



Infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* entre 2002 e 2010: caracterização molecular e padrão de suscetibilidade aos antibióticos

Maria Paula Bajanca-Lavado¹, Alexandra S. Simões²,
Célia Rodrigues Betencourt¹, Raquel Sá-Leão²,
em nome de "The Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive infection"

paula.lavado@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Respiratórias a Agentes Bacterianos. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Laboratório de Microbiologia Molecular de Patógenos Humanos. Instituto de Tecnologia Química e Biológica, Universidade Nova de Lisboa.

Introdução

Haemophilus influenzae pode causar infeções graves, como pneumonia, septicemia e meningite, tanto em crianças como em adultos (1,2). Até à data foram identificados seis tipos capsulares de *Haemophilus influenzae*, classificados de a-f. No entanto, a maior parte das estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas são não-capsuladas (HiNC) (1). *Haemophilus influenzae* serotipo b (Hib) foi a principal causa de elevada morbidade e mortalidade, particularmente em crianças com menos de 5 anos de idade (1). A introdução da vacina conjugada para o Hib na maior parte dos países do mundo levou à diminuição acentuada da incidência da doença neste grupo etário (1). Este facto resultou, contudo, num aumento da incidência da infeção com estirpes não-b, especialmente estirpes HiNC, em todos os grupos etários (1,2). Em Portugal, a vacinação para o Hib, introduzida no Programa Nacional de Vacinação (PNV) em Junho de 2000, foi indicada para todas as crianças em idade pré-escolar (≤ 5 anos de idade), sendo composta por 4 doses, administradas aos 2, 4, 6 e 18 meses de idade (3).

Os antibióticos β -lactâmicos têm sido utilizados no tratamento das infeções por *Haemophilus influenzae*, mas a resistência a esta classe de antibióticos emergiu e disseminou-se por todo o mundo (4). Têm sido descritos dois mecanismos de resistências aos β -lactâmicos: um que envolve a hidrólise enzimática dos β -lactâmicos pelos enzimas TEM-1 ou ROB-1, e outro que envolve a diminuição de afinidade para a proteína de ligação à penicilina (PBP3), devido a mutações no gene *ftsI*, que a codifica (4). Do ponto de vista fenotípico, *Haemophilus influenzae* pode ser de-

signado de acordo com o seu mecanismo de resistência, considerando os "breakpoints" do EUCAST (5), classificando as estirpes como estirpes sensíveis à ampicilina e não produtoras de β -lactamase (BLNAS), estirpes resistentes à ampicilina e não produtoras de β -lactamase (BLNAR) e estirpes resistentes à ampicilina e produtoras de β -lactamase (BLPAR) (6,7).

Objetivo

Este estudo tem como objetivo a caracterização molecular e a determinação da suscetibilidade aos antibióticos de estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas de doentes diagnosticados com infeção invasiva, entre 2002 e 2010, após a introdução da vacina conjugada para o Hib.

Os resultados deste trabalho serão, ainda, discutidos com os obtidos num estudo anterior, relativo a casos com infeção invasiva diagnosticados na era pré-vacinal (1989-2001) (8).

Materiais e métodos

Fonte de dados: O Laboratório Nacional de Referência de Infeções Respiratórias a Agentes Bacterianos (URIR-agentes bacterianos) é o laboratório de referência para o *Haemophilus influenzae*, responsável pela vigilância das infeções invasivas por este agente etiológico. Iniciado em 1989, o sistema de vigilância inclui como fonte de dados, 28 laboratórios hospitalares distribuídos por todas as regiões do país. Entre 1 de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2010, estes laboratórios isolaram e identificaram estirpes invasivas de *Haemophilus influenzae* e, de forma voluntária, enviaram ao laboratório de referência no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) para posterior caracterização.

Caraterização do serotipo capsular: O DNA foi extraído pelo método de fervura. A caraterização do serotipo capsular foi realizada utilizando os primers e as condições descritas por Falla TJ e colaboradores (9).

