

## SOUBORNÉ SDĚLENÍ

# Faktory ovlivňující rezistenci k antibiotikům u *Haemophilus influenzae*

## Factors influencing antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*

Helena Žemličková, Vladislav Jakubů, Lucia Mališová, Iveta Vrbová, Markéta Čechová

Ústav mikrobiologie,  
3. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova,  
Fakultní nemocnice Královské  
Vinohrady a Státní zdravotní  
ústav, Praha

Národní referenční laboratoř  
pro antibiotika,  
Státní zdravotní ústav, Praha

## SOUHRN

**Žemličková H, Jakubů V, Mališová L, Vrbová I, Čechová M. Faktory ovlivňující rezistenci k antibiotikům u *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae* je běžnou součástí mikroflóry horního respiračního traktu, zároveň je také jedním z hlavních původců širokého spektra onemocnění od nekomplikovaných infekcí dýchacích cest až po život ohrožující infekce. Tradičními léky pro terapii hemofilových infekcí jsou betalaktamová antibiotika. Rezistence k betalaktamům je u hemofilů způsobena produkcí betalaktamázy nebo vzniká na podkladě mutací v genu *ftsI*, kódujícím penicilin-binding protein 3. Tyto kmeny jsou označovány jako rPBP3 (genotyp vykazující mutaci v transpeptidázové oblasti *ftsI*). Podle výsledků surveillance antibiotické rezistence vzrůstá v České republice podíl *H. influenzae* kmenů rPBP3 genotypu. Existuje předpoklad, že cefuroxim stimuluje vznik rPBP3 *H. influenzae* více v porovnání s aminopeniciliny. V České republice se zvýšil podíl rPBP3 kmenů v průběhu stejného období, kdy spotřeba cefuroximu vzrostla dvojnásobně.

Cílem projektu NU21-09-00028, Charakterizace kmenů *Haemophilus influenzae* s neenzymatickou rezistencí vůči betalaktamovým antibiotikům v České republice (2020–2024), bylo posouzení možných rizikových faktorů, které souvisí s vývojem neenzymatického typu rezistence u *H. influenzae*. Fylogenetická analýza neprokázala rozšíření specifického klonu. *In vitro* zkoumání vlivu ampicilinu a cefuroximu na selekci mutací genu *ftsI* odhalilo rozdíly v selekčním potenciálu obou antibiotik. Ukázalo se, že obě antibiotika mají potenciál pro vznik mutací v PBP3, ale expozice cefuroximu má v porovnání s ampicilinem tendenci generovat mutace častěji. Rovněž u kmenů *H. influenzae* pasážovaných ve vztupných koncentracích cefuroximu došlo k vyššímu nárůstu minimální inhibiční koncentrace v porovnání s ampicilinem. Nárůst prevalence neenzymatické rezistence k betalaktamům v České republice tedy pravděpodobně spíše souvisel s narůstající spotřebou cefuroximu a zvýšeným selekčním tlakem.

**Klíčová slova:** *Haemophilus influenzae*, antibiotická rezistence, cefuroxim

## SUMMARY

**Žemličková H, Jakubů V, Mališová L, Vrbová I, Čechová M. Factors influencing antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae***

*Haemophilus influenzae* is a common part of the microflora of the upper respiratory tract, and is also one of the main causative agents of a wide range of diseases from uncomplicated respiratory tract infections to life-threatening infections. Traditional drugs for the treatment of hemophilic infections are beta-lactam antibiotics. Resistance to beta-lactams in hemophili is caused by the production of beta-lactamase or arises on the basis of mutations in the *ftsI* gene encoding penicillin-binding protein 3. These strains are referred to as rPBP3 (genotype showing a mutation in the *ftsI* transpeptidase region). According to the results of antibiotic resistance surveillance, the proportion of *H. influenzae* strains of the rPBP3 genotype is increasing in the Czech Republic. There is an assumption that cefuroxime stimulates the formation of rPBP3 *H. influenzae* more than aminopenicillins. In the Czech Republic, the proportion of rPBP3 strains increased during the same period when the consumption of cefuroxime increased twofold.

The aim of the project NU21-09-00028, Characterization of *Haemophilus influenzae* strains with non-enzymatic resistance to beta-lactam antibiotics in the Czech Republic (2020–2024), was to assess possible risk factors associated with the development of non-enzymatic resistance in *H. influenzae*. Phylogenetic analysis did not demonstrate the spread of a specific clone. *In vitro* investigation of the effect of ampicillin and cefuroxime on the selection of mutations in the *ftsI* gene revealed differences in the selection potential of both antibiotics. It was shown that both antibiotics have the potential to cause mutations in PBP3, but exposure to cefuroxime tends to generate mutations more frequently compared to ampicillin. Also, in *H. influenzae* strains passaged in increasing concentrations of cefuroxime, there was a greater increase in the minimum inhibitory concentration compared to ampicillin. The increase in the prevalence of non-enzymatic resistance to beta-lactams in the Czech Republic was therefore probably more related to the increasing consumption of cefuroxime and increased selection pressure.

