

Haemophilus influenzae: características fenotípicas de las cepas aisladas en 12 hospitales catalanes durante un año

Cristina Latorre, Isabel Sanfeliu y Grupo de Trabajo de Hospitales Comarcales de Cataluña^a

^aGrupo de Trabajo de Hospitales Comarcales de Cataluña: Montserrat Sierra, Carme Gallés, Carmina Martí, Xavier Raga, Josefina Guimerà, Teresa Bastida, Josep Manuel Villó, Asunción Gasós, Anna Vilamala, María Antònia Morera (Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues; Corporació Parc Taulí, Sabadell; Hospital de Barcelona SCIAS, Barcelona; Hospital de Calella; Hospital de Granollers; Hospital Sant Pau i Santa Tecla, Tarragona; Hospital de Sant Celoni; Hospital de l'Esperit Sant, Santa Coloma; Pius Hospital de Valls; Hospital Sant Joan de Déu, Martorell; Hospital de l'Alt Penedès, Vilafranca y Consorci Sanitari de Terrassa). España.

INTRODUCCIÓN. El propósito del presente trabajo es conocer las características antigenicas, bioquímicas, de sensibilidad a antibióticos y mecanismos de adquisición de resistencia de las cepas de *Haemophilus influenzae* aisladas en diversos hospitales de Cataluña, como exponente de la situación actual en nuestra zona.

MÉTODOS. Se estudió el serotipo, biotipo y la producción de betalactamasa, así como la sensibilidad a ocho antimicrobianos (ampicilina, cefuroxima, cefotaxima, cefixima, claritromicina, cotrimoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacino) de 497 cepas de *H. influenzae* aisladas durante un año (1-05-1999 a 30-04-2000) en 12 hospitales de Cataluña.

RESULTADOS. El 97,5% de las cepas fueron no tipificables. De entre las cepas capsuladas, sólo el 50% correspondían al serotipo b, siendo todas ellas de niños menores de 5 años. Hubo un predominio del biotipo II, aunque no se detectó tropismo etario ni patológico de ningún biotipo. Nuestra serie confirma la tendencia ya constatada en nuestra zona a la disminución de resistencia a ampicilina por producción de betalactamasa, especialmente en cepas de origen pediátrico; en pediatría prevalecieron en cambio las cepas betalactamasa negativas resistentes a ampicilina (BNRA) sobre las aisladas de adultos. Se detectó una cepa resistente a ciprofloxacino.

CONCLUSIONES. En nuestra zona hay pocas infecciones por *H. influenzae* capsulado y ha disminuido la importancia relativa del serotipo b. Hay tendencia a adquisición de resistencia a ampicilina por mecanismos alternativos a la producción de betalactamasa. Debe vigilarse la sensibilidad a ciprofloxacino para detectar posibles fallos terapéuticos en tratamientos con esta quinolona.

Palabras clave: *Haemophilus influenzae*. Betalactamasa. Resistencia. Estudio multicéntrico.

Correspondencia: Dra. C. Latorre.
Servicio de Microbiología.
Hospital Universitari Sant Joan de Déu.
Pº Sant Joan de Déu, 2. 08950 Esplugues. Barcelona. España.
Correo electrónico: clatorre@hsjdbcn.org

Manuscrito recibido el 20-11-2001; aceptado el 22-07-2002.

126 Enferm Infect Microbiol Clin 2003;21(3):126-30

Haemophilus influenzae: phenotype characteristics of strains isolated in 12 Catalan hospitals over one year

INTRODUCTION. The purpose of this study was to investigate the antigenic and biochemical characteristics, antibiotic susceptibility, and mechanisms for acquiring resistance of *Haemophilus influenzae* strains isolated in several Catalan hospitals, to determine the current situation regarding this microorganism in our area.

METHODS. Serotype, biotype and betalactamase production, as well as susceptibility to eight antimicrobial agents (ampicillin, cefuroxime, cefotaxime, cefixime, clarithromycin, co-trimoxazole, chloramphenicol and ciprofloxacin) were determined in 497 *H. influenzae* strains isolated from 1 May 1999 to 30 April 2000 in 12 Catalan hospitals.

