Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 189
proLékaře.cz | 29.12.2026

Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 59, 2010, č. 4, s. 189–196

Sekvenční charakterizace izolátů *Haemophilus influenzae* působících závažná onemocnění v České republice v letech 2001–2009

Lebedová V.[1], Musílek M.[2], Křížová P.[2]

[1]Národní referenční laboratoř pro hemofilové nákazy, Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz, Státní zdravotní ústav

[2]Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz, Státní zdravotní ústav

SOUHRN

Cíl: **Klonální analýza metodou multilokusové sekvenční typizace (MLST) rozsáhlého souboru kmenů *Haemophilus influenzae* izolovaných z invazivního i neinvazivního onemocnění v České republice v letech 2001–2009.**
Materiál a metody: **Metodou MLST bylo testováno 207 kmenů *H. influenzae*, z toho bylo 153 *H. influenzae* b (Hib), 2 *H. influenzae* e, 2 *H. influenzae* f a 50 neopouzdřených *H. influenzae* (HiNT).**
Výsledky: **Při charakterizaci 153 Hib bylo zjištěno, že 73 % kmenů vykazuje sekvenční typ (ST) ST-6 a 15 % příbuzný ST-83. Další sekvenční typy byly zjištěny jen ojediněle (ST-92, ST-95, ST-108, ST-190, ST-326). Bylo zjištěno 5 nových ST (ST-663 až ST-667). Všechny ST zjištěné u Hib náležely do klonálního komplexu cc6. Metodou MLST bylo testováno 12 kmenů izolovaných z klinického materiálu u skutečného selhání Hib vakcíny: 9 kmenů vykazovalo ST-6, 2 kmeny ST-83 a jeden kmen ST-190. Izoláty *H. influenzae* e vykazovaly ST-18 a izoláty *H. influenzae* f vykazovaly ST-124. Jeden kmen HiNT izolovaný z likvoru vykazoval ST-6 typický pro Hib. U tohoto kmenu se zřejmě jedná o Hib, který ztratil schopnost tvořit pouzdro. Charakterizace dalších 49 testovaných kmenů HiNT vykazovalo 37 různých ST, nejčastěji zastoupený byl ST-276 (4 kmeny), ST-556 (3 kmeny), další ST se vyskytovaly jen ojediněle. Bylo zjištěno 9 nových ST (ST-668 až ST-676). Sekvenční typy *H. influenzae* non-b jsou heterogenní a nenáleží do klonálního komplexu cc6.**
Závěr: **Populace českých izolátů Hib je velmi homogenní a všech 12 zjištěných ST náleží do jediného klonálního komplexu cc6. Sekvenční typ ST-6 je u Hib centrálním genotypem komplexu definovaného pomocí MLST a lze ho nazvat klonálním komplexem cc6. Zjištěné příbuzné varianty centrálního ST-6 jsou jednolokusovými variantami v rámci komplexu cc6 (ST-83, ST-92, ST-95, ST-108, ST-190, ST-326, ST-663 až ST-667). U všech případů selhání vakcíny byl zjištěn klonální komplex cc6. Populace *H. influenzae* non-b je velmi heterogenní a žádný z 39 zjištěných ST nenáleží do klonálního komplexu cc6.**
Klíčová slova: ***H. influenzae*** **– klonální analýza – multilokusová sekvenční typizace – MLST – molekulární epidemiologie.**

SUMMARY

Lebedová V., Musílek M., Křížová P.: Sequence characterization of *Haemophilus influenzae* isolates in the Czech Republic in 2001–2009

Objective: **Multilocus sequence typing (MLST)-based clonal analysis of a large set of *Haemophilus influenzae* strains isolated from both invasive and non-invasive cases in the Czech Republic in 2001–2009.**
Material and methods: **A total of 207 *H. influenzae* strains, i. e. 153 *H. influenzae* b (Hib) strains, 2 *H. influenzae* e strains, 2 *H. influenzae* f strains and 50 non-capsulated *H. influenzae* (HiNT) strains, were tested by the MLST method.**
Results: **MLST classified 73% of 153 Hib strains to sequence type (ST) ST-6 and 15% of them to related ST-83. Other sequence types were uncommon (ST-92, ST-95, ST-108, ST-190 and ST-326). Five new STs were found (ST-663 to ST-667). All STs observed in Hib strains belonged to clonal complex cc6. Of 12 strains isolated from clinical specimens of actual Hib vaccine failure cases, nine were classified by MLST into ST-6, two into ST-83 and one into ST-190. The *H. influenzae* type e isolates were of ST-18 while *H. influenzae* type f isolates belonged to ST-124. A HiNT strain isolated from the cerebrospinal fluid was of ST-6, typical of Hib, and may be a Hib strain that lost the capsule-forming ability. Characterization of other 49 HiNT strains revealed 37 different STs, with ST-276 being the most common (4 strains), followed by ST-556 (3 strains); other STs were only found sporadically. Nine new STs were identified (ST-668 to ST-676). STs of *H. influenzae* non-b are heterogeneous and do not belong to complex cc6.**
Conclusion: **The population of the Czech Hib isolates is highly homogeneous and all 12 STs**

Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 190
proLékaře.cz | 29.12.2026

detected are members of the same clonal complex, cc6. ST-6 is the central genotype in Hib strains of MLST complex cc6. The detected ST-6 single-locus variants are from clonal complex cc6 (ST-83, ST-92, ST-95, ST-108, ST-190, ST-326, ST-663 to ST-667). Clonal complex cc6 was found in all vaccine failure cases. The population of *H. influenzae* non-b is highly heterogeneous and none of the 39 STs found matches clonal complex cc6.
***Key words: H. influenzae* – clonal analysis – multilocus sequence typing – MLST – molecular epidemiology.**

Úvod

Haemophilus influenzae (*H. influenzae*) je malá, nepohyblivá gramnegativní bakterie, která kolonizuje lidský nosohltan. Kmeny mohou být opouzdřené nebo neopouzdřené. U opouzdřených kmenů se rozlišuje šest sérotypů: a, b, c, d, e, f. Neopouzdřené kmeny se nazývají netypovatelné (HiNT) a vyvolávají většinou jen lokální infekce, jako je otitida, sinusitida, konjuktivitida a bronchitida. Původcem závažných onemocnění, jako je sepse nebo meningitida, jsou jen ojediněle, většinou u malých dětí včetně novorozenců a u starších lidí. Před zavedením povinného očkování byl opouzdřený kmen *Haemophilus influenzae* b (Hib) hlavním původcem hemofilových závažných onemocnění zvláště u malých dětí do pěti let věku (meningitida, epiglotitida, bakteriémie nebo sepse, pneumonie, artritida). Ostatní opouzdřené kmeny *H. influenzae* vyvolávají závažná onemocnění jen výjimečně.

V České republice byl od roku 1987 sledován výskyt hemofilových meningitid, nemocnost se pohybovala v rozmezí 0,5–0,7/100 000 obyvatel. V roce 1999 byl zahájen celorepublikový program surveillance závažných onemocnění působených Hib, který se zaměřil na sledování nejen meningitidy, ale i dalších klinických forem (epiglotitida, bakteriémie – septikémie, pneumonie, artritida, jiné závažné definované syndromy) [6]. Rozšíření sledovaných klinických obrazů přineslo v r. 1999 dvojnásobnou nemocnost (1/100 000 obyvatel) oproti předchozím rokům. Nemocnost Hib meningitidy zůstala prakticky na stejných hodnotách, což svědčilo o dobré kvalitě původního hlásicího systému.

Na základě výsledků surveillance a doporučení Poradního sboru pro preventabilní nákazy byla v červenci roku 2001 zavedena rutinní Hib vakcinace dětí do jednoho roku věku formou tetravakcíny (Tetract-Hib) [20]. Základní očkování se provádí čtyřmi dávkami. V roce 2006 byla tetravalentní vakcína nahrazena hexavalentní vakcínou (Infanrix Hexa) [21]. Program surveillance byl po zavedení očkování rozšířen o sledování případného selhání Hib vakcíny [5]. Případy selhání Hib vakcinace jsou zatím ojedinělé. Od zavedení rutinní vakcinace v roce 2001 do roku 2009 bylo celkem hlášeno jen 19 případů selhání Hib vakcinace, z toho 14 případů skutečného selhání, 1 zdánlivé a 4 pravděpodobná selhání.

V prosinci 2008 byl program surveillance Hib závažných onemocnění na základě vyhlášky Ministerstva zdravotnictví ČR rozšířen i o sledování výskytu invazivních onemocnění způsobených *Haemophilus influenzae* non-b (Hi non-b) [22]. Od počátečního zavedení programu surveillance v roce 1999 odpovídá definice sledovaných hemofilových invazivních onemocnění evropské definici: etiologie musí být laboratorně prokázána z klinického materiálu, který je za normálních okolností sterilní [19].

Po zavedení rutinní vakcinace došlo v České republice k poklesu celkové nemocnosti Hib invazivních onemocnění. V roce 2009 byly hlášeny jen dva případy (1 meningitida, 1 sepse). Celková Hib nemocnost byla 0,02/100 000 obyvatel a při porovnání s rokem 1999 došlo k jejímu poklesu o 98 %. V roce 2009 bylo hlášeno také 13 onemocnění způsobených Hi non-b: *H. influenzae* e (1 sepse, 1 artritida), *H. influenzae* f (1 artritida, 1 pneumonie), HiNT (2 meningitidy, 4 sepse, 3 pneumonie) [2].

