

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

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

Vladislav Jakubů

Autoreferát disertační práce
Doktorský studijní program: Lékařská mikrobiologie

Hradec Králové
2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Lékařská mikrobiologie na Ústavu (klinice) klinické mikrobiologie Lékařské fakulty v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Vladislav Jakubů, Státní zdravotní ústav, Praha

Školitel: doc. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.,
Ústav klinické mikrobiologie, LF v Hradci Králové, UK

Školitel konzultant:

Oponenti: prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D., Mikrobiologický ústav, Fakultní
nemocnice u sv. Anny v Brně

MUDr. Otakar Nyč, Ph.D., Ústav lékařské mikrobiologie, Fakultní
nemocnice v Motole

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Lékařská mikrobiologie dne 31.5.2022 v Hradci Králové od 11 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu: -

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel. 495 816 134).

prof. MUDr. Pavel Boštík, PhD.

Předseda komise pro obhajoby disertačních prací

v doktorském studijním programu Lékařská mikrobiologie

Garant studijního programu

1 Obsah

1	Obsah.....	3
2	Souhrn	4
3	Summary.....	4
4	Úvod	5
4.1	<i>Haemophilus influenzae</i>	5
4.1.1	Typizace kmenů	5
4.1.2	Patogeneze	6
4.1.3	Epidemiologie	6
4.2	Ampicilin, léčba hemofilových infekcí	7
4.3	β -laktamázy TEM a ROB	7
4.4	Neenzymatická rezistence	7
4.5	PBP3, tvorba peptidoglykanu a buněčné dělení	7
4.6	Aminokyselinové substituce v PBP3	8
5	Cíle práce	8
6	Materiály a metody	9
6.1	Kmeny.....	9
6.2	Testování citlivosti na β -laktamy	9
6.3	Testování citlivosti na ostatní antibiotika.....	9
6.4	Detekce mutací v genu <i>ftsI</i> a komparativní analýza	10
6.5	Aminokyselinová sekvence analyzovaného úseku <i>ftsI</i>	10
6.6	Multi-Locus Sequence Typing a klonální analýza	10
6.6.1	Multi-Locus Sequence Typing	10
6.6.2	Klonální analýza.....	10
7	Výsledky.....	11
7.1	Fenotypová detekce mutací	11
7.2	Aminokyselinové záměny v PBP3	12
7.3	Multi-Locus Sequence Typing, klonální analýza	13
8	Diskuse.....	15
9	Závěry	17
9.1	Závěry v bodech:	18
10	Literatura	18
11	Přehled publikační činnosti	25
11.1	Původní články v časopisech s impakt faktorem:	25

11.2	Původní články v časopisech bez impakt faktoru	27
11.3	Přednášky od začátku studia, roku 2017, sestupně:	28
11.4	Postery od začátku studia, roku 2017, sestupně:.....	28

2 Souhrn

Podle výsledků pravidelné surveillance rezistence bakteriálních původců infekcí dýchacích cest vzrůstá v České republice počet kmenů *Haemophilus influenzae* s neenzymatickou rezistencí k β -laktamovým antibiotikům. Neenzymatická rezistence je podmíněna mutacemi v genu *ftsI* kódujícím penicilin-vážíci protein (PBP3), jejichž důsledkem je snížená schopnost vázat β -laktamová antibiotika. Průkaz tohoto typu rezistence je obtížnější než detekce β -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 doporučenou metodou EUCAST s využitím pouze penicilinu byl záchyt mutací nižší, 95,7 %.

Sekvenční 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 Summary

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

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 β -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 β -lactam antibiotics. Demonstration of this type of resistance is more difficult than detection of β -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 capture (99.5%) of isolates with non-enzymatic resistance due to mutations in the *ftsI* gene can 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 does not indicate a spread of particular MLST type/clone. A total of 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*. Řadí se mezi kultivačně náročné bakterie vyžadující přídavek suplementů (protoporfyriu IX a NAD) do růstových medií. [1]. Obohacený čokoládový agar obsahující 5 % lyzované ovčí krve a doplněný potřebnými suplementy představuje univerzální médium, které je běžně používáno v klinických laboratořích ke kultivaci *Haemophilus* spp. Optimální kultivační podmínky se nacházejí v rozmezí 35 – 37 °C v aerobní atmosféře s přídavkem 5 – 7 % CO₂ [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 netypovatelné (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 [3,4].

4.1.2 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 [5,6,7]. 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 [8,9,10]. Patogeneze infekcí dýchacího traktu spočívá v kolonizaci nazofaryngu a předchozímu poškození mukociliární činnosti, slizniční integrity a funkce neutrofilů díky virové infekci [11]. Vlastní prvotní nespecifická adherence hemofilů na orofaryngeální epiteliální buňky je umožněna pili na povrchu hemofilů. Jako specifické receptory ale slouží sialylované glykosfingolipidy, proto jsou i kmeny bez pilů schopné vazby na epiteliální buňky. Přes sliznice prochází převážně intercelulárně, i když intracelulární průnik byl také zaznamenán [12,13]. Každý krok v patogenezi je spojen s kombinací exprese několika virulenčních faktorů, mezi které patří některé proteiny P (P2, P5), LOS, pili a IgA proteáza [12,14].

4.1.3 Epidemiologie

Epidemiologie hemofilových onemocnění se dramaticky změnila. 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 netypovatelnými kmeny a jinými typy než Hib [15]. 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 neopouzdřený typ (59 %), dále typ *f* (9 %) a typ *e* (5 %). Hib ve sledovaném období způsobil 5 % onemocnění. V ČR bylo v letech 2009-2020 evidováno 258 závažných infekcí způsobených *H. influenzae*. Nejvyšší věkově specifická nemocnost byla hlášena u dětí do jednoho roku a u osob nad 65 let [16]. 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 [17,18]. *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 [19]. Počet studií o epidemiologii rPBP3 *H. influenzae* je omezený, a proto je obtížné vyvodit jakýkoli závěr o klinickém významu kmenů s tímto mechanismem rezistence.