**Key words:** *Haemophilus influenzae*, antibiotic resistance, cefuroxim

**Korespondující autorka:**

prof. MUDr. Helena Žemličková, Ph.D.  
 Ústav mikrobiologie 3. LF UK, FNKV a SZU  
 Ruská 87  
 100 00 Praha 10  
 helena.zemlickova@lf3.cuni.cz

**ÚVOD**

*Haemophilus influenzae* patří mezi růstově náročné gram-negativní fakultativně anaerobní tyčinky. *H. influenzae* je běžnou součástí mikroflóry horního respiračního traktu, zároveň je také jedním z hlavních původců širokého spektra onemocnění od nekomplikovaných infekcí dýchacích cest až po život ohrožující infekce (meningitida, epiglottitida). Kmeny *H. influenzae* mohou produkovat polysacharidové pouzdro nebo mohou být neopouzdrěné. Invazivní infekce typu meningitidy či epiglottitidy jsou obvykle způsobeny *H. influenzae* typu b (Hib), neopouzdrěné kmeny, označované jako tzv. netypovatelné, jsou spojené především s neinvazivními infekcemi horního respiračního traktu (akutní zánět středouší, sinusitida, konjunktivitida, akutní exacerbace chronické bronchitidy). Zavedení plošného očkování proti Hib minimalizovalo výskyt závažných hemofilových invazivních onemocnění a v současnosti je většina infekcí vyvolána neopouzdrěnými (netypovatelnými) hemofily.<sup>(1)</sup>

Lékem volby hemofilových respiračních infekcí jsou aminopeniciliny. Zatímco rezistence k cefotaximu (resp. k ceftriaxonu), které jsou rezervovány pro terapii závažných invazivních infekcí, je celosvětově velice vzácná, výskyt rezistence k aminopenicilinům je v některých státech poměrně frekventní.<sup>(2–5)</sup> Na rezistenci k betalaktamům se u *H. influenzae* podílí 2 hlavní mechanismy: enzymatická degradace antibiotika pomocí betalaktamázy a tzv. neenzymatická rezistence vznikající na podkladě bodových mutací v genu *ftsI*, kódujícím protein PBP3 (penicillin-binding protein).<sup>(6,7)</sup> V České republice se zvýšil podíl kmenů s neenzymatickou rezistencí vůči betalaktamům v průběhu stejného období, kdy spotřeba cefuroximu vzrostla dvojnásobně.<sup>(8)</sup> Narůstající podíl kmenů mohl být zapříčiněn zvýšenou spotřebou cefuroximu, nelze také vyloučit klonální šíření genotypu, který má lepší schopnost vyvolat infekci.

Projekt NU21-09-00028 (2020–2024): Charakterizace kmenů *Haemophilus influenzae* s neenzymatickou rezistencí vůči betalaktamovým antibiotikům v České republice, podpořený Agenturou pro zdravotnický výzkum České republiky (AZV ČR), byl zaměřený na posouzení možných rizikových faktorů, které souvisí s vývojem neenzymatického typu rezistence u *H. influenzae*. Cílem tohoto projektu bylo zjistit, zda se nárůst rezistence vůči betalaktamům v České republice, vzniklý na podkladě méně obvyklého mechanismu rezistence, odehrál v důsledku klonální expanze rPBP3 *H. influenzae*, nebo je reakcí populace hemofilů na narůstající spotřebu cefuroximu. Souhrnné sdělení popisuje výsledek projektu.

**REZISTENCE K BETALAKTAMŮM U *H. INFLUENZAE***

Rezistence k aminopenicilinům je u hemofilů tradičně spojena především s produkcí betalaktamázy, která je inhibována kyselinou klavulanovou nebo sulbaktamem. Kmeny se označují jako BLPAR (betalaktamáza pozitivní ampicilin rezistentní). U *H. influenzae* byl popsán výskyt dvou různých typů betalaktamázy, TEM-1 a ROB-1.<sup>(4)</sup> Oba tyto enzymy jsou přenášeny plazmidy a jsou produkovány konstitutivně ve velkém množství.