RESULTS. Among the total, 97.5% of strains were nontypable and 50% of the encapsulated strains were serotype b (all isolated from children under 5 years old). There was a predominance of biotype II, though no age or pathologic tropism was found among any of the biotypes. Our series confirms the previously reported trend to decreasing betalactamase mediated ampicillin resistance in our area, mainly in strains from pediatric patients. More betalactamase negative ampicillin-resistant strains (BLNAR) were isolated in children than in adults. One ciprofloxacin-resistant strain was detected.

CONCLUSIONS. Infections caused by encapsulated *H. influenzae* strains are infrequent in our area and the relative importance of serotype b is decreasing. Mechanisms for acquiring ampicillin resistance other than betalactamase production are emerging. Surveillance of ciprofloxacin susceptibility is required to predict therapeutic failures with this quinolone.

Key words: *Haemophilus influenzae*. Betalactamase. Resistance. Multi-center study.

Introducción

Haemophilus influenzae es uno de los principales microorganismos productores de enfermedad comunitaria,

sobre todo de origen respiratorio¹. Hasta la introducción de la vacunación sistemática con vacuna conjugada anti-*H. influenzae* tipo b, este serotipo era, asimismo, una de las principales causas de meningitis y de otras enfermedades invasivas en pacientes pediátricos de Norteamérica y Europa^{2,3}, aunque la incidencia en Cataluña era muy inferior a la de los países anglosajones⁴⁻⁶.

Paralelamente a la incidencia decreciente, su sensibilidad *in vitro* a ciertos macrólidos, como es el caso de claritromicina⁷, también está disminuyendo, y se describe con cierta frecuencia la adquisición de resistencia a ampicilina por alteración de proteínas fijadoras de la penicilina (*penicillin binding proteins* o PBP), mecanismo distinto del enzimático clásico (cepas betalactamasa negativas resistentes a ampicilina, en adelante cepas BNRA)^{8,9}. Asimismo han aparecido nuevos fenotipos de resistencia como el de cepas betalactamasa positivas resistentes a amoxicilina/ácido clavulánico¹⁰ o el de resistencia a ciprofloxacino¹¹. Es, además, un hecho generalizado la resistencia a otros antibacterianos que podrían ser útiles frente a este microorganismo, como cotrimoxazol o cloranfenicol^{9,12}. Esta situación justifica el uso de cefalosporinas para el tratamiento de algunas infecciones producidas por *H. influenzae*¹³.

El propósito del presente trabajo es conocer las características antigenicas, bioquímicas, de sensibilidad a antibióticos y mecanismos de adquisición de resistencia de las cepas de *H. influenzae* aisladas en diversos hospitales de Cataluña como exponente de la situación actual en nuestra zona.

Métodos

Se estudiaron 497 cepas de *H. influenzae* aisladas de pacientes con diversos procesos patológicos durante un año, desde el 1 de mayo de 1999 al 30 de abril de 2000, en 12 hospitales de Cataluña. Se trata de hospitales niveles A, B o C, con un número de camas que oscila entre 96 y 563. No se siguió ningún criterio selectivo para escoger las cepas, incluyéndose todas las identificadas en los citados hospitales durante el período del estudio.

La mayoría de aislamientos (441) se obtuvo de muestras procedentes de las vías respiratorias (262 eran esputos, 55 aspirados de nasofaringe o tráquea y 32 eran muestras bronquiales obtenidas por procedimientos no contaminantes) o estructuras anexas (ojos, oídos), mientras que los 56 restantes provenían de otras localizaciones anatómicas: 20 de sangre, 20 del aparato genital, dos de líquido cefalorraquídeo (LCR), uno de líquido articular y 13 eran secreciones purulentas o exudados de diferentes orígenes. Se consideraron responsables de infecciones respiratorias en 461 pacientes, por haberse aislado de muestras respiratorias no contaminadas o provenir de aislamientos respiratorios potencialmente contaminados o de sangre y presentar el paciente criterios clínicos compatibles con infección respiratoria por *H. influenzae*. En los restantes 36 pacientes produjeron infecciones genitourinarias (23), meníngicas (2), osteoarticulares (2) o infecciones diversas (9).

Las edades de los pacientes estaban comprendidas entre los 11 días y 99 años, con predominio de los dos extremos de la vida: 144 (29%) eran niños menores de 5 años (98, menores o igual a 1 año; 17, entre 1 y 2 años y 29, entre 2 y 5 años), 29 (6%) pacientes tenían entre 5 y 17 años, 129 (26%) entre 17 y 65 años y 195 (39%) eran de más de 65 años de edad.