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]. Ampicilin se velmi omezeně vstřebává z GIT, proto musí být podáván parenterálně [20]. Velmi podobné vlastnosti má i amoxicilin, který je ale určen pro perorální léčbu aminopeniciliny [21]. V kombinacích s inhibitory β -laktamáz (kyselina klavulánová, sulbaktam) je účinný na bakterie produkující základní β -laktamázy, jako jsou TEM a SHV [22].

4.3 β -laktamázy TEM a ROB

První kmeny *H. influenzae* rezistentní na ampicilin byly hlášeny v 70. letech 20. století v Evropě a ve Spojených státech [23]. Bylo zjištěno, že mechanismem rezistence je produkce plazmidem zprostředkované β -laktamázy, která je inhibována kyselinou klavulánovou nebo sulbaktamem. Takové kmeny se nazývají β -laktamáza-pozitivní ampicilin-rezistentní izoláty, BLPAR. U *H. influenzae* byly popsány dva různé typy β -laktamáz, TEM-1 a ROB-1 [23,24].

ROB-1 β -laktamáza je známá od roku 1981. Obvykle je nesena na malých plazmidech (4-5 Kbp) [25,26,27]. Druhá, a v celosvětovém měřítku mnohem více rozšířená, je TEM-1 β -laktamáza. Kmeny s touto β -laktamázou byly poprvé zaznamenány roku 1970. TEM-1 může být nesena na plazmidech, na kterých jsou obvykle neseny i geny determinující rezistenci k dalším antibiotikům (chloramfenikol, tetracyklin) [28,29,30].

4.4 Neenzymatická rezistence

Rezistence na ampicilin u *H. influenzae* způsobená jiným mechanismem rezistence než produkcí β -laktamázy byla popsána v 80. letech [31]. Bylo zjištěno, že za tímto novým mechanismem stojí strukturální změny proteinu vázajícího penicilin (PBP3) kódovaného genem *ftsI* [32]. Izoláty vykazující tento typ rezistence jsou známé jako β -laktamáza negativní ampicilin-rezistentní (BLNAR) nebo rPBP3 a na rozdíl od kmenů produkujících β -laktamázu není jejich snížená citlivost k aminopenicilinům ovlivnitelná inhibitory β -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 β -laktamázu, ale i kmeny, které mají specifický typ mutace ovlivňující citlivost i k jiným β -laktamům, zejména k některým cefalosporinům [33]. Produktem genu *ftsI* je transpeptidáza FtsI, která se účastní syntézy peptidoglykanu. Mutace v genu *ftsI* vedou k substitucím aminokyselin (AA) v transpeptidázové oblasti proteinu PBP3 [32].

4.5 PBP3, tvorba peptidoglykanu a buněčné dělení

Proteiny, na které se váže penicilin a které díky své transglykosylázové a transpeptidázové aktivitě 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 β -laktamová antibiotika [34]. Během buněčného dělení je peptidoglykan syntetizován periplazmatickou částí makromolekulárního komplexu zvaného divisom. Transpeptidázová aktivita PBP3 je závislá na serinu, který zde působí jako katalyzátor hydrolytické reakce [35]. Prostřednictvím PBP3_{88–165} subdomény se zřejmě odehrávají interakce s ostatními proteiny divisomu. Pomocí studií mutagenese genů *dacA* a *dacB*, kódujících geny PBP4 a PBP5, bylo prokázáno, že vliv na rezistenci k β -laktamům mají pouze změny v proteinu PBP3 [32,36].

4.6 Aminokyselinové substituce v PBP3

Důsledkem AA substitucí je snížená afinita vazby aminopenicilinů a cefalosporinů na proteiny. Afinita β -laktamů k PBP3 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). Oba mechanismy rezistence, enzymatický i neenzymatický, se vyskytují i společně [32,37,38,39]. Kmeny *H. influenzae* s rPBP3 jsou klasifikovány do genotypových skupin podle přítomnosti specifických AA substitucí [32]. Genotyp se změněným PBP3 udělujícím rezistenci se označuje jako rPBP3. Genotyp sPBP3 neobsahuje substituci N526K ani R517H a obsahuje pouze mutace v genu *ftsI*, které nevedou k rezistenci na β -laktamy. Skupina I obsahuje substituci R517H a skupina II nese substituci N526K. Skupina III navíc obsahuje mutace v blízkosti motivu S379S-S-N381, zejména S385T. Skupiny I a II se vyznačují nízkou rezistencí vůči β -laktamům, zatímco izoláty skupiny III mají vysoký stupeň rezistence vůči β -laktamům, včetně cefalosporinů druhé generace (cefuroxim) a dokonce i třetí generace (cefotaxim, ceftriaxon) a karbapenemům [32,37,38].

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 β -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 β -laktamáza negativních kmenech, byly do projektu zařazeny všechny kmeny s neenzymatickou rezistencí, to znamená i ty, které produkovaly β -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 β -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) a 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 [33].

6.2 Testování citlivosti na β -laktamy

V NRL pro ATB se testovala diskovou difúzní metodou citlivost na penicilin (1 J), cefuroxim (30 μ g), ampicilin (2 μ g) a amoxicilin/kyselinu klavulánovou (2/1 μ 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 [33]. Interpretace výsledků testování citlivosti byla provedena podle doporučení směrnice 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 β -laktamázy byla testována nitrocefinovou metodou [40].

6.3 Testování citlivosti na ostatní antibiotika

V rámci stanovení citlivosti na β -laktamová antibiotika bylo mikrodiluční bujónovou metodou, podle metodiky EUCAST [33], provedeno stanovení MIC doplňkových antibiotik: ciprofloxacinu, tetracyklinu, chloramfenikolu a trimetoprim-sulfametoxazolu. Interpretace výsledků testování citlivosti byla provedena podle doporučení směrnice EUCAST, verze 10.0.