Rezistence na ampicilin způsobená neenzymatickým mechanismem byla popsána v osmdesátých letech.<sup>(7)</sup> Neenzymatická rezistence vzniká v důsledku snížené afinity PBP3 k betalaktamům. PBP3 jsou kódovány genem *ftsI*. Jeho produktem je transpeptidáza FtsI, která se podílí na syntéze peptidoglykanů. Proteiny Fts obecně hrají roli při tvorbě divizomu (strukturální kruh v buňce připojený k cytoplazmatické membráně) a také při tvorbě septa během buněčného dělení. Mutace v genu *ftsI* vedou k substitucím aminokyselin (AK) v transpeptidázové oblasti proteinu PBP3. Důsledkem těchto substitucí je snížení afinity aminopenicilinů a cefalosporinů k vazbě na tyto proteiny. Izoláty vykazující tento typ rezistence jsou historicky známé jako betalaktamáza negativní ampicilin rezistentní (BLNAR). Termín BLNAR je však podle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) nevhodný, protože termín BLNAR zahrnuje nejen takto původně označované kmeny s rezistencí k aminopenicilinům a neprodukující betalaktamázu, ale i kmeny, které mají specifický typ mutace ovlivňující zejména citlivost k cefalosporinům 2. či 3. generace.<sup>(8)</sup> Nověji jsou kmeny označované jako rPBP3 (genotyp vykazující mutaci v transpeptidázové oblasti *ftsI*) a na rozdíl od kmenů produkcí betalaktamázu není jejich snížená citlivost na aminopeniciliny ovlivněna inhibitory betalaktamázy.

**FENOTYPOVÁ DETEKCE RPBP3 *H. INFLUENZAE***

Fenomén neenzymatické rezistence u *H. influenzae* je rovněž komplikován jeho nesnadným fenotypovým průkazem. rPBP3 izoláty se mohou fenotypově jevit k betalaktamům rezistentní i citlivé, identifikace mutace je možná pouze za použití molekulárně biologických metod (PCR průkaz mutace/mutací genu *ftsI*, případně jeho sekvenace).

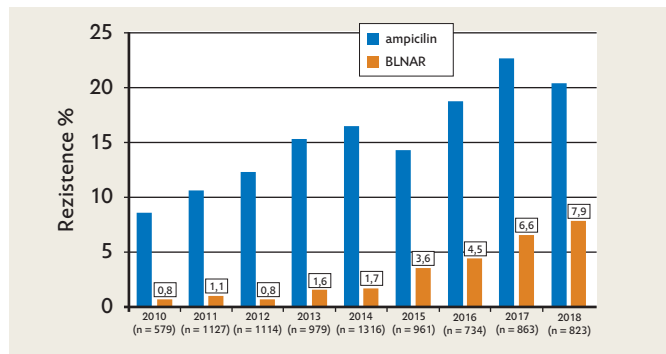
K fenotypovému testování citlivosti vůči antibiotikům se obvykle používá standardizovaná disková difuzní metoda (DDM). Principiálně využívá difuze antibiotika z papírového disku na agarové půdě a případně zábrany růstu bakterií kolem disku v závislosti na vnímavosti k testovanému antibiotiku. Dle standardů EUCAST je pro screening rPBP3 *H. influenzae* doporučeno testování pomocí disku

s penicilinem (1 J), avšak v Národní referenční laboratoři pro antibiotika (NRL pro ATB) byly opakovaně zachyceny klinické izoláty hemofilů, u kterých testování penicilinu rPBP3 fenotyp neodhalilo.<sup>(9)</sup> Při testování různých betalaktamových antibiotik (penicilin, ampicilin, cefuroxim a amoxicilin/klavulanát) a jejich schopnosti detekovat rPBP3 *H. influenzae* byly u výše zmíněných antibiotik správně identifikovány rPBP3 u 91,5 %, 94,4 %, 89,5 % a 70,6 % izolátů.<sup>(10)</sup> Screening za použití ampicilinového disku byl spolehlivější v porovnání s diskem penicilinu, který je doporučován standardy EUCAST. U specificky vybrané populace kmenů byla hodnocena interpretační shoda mezi stanovenou hodnotou minimální inhibiční koncentrace (MIC) a velikostí inhibiční zóny na agarrech od různých výrobců a zároveň schopnost jednotlivých agarů detekovat přítomnost mutovaného PBP3 u problematických kmenů.<sup>(11)</sup> Kategorická shoda (tedy klinická interpretace výsledku testování citlivosti v kategorii 1. citlivý, 2. citlivý, zvýšená expozice nebo 3. rezistentní) při porovnání DDM a vyšetření MIC bujónovou mikrodiluční metodou u ampicilinu a cefuroximu byla pouze 71,1 %, resp. 83,8 %. Výsledky celkově odhalují, bez ohledu na agar/výrobce, nízkou úroveň interpretační shody mezi použitými metodami u námi testované rPBP3 populace *H. influenzae*.

