مقاومت بتا لاکتام در میان هموفیلوس آنفولانزا جدا شده در لهستان

چکیده

هدف : هموفیلوس آنفولانزا یکی از باکتری های کوکوبالیس گرم منفی ویژه ی انسانی است که مسئول تعداد محسولی از عفونت های دستگاه تنفسی و مشکلات شدید تهاجمی مانند مننژیت و عفونت میباشد. هدف این مطالعه توصیف کردن مکانیزم های مقاومت بتا لاکتین در میان نمونه های این باکتری در لهستان و ارزیابی روش های شناسایی مقاومت مورد استفاده میباشد.

روش ها : این مطالعه بر روی ۱۱۷ نمونه ی تفکیک شده از این باکتری در لهستان انجام شد که در سال ۲۰۱۲ جمع آوری شده بود. کمترین غلظت های بازدارندگی نیز از طریق ریز رقیق سازی بررسی شده بود. تمام این نمونه های رنگ آمیزی شده با استفاده از روش نشر دیسکی ارزیابی شده بودند و الگوریتم پیشنهاد داده شده توسط کمیته ی شمالی در مورد تست های احتمال ضد میکروبی (NordicAST) استفاده شده است. برای شناسایی تغییرات در پروتئین های اتصالی به پنیسیلین ۳ (PBP3)، پویش های PCR نیز اجرا شده و بعد از آن توالی سنجی های ژنی ftsI اجرا شده است.

نتایج : نه تولید لاکتان های بتا و نه تغییرات PBP3 در ۷۶ مورد از نمونه های تفکیک شده مشاهده نشد (۶۵,۰٪). حساسیت به آمپیسیلین، آموکسی سیلین/ کلاونیک اسید، سفروکسیم (درون وریدی) و سفریاکسون در ۷۰,۹ ٪ ، ۷۸,۶٪ ، ۹۸,۳٪ ، ۸۲,۹٪ و ۱۰۰٪ از نمونه ها به ترتیب، مشاهده شد. تولید لاکتان های بتا در ۲۱ مورد از این تفکیک های نمونه ها مشاهده شد (۱۷,۹٪). پویش PCR ۲۰ نمونه (۱۷,۱٪) با تغییرات PBP3 را نشان داد و بر اساس توانلی سنجی های بعدی ftsI تمام این نمونه ها در نهایت به عنوان gBLNAR (منفی از نظر لاکتان های بتا به صورت ژنتیکی و مقاوم نسبت به آمپیسیلین)، که در میان این موارد ۶۵,۰٪ مقاوم نسبت به آمپیسیلین بودند. بر اساس طبقه بندی های مولکولی در مورد تغییرات PBP3 ، ۹۵,۰ ٪از gBLNAR ها متعلق به گروه دو بودند که نشان دهنده ی چهار زیر مجموعه به صورت IIa-IId بودند.

جمع بندی : باکتری های هموفیلوس انفلونزا مقاوم نسبت به آنتی بیوتیک ها نیازمند توجه پیوسته ، روش های شناسایی موثر و سیاست های منطقی در مورد استفاده از آنتی بیوتیک ها هستند. الگوریتم پیشنهاد شده توسط NordicAST را میتوان در کار های آزمایشگاهی روتین مورد استفاده قرار داد در حالی که توالی سنجی های ژن های ftsl میتواند در مطالعه های همه گیر شناسی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

کلید واژه ها: مقاومت بتا لاکتین، BLNAR، BLPAR، BLPACR

مقدمه

هموفیلوس انفولانزا یکی از باکتری های خاص انسان با گرم منفی میباشد که در قسمت بالایی دستگاه تنفسی انسان به عنوان بخشی از جمعیت های میکروبی به صورت رایج دیده میشود. این باکتری همچنین میتواند مسئول تعداد محسوسی از عفونت های دستگاه تنفسی و همچنین عفونت های تهاجمی شدید مانند مننژیت و عفونت های دیگر باشد که در افراد بالغ و کودکان دیده میشود.