6.4 Detekce mutací v genu *ftsI* a komparativní analýza

Sekvenace genu *ftsI*:

Všechny kmeny byly osekvenovány v oblasti 977–1597* bp genu *ftsI* (fragment 621 bp), aby se ověřila přítomnost mutací v oblasti transpeptidázy PBP3 dle údajů publikovaných v PubMLST [41].

Sekvence primerů (ve směru 5′- 3′) byla následující: primer *ftsI*IF: **GTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGTTAATGCGTAACCGTGCAATTAC** a primer *ftsI*IR: **TTGTGAGCGGATAACAATTCACCACTAATGCATAACGAGGATC***

* Číslování osekvenované oblasti se vztahuje k číslování sekvence *ftsI* *H. influenzae* Rd KW20 (ATCC 51907), accession number L42023. Zeleně je označena cílová sekvence pro sekvenační primery.

6.5 Aminokyselinová sekvence analyzovaného úseku *ftsI*

Níže je uvedena peptidová sekvence odvozená ze sekvenovaného fragmentu 621 bp:

326GSTV**K**PFVVLTALQRGVVVKRDEIIDTTSFKLSGKEIVDVAPRAQQTLDEIL
MNSSNRGVSRLALRMPPSALMETYQNAGLSKPTDLGLIGEQVGILNANRKRWADIER
ATVAYGYGITATPLQIARAYATLGSFGVYRPLSITKVDPPVIGKRVFSEKITKDIVGILE
KVAIKNKRAMVEGYRVGV**KTC**TARKIENGHYVNKYVAFT**532**

Zeleně jsou vyznačeny konzervované motivy (viz kapitola 4.9) na pozicích 327, 379 a 512.

Získaná nukleotidová sekvence byla přeložena na aminokyselinovou (AA) sekvenci v programu Bionumerics 7.6.2 (Applied Maths, Gent, East Flanders, Belgie) a porovnána s AA sekvencí (pozice 326–532) nemutovaného referenčního kmene *H. influenzae* ATCC 51907 (GenBank accession number L42023) [42].

6.6 Multi-Locus Sequence Typing a klonální analýza

U metody Multi-Locus Sequence Typing (MLST) se sekvenuje přibližně 450 bp dlouhý vnitřní fragment sedmi housekeeping genů (*H. influenzae*: *adk*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi* a *recA*) [41,43] a porovnává se jejich alelický profil.

6.6.1 Multi-Locus Sequence Typing

MLST byla provedena u všech 228 kmenů. Amplifikační reakce probíhala s použitím primerů popsanych v <https://pubmlst.org/>. Číslo alel a sekvenčních typů byla přiřazena pomocí Bionumerics 7.6.2 (Applied Maths, Ghent, Východní Flandry, Belgie) a volně přístupné webové stránky (Veřejná databáze pro molekulární typizaci a diverzitu mikrobiálního genomu, <https://pubmlst.org/organisms/haemophilus-influenzae>).

6.6.2 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) [44]. 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 [43]. Bylo použito výchozí nastavení programu pro čtyři populační MLST analýzy: goeBURST level 1, goeBURST – Full MLST, Hierarchical Clustering - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) a Neighbor-Joining (Studier-Kepler Criterion).

7 Výsledky

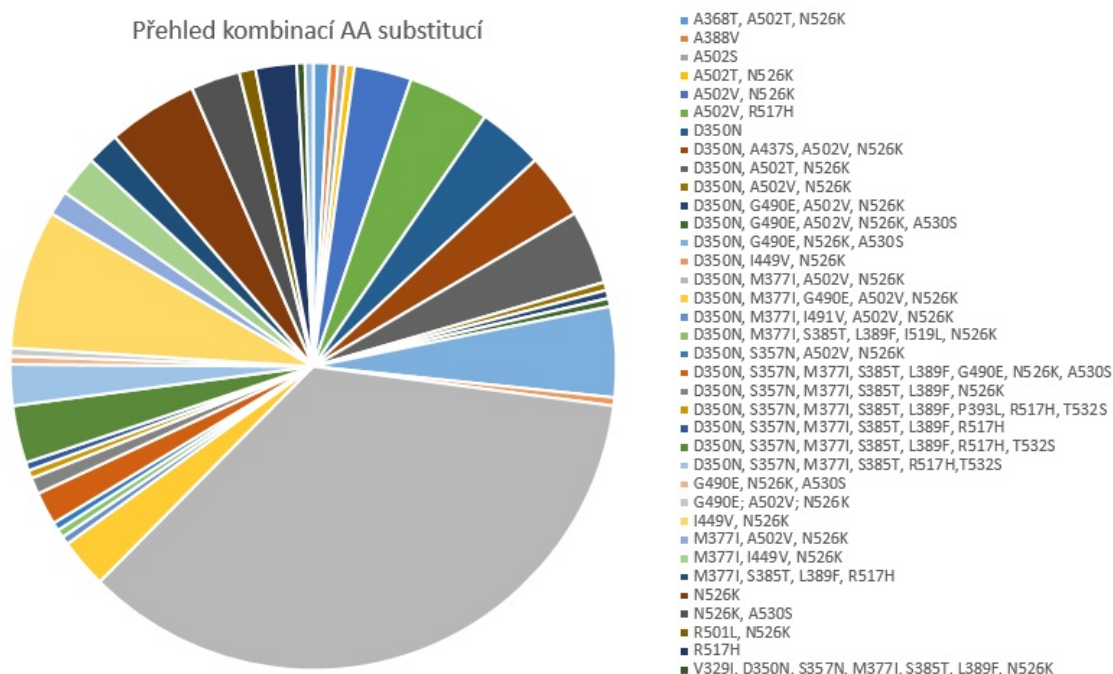
Výsledky fenotypových i genotypových analýz jsou většinou prezentované za celý soubor měření / kmenů. Rozdělením souboru kmenů na části, které by se logicky nabízely (skupiny rPBP3 I, II a III nebo dle epidemiologického členění – věkové skupiny, sex, materiál), nebyly získány výsledky odlišné od analýz celého souboru kmenů.