Determinação da susceptibilidade aos antibióticos: A resistência à ampicilina por produção de β -lactamase foi pesquisada pelo método colorimétrico, utilizando nitrocefina como substrato. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM, mg/L) foi realizada pelo método de microdiluição em placa (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA) para 13 antibióticos (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefaclor, cefuroxima, ceftriaxone,

cefepime, meropenem, cloranfenicol, tetraciclina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, ciprofloxacina e azitromicina). Os valores de "breakpoints" considerados foram os recentemente preconizados pelo EUCAST (5). O antibiótico cefaclor não foi analisado por, ainda, não existirem "breakpoints" estabelecidos pelo EUCAST. Como controlos foram utilizadas as estirpes de referência: ATCC49247 (BLNAR), ATCC10211 (BLNAS) e NCTC11315 (BLPAR).

Determinação genética da resistência à ampicilina: A deteção do gene *bla*_{TEM-1}, que codifica a enzima β-lactamase, foi realizada para todas as estirpes BLPAR, utilizando os primers e as condições descritas por Mendonça e colaboradores (10). Alterações nas PBP3 foram investigadas nos isolados não produtores de β-lactamase, com CIM à ampicilina ≥1mg/L, sequenciando a região do gene *ftsI*, como previamente descrito (11). As sequências foram comparadas com as de *Haemophilus influenzae* RD KW20 (nº de acesso NC_000907).

Análise estatística: Para a descrição das características demográficas recorreu-se ao cálculo de frequências absolutas e relativas. Na análise univariada, a intensidade da associação entre variáveis foi estudada aplicando o teste do chi-quadrado. Para todos os testes estatísticos utilizados foi considerado um nível de significância de 5%.

_Resultados

Entre 1 de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2010 foram recebidas pelo Laboratório de Referência do INSA 144 estirpes isoladas de doentes com infeção invasiva por *Haemophilus influenzae*, que foram enviadas pelos 28 laboratórios hospitalares envolvidos no sistema de vigilância.

Os produtos biológicos das estirpes isoladas foram: sangue (n=109; 75,7%), líquido cefalorraquidiano (LCR) (n=29; 20,1%) e líquido pleural (n=6; 4,2%). Em relação aos 144 doentes, de quem as estirpes de *Haemophilus influenzae* foram isoladas, verificou-se que 59% (85/144) eram do género masculino. Em relação à distribuição etária, 44 (30,6%) doentes pertenciam ao grupo etário ≤5 anos de idade, 15 (10,4%) eram crianças entre os 6 e os 18 anos e 85 (59%) eram adultos com idade superior a 18 anos.

Serotipos capsulares: Do total dos 144 isolados, 111 (77,1%) foram caracterizados como *Haemophilus influenzae* não capsulados e 22,9% como *Haemophilus influenzae* capsulados, sendo 13,2% do serotipo b, 6,9% do serotipo f, 2,1% do serotipo a e 0,7% do sero-

tipo d. A distribuição dos serotipos por ano de isolamento está representada no **Gráfico 1**.

Em 11 crianças, com idade inferior a 18 anos, foi diagnosticada infeção invasiva a Hib. Sete destas crianças pertenciam ao grupo etário ≤ 5 anos. O estado vacinal foi conhecido em seis crianças, cinco das quais estavam a cumprir o PNV.

Suscetibilidade aos antibióticos e produção de β-lactamase: A determinação da suscetibilidade aos antibióticos foi realizada em isolados pertencentes a 142 doentes (**Tabela 1**). A resistência à ampicilina foi encontrada em 20 isolados (14,1%) (15 BLPAR, 5 BLNAR). Observou-se resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefepime e cefotaxima em 1,4%, 4,2% e 3,5% dos isolados respetivamente. A não suscetibilidade (I+R) à cefuroxima (i.v.) e tetraciclina foi detetada em 16,9% e 2,1% dos isolados respetivamente. Para o trimetoprim-sulfametoxazol, 20,4% dos isolados eram não suscetíveis. Todos os isolados foram suscetíveis ao meropenem, à ciprofloxacina, ao cloranfenicol e à rifampicina e intermédios à azitromicina. Até ao momento não existem breakpoints definidos pelo EUCAST (5) para o cefaclor.