برای سال های طولانی عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری با استفاده از آمپیسیلین به صورت موفق درمان میشد. اما در دهه های اخیر مقاومت نسبت به این آنتی بوتیک و همچنین دیگر لاکتام های بتا در میان این باکتری ها بیشتر رایج شده است. دو عامل اصلی مقاومت نسبت به این آنتی بیوتیک ها شناسایی شده است که اصطلاحا با نام های لاکتاماز های بتای هیدرولیزی آنزیمی و تغییرات در پروتئین های اتصالی پنسیلین (PBP) توصیف شده است. به صورت متداول، بیشتر این مکانیزم های مقاومت نسبت به این لاکتام های بتا در این باکتری ها همراه با تولید لاکتاماز بتا ایجاد میشود. مقاومت ایجاد شده نسبت به آمپیسیلین به واسطه ی ایجاد شده لاکتاماز در اوایل دهه ی ۱۹۷۰ توصیف شد. عبارت BLPAR (فعال از نظر لاکتاماز بتا و مقاوم نسبت به آمپیسیلین) به صورت رایج به عنوان گروه توصیف کننده برای نمونه های شناسایی شده با این مکانیزم مورد استفاده قرار میگیرد و ثابت شده است که نمونه های رنگ آمیزی شده از این باکتری، لاکتاماز های بتای تولید شده به واسطه ی پلاسمید را دارند، که آنزیم های ویژه

(TEM ، ROB و VAT) مشابه با پپتید های میانی باکتری ها در ساختار خودشان دارند که این آنزیم ها میتوانند به صورت موثر، آنتی بیوتیک های هدف را خنثی و غیر فعال کنند.

پنج PBP (1A ، 1B ، 2 و3 و 4) در این باکتری شناسایی شده است. تغییرات در یک حالت، که با نام PBP3 شناخته میشود، با استفاده از ژن های ftsI کد گذاری میشود، که موجب به مقاومت نسبت به آنتی بوتیک های لاکتام بتا میشود. جهش های مختلف در دامنه ی ترانس پپتیداز در PBP3 ها در این زمینه شناسایی شده است که بعضی از آن ها موجب کاهش حساسیت نسبت به پنیسیلین ها و همچنین سفالوسپورین ها میشود. لکه های باکتری که این PBP های تغییر یافته را حمل میکنند با نام BLNAR شناخته میشوند و این نام در اوایل دهه ی ۱۹۷۰ به آن ها اتلاق شده است. نمونه های تفکیک شده ی BLNAR توسط حضور N526K و یا R517H ها در PBP3 ها شناسایی میشوند که توسط ژن های تغییر یافته ی ftsI ایجاد میشوند. طبقه بندی های مختلفی در این قسمت بر اساس آمینو اسید های PBP3 ارائه شده است. طبقه بندی هایی به صورت گسترده مورد قبول هستند ، طبقه بندی های ارائه شده توسط Ubukata و همکارانش Dabernat و همکارانش میباشد. طبقه بندی های ارائه شده توسط تیم اول ، نمونه های این باکتری را در سه گروه تقسیم بندی میکند. نمونه های تفکیک شده با جایگزینی R517H در گروه ۱ قرار گرفته اند، در حالی که N526K در ترکیب با بعضی دیگر از جایگزینی ها در گروه ۲ قرار گرفته اند. در نهایت، گروه ۳ نیز گروهی است که شامل جهش های N526k در ترکیب با جایگزینی های M377I ، S385T و یا L289F میباشد. Dabernat و همکارانش گروه دوم را به چند گروه دیگر تقسیم کردند. با وجود این که فراوانی لکه های BLNAR به صورت محسوس بین کشور های مختلف متغیر است، یک کاهش محسوس در بسیاری از کشور های اروپایی و در سراسر جهان در سال های اخیر دیده شده است. علاوه بر این، لکه های خاص از این باکتری از نظر PBP تغییرات جدی داشته و میتوانند به صورت پیوسته لاکتاماز های بتا را ایجاد کنند.

با این وجود ، بعضی از نویسنده ها به موضوع نقش دیگر مکانیزم ها در این روند اشاره کرده اند. سرکوب کردن گسترده ی پمپ های جریان AcrR و تغییرات در پروتئین های غشایی خارجی ۲ (OMP2) به صورت گسترده در این زمینه

مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج مختلف و متضادی در این زمینه به دست آمده است. بیشترین تمرکز در این زمینه بر روی مکانیزم های کلاسیکی بوده است که در بالا بیان شده است.

هدف این مطالعه تحلیل کردن مکانیزم های مقاومت است که توسط باکتری انفولانزا هموفیلوس نشان داده میشود که نمونه هایش در لهستان تفکیک شده است، تا بتوان حساسیت آن ها را نسبت به آنتی بیوتیک های انتخاب شده ی لاکتام بتا مشخص کرده و روش های مختلف برای شناسایی آزمایشگاهی مقاومت نسبت به لاتکام بتا را در آن ها بررسی کرد.