Metoda multilokusové sekvenční typizace (MLST) umožňuje mezilaboratorní přenos typizačních dat a celosvětové srovnávání výsledků. Může se využít v celosvětové molekulární epidemiologii. V roce 1998 byla metoda MLST vyvinuta pro klonální studium *Neisseria meningitis* [3], pro kterou je k dispozici v současné době nejrozsáhlejší celosvětová MLST databáze sekvenčních typů (ST) a klonálních komplexů (cc) [http://pubmlst.org/neisseria/], na jejímž základě lze velmi přesně určovat, zda jednotlivé kmeny patří do hypervirulentních komplexů. MLST byla postupně aplikována i na další bakteriální agens [http://www.mlst.net/databases/]. Pro *H. influenzae* se celosvětová MLST databáze teprve tvoří [http://haemophilus.mlst.net/].

V České republice byla dosud publikována MLST charakterizace 28 kmenů *H. influenzae*, která naznačuje klonální homogenitu Hib [1]. Cílem současné studie je klonální analýza rozsáhlého souboru kmenů *H. influenzae*, izolovaných z invazivního i neinvazivního onemocnění v České republice v letech 2001–2009.

Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 191
proLékaře.cz | 29.12.2026

Materiál a metodika

Metoda MLST

Metoda MLST byla provedena sekvenací oblastí sedmi housekeeping genů (*adk, atpG, frdB, fucK, mdh, pgi, recA*) postupem podle [4], s analýzou alelických variant v ústřední databázi [http://haemophilus.mlst.net/eburst/] a klonální analýzou sekvenčních typů v aplikaci eBURST [ ]. Sekvenační amplifikace byly provedeny kitem BigDye v.3.1 s detekcí fragmentů analyzátorem 3130xl podle protokolů výrobce (Applied Biosystems, Foster City, USA), k získání výsledných sekvencí byl užit software Lasergene (DNASTAR, Madison, USA).

Výběr izolátů

Pro sekvenční charakterizaci *H. influenzae* metodou MLST bylo v rámci projektu CZ0127 „Sekvenční charakterizace vybraných bakteriálních agens působících závažná onemocnění v ČR" [http://www.sekvenace.cz/] vybráno 207 izolátů, které byly do Národní referenční laboratoře pro hemofilové nákazy poslány mikrobiologickými laboratořemi ze všech krajů České republiky k ověření a další charakterizaci pomocí specializovaných metod. Přednostně byly vyšetřovány aktuální kmeny izolované od pacientů v průběhu roku 2007 až do poloviny roku 2009. Dále byly doplněny kmeny Hib izolovanými v období bezprostředně po zahájení rutinní Hib vakcinace.

Kultivace a biochemické testy

Izoláty *H. influenzae* byly určeny standardními metodami: podle morfologie kolonií na Levinthalově agaru nebo čokoládovém agaru pro hemofily, podle přítomnosti hemolýzy na krevním agaru s 5 % koňské krve, podle simultánních požadavků na X a V růstové faktory a podle biochemických testů [15]. Požadavek na faktor X byl testován satelitním růstem kolem stafylokokové čáry na krevním agaru. Z biochemických testů byly použity testy fermentace glukózy, laktózy, manózy, sacharózy a tvorba sirovodíku. Pro určení biotypu byla zjišťována tvorba indolu, ureázy a ornithin dekarboxylázy. Sérotypizace byla prováděna monovalentními antiséry a, b, c, d, e, f (Remel Inc., Lenexa, KS, USA).

Výsledky

Metodou MLST bylo testováno 207 kmenů *H. influenzae*, z toho bylo 153 *H. influenzae* b (Hib), 2 *H. influenzae* e, 2 *H. influenzae* f a 50 neopouzdřených *H. influenzae* (HiNT) – tabulka 1.

Analýza *H. influenzae* b

Bylo testováno 153 izolátů z let 2001–2009, téměř polovina z nich byla izolována v prvních třech letech: 24 kmenů v roce 2001 (16 %), 27 kmenů v roce 2002 (18 %) a 18 kmenů v roce 2003 (12 %). 144 kmeny Hib (94 %) byly izolovány z invazivního onemocnění, jako je meningitida (87 kmenů), epiglotitida (40 kmenů), sepse (11 kmenů), artritida (3 kmeny) a pneumonie (3 kmeny). Z neinvazivního onemocnění bylo testováno 8 kmenů Hib (5 %) a jeden kmen (1 %) byl izolován od zdravého jedince. 143 kmeny (93 %) byly vyšetřeny ve věkové skupině 0–9 let, z toho bylo ve věkové skupině 0–11 měsíců testováno 16 kmenů (11 %), ve věkové skupině 1–4 roky 97 kmenů (68 %) a ve věkové skupině 5–9 let 30 kmenů (21 %). Ve věkové skupině nad 10 let bylo vyšetřeno 10 kmenů (7 %). U kmenů Hib převažoval biotyp I (151 kmenů, tj. 99 %), biotyp II a biotyp IV byl jen u jednoho kmene.