Determinantes genéticos da resistência aos β-lactâmicos: Observou-se que todas as 15 estirpes BLPAR isoladas, entre 2002 e 2010, apresentavam o mesmo gene *bla*_{TEM-1}. O gene *ftsI* foi analisado em cinco isolados BLNAR e em sete isolados adicionais, sensíveis à ampicilina, com CIM de 1 mg/L, uma vez que mutações observadas neste gene têm sido associadas a CIMs desta ordem de grandeza (6,12). Onze isolados apresentaram mutações no domínio da transpeptidase, sendo classificados como gBLNAR (**Quadro 1**). As substituições aminoacídicas mais frequentes foram Asn526Lys (10/11; 90,9%) e Asp350Asn (9/11; 81,9%) (6,13). Um isolado com CIM à ampicilina=2mg/L não apresentou mutações no gene *ftsI*.

_Discussão

Em Portugal é escassa a informação sobre a infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*. Tendências temporais foram descritas apenas para o período entre 1989 e 2001 (8). Nesse estudo foram apresentadas as alterações ao nível da cápsula e da suscetibilidade aos antibióticos entre as estirpes invasivas obtidas em três períodos, que compreenderam a era pré-vacinal (1989-1993), o período em que a vacina esteve disponível mas não fazia parte do PNV (1994-1999) e os primeiros 18 meses que se seguiram à introdução da vacina no PNV (2000-2001) (8).

artigos breves_ n. 4

No estudo atual, observou-se que durante o período 2002-2010, as estirpes de Hib foram responsáveis por 13,2% (19/144) do total das infeções invasivas identificadas, um valor significativamente mais baixo do que o observado na era pré-vacina (81%, $p < 0,001$) e comparável ao do valor obtido para os primeiros 18 meses que se seguiram à introdução da vacina no PNV (16%, $p = 0,71$) (8). Obser-

vou-se, ainda neste estudo, que o HiNC foi responsável pela maior parte dos casos de infeção invasiva (77,1%; 111/144), um aumento significativo quando comparado com a era pré-vacinal (19,0%, $p < 0,001$), e comparável aos primeiros 18 meses que se seguiram após a inclusão da vacina no PNV (80,0%, $p = 0,75$) (8).

Tabela 1: Suscetibilidade aos antibióticos dos 142 doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*, 2002-2010.

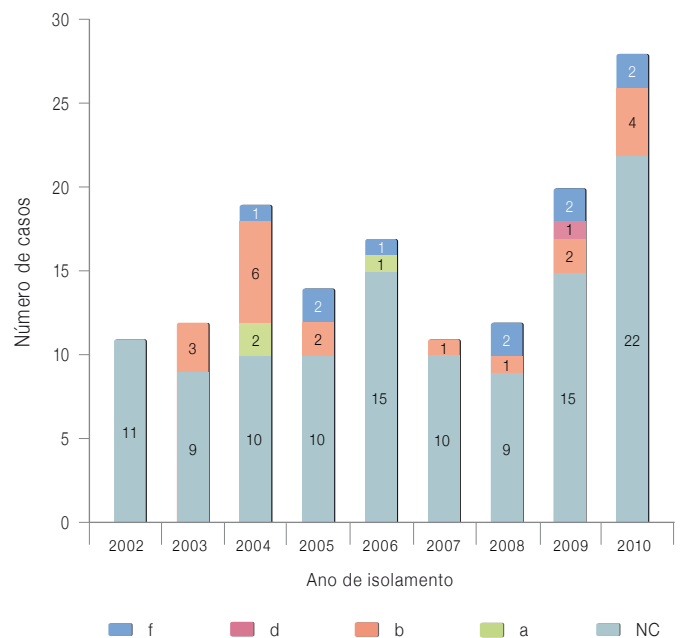
Antibiótico	Padrão de suscetibilidade (%)		
	S	I	R
Ampicilina	85,9	0	14,1
Amoxicilina/ácido clavulânico	98,6	0	1,4
Cefepime	95,8	0	4,2
Cefotaxima	96,5	0	3,5
Cefuroxima (i.v.)	83,1	8,45	8,45
Meropenem	100	0	0
Ciprofloxacina	100	0	0
Azitromicina	0	100	0
Tetraciclina	97,9	0	2,1
Cloranfenicol	100	0	0
Rifampicina	100	0	0
Trimetoprim-sulfametoxazole	79,6	0,7	19,7

S=Sensível; I=Intermédio; R=Resistente

Os "breakpoints" considerados são os preconizados pelo EUCAST (5)

O antibiótico cefaclor não foi analisado por não existir valor de "breakpoints" estabelecido pelo EUCAST (5)

Gráfico 1: Distribuição dos serotipos de 144 doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* por ano de isolamento, 2002-2010.