مواد و روش ها

نمونه های تفکیک شده ی مطالعه

این مطالعه بر روی ۱۱۷ نمونه ی تفکیک شده از این باکتری در لهستان انجام شده است که در مرکز ملی مننژیت های باکتریایی (NRCBM) ، دپارتمان همه گیر شناسی و میکروب شناسی بالینی سازمان بهداشت ملی در وارساو، لهستان، بین ژانویه تا دسامبر ۲۰۱۲ به دست آمده است. تمام لکه های شناسایی شده در این مطالعه در دو برنامه ی نظارت پیوسته به دست آمده است که توسط NRCBM انجام شده است. اولین برنامه ی نظارت شامل نمونه هایی (n=89) بود که مسئول مشکلات رایج پایینی در دستگاه تنفس (LRT) بودند. برنامه ی نظارت ثانویه نیز شامل نمونه های تفکیک شده از عفونت های تهاجمی دستگاه گوارش در لهستان بود.

تعداد کلی ۲۸ نمونه (۲۳,۹٪) از مایع نخاعی مغزی و خون به دست آمده و ۸۹ نمونه ی دیگر (۷۶,۱٪) از LRT به دست آمدند (اسپاکتوم، حفره های هوایی برونشیمی و قسمت های داخلی دستگاه تنفسی).

تمام این نمونه ها بر اساس روند های استاندارد آزمایشگاهی ، از نظر انواع مختلف طبقه بندی شدند. به علاوه، PCR نیز برای تایید نمونه ها و برای شناسایی ژن های خاص کپسولی، اجرا شد.

شناسایی نمونه ها بر اساس پویش PCR و تولید لاکتاماز بتا

پویش کردن PCR نیز برای تمام نمونه های تفکیک شده انجام شد تا بتوان جهش های ایجاد شده در ژن های ftsI مرتبط با جایگزینی های N526K و یا S385T را شناسایی کرد، و در این زمینه از تک نوکلئوتید های H-PBP2-S

و H-PBP3-BLN مبتنی بر شکل های چند گانه استفاده شد که توسط Hasegawa و همکارناش توصیف شده بود. این پرایمر های H-PBP3-S به گونه ای طراحی شده بودند که بتوانند نمونه های منفی از نظر لاکتاماز بتا ، و حساس به آمپیسیلین (BLNAS) را بدون آسیب در PBP3 شناسایی کنند (یعی بدون جایگزین کردن N526K)، در حالی که پرایمر های H-PBP3-BLN ها به گونه ای طراحی شده بودند که بتوانند نمونه ها با جایگزینی های N526K و S385T را شناسایی کنند که برای نمونه های تفکیک شده ی BLNAR بالا رایج بود. مکبود تقویت تولید با استفاده از پرایمر های بیان شده در بالا موجب میشود که نمونه های تفکیک شده ی BLNAR پایین شناسایی شود. تولید لاکتماز بتا نیز توسط آرایه های کروژنیک با استفاده از نیتروسفین به عنوان بستر، شناسایی شد.

در این مطالعه، نتایج پویش های PCR همراه با نیتروسفین ها امکان این را فراهم کرد تا بتوان نمونه های تفکیک شده را به صورت زیر طبقه بندی کرد : gBLNAR (نمونه های منفی از نظر لاکتاماز بتا به صورت ژنتیکی، مقاومت نسبت به آمپیسیلین ؛ نمونه های N526K و S385T و یا خود N526K بدون تولید لاکتماز بتا شناسایی شدند)؛ gBLPACR (نمونه های مثبت از نظر تولید لاکتماز ژنتیکی، مقاومت نسبت به آموکسی سیلین و یا کلاونیک اسید ؛ جایگزینی های N526K و S385T و یا N526K به تنهایی همراه با تولید لاکتماز بتا شناسایی شدند) ؛ و gBLPAR (نمونه های مثبت لاکتماز بتا به صورت ژنتیکی ، جایگزینی های نمونه های وحشی PBP3 بدون جایگزینی N526K و S385T شناسایی شدند اما تولید لاکتماز بتا در این موارد دیده میشد). نمونه های تفکیک شده با حساسیت نسبت به آمپیسیلین (gBLNAS ها) در صورتی شناسایی میشدند که هیچ جایگزینی N526K/S385T و یا تولید لاکتماز بتا در آن ها وجود نداشت.