Výsledky MLST charakterizace Hib jsou uvedeny v tabulce 2: u 111 kmenů byl zjištěn ST-6 (73 %) a u 23 kmenů ST-83 (15 %). Dále byl u Hib zjištěn ST-92 (2 kmeny), ST-95 (1 kmen), ST-108 (2 kmeny), ST-190 (6 kmenů), ST-326 (1 kmen). Bylo zjištěno 5 nových ST, kterým byla přiřazena nová čísla a byly poslány do celosvětové MLST databáze k ověření a zařazení (ST-663 až ST-667). Nové ST byly zjištěny jen u jednotlivých kmenů.

Metodou MLST bylo vyšetřeno 12 kmenů izolovaných z klinického materiálu u skutečného selhání Hib vakcíny: 9 kmenů vykazovalo ST-6, 2 kmeny ST-83 a jeden kmen ST-190 – tabulka 3.

Analýza *H. influenzae* e a *H. influenzae* f

H. influenzae e byly vyšetřeny 2 kmeny, které byly izolovány od nemocných vyšší věkové kategorie (nad 10 roků věku), jeden z likvoru u meningitidy a jeden z krve u sepse. Jeden kmen měl biotyp I a jeden biotyp IV. Oba izoláty vykazovaly ST-18 – tabulka 4.

H. influenzae f byly vyšetřeny 2 kmeny. Byly rovněž izolovány od nemocných vyšší věkové kategorie (nad 10 roků věku), jeden z likvoru

Tab. 1. Soubor izolátů *H. influenzae* vybraný k MLST charakterizaci, Česká republika, 2001-2009

Table 1. *H. influenzae* isolates selected for MLST characterization, Czech Republic, 2001–2009

Sérotyp	Invazivní onemocnění				Neinvazivní onemocnění				Celkem
	0–11 m	1–4 r	5–9 r	10 + r	0–11 m	1–4 r	5–9 r	10 + r	
Hib	15	91	28	10	1	6	2		**153**
Hie				2					**2**
Hif				2					**2**
HiNT	4	3		9	1	15	17	1	**50**
Celkem	**19**	**94**	**28**	**23**	**2**	**21**	**19**	**1**	**207**

Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 192
proLékaře.cz | 29.12.2026

Tab. 2. Sekvenční typy izolátů *H. influenzae* b, Česká republika, 2001-2009

Table 2. Sequence types of *H. influenzae* b isolates, Czech Republic, 2001–2009

Sekvenční typ	Invazivní onemocnění				Neinvazivní onemocnění				Celkem
	0–11 m	1–4 r	5–9 r	10 + r	0–11 m	1–4 r	5–9 r	10 + r	
ST-6	10	71	19	5		5	1		**111**
ST-83	3	10	5	4		1			**23**
ST-92		2							**2**
ST-95		1							**1**
ST-108	1	1							**2**
ST-190		2	3	1					**6**
ST-326		1							**1**
ST-663		1							**1**
ST-664	1	1							**2**
ST-665			1						**1**
ST-666		1							**1**
ST-667					1		1		**2**
Celkem	**15**	**91**	**28**	**10**	**1**	**6**	**2**	**0**	**153**

= nový ST

Tab. 3. Sekvenční typy izolátů *H. influenzae* b z případů selhání Hib vakcinace, Česká republika, 2001-2009

Table 3. Sequence types of *H. influenzae* b isolates from Hib vaccination failure cases, Czech Republic, 2001–2009

Sekvenční typ	Invazivní onemocnění				Celkem
	0–11 m	1–4 r	5–9 r	10 + r	
ST-6	3	5	1		9
ST-83		2			2
ST-190		1			1
Celkem	**3**	**8**	**1**	**0**	12

= nový ST

u meningitidy a jeden z krve u sepse. Oba kmeny měly biotyp I a oba vykazovaly ST-124 (viz tab. 4).

Analýza *H. influenzae* NT

Metodou MLST bylo testováno 50 kmenů HiNT, které byly izolovány v letech 2006–2009. 22 kmenů bylo izolováno v roce 2008 (44 %), 14 kmenů v roce 2009 (28 %), 13 kmenů v roce 2007 (26 %), 1 kmen v roce 2006 (2 %). Z invazivního onemocnění bylo testováno 15 kmenů HiNT (30 %): meningitida (4 kmeny), sepse (10 kmenů) a amniová tekutina (1 kmen). Z neinvazivního onemocnění bylo testováno 35 kmenů HiNT (70 %), 32 kmenů pochází z horních cest dýchacích, po jednom kmeni z otitidy, konjuktivitidy, vulvitidy. 40 kmenů HiNT (80 %) bylo izolováno ve věkové skupině 0–9 let, z toho ve věkové skupině 0–11 měsíců bylo izolováno 5 kmenů, ve věkové skupině 1–4 roky 18 kmenů a ve věkové skupině 5–9 let 17 kmenů. 10 kmenů (20 %) bylo izolováno od starších osob. U kmenů HiNT bylo zastoupeno více biotypů než u Hib: 20 kmenů mělo biotyp II (40 %), 10 kmenů biotyp III (20 %) a 10 kmenů biotyp V (20 %), dále 9 kmenů biotyp I (18 %) a 1 kmen biotyp VI (2 %).