Quadro 1: Substituições de aminoácidos identificadas no domínio da transpeptidase do gene *ftsI* dos isolados gBLNAR.

Grupo ^a	Nº de isolados não produtores de β -lactamase ^b	Substituições de aminoácidos											
		Próximo do motivo SSN		Próximo do motivo KTG									
		Asp350	Met377	Ala437	Ile449	Gly490	Ala502	Arg517	Asn526	Ala530	Thr532	Val547	Asn569
I	1	Asn	Ile					His			Ser	Ile	
IIb	1	Asn		Ser	Val					Lys		Ile	Ser
	2	Asn	Ile				Val			Lys		Ile	Ser
	1	Asn	Ile			Glu	Val			Lys		Ile	Ser
	3	Asn				Glu				Lys	Ser		
	1						Val			Lys			
	1	Asn								Lys		Ile	Ser
	1					Glu	Val			Lys		Ile	Ser

^a Grupos e subgrupos definidos de acordo com Ubukata *et al* and Dabernat *et al* (6, 13)

^b Uma das estirpes estudada não apresentava mutações no gene *ftsI*, apesar da CIM de 2 mg/L à ampicilina e à amoxicilina/ácido clavulânico

artigos breves_ n. 4

Noutros países, onde esta vacina foi introduzida, também tem sido descrito um decréscimo significativo da infeção a Hib, em crianças, com um aumento concomitante das infeções invasivas a HiNC (14-17).

Os resultados obtidos no trabalho que agora se apresenta sugerem a emergência de serotipos não-b, uma vez que no período pré-vacinal é conhecido um único caso de doença invasiva por serotipo não b (uma estirpe do serotipo f, isolada em 2001) (8). Neste estudo foram caracterizadas estirpes dos serotipos f (n=10), a (n=3) e d (n=1). Estirpes de serotipo f têm sido igualmente responsáveis por infeção invasiva noutros países europeus (18-20). Em 2009, isolou-se e caracterizou-se em Portugal uma estirpe de serotipo d, responsável por uma meningite numa criança de 5 meses, tendo sido o primeiro caso declarado na Europa (21). Este serotipo, descrito como um serotipo que não provoca infeção, é raro e está normalmente associado a adolescentes e adultos (22).

No decorrer do estudo foram diagnosticadas 5 crianças, entre os 6 meses e os 2 anos de idade, com infeção invasiva a Hib. Estas crianças estavam a cumprir o PNV, tendo uma delas completado o ciclo de vacinação e às outras terem já sido administradas entre duas e três doses da vacina para o Hib. Este facto, alerta para a possibilidade de falências vacinais, de acordo com a definição (23), que merecem atenção das entidades competentes, bem como estudos complementares sobre o estado imunitário das crianças em causa (23).

A resistência aos antibióticos é uma questão preocupante, especialmente com o aumento da deteção, em todo o mundo, de estirpes BLNAR (24-27). A deteção deste fenótipo é clinicamente relevante, uma vez que estas estirpes têm uma resposta diminuta aos antibióticos β -lactâmicos e, simultaneamente, não são alvo do ácido clavulânico. Em Portugal, este fenótipo de resistência tem sido descrito desde 1992 estando normalmente associada com infeções respiratórias (28, 29).

Neste estudo foram identificadas 11 estirpes gBLNAR (CIM à ampicilina de 1-2 mg/L), todas com mutações associadas à resistência à ampicilina, no gene *ftsI* (6, 13). Apesar de as estirpes com uma CIM à ampicilina de 1 mg/L serem consideradas sensíveis pelo EUCAST (5, 30, 31), os resultados obtidos estão de acordo com os de outros estudos que têm detetado mutações no gene *ftsI* destas estirpes, resultando em substituições de aminoácidos nas PBP3, que são responsáveis pela diminuição de suscetibilidade à ampicilina (6, 12, 13, 32).

A produção de β -lactamase foi observada em 10,4% (15/144) dos isolados obtidos dos doentes com infeção invasiva a *Haemophilus influenzae*, um valor mais baixo do que o observado no estudo anterior (26,9%, $p=0,05$) (8).