Los hospitales participantes en el estudio proporcionaron todos los datos de que disponían sobre serotipo y biotipo de las cepas, así como de producción de betalactamasa y sensibilidad a ampicilina,

cefuroxima, cefotaxima, cefixima, claritromicina, cotrimoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacino.

Las cepas se identificaron por morfología de las colonias en agar chocolate, tinción de Gram y requerimiento para su desarrollo en agar de factores X y V impregnados en discos de papel de filtro¹⁴.

El serotipo se determinó mediante una técnica de coaglutinación con anticuerpos contra el polisacárido de la cápsula con los reactivos Phadebact *H. influenzae*, type b Reagent 51-5412-02 y Phadebact *H. influenzae*, type a, c-f Reagent 51-5413-02 02, de Boule Diagnostics (Huddinge, Suecia). Si el anticuerpo polivalente aglutinaba, se determinaba el nivel de serotipo con antisueros monoespecíficos: *H. influenzae* Agglutinating Sera, Murex Diagnostics (Reino Unido). En 6 hospitales se estudió el serotipo de todas las cepas, en otros dos solamente si eran responsables de un proceso invasivo, y en los cuatro restantes esta determinación no formaba parte de la práctica habitual del laboratorio.

El biotipo se estableció según la producción de ureasa, indol y/o ornitina descarboxilasa¹⁴. Proporcionaron datos sobre el biotipo de sus cepas todos los hospitales participantes, excepto dos.

El estudio de betalactamasa se realizó en todos los centros por el método de la cefalosporina cromogénica (BBL Cefinase, Becton Dickinson, Cockeysville, EE.UU.).

La sensibilidad a antibióticos se estudió en cada centro según sus técnicas habituales: difusión con disco en agar, E-test (AB Biodisk, Solna, Suecia) o microdilución en caldo mediante paneles comerciales Wider fastidious W1 (Soria Melguizo, S.A., Madrid, España). Se utilizó siempre medio HTM y los puntos de corte se establecieron según criterios del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)^{15,16}. Todos los hospitales participantes estudiaron la sensibilidad a ampicilina, cefuroxima, cefotaxima y ciprofloxacino. Sólo 4 centros estudiaron la sensibilidad a cefixima, nueve a claritromicina, 11 a cotrimoxazol, y 10 a cloranfenicol. Como cepas control de referencia se usaron las recomendadas por el NCCLS¹⁴ (*H. influenzae* ATCC 49247 y ATCC 49766).

Para el estudio estadístico de los datos se aplicó la ley de chi cuadrado (χ^2), considerándose significativa una diferencia entre los grupos cuando $p < 0,05$, con $v = 1$ grado de libertad y un riesgo $\alpha = 0,05$.

Resultados

Se obtuvo el serotipo de 355 cepas, siendo 346 (97,47%) de ellas no tipificables, cuatro del serotipo b (1,13%), una del d (0,28%), dos del e (0,56%) y una del f (0,28%); una cepa era autoaglutinable. Todas las cepas del serotipo b, así como la del f, se habían aislado de pacientes pediátricos menores de 5 años. En cuanto a la detección de cápsula en las cepas productoras de enfermedad invasiva, las 2 cepas aisladas de LCR fueron capsuladas (serotipos b y d), así como una cepa aislada de líquido articular (serotipo f) y dos de sangre (serotipo b).

Se consiguieron datos sobre el biotipo de 392 cepas, perteneciendo 70 de ellas (17,86%) al biotipo I, 150 (38,27%) al II, 126 (32,14%) al III, 16 (4,08%) al IV, 20 (5,10%) al V, 4 (1,02%) al VI, 3 (0,77%) al VII y también 3 al VIII. No se observó tropismo etario ni patológico de ningún biotipo: las 2 cepas productoras de meningitis eran de los biotipos II y III, mientras que las 17 cepas productoras de infecciones genitourinarias estaban repartidas entre los biotipos I (4 cepas), II (6), III (3), IV (2), VII y VIII (una cepa de cada uno de ellos). La relación entre serotipos y biotipos de las cepas de las que se dispuso de ambos datos queda reflejada en la tabla 1.