Metodou MLST bylo zjištěno, že jeden kmen HiNT izolovaný z likvoru, vykazoval ST-6 typický pro Hib. U tohoto kmenu by se mohlo jednat o Hib, který ztratil schopnost tvořit pouzdro. Dalších 49 testovaných kmenů HiNT vykazovalo 37 různých ST – viz tabulka 4: nejčastěji zastoupený byl ST-276 (4 kmeny), ST-556 (3 kmeny), čtyři ST se vyskytovaly u dvou izolátů HiNT, 25 ST se vyskytovalo jen jednotlivě. ST-393 byl zjištěn u 2 izolátů z výtěru z krku, které byly provedeny v rozpětí jednoho měsíce od stejného pacienta. Bylo zjištěno 9 nových ST, kterým byla přiřazena nová čísla a byly poslány do celosvětové MLST databáze k ověření a zařazení (ST-668 až ST-676), nové ST byly zjištěny jen u jednotlivých kmenů.

Klonalita populace *H. influenzae*

V souboru 207 izolátů bylo zjištěno celkem 51 ST, z nichž 12 ST zjištěných u Hib (153 izolátů)

Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 193
proLékaře.cz | 29.12.2026

Tab. 4. Korelace typu a ST izolátů *H. influenzae*, Česká republika, 2001-2009

Table 4. Correlation between the type and ST of *H. influenzae* isolates, Czech Republic, 2001–2009

Klonální komplex	Sekvenční typ	Hib	Hie	Hif	HiNT	Celkem
cc6	ST-6	111			1*	112
	ST-83	23				23
	ST-92	2				2
	ST-95	1				1
	ST-108	2				2
	ST-190	6				6
	ST-326	1				1
	ST-663	1				1
	ST-664	2				2
	ST-665	1				1
	ST-666	1				1
	ST-667	2				2
UA	ST-11				1	1
	ST-14				2	2
	ST-18		2			2
	ST-57				2	2
	ST-98				1	1
	ST-103				1	1
	ST-105				1	1
	ST-124			2		2
	ST-139				1	1
	ST-145				2	2
	ST-155				1	1
	ST-170				1	1
	ST-180				1	1
	ST-196				1	1
	ST-203				1	1
	ST-241				1	1
	ST-264				1	1
	ST-266				1	1
	ST-276				4	4
	ST-280				2	2
	ST-368				2	2
	ST-389				1	1
	ST-393				2	2
	ST-395				1	1
	ST-408				1	1
	ST-422				2	2
	ST-425				1	1
	ST-531				1	1
	ST-555				1	1
	ST-556				3	3
	ST-668				1	1
	ST-669				1	1
	ST-670				1	1
	ST-671				1	1
	ST-672				1	1
	ST-673				1	1
	ST-674				1	1
	ST-675				1	1
	ST-676				1	1
	Celkem	153	2	2	50	207

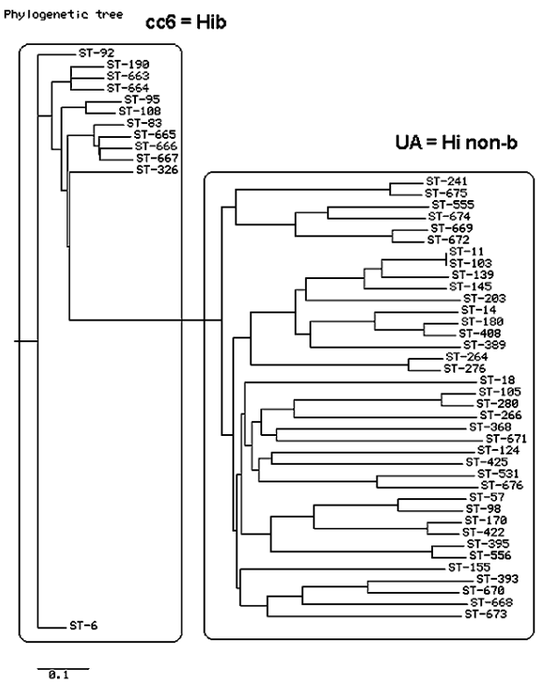
= nový ST

*Pravděpodobně se jedná o Hib, který ztratil schopnost tvořit pouzdro.
UA = unassigned = ST nezařazen do klonálního komplexu

Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 194
proLékaře.cz | 29.12.2026

náleží do klonálního komplexu cc6 (viz tab. 4). Zjištěné příbuzné varianty centrálního ST-6, tedy ST-83, ST-92, ST-95, ST-108, ST-190 a ST-326 a nové ST-663 až ST-667, jsou jednolokusovými variantami v rámci komplexu cc6. Populace českých izolátů Hib je velmi homogenní a náleží do jediného klonálního komplexu cc6. Oproti tomu populace Hi non-b je velmi heterogenní. Výjimkou byl jeden kmen HiNT izolovaný z likvoru, který vykazoval ST-6 typický pro Hib. U tohoto kmene by se mohlo jednat o Hib, který ztratil schopnost tvořit pouzdro. V souboru dalších 53 izolátů bylo zjištěno 39 ST a žádný z nich nenáleží do klonálního komplexu cc6 – zůstávají tedy označeny jako UA = unassigned = nezařazeny – viz tabulka 4 a obrázek 1.