Apesar de a frequência das estirpes BLPAR ser muito diferente nos dois estudos em comparação, este facto não contribuiu para as diferenças nas resistências obtidas: no estudo prévio, a produção de β -lactamase foi observada em 31,9% e 19,6% das estirpes b e HiNC, respetivamente; no presente estudo observou-se 5,3% e 12,6%, respetivamente para Hib e HiNC. Apesar da frequência elevada de estirpes produtoras de β -lactamase, descrita no Japão (31), na Europa e nos Estados Unidos, tem-se assistido a uma diminuição da frequência de estirpes com esse mecanismo de resistência (24,34).

Relativamente a outros antibióticos, é de assinalar o decréscimo da resistência à tetraciclina (16,0% vs 2,1%) e ao cloranfenicol (10,1% vs 0%). Estes resultados podem ser atribuídos à diminuição do serotipo b, uma vez que estas estirpes estavam associadas a este fenótipo de resistência.

_Conclusão

Apesar das limitações deste estudo, relacionadas com a representatividade dos sistemas de vigilância de base laboratorial, pretendeu-se, no entanto, caracterizar a infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* em doentes, cujas estirpes foram enviadas ao INSA. De qualquer modo, foram recebidos isolados de 28 hospitais de todo o país, pelo que os resultados obtidos, entre 2002 e 2010, podem fortemente refletir o perfil epidemiológico da infeção invasiva a *Haemophilus influenzae* em Portugal.

Os resultados deste estudo mostram que a implementação da vacina para o Hib no PNV resultou numa redução efetiva do número de casos de Hib que causam doença invasiva. Igualmente, constatou-se uma diminuição acentuada no padrão de resistência aos antibióticos, em particular à ampicilina, e verificou-se que a maior parte dos casos de doença invasiva a *Haemophilus influenzae*, que ocorreram em Portugal durante este período, são agora devidos a estirpes HiNC susceptíveis.

Em conclusão, este estudo demonstra, só por si, a importância de se avaliar os sistemas nacionais de vigilância atualmente existentes e de se articular a componente clínica, laboratorial e epidemiológica desses mesmos sistemas para, assim, melhor se conhecer e monitorizar a infeção por *Haemophilus influenzae* e por outros agentes infecciosos em Portugal.