Je zřejmé, že identifikace rPBP3 kmenů je nesnadná, a proto lze předpokládat, že skutečný výskyt tohoto typu rezistence může být vyšší. Další problematickou oblastí je samotná klinická interpretace nálezu. Z dosavadních pozorování totiž vyplývá, že nalezená mutace nemusí být vždy nutně fenotypově vyjádřena a rutinní testování citlivosti k aminopenicilinům spolehlivě neodliší rPBP3 kmeny od citlivé populace. I z těchto důvodů je u *H. influenzae* při perorální antibiotické léčbě doporučeno použití vyšších terapeutických dávek příslušných antibiotik (amoxicilin, amoxicilin/klavulanát, případně cefuroxim).<sup>(9)</sup>

## EPIDEMIOLOGIE REZISTENCE VŮČI BETALAKTAMŮM U *H. INFLUENZAE*

Oba mechanismy rezistence, tedy enzymatický i neenzymatický, se mohou vzájemně kombinovat a izoláty s mutací PBP3 a současně produkující betalaktamázu byly zachyceny i v NRL pro ATB. Frekvence výskytu neenzymatické rezistence k aminopenicilinům celosvětově narůstá. Výsledky pravidelného sledování antibiotické rezistence u *H. influenzae* způsobujícího infekce dýchacích cest (sinusitida, akutní zánět středního ucha, komunitní pneumonie), které každoročně provádí NRL pro ATB, ukazují rostoucí trend výskytu ampicilinové rezistence u kmenů *H. influenzae*.<sup>(12)</sup> Od roku 2010 došlo k celkovému nárůstu rezistence *H. influenzae* na ampicilin z 8,6 % v roce 2010 na 20,4 % v roce 2018. Ve stejném období se podíl kmenů rPBP3 zvýšil z 0,8 % na 7,9 % (obr. 1). Poslední údaje z roku 2024 potvrzují rezistenci na ampicilin u 24,6 % kmenů, rezistence k amoxicilin/klavulanátu dosáhla 8,5 %. Zatímco míra výskytu BLPAR je tedy téměř konstantní, podíl kmenů rPBP3 se od roku 2010 zvýšil desetinásobně. Od roku 2015 jsou v NRL pro ATB potvrzeny i kmeny rezistentní na cefotaxim i na karbapenemy.<sup>(13)</sup>



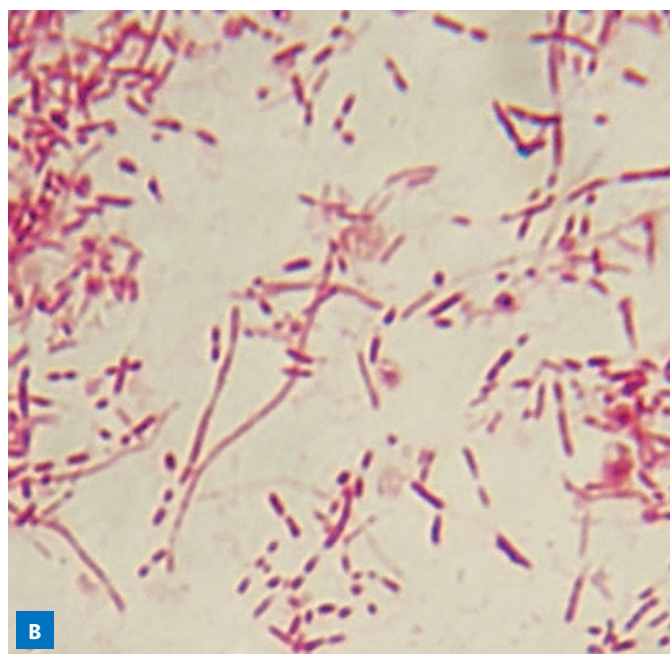
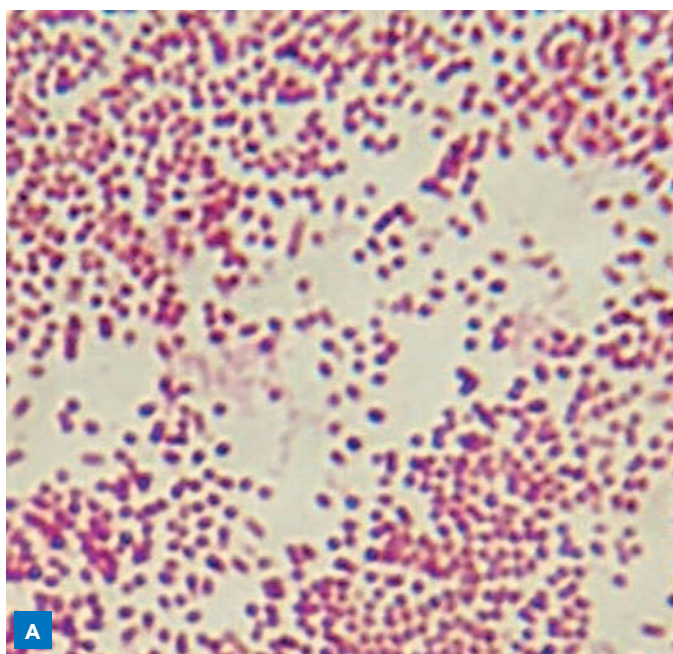
Obr. 1: Vývoj rezistence k aminopenicilinům u *Haemophilus influenzae*, vyvolávajícího komunitní respirační infekce v České republice, respirační studie, NRL pro ATB (Státní zdravotní ústav) ve spolupráci s Pracovní skupinou pro monitorování rezistence (PSMR). Modré sloupce ukazují celkový výskyt (%) rezistence k ampicilinu bez ohledu na mechanismus rezistence, oranžové sloupce pak udávají podíl (%) kmenů rezistentních k amoxicilin/klavulanátu hodnocených jako BLNAR (= rPBP3), v závorkách je uveden celkový počet kmenů, které byly testovány.