تست های حساسیت نسبت به ضد میکروب ها

کمترین غلظت بازدارنده (MIC) از آمپیسیلین ، آموکسی سیلین، اسید کلاونیک و آموکسی سیلین (AMC) ، سفروکسیم ، سفتریاکسون و سفلاکسور با استفاده از روش ریز رقیق سازی (BMD) بر اساس رهنمود های سازمان استاندارد های آزمایشگاهی ، انجام شد. روش نشر دیسکی همراه با آمپیسیلین (2ug) ، AMC (2.1 ug) و بنزیل پنیسیلین (1U) مورد استفاده قرار گرفت تا مناطق بازدارندگی رشد شناسایی شود. نتایج بر اساس رهنمود های

کمیته ی اروپایی در مورد تست های حساسیت ضد باکتریایی (EUCAT) تفسیر شد. Haemophilus influenzae ATCC 49766 (BLNAS), ATCC 49247 (BLNAR) و NCTC 8468 (BLNAS) برای کنترل کیفی به روش پیشنهاد شده توسط CLSI و EUCAST مورد استفاده قرار گرفتند.

رهنمود های کمیته ی شمالی در مورد تست های ضد باکتریایی (NordicAST) نیز برای ارزیابی کردن مکانیزم های مقاومت نسبت به لاکتام بتا در تمام نمونه های تست شده، مورد استفاده قرار گرفت. یک منطقه ی بازدارندگی بیشتر از 12mm در پویش های اولیه همراه با دیسک های بنزیل پنیسیلین ، نشان دهنده ی حساسیت این باکتری نسبت به این آنتی بیوتیک بود. تست های بعدی برای حضور لاکتاماز بتا نیز به عنوان گام دوم الگوریتم برای این نمونه ها نشان داد که ناحیه ی بازدارندگی کمتر از 12mm بود. یک نتیجه ی منفی از آرایه های نیتروسفین نیز معادل با شناسایی BLNAR بود، در حالی که نتایج مخالف موجب شد که تست نمونه ها با با دیسک های سفاسلور (30ug) ضروری شود. یک نقطه ی عطف 23mm در ناحیه ی بازدارندگی رشد نیز ایجاد شد تا نمونه های BLPAR از BLPACR متمایز شود.

توالی سنجی DNA

توالی سازی های ftsI برای تمام نمونه های تفکیک شده ی gBLNAR و gBLPCAR بر اساس نتایج پویش PCR انجام شد. یک بخش 705-bp از ژن ftsI با استفاده از پرایمر های زیر با تطبیق برای توالی، تقویت شد : 50-GTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGT- TAATGCGTAACCGTGCAATTAC-30 و 50-TTGTGAGCGGATAA- CAATTTCACCACTAATGCATAACGAGGATC-30. محصول ها نیز با استفاده از الکتروفورز های استاندارد ژلی شناسایی شده و سپس با استفاده از مجموعه ی دوم از پرایمر ها ، توالی سازی شدند. توالی های ftsI با استفاده از نرم افزار LaserGene 7 تحلیل شده و سپس با توالی های ژنی باکتری مورد نظر Rd KW20 مقایسه شد تا جایگزین های مختلف هسته ای در آن شناسایی شود. طبقه بندی های بعدی در دسته های مولکولی مختلف نیز ، مطابق با شرایطی که از قبل پیشنهاد شده بود انجام شد.

جدول ۱ داده های حساسیت گروه های تفکیک شده ی هموفیلوس انفولانزا که با استفاده از هر دو روش ریز رقیق سازی ارزیابی شده است