A todas las cepas se les realizó la prueba de la producción de betalactamasa, que resultó positiva en 85 (17,10%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en

TABLA 1. Distribución en serotipos de las cepas pertenecientes a cada biotipo

Serotipo	Biotipo							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
b	2	2						
d			1					
e				2				
f	1							
AA		1						
NT	54	118	73	8	17	3	2	2

cuanto a producción de betalactamasa por parte de cepas aisladas de sangre (15%) u oído medio (17,5%), ni entre las productoras de infecciones respiratorias (16,6%) o de otro tipo (24,24%). El porcentaje de cepas productoras de betalactamasa fue inferior en los pacientes pediátricos menores de 5 años (12,5%) que a partir de esa edad (17,24% entre los 5 y los 17 años, 20,16% entre los 17 y los 65 años, y 18,45% en los mayores de 65 años), pero en ningún caso las diferencias llegaron a alcanzar significado estadístico.

Los resultados de los estudios de sensibilidad a antibióticos se resumen en la tabla 2. Las tasas de sensibilidad a los antimicrobianos ensayados fueron superiores al 90% excepto en el caso de ampicilina (80%), claritromicina (88%) y cotrimoxazol (37%).

La posible relación entre producción de betalactamasa y resistencia a los antimicrobianos ensayados queda asimismo reflejada en la tabla 2, y en ella destaca la mayor tasa de resistencia a ampicilina y cloranfenicol entre las cepas que eran productoras de betalactamasa ($p < 0,05$).

Del total de 497 cepas en las que se estudió la actividad de ampicilina, 18 (3,6%) tenían disminuida su sensibilidad por un mecanismo no enzimático, puesto que no eran productoras de betalactamasa (cepas BNRA). Considerando sólo las cepas resistentes a ampicilina (103), el 17,5% eran BNRA. Este último porcentaje fue mayor en los lactantes de un año o menos ($4/18 = 22,2\%$) que en el resto de la población ($14/85 = 16,47\%$), aunque esta diferencia no llega a tener significación estadística.

El porcentaje global de cepas con algún grado de resistencia a cefuroxima fue del 6,64%, siendo una cuarta parte de ellas productoras de betalactamasa. Entre las 85 cepas productoras de betalactamasa, el 9,41% presentaba algún grado de resistencia a cefuroxima,

mientras que entre las 412 no productoras de esta enzima el porcentaje era del 6,1%, aunque esta diferencia no tuvo tampoco significación estadística. El porcentaje de cepas cefuroxima-R entre las BNRA fue del 44,4%. Las cefalosporinas de tercera generación ensayadas fueron siempre efectivas *in vitro* frente a nuestros aislamientos. No ocurrió lo mismo con claritromicina, pues se detectó que casi el 12% de cepas presentaba algún grado de resistencia a este macrólido; de ellas, el 21,2% eran productoras de betalactamasa. Entre las 56 cepas productoras de betalactamasa en las que se estudió la sensibilidad a claritromicina, el 12,5% presentó algún grado de resistencia, porcentaje muy parecido al de las 225 no productoras de betalactamasa (11,5%).

Más de la mitad de las cepas ensayadas fueron resistentes a cotrimoxazol, sin diferencia significativa entre las productoras de betalactamasa y las que no lo eran. Sólo seis de las 363 cepas en las que se estudió la sensibilidad a cloranfenicol mostraron algún grado de resistencia, siendo cinco de ellas (83,3%) betalactamasa positivas. Casi el 8% de las 63 cepas productoras del enzima fueron de sensibilidad disminuida, mientras que entre las 300 no productoras, sólo hubo una resistente ($p < 0,001$). Sólo una entre las 411 cepas en las que se estudió la sensibilidad a ciprofloxacino presentó un fenotipo de resistencia a este antibiótico (concentración inhibitoria mínima [CIM] de 2 $\mu\text{g/ml}$). Se aisló del broncoaspirado de una paciente de 70 años diabética que se intubó tras un accidente cerebrovascular; era sensible a los demás antibióticos excepto a cotrimoxazol y no producía betalactamasa.

El biotipo de las cepas capsuladas, sus características de sensibilidad antibiótica frente a los antibacterianos ensayados, así como las muestras de las que se aislaron y el diagnóstico y la edad de los pacientes, se recogen en la tabla 3. El 27,8% de las cepas capsuladas eran productoras de betalactamasa.