## VZNIK A ŠÍŘENÍ NEENZYMATICKÉ REZISTENCE U *H. INFLUENZAE*

Bylo prokázáno, že expozice cefuroximu má stimulační účinek na nárůst kmenů rPBP3 *H. influenzae* ve srovnání s amoxicilinem/kyselinou klavulanovou.<sup>(14)</sup> V České republice se zvýšil podíl rPBP3 kmenů v průběhu stejného období, kdy spotřeba cefuroximu vzrostla dvojnásobně (z 1,2 definovaných denních dávek [DDD] na 1000 obyvatel v roce 2010 na 2,3 DDD na 1000 obyvatel v roce 2017).<sup>(15)</sup> Narůstající podíl rPBP3 kmenů mohl být zapříčiněn zvýšenou spotřebou cefuroximu, nelze také vyloučit klonální šíření genotypu rPBP3 *H. influenzae* s vyšším klinickým významem.

Sekvenční analýza a následná fylogenetická analýza neprokázaly souvislost mezi dominantním šířením specifického rezistentního klonu a vzestupem podílu neenzymatické rezistence u *H. influenzae* v České republice.<sup>(16)</sup> Celkem 228 rPBP3 *H. influenzae* izolátů shromážděných v NRL pro ATB v letech 2010–2018 bylo sekvenováno pomocí MLST (multi-locus sequence typing). Kmeny patřily do 74 různých sekvenčních typů (ST). Pouze ve čtyřech ST dosáhl počet kmenů 10 nebo více izolátů: ST1034 (n = 49, 21,5 %), ST103 (n = 17, 7,5 %), ST14 (n = 13, 5,7 %) a ST1218 (n = 13, 5,7 %). ST1034 je nejčastější od roku 2014 (31,6 %), s oscilací výskytu v následujících letech mezi 15–28 %.

U rPBP3 izolátů byla sekvenována oblast 977-1597 bp (base pair) genu *ftsI* (621bp fragment) za účelem ověření přítomnosti mutací v transpeptidázové oblasti PBP3 podle protokolu z PubMLST.org. Nukleotidová sekvence byla převedena na sekvenci AK v programu Bionumerics 7.6.2 (Applied Maths, Ghent, East Flanders, Belgie) a porovnána s AK sekvencí (pozice 326–532) nemutovaného referenčního kmene *H. influenzae* ATCC 51907 (GenBank přístupové číslo L42023). U těchto kmenů bylo zjištěno 23 různých (AK) substitucí: V329I, D350N, S357N, A368T, M377I, S385T, A388V, L389F, P393L, A437S, I449V, G490E, I491V, R501L, A502S,



Obr. 2: **A** – kontrolní kmen bez přítomnosti antibiotik, **B** – kmen č. 5 po kultivaci ve 2 mg/l ampicilinu. Optický mikroskop Olympus, zvětšení 1000 $\times$ . (Foto: Vladislav Jakubů, Národní referenční laboratoř pro antibiotika, Státní zdravotní ústav)

A502T, A502V, V511A, R517H, I519L, N526K, A530S a T532S. Nejčtenější kombinace záměn u rPBP3 betalaktamáza negativních kmenů byly AK substituce D350N, M377I, A502V, N526K. U kmenů s touto nejčastější kombinací mutací (n = 80) bylo identifikováno 11 různých ST, z nichž dominovalo ST1034 (n = 47; 58,8 %).

