain remain susceptible to cefotaxime and imipenem. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014, *69*, 111–116.
88. Hotomi, M.; Fujihara, K.; Billal, D.S.; Suzuki, K.; Nishimura, T.; Baba, S.; Yamanaka, N. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase non-producing ampicillin-resistant (BLNAR) *Haemophilus*

- influenzae* isolated from the upper respiratory tract in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007, *51*, 3969–3976.
89. Honda, H.; Sato, T.; Shinagawa, M.; Fukushima, Y.; Nakajima, C.; Suzuki, Y.; Shiraishi, T.; Kuronuma, K.; Takahashi, S.; Takahashi, H.; et al. Multiclonal Expansion and High Prevalence of Lactamase-Negative *Haemophilus influenzae* with High-Level Ampicillin Resistance in Japan and Susceptibility to Quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018, *62*, e00851.
  90. Thegerström, J.; Matuschek, E.; Su, Y.C.; Riesbeck, K.; Resman, F. A novel PBP3 substitution in *Haemophilus influenzae* confers reduced aminopenicillin susceptibility. *BMC Microbiol.* 2018, *18*, 48–55.