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 β -laktamázy bla_{TEM-1} a jeden (0,4 %) na gen bla_{ROB-1}. Kmen produkující ROB-1 β -laktamázu byl citlivý k penicilinu a detekce β -laktamázy nitrocefínovou metodou byla negativní. Izoláty byly klasifikovány do všech čtyř skupin PBP3. 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 β -laktamy. 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. Senzitivita detekce mutací v genu *ftsI* pro jednotlivé antibiotické disky se pohybovala od 84,6 % (amoxicilin/kyselina klavulánová) do 92,6 % (cefuroxim), 95,7 % (ampicilin) a 95,7 % (penicilin) a byla kalkulována jako poměr počtu β -laktamáza negativních rPBP3 kmenů rezistentních k danému antibiotiku k součtu β -laktamáza negativních kmenů ze skupin rPBP3 I, II a III (n = 188). Celková senzitivita detekce mutací (99,5 %) byla vypočítána jako poměr z počtu β -laktamáza negativních kmenů rezistentních alespoň k jednomu z testovaných β -laktamových antibiotik (n = 187) k součtu β -laktamáza negativních kmenů ze skupin rPBP3 I, II a III (n = 188).

7.2 Aminokyselinové záměny v PBP3

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 (Graf 1) těchto AA substitucí.



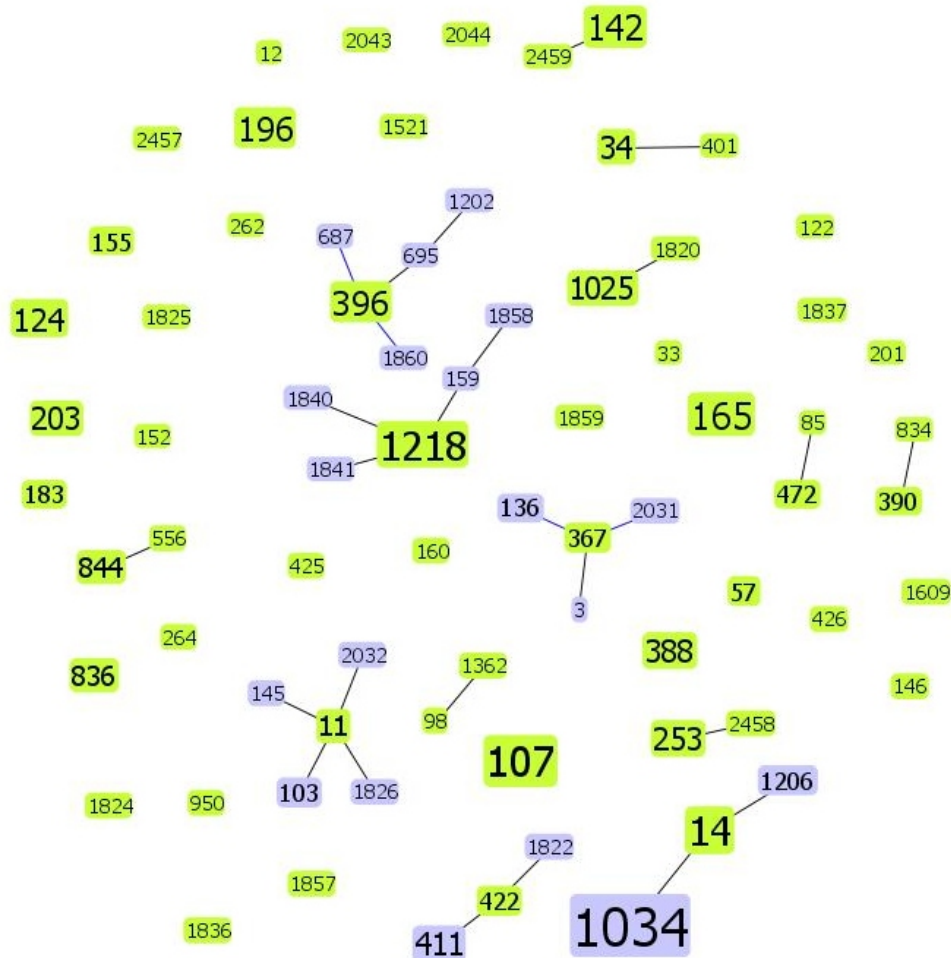
Graf 1. Přehled kombinací AA substitucí zjištěných v této studii u 228 klinických izolátů *H. influenzae*. Graf zobrazuje celkové zastoupení kombinací bez ohledu na produkci β -laktamázy. Nejčastěji detekovanou kombinací byla D350N, M377I, A502V, N526K (35 %).

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 %. Substituce N526K byla nalezena v kombinaci (25x) nebo samostatně u 184 kmenů (80,7 %). Druhá základní substituce, R517H, byla nalezena v šesti kombinacích (33 kmenů, 14,5 %). Substituce N526K a R517H nebyly nalezeny společně v žádné kombinaci. Pokud se v PBP3 nacházela více jak jedna AA záměna, byla v kombinacích vždy přítomna substituce N526K nebo R517H. Kromě základní mutace N526K nebo R517H měly všechny kmeny skupiny III ($n = 26$) také mutace S385T, M377I a další. Z 228 vyšetřených kmenů bylo 32 kmenů pozitivních na gen bla_{TEM-1} a 1 kmen na gen bla_{ROB-1} . Z 12 kmenů sPBP3 produkovalo β -laktamázu TEM-1 pět kmenů. Z 15 kmenů skupiny I produkoval jeden kmen β -laktamázu TEM-1 a jeden ROB-