Discusión

Se han realizado numerosas revisiones tanto en nuestro país⁹ como en otras zonas geográficas^{10,12} sobre la resistencia de *H. influenzae* a antibióticos, los mecanismos por los que se llega a ella y la relación con diferentes parámetros concernientes a la cepa y al paciente del que se aisló. Debido precisamente a los cambios observados en los mencionados estudios y a la evolución de las tasas de resistencia en los

TABLA 2. Sensibilidad de *Haemophilus influenzae* a ocho antimicrobianos

Antibiótico (número de cepas estudiadas)	Porcentaje de cepas I + R (R)		Porcentaje (n) de cepas R entre las productoras de betalactamasa	Porcentaje (n) de cepas R entre las no productoras de betalactamasa
	Cepas (n)	Cepas productoras de betalactamasa entre las R (n)		
Ampicilina (497)	20,7 (103)	82,5% (85)	100 (85/85)	4,4 (18/412)
Cefuroxima (497)	6,6 (33)	24,2 (8)	9,4 (8/85)	6,1 (25/412)
Cefotaxima (497)	0	—	—	—
Cefixima (94)	0	—	—	—
Clarithromicina (281)	11,7 (33)	21,2 (7)	12,5 (7/56)	11,5 (26/225)
Cotrimoxazol (423)	63,4 (140)	22,1 (31)	41,9 (31/74)	31,2 (109/349)
Cloranfenicol (363)	1,7 (6)	83,3 (5)	7,9 (5/63)	0,3 (1/300)
Ciprofloxacino (411)	0,2 (1)	—	—	0,2 (1/411)

TABLA 3. Características de las cepas capsuladas y de los pacientes de los que se aislaron

Serotipo	Biotipo	Betalactamasa	Patrón de resistencia antibiótica*	Muestra (diagnóstico)	Edad paciente
b	II	+	A/C/Co	LCR + sangre (meningitis)	1 mes
b	I	+	S	Sangre (otitis)	2 meses
b	I	+	S	SO paracentesis (otitis)	2 meses
b	II	-	S	Sangre (otitis)	3 años
d	III	-	S	LCR (meningitis)	53 años
e	IV	+	Co	E (EPOC)	67 años
e	IV	+	Cl	E (EPOC)	59 años
f	I	-	Cl	Líquido articular (artritis)	5 años

*Cepa resistente a: A (ampicilina), C (cefuroxima), Co (cotrimoxazol), Cl (claritromicina).

S: cepa sensible a los antibacterianos ensayados.

LCR: líquido cefalorraquídeo; SO paracentesis: supuración ótica obtenida por paracentesis; E: esputo; EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

aislamientos españoles¹², creímos interesante estudiar la situación actual en Cataluña, comunidad con transferencia de la sanidad pública y por tanto con posibles particularidades referidas a pautas y recomendaciones gubernamentales específicas.

Antes de la introducción sistemática de la vacuna conjugada contra *H. influenzae* tipo b, entre el 80 y el 99% de las cepas capsuladas eran del serotipo b^{17,18}. Esta situación ha cambiado en la era vacunal, en la que la tasa de infección por este serotipo ha sufrido un fuerte declive^{19,20} como muestra también nuestro estudio, que arroja sólo el 50% de cepas del serotipo b entre las capsuladas. El porcentaje en Cataluña era también muy diferente en 1996, antes de las campañas de vacunación sistemática, cuando había el 91,4% de cepas capsuladas pertenecientes al serotipo b entre las productoras de enfermedad invasiva²¹. La distribución etaria no ha sufrido sin embargo cambios apreciables, sigue habiendo un predominio de los niños menores de 5 años entre los afectados por cepas capsuladas, como quedaba también de manifiesto en el estudio catalán de 1996.

Dos casos de meningitis no son suficientes para comprobar la prevalencia de uno u otro biotipo como causante de este proceso, pero sí vale la pena constatar que ninguna de las 2 cepas era del biotipo I, descrito como predominante entre los aislamientos meníngeos en muchos países europeos^{22,23} y americanos²⁴, especialmente en pacientes menores de un año de edad¹. Coincidendo con Takala et al²⁵, tampoco en nuestro caso las cepas del biotipo IV tuvieron especial tropismo genitourinario, como está en cambio descrito en otras series²⁶.