Metoda MLST ukázala genetickou odlišnost populací Hib *versus* Hi non-b.



Obr. 1. Genetická příbuznost sekvenčních typů zjištěných u 207 izolátů *H. influenzae*
Analýza SPLIT TREE, Česká republika, 2001–2009

Fig. 1. Genetic relatedness of sequence types identified in 207 *H. influenzae* isolates
SPLIT TREE analysis, Czech Republic, 2001–2009

Diskuse

Ve světové literatuře se uvádí, že až 80 % zdravých osob v populaci má ve výtěrech z nosohltanu *H. influenzae* – hovoříme o zdravých nosičích [8, 12, 15]. V České republice byla provedena studie, která se zabývala nosičstvím potenciálních patogenů *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* a *Staphylococcus aureus* izolovaných z nazofaryngu od zdravých dětí navštěvujících 16 mateřských školek v České republice v období zimy na konci roku 2004 a počátkem roku 2005 [23]. Bylo vyšetřeno 425 zdravých dětí ve stáří 3–6 let. U 24,9 % dětí byl zjištěn ve výtěru *H. influenzae*, většina kmenů byla neopouzdřena (94,3 %). Mezi opouzdřenými kmeny byly izolovány 3 kmeny *H. influenzae* e a 3 kmeny *H. influenzae* f, nebyl izolován žádný *H. influenzae* b. Nosičství hemofilů u dospělých není v České republice zmapováno.

Metoda MLST byla vyvinuta v Anglii v 90. letech minulého století [3]. Používá se pro studium klonality bakteriálních agens. Je univerzálně použitelná, umožňuje mezilaboratorní přenos dat a lze ji použít v celosvětové molekulární epidemiologii [18]. Tato metoda pomáhá analyzovat vývoj bakteriálních populací a detekovat virulentní bakteriální komplexy. Pro *H. influenzae* se celosvětová MLST databáze teprve tvoří a publikace popisující MLST analýzu populací *H. influenzae* jsou zatím ojedinělé.

V České republice bylo metodou MLST v předchozích letech zatím otypováno 28 kmenů *H. influenzae*. Pro tehdejší studium byly vybrány kmeny *H. influenzae* izolované v České republice z invazivních onemocnění v prvním čtvrtletí roku 2001, tj. před zařazením vakcíny proti *H. influenzae* b do očkovacího schématu. První výsledky charakterizace těchto kmenů metodou MLST ukázaly jejich klonální homogenitu. Pro *H. influenzae* b izolované z invazivních onemocnění v České republice se ukázal být typickým ST-6. Touto metodou byly popsány nové sekvenční typy: ST-83 a ST-84, ST-85 [1].

Při charakterizaci 153 Hib metodou MLST bylo v nyní prezentované studii zjištěno, že 73 % kmenů vykazuje ST-6 a 15 % příbuzný ST-83. Další sekvenční typy (ST-92, ST-95, ST-108, ST-190, ST-326 a nové ST-663 až ST-667) byly zjištěny jen ojediněle. Z našich výsledků je zřejmé, že právě tento sekvenční typ ST-6 u Hib, respektive jeho alelický profil, je centrálním genotypem komplexu definovaného pomocí MLST, respektive metodou BURST analýzy. Tudíž, daný komplex je z tohoto pohledu možno nazvat klonálním komplexem cc-6.

Výskyt kmenů náležejících ke komplexu cc6 byl v souborech Hib izolátů kromě České republiky zjištěn též v postvakcinačních podmínkách v menší míře autory v Kanadě a v USA [17, 11], ve významnějším zastoupení mezi Hib izoláty v Nizozemsku [13] a Velké Británii [9]. V rámci států střední a východní Evropy, kde plošná vak-

Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 195
proLékaře.cz | 29.12.2026

cinace proti Hib neprobíhá, byly izoláty náležející do komplexu cc6 popsány v Polsku [14] a v Rusku [7, 10]. Přítomnost kmenů komplexu cc6 v hemofilové populaci naopak nebyla zjištěna v podmínkách Číny [16].

Metoda MLST českých izolátů *H. influenzae* z let 2001–2009 ukázala genetickou odlišnost populací Hib versus Hi non-b. Tento nález je významný pro vývoj nových vakcín proti *H. influenzae* a pro určování vakcinační strategie jak z národního, tak z mezinárodního hlediska.