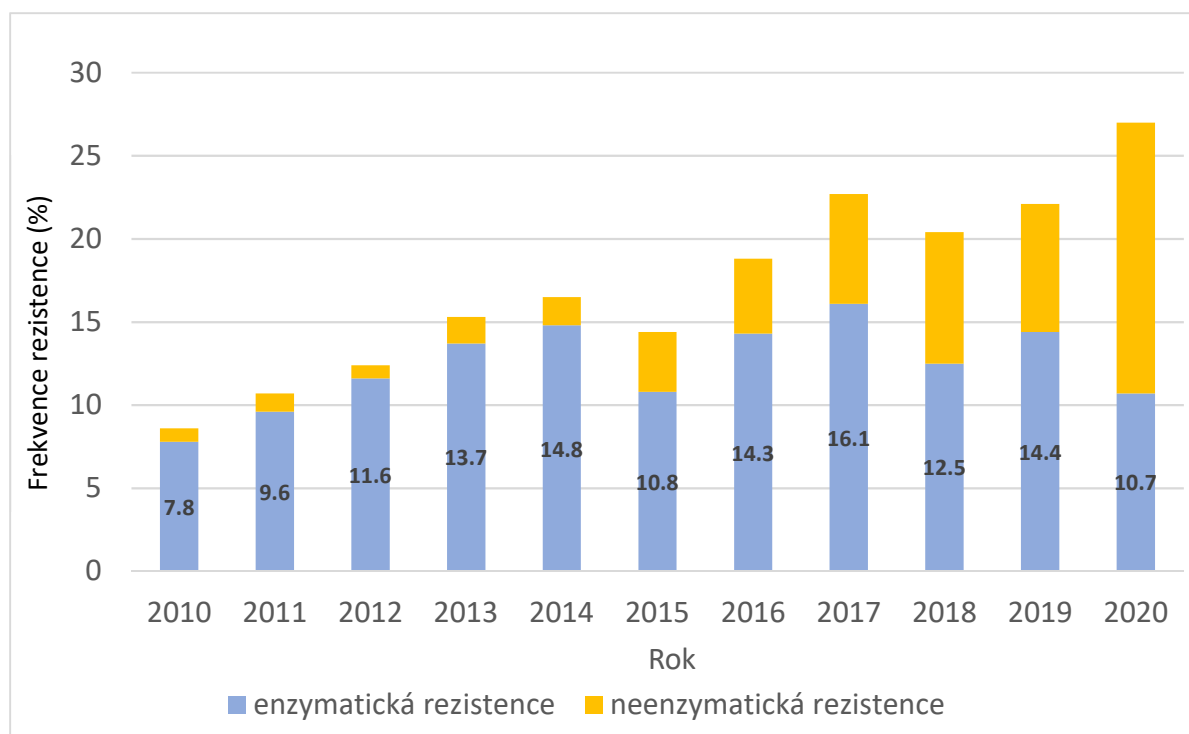
1. Ve skupině II, kam patřilo celkem 175 kmenů s 23 různými kombinacemi AA záměn, produkovalo β -laktamázu TEM-1 15 kmenů. Největší poměrné zastoupení v produkci β -laktamázy TEM-1 měla rPBP3 skupina III, 42,3 %.

7.3 Multi-Locus Sequence Typing, klonální analýza

Ve sbírce 228 kmenů bylo zjištěno 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. 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). 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 %). Výsledky všech čtyř použitých populačních analýz ukazují na velkou epidemiologickou různorodost kmenů (Obrázek 1) a na velmi nízkou příbuznost kmenů obsahujících AA záměny R517H a N526K. 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 %). Klonální analýza 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). Nalezené 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 ST 1822) a CC 1218 (n = 17, ST 159, ST 1218, ST 1840, ST 1841 a ST 1858).



Obrázek 1. 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). 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.



Graf 2. Trend rezistence k β -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) 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 2) u kmenů *H. influenzae* s neenzymatickou rezistencí na β -laktamová antibiotika v ČR [45]. 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 [45]. Bylo prokázáno, že expozice cefuroximu má stimulační účinek na zvýšení výskytu rPBP3 kmenů *H. influenzae* ve srovnání s amoxicilinem/kyselinou klavulánovou [46,47]. 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 [48].

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 v PBP3 a jejich kombinací.

Senzitivita detekce neenzymatické rezistence jednotlivými β -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. [49]. Stejnou citlivost (95,7 %) ale prokázal i test s ampicilinem (2 μ 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 %.

Provedená komparativní analýza odhalila 37 kombinací a 23 různých AA substitucí v proteinu PBP3. Tato čísla jsou vyšší než v podobných studiích [49,50,51], pravděpodobně kvůli našemu většímu počtu kmenů nebo delšímu sledovanému časovému úseku. Substitute N526K, nejčastěji nalézaná substitute na světě [32,52,53,54], 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 [49,50]. Vzhledem k velkému počtu AA substitucí a jejich kombinací není možné určit konkrétní příspěvek každé substitute k β -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 substitute byla popsána pouze v jediné publikaci [55]. 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 [54,56]. 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 substitute je nejčastější např. v Austrálii [57]. Z osmi kmenů nesoucích samotnou substituci D350N bylo pět citlivých na všechny testované β -laktamy. Její přínos k hodnotě rezistence je tudíž diskutabilní. To samé platí i pro AA záměnu A388V vyskytující se samostatně u jednoho kmene. Někteří autoři [51,58] uvádějí, že tyto substitute spolu s A368T a R510L nemají žádný vliv na rezistenci. V našem studijním souboru bylo 26 kmenů rPBP skupiny III, se substitucemi M377I, S385T a N526K nebo R517H nalezenými ve všech těchto kmenech. Substitute S385T společně s N526K nebo R517H jsou dle dostupné literatury nezbytné pro rezistenci na cefalosporiny 3. generace [32,54,56]. Tři z pěti kmenů s kombinacemi D350N, S357N, M377I, S385T, R517H a T532S byly ale na cefalosporiny 3. generace citlivé (MIC cefotaximu 0,125 mg/l). Naproti tomu kmene rezistentní k cefotaximu byly nalezeny ve skupině II v kombinacích D350N, G490E, A502V, N526K, A530S (jeden kmen s produkcí β -laktamázy) a M377I, I449V, N526K. Kmeny rPBP3 rezistentní k cefotaximu se vyskytují již od 90. let 20. století zejména v

některých asijských regionech [54,59,60]. V evropských zemích byl výskyt až do roku 2008 velmi vzácný a první klonální šíření bylo popsáno z Norska [61], v ČR byly první takové kmeny zachyceny v roce 2015 [62].