Sólo el 17,1% de las cepas de nuestro estudio fueron productoras de betalactamasa, cifra muy inferior a la detectada en 1990 en un multicéntrico español (35%)⁹ o en la misma época en uno americano (36,4%)¹⁰, pero más cercana a la hallada en otro estudio también español de cepas de origen respiratorio de los años 1996-1997 (25,7%)⁷, o superior a del Segundo Estudio Colaborativo Europeo publicado en el año 1990 (9,1%)¹². La tendencia a la disminución de la resistencia a ampicilina por producción de betalactamasa en nuestra zona ya fue constatada en el Segundo Estudio Español de Resistencias en *H. influenzae*⁹. Contrariamente a lo observado en dicho estudio, en nuestra serie no detectamos menor frecuencia de cepas productoras de betalactamasa entre las aisladas del aparato respiratorio ni estructuras anejas. En cambio, sí coincidimos en los menores porcentajes de resistencia enzimática en las

cepas de origen pediátrico observado por Doern et al¹⁰ en Estados Unidos. Igualmente, el porcentaje superior de cepas productoras de betalactamasa entre las capsuladas ha sido ya constatado por otros autores¹².

La resistencia a ampicilina se debió en nuestra serie, en el 82,52% de los casos, a la producción de betalactamasa, pero en 18 cepas la pérdida de sensibilidad a ampicilina fue por otros mecanismos no enzimáticos. Estas cepas BNRA suponen el 3,6% del total de las estudiadas y el 4,4% de *H. influenzae* no productores de betalactamasa, porcentaje inferior al de previas publicaciones españolas⁹, que están entre el 6,5 y el 11,3% según la fuente del aislamiento, pero algo superior al 4% detectado en Estados Unidos¹⁰. Por otra parte, nuestro hallazgo de una mayor prevalencia de cepas BNRA en niños menores de un año no coincide con estudios anteriores en nuestra zona⁹.

La falta de correlación *in vitro* entre la producción o no de betalactamasa y la resistencia a otros antibióticos betalactámicos que no sean la ampicilina es un hecho contemplado por el NCCLS¹⁵, que recomienda considerar resistentes a ampicilinas y penicilinas asociados a inhibidores de betalactamasas y a las cefalosporinas de segunda generación todas las cepas BNRA, a pesar de su aparente sensibilidad *in vitro* a estos agentes.

Los resultados de sensibilidad a claritromicina pueden subestimar su efectividad *in vivo* por el efecto de su metabolito 14-OH resultante del metabolismo hepático. Los elevados porcentajes de resistencia observados en cotrimoxazol lo invalidan como terapéutica empírica o alternativa en las infecciones posiblemente causadas por *H. influenzae*.

Hemos confirmado la existencia de una cepa resistente a ciprofloxacino, lo que arroja el teórico porcentaje del 0,24%, algo superior al hallado recientemente en un programa de vigilancia en América¹¹. Referente a nuestro hallazgo de una mayor frecuencia de resistencia a cloranfenicol entre las cepas productoras de betalactamasa respecto a las no productoras, este es un hecho ya descrito en la literatura médica⁹.

En conclusión, en Cataluña hay baja incidencia de infección por cepas capsuladas de *H. influenzae* y ha disminuido la importancia relativa del serotipo b, siendo los niños menores de 5 años los principales afectados por estas cepas. Por otra parte, se confirma la tendencia en nuestra zona a la disminución de resistencia a ampicilina por producción de betalactamasa, sobre todo en cepas de origen pediátrico aisladas de niños de edades iguales o

inferiores a un año. Las cepas BNRA son más prevalentes en pacientes pediátricos que en adultos. La aparición de una cepa resistente a ciprofloxacino obliga a una vigilancia para detectar posibles fallos terapéuticos en tratamientos con esta quinolona.