_Agradecimentos

Aos membros do "The Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive infection" pelo envio das estirpes de *Haemophilus influenzae*: Centro Hospitalar do Barreiro Montijo, Centro Hospitalar de Coimbra, Centro Hospitalar de Lisboa Central, Centro Hospitalar Lisboa Norte, Centro Hospitalar de Lisboa Ocidental, Centro Hospitalar do Porto, Centro Hospitalar de S. João, Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, Centro Hospitalar Vila Nova de Gaia-Espinho, Hospital de Faro, Hospital Dr. Nélio Mendonça, Funchal, Hospital Espírito Santo, Évora, Hospital Garcia de Orta, Almada, Hospital Infante D. Pedro, Aveiro, Hospital Professor Doutor Fernando da Fonseca, Amadora, Hospital de Santa Luzia, Viana do Castelo, Hospital de São Teotónio, Viseu, Instituto Nacional de Saúde, Porto, Hospital Reynaldo dos Santos, Vila Franca de Xira, Hospital dos SAMS, Lisboa, Hospital de Vila Real; À Doutora Manuela Caniça, Responsável pelo Laboratório de Resistência aos Antibióticos e Infecções Associadas aos Cuidados de Saúde pela colaboração e apoio na coleção de estirpes de *Haemophilus influenzae*; À Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, et al. Burden of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*. 2009;374(9693):903-11.
- (2) Rubach MP, Bender JM, Mottice S, et al. Increasing incidence of invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults, Utah, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(9):1645-50. [LINK](#)
- (3) Direção-Geral da Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2006. Ed. ver. Lisboa: DGS, 2005. (Orientações técnicas; 10), p.18. [LINK](#)
- (4) Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(2):368-89. [LINK](#)
- (5) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. V. 4.0, 2014 (válida desde 1/1/2014). [LINK](#)
- (6) 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(6):1693-9. [LINK](#)
- (7) Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist*. 2003;9(1):39-46.
- (8) Bajanca P, Canica M. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *J Clin Microbiol*. 2004;42(2):807-10. [LINK](#)
- (9) Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, et al. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(10):2382-6. [LINK](#)
- (10) Mendonca N, Ferreira E, Canica M. Occurrence of a novel SHV-type enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum beta-lactamase-producing evaluation. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56(4):415-20
- (11) Cerquetti M, Giufre M, Cardines R, et al. First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(9):3155-61. [LINK](#)
- (12) Barbosa AR, Giufre M, Cerquetti M, et al. 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(4):788-96. [LINK](#)
- (13) Dabernat H, Delmas C, Seguy M, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2208-18. [LINK](#)
- (14) Livorsi DJ, Macneil JR, Cohn AC, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* in the United States, 1999-2008: epidemiology and outcomes. *J Infect*. 2012;65(6):496-504.
- (15) Ulanova M, Tsang RS. Invasive *Haemophilus influenzae* disease: changing epidemiology and host-parasite interactions in the 21st century. *Infect Genet Evol*. 2009;9(4):594-605.
- (16) Giufre M, Cardines R, Caporali MG, et al. Ten years of Hib vaccination in Italy: prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. *Vaccine*. 2011;29(22):3857-62.
- (17) Kastrin T, Paragi M, Kolman J, et al. Characterisation of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Slovenia, 1993-2008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(6):661-8.
- (18) Ladhani SN, Collins S, Vickers A, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* serotype e and f disease, England and Wales. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(5):725-32. [LINK](#)
- (19) Campos J, Hernando M, Roman F, et al.; Group of Invasive *Haemophilus* Infections of the Autonomous Community of Madrid, Spain. Analysis of invasive *Haemophilus influenzae* infections after extensive vaccination against *H. influenzae* type b. *J Clin Microbiol*. 2014;42(2):524-9. [LINK](#)
- (20) Bruun B, Gahrn-Hansen B, Westh H, et al. Clonal relationship of recent invasive *Haemophilus influenzae* serotype f isolates from Denmark and the United States. *J Med Microbiol*. 2004;53(Pt 11):1161-5. [LINK](#)
- (21) Calado R, Betencourt C, Goncalves H, et al. Complicated meningitis caused by a rare serotype of *Haemophilus influenzae* in Portugal. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(1):111-3.
- (22) Ladhani S, Slack MP, Heath PT, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(3):455-63. [LINK](#)
- (23) Ladhani S, Heath PT, Ramsay ME, et al. Long term immunological follow-up of children with *Haemophilus influenzae* serotype b vaccine failure in the United Kingdom. *Clin Infect Dis*. 2009;49(3):372-80. [LINK](#)
- (24) Garcia-Cobos S, Campos J, Cercenado E, et al. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for beta-lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(8):2760-66. [LINK](#)
- (25) Resman F, Ristovski M, Forsgren A, et al. Increase of beta-lactam-resistant invasive *Haemophilus influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4408-15. [LINK](#)
- (26) Shuel ML, Tsang RS. Canadian beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* isolates showing decreased susceptibility toward ampicillin have significant penicillin binding protein 3 mutations. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009;4(4):379-83.
- (27) Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):3969-76. [LINK](#)
- (28) Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist*. 2001;7(1):33-8.
- (29) Bajanca-Lavado MP, Casin I, Vaz Pato MV. Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal. The Multicentre Study Group. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38(4):615-25.
- (30) Garcia-Cobos S, Arroyo M, Perez-Vazquez M, et al. Evaluation of the EUCAST disc diffusion susceptibility testing method for *Haemophilus influenzae* based on the resistance mechanism to beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 2012;68(1):159-63.
- (31) Sondergaard A, Petersen MT, Fuursted K, et al. Detection of N526K-substituted penicillin-binding protein 3 conferring low-level mutational resistance to beta-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* by disc diffusion testing on Mueller-Hinton agar according to EUCAST guidelines. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(6):1401-4.
- (32) Garcia-de-Lomas J, Lerma M, Cebrian L, et al. Influence of *Haemophilus influenzae* beta-lactamase production and/or *ftsI* gene mutations on in vitro activity of and susceptibility rates to aminopenicillins and second- and third-generation cephalosporins. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(2):190-2.
- (33) Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, et al. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000-2011. *J Infect Chemother*. 2013;19(1):34-41.
- (34) Heilmann KP, Rice CL, Miller AL, et al. Decreasing prevalence of beta-lactamase production among respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(6):2561-4. [LINK](#)