Pro zjištění epidemiologické souvislosti kmenů byla použita metoda MLST. Následné klonálně fylogenetické analýzy ukázaly velikou heterogenitu populace českých rPBP3 *H. influenzae*. Podobně fragmentovaná populace byla hlášena např. z Norska, Španělska, Itálie a Japonska [63,64,65,66,67]. 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 [67]. Ani kmeny izolované z krve (n = 25), ani kmeny produkující β -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.

Podle Thegerströma [68] 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. Velkou otázkou je, jak velký vliv na výslednou hodnotu citlivosti mohou mít domnělé/přidružené mechanismy rezistence, jako je nadměrná exprese efluxní pumpy AcrAB [69]. Tento mechanismus by mohl vysvětlit výskyt širokého rozmezí citlivostí i v rámci jedné AA kombinace [49]. 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

V České republice se podíl kmenů rPBP mezi kmeny rezistentními na ampicilin neustále zvyšuje [45]. 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. 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 μ 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. Nejlepší předpoklady pro odhalení kmenů s neenzymatickým mechanismem rezistence pomocí finančně nenáročné diskové difúzní metody má antibiotikum penicilin společně s ampicilinem (každé 95,7 % senzitivita, spolu 98,9 %)

10 Literatura

1. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S.; Wood, W.B. The *Haemophilus-Bordetella* group. In *Microbiology*, 3rd 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. Jordens, J.Z.; Slack, M.P.E. *Haemophilus influenzae*: Then and now. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1995, 14, 935–948.
6. 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.
7. Monto, A.S. Acute respiratory infection in children of developing countries: challenge of the 1990's. *Rev. Infect. Dis.* 1989, 11, 498-505.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. St. Geme, J.W. Nontypeable *Haemophilus influenzae* disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect. Agents Dis.* III. 1993, 2, 1-16.
12. 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.
13. 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.
14. Rubin, L.G.; Moxon, E.R. Pathogenesis of bloodstream invasion with *Haemophilus influenzae* type b. *Infect. Immun.* 1983, 41, 280-284.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Reese, R.E; Betts, R.F.; Gumustop, B. *Handbook of Antibiotics.* 3rd ed.; Lippincott Williams & Wilkins:Philadelphia, USA, 2000.
21. 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.

22. Grayson, M.L. *Kucers' The Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal and Antiviral Drugs*, 6th ed.; CRC Press, 2010, Volume 1.
23. 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.
24. 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 betalactamase. *Lancet* 1981, *2*, 1008–1010.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. Mendelman, P. M.; Chaffin, D. O.; Kalaitzoglou, G. Penicillin binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990, *25*, 525–534.
32. 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 β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, *45*, 1693–1699.
33. 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>.
34. 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.

35. Ghuysen, J.M. Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins. *Annu Rev Microbiol.* 1991, *45*, 37–67.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. Montgomery, K.; Raymundo, L.; Drew, W.L. Chromogenic cephalosporin spot test to detect β -lactamase in clinically significant bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 1979; *9*, 205–207.
41. 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.
42. 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.
43. Meats, E.; Feil, E.J.; Stringer, S.; Cody, A.J.; Goldstein, R.; Kroll, J.S.; Popovic, T.; Spratt, B.G. Characterization of Encapsulated and Nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and Determination of Phylogenetic Relationships by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 2003, *41*, 1623–1636.
44. 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.
45. Respirační Patogeny. Dostupné online: https://apps.szu.cz/rp/respiracni_patogeny.php
46. 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.

47. 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.
48. Spotřeba 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
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.

58. Tristram, S.; Jacobs, M.R.; Appelbaum, P.C. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007, *20*, 368–389.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. Jakubů, V.; Urbášková, P.; Žemličková, H. First detection of cefotaxime-resistant strains of *Haemophilus influenzae*. *Zpr. Cent. Epidemiol. Mikrobiol.* 2015, *24*, 387–388.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.

68. 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.
69. 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.

11 Přehled publikační činnosti

Seznam publikací od začátku studia, roku 2017 (sestupně)

11.1 Původní články v časopisech s impakt faktorem:

1. **Jakubu, V.**; Malisova, L.; Musilek, M.; Pomorska, K.; Zemlickova, H. Characterization of *Haemophilus influenzae* Strains with Non-Enzymatic Resistance to β -Lactam Antibiotics Caused by Mutations in the PBP3 Gene in the Czech Republic in 2010–2018, *Life* 2021, 11(11), 1260. IF **3.78**
2. Malisova, L.; Spanelova, P.; Sedlacek, I.; Pajer, P.; Musilek, M.; Puchalkova, B.; **Jakubu, V.**; Zemlickova, H.; Safrankova, R. The first case of *Planococcus glaciei* found in blood, a report from the Czech Republic. *Folia Microbiol* (Praha). 2021, 67(1), 121-127. IF **2.099**
3. Pomorska, K.; **Jakubu, V.**; Malisova, L.; Fridrichova, M.; Musilek, M.; Zemlickova, H. Antibiotic Resistance, spa Typing and Clonal Analysis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Isolates from Blood of Patients Hospitalized in the Czech Republic. *Antibiotics*, 2021, 10(4), 395. IF **4.639**
4. Kraftova, L.; Finianos, M.; Studentova, V.; Chudejova, K.; **Jakubu, V.**; Zemlickova, H.; Papagiannitsis, C.C.; Bitar, I. Evidence of an epidemic spread of KPC-producing *Enterobacterales* in Czech hospitals. *Scientific Reports*, 2021, 11(1), 15732. IF **4.379**
5. Malisova, L.; **Jakubu, V.**; Pomorska, K.; Musilek, M.; Zemlickova, H. Spread of Linezolid-Resistant *Enterococcus* spp. in Human Clinical Isolates in the Czech Republic. *Antibiotics*, 2021, 10(2), 219. IF **4.639**
6. Neradova, K.; Fridrichova, M.; **Jakubu, V.**; Pomorska, K.; Zemlickova, H. Epidemiological characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from bloodstream cultures at University Hospital in the Czech Republic. *Folia Microbiol.* 2020; 65(3),615-622. IF **2.099**
7. Malisova, L.; **Jakubu, V.**; Musilek, M.; Keklakova, J.; Zemlickova, H. Phenotype and Genotype Characteristics of *Staphylococcus aureus* Resistant to Methicillin/Oxacillin Carrying Gene *mecC* in the Czech Republic from 2002 to 2017. *Microbial Drug Resistance*, 2020, 26, 918-923. IF **3.431**
8. Neradova, K.; **Jakubu, V.**; Pomorska, K.; Zemlickova, H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in veterinary professionals in 2017 in the Czech Republic. *BMC Veterinary Research*, 2020, 16(1), 4. IF **2.67**
9. Paskova, V.; Chudejova, K.; Sramkova, A.; Kraftova, L.; **Jakubu, V.**; Petinaki, E.; Zemlickova, H.; Neradova, K. Insufficient repeatability and reproducibility of MALDI-