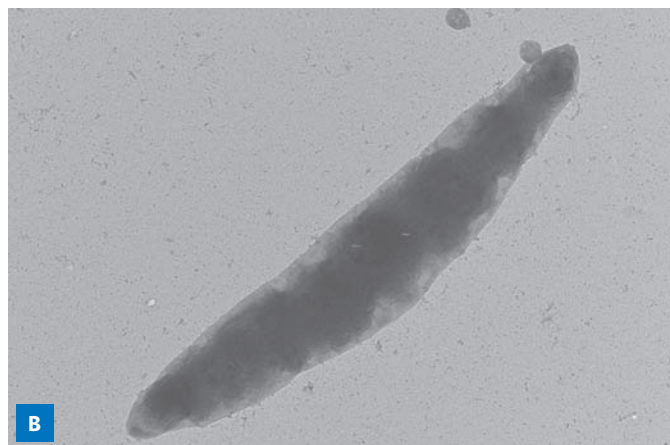
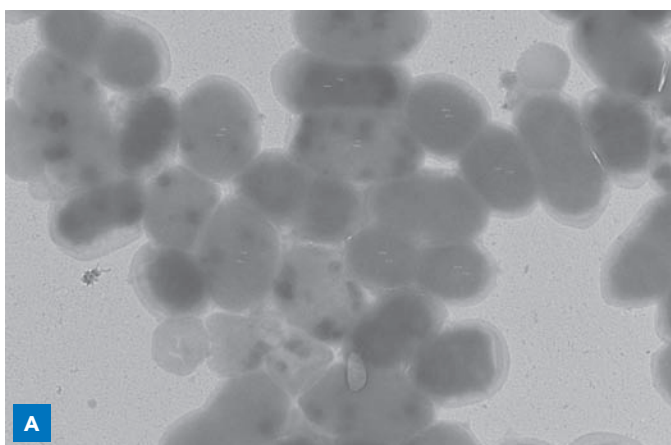
Použití antibiotik může významně přispívat ke vzniku a udržení rezistence. Rezistentní bakterie mohou být selektovány jak při vysokých koncentracích antibiotik používaných terapeuticky, tak i při mnohem nižších (tzv. subinhibičních) koncentracích antibiotik. Pro porovnání potenciálu betalaktamů na indukci rezistence u *H. influenzae* jsme postavili klinické kmeny genotypů sPBP3 (citlivá populace bez mutací v transpeptidázové oblasti *ftsI*) a rPBP3 (iniciální mutace N526K) subinhibičním koncentracím ampicilinu a cefuroximu. Celkem 10 kmenů (5 sPBP3 a 5 rPBP3) bylo sériově pasážováno po dobu 30 dnů s jednonásobným zvýšením koncentrace antibiotika každých 5 dnů.<sup>(17)</sup>

Zkoumání vlivu ampicilinu a cefuroximu na selekci aminokyselinových záměn genu *ftsI* odhalilo rozdíly v selekčním potenciálu obou antibiotik. U kmenů *H. influenzae* pasážovaných ve vzestupných koncentracích cefuroximu došlo k vyššímu nárůstu MIC v porovnání s ampicilinem. U pasážovaných kmenů se také *in vitro* objevily nové mutace, které dosud nebyly u klinických izolátů popsány. Cefuroxim indukoval širší spektrum AK záměn v oblastech pokrývajících téměř polovinu PBP3, zatímco ampicilinem indukované záměny se vyskytly pouze v poslední šestině primární sekvence PBP3. Ukázalo se tedy, že obě antibiotika mají potenciál pro vznik mutací v PBP3, ale expozice cefuroximu má v porovnání s ampicilinem tendenci

generovat mutace častěji, zejména u kmenů s již existující základní mutací N526K.

### MORFOLOGICKÉ ZMĚNY RPBP3 *H. INFLUENZAE* KMENŮ PASÁŽOVANÝCH V ANTIBIOTICÍCH

U kmenů kultivovaných v obou antibioticích byly pod optickým mikroskopem nalezeny změny v morfologii buněk. Zaměřili jsme se na korelaci mezi detaily změněné morfologie (výstup z elektronového mikroskopu) a změnami v genech podílejících se na septaci a tvorbě buněčné stěny.<sup>(18)</sup> Ve srovnání s kontrolním kmenem *H. influenzae* ATCC 49766, byl u kmenů po 30 dnech kultivace s betalaktamy pozorován světelným mikroskopem vláknitý tvar hemofilů, a to po expozici ampicilinu i cefuroximu (obr. 2). Kvantitativní analýza velikosti buněk transmisním elektronovým mikroskopem ukázala, že ošetřené buňky se prodloužily podél obou os, délka krátké osy se zvětšila přibližně o 28 % (z 0,767  $\mu$ m na 1,06  $\mu$ m), délka dlouhé osy se zvětšila o 54 % (z 1  $\mu$ m na 2,175  $\mu$ m). V porovnání s kontrolním kmenem se hemofily v přítomnosti těchto antibiotik nedokázaly od sebe oddělit (obr. 3). Na konci kultivace potvrdila analýza sekvenování celého genomu testovaných izolátů *de novo* mutace v genech zodpovědných za morfologii buněk. Různé sady mutací byly nalezeny v genu *ftsI* (peptidoglykan D, D-transpeptidáza FtsI, PBP3), *mreB* (protein určující tvar buňky MreB), *mreC* (protein určující tvar buňky MreC) a *mrdA* (peptidoglykanová D,D-transpeptidáza MrdA). Jednotlivé mutace byly zjištěny také v genech *mrdB* (peptidoglykanová glykosyltransferáza MrdB) a *rodA* (peptidoglykanová glykosyltransferáza