Charakterizace izolátů Hib sekvenčními metodami rovněž přispěla k objasnění selhání Hib vakcinace. Metodou MLST bylo vyšetřeno 12 kmenů izolovaných z klinického materiálu u skutečného selhání Hib vakcíny: 9 kmenů vykazovalo ST-6, 2 kmeny ST-83 a jeden kmen ST-190. Všechny ST zjištěné u izolátů z případů selhání vakcíny náležely do komplexu cc6.

Charakterizace dvou kmenů *H. influenzae* e a dvou kmenů *H. influenzae* f metodou MLST ukázala, že se zřejmě jedná také o homogenní populace. Je ale potřeba vyšetřit více izolátů, abychom mohli potvrdit tyto výsledky.

Jeden kmen HiNT izolovaný z likvoru vykazoval ST-6 typický pro Hib. U tohoto kmenu by se mohlo jednat o Hib, který ztratil schopnost tvořit pouzdro.

Charakterizace dalších 49 kmenů HiNT metodou MLST prokázala, že se jedná o heterogenní populaci, geneticky odlišnou od populace Hib. Sekvenční typy jsou velmi diferencované, žádný nenáleží do klonálního komplexu cc6 a zůstávají nezařazeny do klonálního komplexu (označení UA).

Charakterizace *H. influenzae* metodou MLST, která byla prováděna v rámci projektu CZ0127 „Sekvenční charakterizace vybraných bakteriálních agens působících závažná onemocnění v ČR“, přispěla nejen k objasnění epidemiologie závažných forem hemofilových invazivních onemocnění (meningitida, sepse) ohrožujících zejména děti a mladistvé, ale i k objasnění onemocnění horních cest dýchacích a i dalších neinvazivních onemocnění.

Získaná data byla vložena do celosvětové MLST databáze. Globální analýza sekvenčních dat umožní vývoj nových vakcín genetickými metodami. Mezinárodní sdílení sekvenčních dat bakteriálních kmenů izolovaných v České republice je pro vývoj vakcín velmi významné proto, že české bakteriální populace jsou odlišné od populací západoevropských a řešitelské pracoviště disponuje rozsáhlými sbírkami izolátů pokrývající období třiceti let.

Výsledky získané řešením projektu budou poskytovány Ministerstvu zdravotnictví ČR a stanou se podkladem k aktualizaci programů surveillance jednotlivých infekčních onemocnění včetně vakcinačních strategií.

Literatura

1. **Křížová, P., Kalmusová, J., Lebedová, V., Felsberg, J., Haugvicová, R.** Charakterizace kmenů *Haemophilus influenzae* metodou multilokusové sekvenační typizace. *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, 2004, 53, 2, p. 74–77.
2. **Lebedová, V., Beneš, Č., Kalmusová, J., Křížová, P.** Závažná onemocnění způsobená *Haemophilus influenzae* v České republice v roce 2009. *Zprávy EM*, 2010, 19, 1–2, p. 31–34.
3. **Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G. et al.** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 6, p. 3140–3145.
4. **Meats, E., Feil, E. J., Stringer, S., Cody, A. J. et al.** Characterization of encapsulated and noncapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, 41, 4, p. 1623–1636.
5. Metodická opatření – Metodický návod k zajištění surveillance programu invazivních onemocnění způsobených *H. influenzae* b. *Věstník MZ ČR*, prosinec 2002, částka 13, p. 15–19.
6. Metodická opatření – Zajištění surveillance programu invazivních onemocnění způsobených *H. influenzae* b. *Věstník MZ ČR*. Duben 1999, částka 3, p. 1–4.
7. **Mironov, K. O., Platonov, A. E., Nikolaev, M. K., Koroleva, I. S., Shipulin, G. A.** Genetic characteristic of *Haemophilus influenzae* type B strains isolated in Russian regions. *Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 2010, 1, p. 24–28.
8. **Mukundan, D., Ecevit, Z., Patel, M., Marrs, C. F., Gilsdorf, J. R.** Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45, 10, p. 3207–3217.
9. **Oh, S. Y., Griffiths, D., John, T., Lee, Y. C. et al.** School-aged children: a reservoir for continued circulation of *Haemophilus influenzae* type b in the United Kingdom. *J. Infect. Dis.,* 2008, 197, 9, p. 1275–1281.
10. **Platonov, A. E., Mironov, K. O., Iatsyshina, S. B., Koroleva, I. S. et al.** Multilocus sequence-typing for characterization of Moscow strains of *Haemophilus influenzae* type b. *Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol.*, 2003, 2, p. 21–25.
11. **Sacchi, C. T., Alber, D., Dull, P., Mothershed, E. A. et al.** High level of sequence diversity in the 16S rRNA genes of *Haemophilus influenzae* isolates is useful for molecular subtyping. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, 8, p. 3734–3742.
12. **Sá-Lečo, R., Nunes, S., Brito-Avô, A., Alves, C. R. et al.** High rates of transmission of and colonization by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* within a day care center revealed in a longitudinal study. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, 46, 1, p. 225–234.
13. **Schouls, L. M., van der Ende, A., van de Pol, I., Schot, C. et al.** Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in the Netherlands. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, 6, p. 2741–2749.