	gBLNAS (n = 76)	gBLNAR (n = 20)	gBLPAR (n = 21)	All (N = 117)
Ampicillin				
$MIC_{50/90}$ (mg/L)	0.25/0.5	2.0/2.0	>16/>16	0.5/>16
MIC range (mg/L)	0.06–1.0	0.5–4.0	16 to >16	0.06 to >16
% S/R[a]	100/0	35/65	0/100	70.9/29.1
Amoxicillin				
$MIC_{50/90}$ (mg/L)	0.25/0.5	2.0/4.0	>32/>32	0.5/>32
MIC range (mg/L)	0.06–2.0	0.5–4.0	>32 to >32	0.06 to >32
% S/R[a]	100/0	80/20	0/100	78.6/21.4
Amoxicillin/clavulanic acid				
$MIC_{50/90}$ (mg/L)	0.25/1.0	2.0/2.0	1.0/1.5	0.5/2.0
MIC range (mg/L)	0.12–2.0	0.25–4.0	0.25–2.0	0.12–4.0
% S/R[a]	100/0	90.0/10.0	100/0	98.3/1.7
Cefuroxime (intravenous)				
$MIC_{50/90}$ (mg/L)	0.5/1.0	2.0/2.0	0.5/2.0	1.0/2.0
MIC range (mg/L)	0.125–4.0	0.5–4.0	0.125–2.0	0.125–4.0
% S/I/R[a]	96.1/2.6/1.3	25.0/65.0/10.0	90.5/9.5/0	82.9/14.5/2.6
Ceftriaxone				
$MIC_{50/90}$ (mg/L)	≤0.0037/0.0075	0.015/0.03	0.0037/0.0075	0.0037/0.015
MIC range (mg/L)	≤0.0037–0.12	0.0037–0.03	≤0.0037–0.0075	≤0.0037–0.12
% S/R[a]	100/0	100/0	100/0	100/0
Cefaclor				
$MIC_{50/90}$ (mg/L)	2.0/4.0	8.0/8.0	8.0/16	2.0/8.0
MIC range (mg/L)	0.25–8.0	4.0–16.0	2.0–16.0	0.25–16
% S/R[a]	No EUCAST breakpoints			

gBLNAS, genetically β-lactamase-negative, ampicillin-susceptible; gBLNAR, genetically β-lactamase-negative, ampicillin-resistant; gBLPAR, genetically β-lactamase-positive, ampicillin-resistant; MIC, minimum inhibitory concentration; $MIC_{50/90}$, MIC for 50% and 90% of the isolates, respectively; S, susceptible; I, intermediate-resistant; R, resistant; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.

[a] Results were interpreted according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) 2016 guidelines [23].

نتایج

از میان ۱۱۷ نمونه ی تفکیک شده، ۷۶ مورد (۶۵٪) نه تولید لاکتاماز بتا و نه تغییرات PBP3 را نشان داده و به عنوان gBLNAS شناسایی شدند، در حالی که ۴۱ نمونه (۳۵٪) شامل مکانیزم های مقاومت لاکتام بتا بودند. تولید لاکتاماز بتا همراه با کمبود تغییرات PBP3 (gBLPAR) نیز در ۲۱ نمونه (۱۷,۹٪) شناسایی شد. هیچ محصول تقویت نیز در واکنش های PCR با استفاده از پرایمر های Hasegawa (gBLNAR) برای ۲۰ نمونه یافت شد. هیچ gBLPACR در طول این مطالعه دیده نشد.

از میان ۱۱۷ نمونه ی به دست آمده ، ۸۳ نمونه (۷۰,۹٪) نسبت به آمپیسیلین ، ۹۲ مورد (۷۸,۶٪) نسبت به آموکسی سیلین و ۱۱۵ مورد (۹۸,۳٪) نسبت به AMC حساس بودند . در میان ۳۴ نمونه ی مقاوم نسبت به آمپیسیلین بر اساس نتایج روش BMD ، ۲۱ مورد (۶۱,۸٪) از نوع gBLPAR و ۱۳ (۳۸,۲٪) از نوع gBLNAR بودند. مشخصه های دقیق این نمونه های تفکیک شده ، همراه با حساسیت های خارج از محیط طبیعی، مقادیر MIC_{50}/MIC_{90} و گستره های MIC در جدول ۱ نشان داده شده است.

در گروه gBLNAT ، ۵ نمونه (۲۵٪) ، از نمونه های اصلی خودشان جدا شدند که دارای عفونت های تهاجمی بودند. چهار مورد از این نمونه ها نسبت به آمپیسیلین حساس بوده و یک نمونه (از خون) نیز نسبت به آن مقاوم بود (MIC = 2 mg/L) . ۱۵ مورد باقی مانده ی gBLNAR (۷۵٪) نیز از LRT به دست آمده بودند. در میان این نمونه ها ، ۸۰٪ نیز نسبت به آمپیسیلین مقاوم بودند. (MIC >1 mg/L)

در میان ۱۱۷ نمونه ی به دست آمده ، تمایز ها در دسته بندی های حساسیت نیز برای ۱۵ مورد (۱۲,۸٪) و برای AMC در ۱۱ مورد (۹,۴٪) ، مبتنی بر روش مورد استفاده (نشر دیسکی و BMD) مشاهده شد. نتایج این تست های حساسیت برای آمپیسیلین و AMC در راستای روش های آزمایشگاهی مورد استفاده به صورت خلاصه در جدول شماره ی ۲ نشان داده شده است.