Obr. 3: **A** – kontrolní kmen bez přítomnosti antibiotik, **B** – kmen č. 5 po kultivaci ve 2 mg/l ampicilinu. Transmisní elektronový mikroskop Hitachi HT7800, zvětšení 20000×. (Foto: Daniel Krsek, Národní referenční laboratoř pro elektronovou mikroskopii, Státní zdravotní ústav)

Roda). Ampicilin vyvolal mutace především v genech *ftsI*, *mreB*, *mreC* a *mrda*, zatímco cefuroxim způsobil mutace také v genech *mrdB*, *mltC* a *rodA*. Vzestup MIC betalaktamů lze tedy korelovat i s mutacemi, které primárně probíhají mimo dominantní transpeptidázovou oblast *ftsI*.

## ZÁVĚR

Fylogenetická analýza rPBP3 kmenů neprokázala rozšíření specifického dominantního klonu, naopak rPBP3 populace byla značně heterogenní. Nárůst prevalence neenzymatické rezistence k betalaktamům v České republice tedy pravděpodobně spíše souvisel s narůstající spotřebou širokospektrých betalaktamových antibiotik (zejména cefuroximu) a zvýšeným selekčním tlakem.

Antibiotická rezistence je značně dynamický fenomén a její vznik může být ovlivněn mnoha různými faktory. Účelné předepisování antibiotik je jedním ze zásadních nástrojů boje s rezistencí vůči antibiotikům. Důležitá je nejen celková spotřeba antibiotik, ale i volba konkrétních skupin, protože potenciál antibiotik stimulovat rozvoj rezistence se liší. Tento fakt zohledňuje i Světová zdravotnická organizace (WHO), která zavedla klasifikaci antibiotik AWaRe.<sup>(19)</sup> Jedná se o akronym složený z názvů tří skupin antibiotik: Access, Watch a Reserve. Cílem kategorizace antibiotik WHO AWaRe je poskytnout nástroj pro bezpečné a efektivní užívání antibiotik. Zatímco antibiotika ze skupiny Access jsou antibiotika základní, s relativně úzkým spektrem účinku (např. penicilin V, amoxicilin, doxycyklin), do skupiny Watch (např. cefuroxim, makrolidy, fluorochinolony) a Reserve (např. linezolid, kolistin, tigecyklin) jsou řazena antibiotika, která obvykle

nepředstavují první volbu a jejich preskripce by měla být vymezena pouze pro situace, kdy antibiotika ze skupiny Access, resp. Watch u skupiny Reserve, nelze použít.

V roce 2023 přijala Rada Evropské unie doporučení Rady o zintenzivnění opatření EU v boji proti antimikrobiální rezistenci v rámci přístupu jednoho zdraví (2023/C 220/01).<sup>(20)</sup> Doporučení obsahuje i pět konkrétních a měřitelných cílů, jsou tedy dobrým nástrojem sledování pokroku souvisejícího s prevencí a snižováním antibiotické rezistence do roku 2030. Dva z těchto cílů se soustředí na optimalizaci používání antibiotik, pokles celkové spotřeby antibiotik by měl být zároveň provázen kvalitativní změnou spektra používaných antibiotik. Česká republika by měla v souladu s doporučením do roku 2030 snížit celkovou spotřebu antibiotik u lidí (v definované denní dávce na 1000 obyvatel na den) o 9% ve srovnání s referenčním rokem 2019 a zabezpečit, aby do roku 2030 alespoň 65% celkové spotřeby u lidí představovala antibiotika náležející do skupiny antibiotik skupiny Access. Tyto cíle se zatím nedaří plnit. Jak vyplývá z posledních dostupných údajů spotřeby antibiotik z roku 2023, v České republice ve srovnání s rokem 2019 v roce 2023 stoupla celková spotřeba o 9%, podíl skupiny Access tvoří 60,6%.<sup>(21)</sup> Ačkoliv celková spotřeba antibiotik se v České republice stále drží pod evropským průměrem, špatnou zprávou je narůstající trend spotřeby antibiotik a preference širokospektrých antibiotik, i když pro jejich používání není při léčbě zejména komunitních infekcí racionální zdůvodnění.