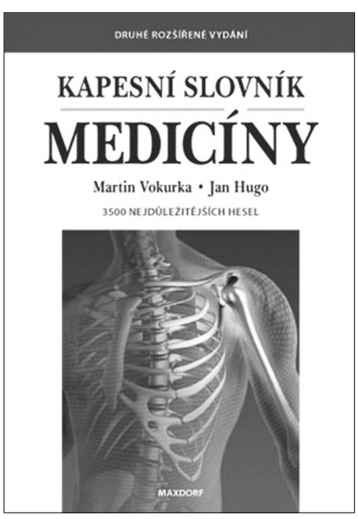
Epidemiologie 4-010 6.12.2010 11:02 Str. 196
proLékaře.cz | 29.12.2026

14. **Skoczynska, A., Kadlubowski, M., Empel, J., Hryniewicz, W.** Characteristics of *Haemophilus influenzae* type b responsible for meningitis in Poland from 1997 to 2004. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, 43, 11, p. 5665–5669.
15. **Slack, M. P. E.** *Haemophilus*. In Parker, M. T., Collier, L. H. (eds). *Topley & Wilsones principles of bacteriology, virology and immunity.* 8th ed. Philadelphia and Hamilton: B. C. Decker Inc., 1990, 2, p. 355–382, ISBN 1-55664-290-3.
16. **Tian, G., Zhang, L., Li, M., Wang, X. et al.** Genotypic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric pneumonia patients in Chengdu city, Sichuan, China. *J. Microbiol.*, 2009, 47, 4, p. 494–497.
17. **Tsang, R. S., Mubareka, S., Sill, M. L., Wylie, J. et al.** Invasive *Haemophilus influenzae* in Manitoba, Canada, in the postvaccination era. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44, 4, p. 1530–1535.
18. **Urwin, R., Maiden, M. C.** Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol*., 2003, 11, 10, p. 479–487.
19. Úřední věstník Evropské unie 2008/426/ES, Rozhodnutí komise ze dne 28. dubna 2008, kterým se mění rozhodnutí 2002/253/ES, kterým se stanoví definice případů pro hlášení přenosných nemocí do sítě Společenství podle rozhodnutí Evropského parlamentu a Rady č. 2119/98/ES (oznámeno pod číslem K(2008) 1589), L 159/46-159/90.
20. Vyhláška MZ ČR ze dne 6. prosince 2000, o očkování proti infekčním nemocem. Sbírka zákonů č. 439/2000, částka 121, s. 5788–5792.
21. Vyhláška MZ ČR ze dne 29. listopadu 2006, o očkování proti infekčním nemocem. Sbírka zákonů č. 537/2006, částka 174, s. 7282–7288.
22. Vyhláška MZ ČR ze dne 17. prosince 2008, o systému epidemiologické bdělosti pro vybrané infekce. Sbírka zákonů č. 473/2008, částka 151, s. 8010–8043.
23. **Žemličková, H., Urbášková, P., Adámková, V., Motlová, J. et al.** 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, 6, p. 1179–1187.

Poděkování: *Sekvenční charakteristika izolátů H. influenzae byla podpořena projektem CZ0127 „Sekvenční charakterizace vybraných bakteriálních agens působících závažná onemocnění v ČR“ [http://www.sekvenace.cz/]. Definování alel a sekvenčních typů bylo provedeno srovnáním sekvenčních dat s hemofilovou MLST databází [http://haemophilus.mlst.net/]. Za technickou pomoc autoři děkují laborantkám Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz OML SZÚ Praha. Autoři děkují všem mikrobiologům, epidemiologům a klinickým lékařům za spolupráci při realizaci programu surveillance invazivního hemofilového onemocnění v České republice a zejména za posílání izolátů H. influenzae do NRL.*

Do redakce došlo 22. 7. 2010.

MUDr. Věra Lebedová
Národní referenční laboratoř pro hemofilové nákazy
Oddělení vzdušných bakteriálních nákaz
Státní zdravotní ústav
Šrobárova 48
100 42 Praha 10
e-mail: lebedova@szu.cz



KAPESNÍ SLOVNÍK MEDICÍNY (2. VYDÁNÍ)

Martin Vokurka, Jan Hugo

Druhé rozšířené vydání kapesní verze lékařského slovníku obsahuje přibližně 3500 nejdůležitějších lékařských termínů. Kniha je zdrojem základních informací o zdraví a nemocech pro nejširší čtenářskou obec.

Vydalo nakladatelství Maxdorf v roce 2008, 192 str.. cena 195 Kč, formát A6, brož., ISBN: 978-80-7345-163-9.

Objednávky můžete posílat na adresu: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz. Na objednávce laskavě uveďte i jméno časopisu, v němž jste se o knize dozvěděli.