TOF MS-based identification of MRSA. *Folia Microbiologica*, 2020, 65(5), 895-900. IF **2.099**

10. Spanelova, P.; **Jakubu, V.**; Malisova, L.; Musilek, M.; Kozakova, J.; Papagiannitsis, C.C.; Bitar, I.; Hrabak, J.; Pantosti, A.; Del Grosso, M.; Zemlickova, H. Whole genome sequencing of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A sequence type 416. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1), 224. IF **3.605**
11. Zemlickova, H.; **Jakubu, V.**; Fridrichova, M.; Malisova, L.; Musilek, M.; Trojanek, M. The association of pili with the emergence and replacement of the major antibiotic resistant pneumococcal clones. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 2020, 53, 690-695. IF **4.399**
12. Bitar, I.; Medvecký, M.; Gelbicova, T.; **Jakubu, V.**; Hrabak, J.; Zemlickova, H.; Karpiskova, R.; Dolejska, M. Complete Nucleotide Sequences of *mcr-4.3*-Carrying Plasmids in *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 345 of Human and Food Origin from the Czech Republic, the First Case in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019, 63(10), e01166-19. IF **5.191**
13. Malisova, L.; Urbaskova, P.; **Jakubu, V.**; Spanelova, P.; Kozakova, J.; Musilek, M.; Zemlickova, H. Surveillance antibiotické rezistence u *Streptococcus pneumoniae* v České republice, výsledky respirační studie, rok 2010 - 2017. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2019, 68, 75-81. IF **0.379**
14. Malisova, L.; Safrankova, R.; Keklakova, J.; Petras, P.; Zemlickova, H.; **Jakubu, V.** Correct species identification (reclassification in CNCTC) of strains of *Staphylococcus intermedius*-group can improve an insight into their evolutionary history. *Folia Microbiologica*, 2019, 64(2), 231-236. IF **2.099**
15. Botka, T.; Pantucek, R.; Maslanova, I.; Benesik, M.; Petras, P.; Ruzickova, V.; Havlickova, P.; Varga, M.; Zemlickova, H.; Kolackov, I.; Florianova, M.; **Jakubu, V.**; Karpiskova, R.; Doskar, J. Lytic and genomic properties of spontaneous host-range Kayvirus mutants prove their suitability for upgrading phage therapeutics against staphylococci. *Scientific Reports*. 2019, 9(1), 5475. IF **4.379**
16. Zemlickova, H.; Malisova, L.; Spanelova, P.; **Jakubu, V.**; Kozakova, J.; Musilek, M.; Medvecký, M. Molecular characterization of serogroup 19 *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic in the post-vaccine era. *Journal of Medical Microbiology*. 2018, 67, 1003-1011. IF **2.472**
17. Papagiannitsis, C.C.; Paskova, V.; Chudejova, K.; Medvecký, M.; Bitar, I.; **Jakubu, V.**; Zemlickova, H.; Jirsa, R.; Hrabak, J. Characterization of pEncl-30969cz, a novel ColE1-like plasmid encoding VIM-1 carbapenemase, from an *Enterobacter cloacae* sequence type 92 isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018, 91(2), 191-1935. IF **2.803**

18. Paskova, V.; Medvecký, M.; Skalova, A.; Chudejova, K.; Bitar, I.; **Jakubu, V.**; Bergerova, T.; Zemlickova, H.; Papagiannitsis, C.C.; Hrabak, J. Characterization of NDM-Encoding Plasmids From *Enterobacteriaceae* Recovered From Czech Hospitals. *Frontiers in Microbiology* . 2018, 9, 1549. IF **5.64**
19. **Jakubu, V.**; Zavadilova, J.; Fabianova, K.; Urbaskova, P. Trends in the minimum inhibitory concentrations of erythromycin, clarithromycin, azithromycin, ciprofloxacin, and trimethoprim/sulfamethoxazole for strains of *Bordetella pertussis* isolated in the Czech Republic, 1967-2015. *Central European Journal of Public Health*. 2017, 25(4), 282-286. IF **2.341**
20. Papagiannitsis, C.C.; Medvecký, M.; Chudejova, K.; Skalova, A.; Rotova, V.; Spanelova, P.; **Jakubu, V.**; Zemlickova, H.; Hrabak, J.; + Czech Participants of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant sequence type 357 expressing IMP-7 metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(12), e01811-17. IF **5.191**
21. Skalova, A.; Chudejova, K.; Rotova, V.; Medvecký, M.; Studentova, V.; Chudackova, E.; Lavicka, P.; Bergerova, T.; **Jakubu, V.**; Zemlickova, H.; Papagiannitsis, C.C.; Hrabak, J. Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic: evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(2), e01889-16. IF **5.191**
- 11.2 Původní články v časopisech bez impakt faktoru
1. Zemlickova, H.; **Jakubu, V.**; Urbaskova, P.; Malisova, L.; Pomorska, K. Trendy antibiotické rezistence v České republice v průběhu pandemie covid-19. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2021, 30(11), 366 – 373.
 2. Zemlickova, H.; Malisova, L.; **Jakubu, V.**; Spanelova, P.; Sramkova, A.; Chudejova, K.; Hrabak, J. Výskyt *Enterobacterales* produkujících karbapenemázy (CPE, Carbapenemase Producing *Enterobacterales*) v České republice v letech 2014 – 2019. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2020, 29(3), 114 – 120.
 3. Malisova, L.; **Jakubu, V.**; Pomorska, K.; Zemlickova, H. Záchyt serinové karbapenemázy typu GES v izolátech *Pseudomonas aeruginosa* v letech 2018–2019. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2020, 29(5), 207 – 209.
 4. Zemlickova, H.; **Jakubu, V.**; Fridrichova, M. Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* in the Czech Republic in 2016. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lekarství*. 2017, 23(4), 132 – 135.