Jak potvrzují i naše výsledky, nevhodná spotřeba antibiotik má reálné negativní dopady. K praktickým výstupům grantového projektu proto patří snaha o rozšíření povědomí o možných rizicích souvisejících s nadužíváním cefuroximu. |

## LITERATURA

1. **Lebedová V, Křížová P, Beneš Č.** Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v období 2009–2013. Zprávy CEM 2014; 23: 170–174.
2. **Abavisani M, Keikha M, Karbalaei M.** First global report about the prevalence of multi-drug resistant *Haemophilus influenzae*: a systematic review and meta-analysis. BMC Infect Dis 2024; 24(1): 90.
3. **Aguirre-Quiñero A, Pérez Del Molino IC, de la Fuente CG, et al.** Phenotypic detection of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* with altered penicillin-binding protein 3. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2018; 37(8): 1475–1480.
4. **Giufre M, Cardines R, Marra M, et al.** Antibiotic susceptibility and molecular typing of invasive *Haemophilus influenzae* isolates, with emergence of ciprofloxacin resistance, 2017–2021, Italy. Microorganisms 2023; 11(2): 315.
5. **Che J, Zhang HB, Guo YH, et al.** Characteristics of 241 invasive and non-invasive *Haemophilus influenzae* isolated from patients under 14 years old, Hebei Province, China. BMC Infect Dis 2025; 25(1): 1144.
6. **Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC.** Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 368–389.
7. **Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al.** 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.
8. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Frequently asked questions - valid from 2016-03-29. Dostupné na: [http://www.eucast.org/frequently\\_asked\\_questions\\_faq/](http://www.eucast.org/frequently_asked_questions_faq/)
9. **The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.** Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. Dostupné na: <http://www.eucast.org>
10. **Jakubu V, Cechova M, Musilek M, et al.** Amino acid substitutions in PBP3 in *Haemophilus influenzae* strains, their phenotypic detection and impact on resistance to  $\beta$ -lactams. J Antimicrob Chemother 2025; 80: 980–987.
11. **Jakubů V, Vrbová I, Čechová M, et al.** Porovnání výsledků testování  $\beta$ -laktamů pomocí diskové difuzní metody provedené na agarech několika výrobců u kmenů *Haemophilus influenzae*. Zprávy CEM 2025; 34: 193–197.
12. **Národní referenční laboratoř pro antibiotika a Pracovní skupina pro monitorování rezistence.** Databáze výsledků studie Respirační patogeny. Dostupné na: <https://apps.szu.cz/rp/rezistence.php>
13. **Jakubů V, Urbášková P, Žemličková H.** Záchyt kmenů *Haemophilus influenzae* rezistentních k cefotaximu. Zprávy CEM 2015; 24: 387–388.
14. **Gonzalez N, Aguilar L, Alou L, et al.** Influence of different resistance traits on the competitive growth of *Haemophilus influenzae* in antibiotic-free medium and selection of resistant populations by different -lactams: an in vitro pharmacodynamic approach. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 1215–1222.
15. **Prokeš M, Kalousek K, Žemličková H, et al.** Kvalita spotřeby antibiotik v České republice v letech 2008–2017. Practicus 2018; 17(4): 18–24.
16. **Jakubu V, Malisova L, Musilek M, et al.** Characterization of *Haemophilus influenzae* strains with non-enzymatic resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics caused by mutations in the PBP3 gene in the Czech Republic in 2010–2018. Life 2021; 11: 1260.
17. **Jakubu V, Vrbova I, Bitar I, et al.** Evolution of mutations in the *ftsI* gene leading to amino acid substitutions in PBP3 in *Haemophilus influenzae* strains under the selective pressure of ampicillin and cefuroxime. Int J Med Microbiol 2024; 316: 151626.
18. **Malisova L, Jakubu V, Bitar I, et al.** Whole-genome sequence analysis of morphological changes in *Haemophilus influenzae* after beta-lactam exposure. J Glob Antimicrob Resist 2024; 39: 114–118.
19. **Web Annex C.** WHO AWaRe (access, watch, reserve) classification of antibiotics for evaluation and monitoring of use, 2023. In: The selection and use of essential medicines 2023: Executive summary of the report of the 24th WHO Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines, 24–28 April 2023. Geneva: World Health Organization 2023 (WHO/MHP/HPS/EML/2023.04).
20. Doporučení Rady o posílení opatření EU pro boj proti antimikrobiální rezistenci v rámci přístupu „Jedno zdraví“ (COM/2023/C 220/01). Dostupné na: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32023H0622\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32023H0622(01))
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) – Annual Epidemiological Report 2023. Stockholm: ECDC 2024.