ارزیابی الگوریتم NordicAST و تست پویش دیسک EUCAST

دیسک های بنزیل پنیسیلین (BLNAS (1U را نسبت به نمونه های تفکیک شده ی BLNAR در تمام موارد متمایز کرد، که این موضوع برای gBLNAR با استفاده از توالی های ftsI ، بیشتر تایید شد. بر اساس الگوریتم، ۷۶ نمونه (۶۵٪) هیچ گونه مکانیزم مقاومت نسبت به لاکتام های بتا (BLNAS) را نداشتند، ۲۰ نمونه نیز به عنوان BLNAR شناسایی شدند در حالی که ۲۱ نمونه ی دیگر تولید لاکتاماز های بتا را داشتند. بعد از استفاده از دیسک های سفلاکور ، ۱ مورد از ۲۱ نمونه ی تولید کننده ی لاکتاماز بتا ، به عنوان BLPACR ، بر اساس ناحیه ی بازدارندگی بیشتر از 23 mm شناسایی شد. نکته ی مهم در این زمینه این است که پویش PCR همراه با توالی سازی های مولکولی ، تغییرات معمول PBP را در این نمونه تایید نکرد ؛ ازین رو، این نمونه در نهایت به عنوان یک gBLPAR شناسایی شد.

نتایج توالی سازی های ftsI

از میان ۱۱۷ نمونه ی بررسی شده ، ۲۰ نمونه ی gBLNAr (۱۷,۱٪) ، بر اساس پویش PCR شناسایی شده و سپس تحت توالی سازی های ftsI قرار گرفتند. بر اساس طبقه بندی های مولکولی پیشنهاد شده، ۱۹ نمونه (۹۵٪) با PBP3 های تغییر یافته (gBLNAR) متعلق به گروه ۲ بودند که چهار زیر گروه را شامل میشدند :

IIa (n = 7; 35.0%); IIb (n = 8; 40.0%); IIc (n = 1; 5.0%); و IId (n = 3; 15.0%). .

نمونه های منفرد دیگر نیز متعلق به گروه های آمینواسیدی بودند. به صورت عمومی، رایج ترین جایگزین های آمینو اسید ها به صورت N526K (20/20; 100%), D350N (16/20; 80.0%), و A502V, M377I و G490E (each 9/20; 45.0%)بودند. جایگزین های ژنی ftsI که در نمونه های لهستانی این باکتری شناسایی شده بودند، در جدول ۳ نشان داده شده اند.

جدول ۲ مقایسه ی حساسیت نسبت به آمپیسیلین و آموکسی سیلین / اسید کلاونیک (AMC) بر اساس روش های آزمایشگاهی مورد استفاده: نشر دیسک (DD) نسبت به روش ریز رقیق سازی (BMD).

Antibiotic	Genotype (*n*)	Method	Susceptible [*n* (%)]	Resistant [*n* (%)]
Ampicillin	gBLNAS (76)	DD	64 (84.2)	12 (15.8)
		BMD	76 (100)	0
	gBLPAR (21)	DD	0	21 (100)
		BMD	0	21 (100)
	gBLNAR (20)	DD	4 (20.0)	16 (80.0)
		BMD	7 (35.0)	13 (65.0)
	All (117)	DD	68 (58.1)	49 (41.9)
		BMD	83 (70.9)	34 (29.1)
AMC	gBLNAS (76)	DD	76 (100)	0
		BMD	76 (100)	0
	gBLPAR (21)	DD	19 (90.5)	2 (9.5)
		BMD	21 (100)	0
	gBLNAR (20)	DD	9 (45.0)	11 (55.0)
		BMD	18 (90.0)	2 (10.0)
	All (117)	DD	104 (88.9)	13 (11.1)

در میان تمام H انفولانزا های تست شده ، تنها دو مورد از نمونه های تهاجممی متعلق به نوع b (Hib) بودند، که شامل gBLNAR های رایج ترین گروه IIb و یک BLNAS بود. بقیه ی نمونه ها نیز شامل دیگر انواع H انفولانزا بودند.