5. Pomorska K.; **Jakubu V.**; Zelendova M.; Dolejska M.; Zemlickova H.: Záchyt plazmidy determinované rezistence ke kolistinu zprostředkované geny *mcr* v České republice. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2018, 27(9), 219 - 222.
6. **Jakubu, V.**; Urbaskova, P.; Zemlickova, H. Záchyt kmenů *Haemophilus influenzae* rezistentních k cefotaximu. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie*. 2015, 24(11-12), 387–388.

11.3 Přednášky od začátku studia, roku 2017, sestupně:

1. 28. kongres Československé společnosti mikrobiologické (ČSSM), Tatranské Matliare, Slovensko. 2019. **Jakubů**. Mutations in the *pbp3* gene and their effects on resistance to beta-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* strains.
2. Kurz “Lékařská mikrobiologie“, IPVZ, Praha, 2019. **Jakubů**: Vyšetření citlivosti bakterií, sběr a zpracování dat.
3. Studentská konference DSP, 2019, Hradec Králové. **Jakubů**. Mutations in the *pbp3* gene and their effects on resistance to beta-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* strains.
4. Mezioborový seminář Třeboň, SLM, 2019. **Jakubů**: Rezistence k linezolidu u enterokoků a stafylokoků
5. Kurz „Rezistence bakterií k antibiotikům“, IPVZ, Praha. **Jakubů**: Rezistence k linezolidu u enterokoků a stafylokoků.
6. Kurz “Lékařská mikrobiologie“, IPVZ, Praha, 2018. **Jakubů**: Vyšetření citlivosti bakterií, sběr a zpracování dat.
7. Seminář mikrobiologického oddělení FN HK, 2018, Hradec Králové. **Jakubů**. Rezistence kmenů *Haemophilus influenzae* k antibiotikům, zejména k β -laktamovým.
8. Seminář ČLS JEP v Lékařském domě, 2018. **Jakubů**. Rezistence kmenů *Haemophilus influenzae* k antibiotikům, zejména k β -laktamovým.
9. Kurz “Lékařská mikrobiologie“, IPVZ, Praha, 2017. **Jakubů**: Vyšetření citlivosti bakterií, sběr a zpracování dat.
10. Kongres KMINE, 2017, Praha. **Jakubů**. Fenotypová detekce kmenů *Haemophilus influenzae* s neenzymatickou rezistencí k β -laktamovým antibiotikům a sekvenční analýza genu *ftsI*.

11.4 Postery od začátku studia, roku 2017, sestupně:

1. 28. kongres Československé společnosti mikrobiologické (ČSSM), Tatranské Matliare, Slovensko. 2019. Safrankova, R.; Malisova, L.; Musilek, M.; Jezek, P.; Zemlickova,

- H.; **Jakubu, V.** Uncommon bacterial species isolated in various clinical specimens identified in the National Reference Laboratory (NRL) for Antibiotics and in the Czech National Collection of Type Culture (CNCTC) in 2016-2018.
2. XXXVIII Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation, Turín, 2018. Malisova, L.; Safrankova, R.; Keklakova, J.; Petras, P.; Zemlickova, H.; **Jakubu, V.** Correct species identification / reclassification of strains of *Staphylococcus intermedius*-group can improve an insight into their evolutionary history
 3. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, 2018. **Jakubu, V.**; Malisova, L.; Spanelova, P.; Musilek, M.; Zemlickova, H. “D350N, M377I, A502V, N526K” is the most prevalent combination of amino acid substitutions in PBP3 of Czech *Haemophilus influenzae* β -lactamase negative ampicillin resistant strains.
 4. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, 2018. **Jakubu, V.**; Malisova, L.; Spanelova, P.; Medvecký, M.; Zemlickova, H. Resistance to tetracycline in pneumococci: the discrepancy between genotype and phenotype.
 5. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, 2018. Malisová, L.; Spanelova, P.; **Jakubu, V.**; Kozakova, J.; Musilek, M.; Zemlickova, H. Sequence type 416 of serotype 19A is responsible for the increasing macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* in the Czech Republic.
 6. 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Madrid, 2018. Spanelova, P.; Malisova, L.; **Jakubu, V.**; Zemlickova, H. Next generation sequencing applied on antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* serogroup 19 reviewed coincidence between genes of resistance and sequence type.
 7. XXXVI Annual Meeting of the European Culture Collections' Organisation, Brno, 2017. Safrankova, R.; Malisova, L.; Vrestiakova, E.; Marejkova, M.; Petras, P.; Zavadilova, J.; Musilek, M.; Jezek, P.; Scharfen, J.; Kubele, J.; **Jakubu, V.** Clinically interesting bacterial isolates identified in the NRL for antibiotics and in the Czech National Collection of Type Culture (CNCTC) in 2011-2015.
 8. Konference KMINE, Praha, 2017. Fridrichova, M.; Malisova L.; **Jakubu V.**; Keklakova, J.; Vrbova, I.; Cechova, M.; Zemlickova, H. Fenotypová a genotypová charakteristika kmenů *Staphylococcus aureus* nesoucích gen *mecC* v České republice.