Bibliografía

1. Landgraf IM, Vieira FP. Biotypes and Serotypes of *H. influenzae* from Patients with Meningitis in the City of Sao Paulo, Brazil. *J Clin Microbiol* 1993;31:743-5.
2. Shapiro ED, Ward JI. The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Epidemiol Rev* 1991;13:113-42.
3. Wenger JD, Hightower AW, Facklam RR, Gaventa S, Broome CU. Bacterial meningitis in the United States, 1986: report of a multistate surveillance study. *J Infect Dis* 1990;162:1316-23.
4. Prats G, Domínguez A, Salleras LL. *Haemophilus influenzae*. Epidemiología de la enfermedad invasiva. *Med Clin (Barc)* 1996;107:422-8.
5. Malaltia invasiva per *Haemophilus influenzae*. Catalunya 1992. Butlletí Epidemiològic de Catalunya 1993;13:111-5.
6. Domínguez A, Latorre C, Pineda V, Margall N, Bou R, Fontanals D, et al. Enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b en Cataluña (1996). *Med Clin* 1999;112:5-9.
7. García-Rodríguez JA, Baquero F, García de Lomas J, Aguilar L and the Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial susceptibility of 1,422 *Haemophilus influenzae* isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996-97) multicenter surveillance study. *Infection* 1999;27:265-7.
8. Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack KD, Smith AL. Characterization of non-β-lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;26:235-44.
9. Perea EJ, García MC, Clavijo MJ, Piérdola G, Campos J, García-Rodríguez JA, et al. Resistencias en *Haemophilus influenzae* en España. Segundo estudio (1990). *Enf Infecc Microbiol Clin* 1993;11:19-28.
10. Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP Jr, Rauch A. Antibiotic Resistance among Clinical Isolates of *Haemophilus influenzae* in the united states in 1994 and 1995 and detection of β-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: Results of a National Multicenter Surveillance Study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:292-7.
11. Biedenbach DJ, Jones RN. Fluorquinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: Frequency of occurrence and analysis of confirmed strains in the SENTRY antimicrobial surveillance program (North and Latin America). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36:255-9.
12. Kayser FH, Morenzoni G, Santanam P. The Second European Collaborative Study on the frequency of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:810-7.
13. Jorgensen JH. Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Infect Dis* 1992;14:1119-23.
14. Campos JM. *Haemophilus*. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 1999; p. 604-13.
15. M100-S9 Vol 19 N° 1. Jan 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Ninth Informational Supplement. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 1999.
16. M7-A5 Vol 20 N° 2. Jan 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard. 5th ed. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2000.
17. Wall RA, Mabey DCW, Corrah PT. *Haemophilus influenzae* non type b. *Lancet* 1985;2:845.
18. Bijlsma FA. World-wide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis: Industrialized versus nonindustrialized countries. *Vaccine* 1991;9(Suppl): S5-S9.
19. Shinefield HR, Black S. Postlicensure surveillance for *Haemophilus influenzae* type b invasive disease after use of *Haemophilus influenzae* type b oligosaccharide CRM₁₉₇ conjugate vaccine in a large defined United States population: A four-year eight-month follow-up. *Pediatr Infect Dis J* 1995;14: 978-81.
20. Petola H, Kilpi T, Anttila M. Rapid disappearance of *Haemophilus influenzae* type b meningitis after routine childhood immunization with conjugate vaccines. *Lancet* 1992;340:592-4.
21. Domínguez A, Latorre C, Pineda V, Margall G, Bou R, Fontanals D, et al. Enfermedad invasiva por *Haemophilus influenzae* tipo b en Cataluña (1996). *Med Clin (Barc)* 1999;112:5-9.
22. Killian MJ, Sorensen I, Frederiksen W. Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. *J Clin Microbiol* 1979;9:409-12.
23. Van Alphen L, Geelen L, Jónsdóttir K, Takala AK, Käyhty H, Zanen C. Distinct geographic distribution of subtypes of *Haemophilus influenzae* type b in western Europe. *J Infect Dis* 1987;156:216-8.
24. Barenkamp SJ, Munson RSJ, Granoff DM. Comparison of outer-membrane protein subtypes and biotypes of isolates of *Haemophilus influenzae* type b. *J Infect Dis* 1981;144:480.
25. Takala AK, Pekkanen E, Eskola J. Neonatal *Haemophilus influenzae* infections. *Arch Dis Child* 1991;66:437-40.
26. Quentin R, Musser JM, Mellouet M, Sizaret P-Y, Selander RK, Goudeau A. Typing of Urogenital, Maternal and Neonatal Isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in Correlation with Clinical Source of Isolation and Evidence for a Genital Specificity of *H. influenzae* biotype IV. *J Clin Microbiol* 1989;27:2286-94.