ارتباط بین تغییرات PBP3 و حساسیت های ضد میکروبی

از میان ۲۰ نمونه ی gBLNAR شناسایی شده، ۱۳ نمونه (۶۵٪) در محیط آزمایشگاهی نسبت به آمپیسیلین مقاوم بودند (MIC >1 mg/L) ، که از میان این موارد ، سه مورد (۲۳,۱ ٪) در زیر گروه IIa قرار گرفتند (D350, G490, N526 and A530) ، ۷ مورد (۵۳,۸٪) نیز در زیر گروه IIb (D350, M377, G490, A502 and N526) و ۱ مورد (۷,۷٪) در زیر گروه IIc (A502 و N 526) و ۲

مورد (۱۵,۴٪) در زیر گروه IId (I449 و N526) قرار گرفتند. در میان هفت نمونه ی حساس به آمپیسیلین در محیط آزمایشگاهی ، چهار مورد متعلق به زیر گروه IId بودند در حالی که یکی از نمونه ها از دیگر دسته ها بود.

مباحث

در میان دو مورد از رایج ترین مکانیزم های مقاومت نسبت به آمپیسیلین ، تولید لاکتاماز های بتا معمولا به راحتی در تنظیمات آزمایشگاهی شناسایی میشوند. نمونه های توصییف شده با استفاده از این مکانیزم نشان دهنده ی مقاومت هستند زمانی که با استفاده از دیسک های آمپیسلین مورد بررسی قرار میگیرند و MIC های آن ها بالاتر از نقطه ی عطف مقاومت بوده و آن ها در تست های نیتروسفین نیز مثبت هستند. نمونه های BLNAR با MIC های بالا برای آمپیسیلین (مثلا $8-16\ mg/L$) ، توسط بعضی از نویسنده ها به عنوان نمونه های BNLAR بالا توصیف شده اند، که به راحتی با استفاده از تست های حساسیت قابل شناسایی هستند. اما، در کشور های اروپایی، بیشتر نمونه های BLNAR برای آمپیسیلین MIC هایی پایینی را نشان میدهند و موجب میشوود که نسبت به آمپیسیلین و AMC حساسیت داشته باشند و اصطلاحا به گروه BLNAR های پایین تعلق داشته باشند. اهمیت بالینی تمایز بین BLNAS و نمونه های BLNAR پایین هنوز به صورت شفاف مشخص نشده است. انتخاب های درمانی مبتنی بر مقادیر MIC میباشد و در بیشتر موارد ، نمونه های BLNAR پایین ، نسبت به آمینو پنیسیلین ها در محیط آزمایشگاهی، حساس هستند. اما، باید نسبت به افزایش تهاجم این نمونه ها توجه بیشتری شود، زیرا حساسیت کمتر نسبت به لاکتام های بتا میتواند موجب افزایش خطر شکست درمان شود که باید در نظر گرفته شود.

روش های مختلف برای ایجاد تمایز در مورد مکانیزم های مقاومت این باکتری نسبت به لاکتام بتا وجود دارد که شامل شناسایی های مولکولی ژن های مسئول میباشد. با این وجود، روش های فنوتیپی کلاسیک نیز جایگاه خوبی در این زمینه دارند. NordicAST نیز یک الگوریتم ساده برای شناسایی مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های لاکتام بتا مبتنی بر نقطه عطف نشر دیسک EUCAST ارائه کرده است. در این مطالعه، هدف ما استفاده از این الگوریتم همراه با دیگر روش ها برای شناسایی مکانیزم های مقاومت نسبت به لاکتام های بتا میباشد که توسط نمونه های باکتری H انفولانزای لهستانی ایجاد میشود.

بر اساس دانش ما، این مطالعه اولین مطالعه ی دقیق در لهستان در مورد مکانیزم های مقاومت نسبت به لاکتام بتا در این نوع باکتری میباشد، که ابعاد مولکولی این مقاومت نیز در نظر گرفته شده است. پویش های PCR و توالی سازی های ftsl به صورت روتین در آزمایشگاه های لهستان مورد استفاده قرار نمیگیرد. شناسایی مقاومت نسبت به لاکتام های بتا و مکانیزم های آن محدود به نشر دیسکی و یا مکانیزم های گرادیان آنتی بیوتیک و تست های نیتروسفین میباشد. علاوه بر این، داده ها مرتبط با نمونه های این باکتری بسیار پراکنده هستند. در مطالعه های بین المللی توسط Fluit و همکارانش، مشخصات مقاومت این باکتری نسبت به دیگر کشور های اروپایی متفاوت میباشد. جالب است که افزایش شدید در نمونه های BLNAR در لهستان بین دو دوره ی جمع آوری شناسایی شده است (۱۹۹۸-۱۹۹۷ و ۲۰۰۳-۲۰۰۲). اما، این نتایج باید با احتیاط بیشتری تفسیر شود زیرا ارائه های کافی در مورد این اطلاعات وجود ندارد و عدم تطبیق هایی در مورد کمیت های نمونه های جمع آوری شده در کشور های مختلف، وجود دارد (مثلا در لهستان به ترتیب ۵۰ و ۳۵ نمونه در هر دوره ی مورد مطالعه، ارائه شده است) ، همچنین نوسان ها در تعداد نمونه های جمع آوری شده در طول زمان نیز باید در نظر گرفته شود. مطالعه ی آخر در مورد الگو های مقاومت این پاتوژن های دستگاه تنفسی در لهستان نیز بر اساس باکتری همچنین نوسان ها در تعداد نمونه های جمع آوری شده در طول زمان نیز باید در نظر گرفته شود. مطالعه ی آخر در مورد الگو های مقاومت این پاتوژن های دستگاه تنفسی در لهستان نیز بر اساس باکتری 344H انفولانزا انجام شده است که بین سال های ۲۰۰۲ تا ۲۰۰۴ جمع آوری شده اند. این مطالعه نشان داد که ۹ ٪ از این نمونه ها دارای لاکتاماز بتا بودند، که تقریبا ۱۳٪ آن ها نیز به صورت BLNAR های پایین شناسایی شده بودند و تنها یک مورد هر دو مکانیزم مقاومت را همراه با هم داشت و به عنوان BLPACR شناسایی شده بود. با مقایسه ی نتایج آخر با این مطالعه، ما مشاهده کردیم که یک افزایش در درصد نمونه های مثبت از نظر لاکتاماز بتا و همچنین BLNAR های پایین وجود دارد.

در مطالعه ی فعلی، مقاومت نسبت به آمپیسیلین اندکی نسبت به یک تحلیل در بلغارستان ، بالاتر بود (۲۹,۱٪ در مقابل ۲۲٪). بیشتر نمونه های لهستانی gBLNAR که در میان LRT و نمونه های عفونی تهاجمی به دست آمده بودند، مشابه بودند (۱۶,۹٪ و ۱۷,۹٪). به صورت عمومی، نمونه ی لهستانی این باکتری مکانیزم های مقاومت مشابه را از

خودش نشان میدهد که در دیگر کشور های اروپایی نیز دیده میشود ؛ اما، الگو های جهش غیر مکرر در نمونه های لهستانی این باکتری به صورت کلی مشاهده نشده است. همه ی مطالعه ها به غیر از یک مورد، نمونه های BLNAR ارائه شده در گروه دوم بر اساس طبقه بندی Dabernat را ارائه کرده اند. به صورت مشابه، در یک تحلیل که در آلمان انجام شده بود و در مورد مکانیزم های مقاومت این باکتری نسبت به آمپیسیلین بین سال های ۲۰۰۹ و ۲۰۱۲ بود، بیشتر این نمونه ها متعلق به دسته ی ۲ بودند. اما دو نمونه نیز یک الگوی جهش را داشتند که مطابق با گروه سه بود، و بعضی از جهش های اضافی را هم در خودش داشت که مشابه با جهش های گروه سوم بود. در پرتغال و فرانسه نیز تحلیل هایی انجام شد و این نمونه ها به صورت مجزا شناسایی شدند. بر اساس Skaar و همکارانش، دسته های گروه ۳ و نمونه های مشابه گروه ۳ با مقاومت سطح بالا نسبت به نسل سوم سفالوسپورین در نروژ شناسایی شد. در تمام نمونه های مطرح شده در بالا ، اکثریت بیشتر این نمونه ها متعلق به گروه IIb بودند که مشابه با نتایج همین مطالعه میباشد. همچنین، مشاهده های انجام شده توسط مرکز مرجع تست های حساسیت ملی در لهستان (NRCST ؛ http://www.korld.edu.pl) ، بر اساس نمونه های ارسال شده توسط آزمایشگاه های بیمارستانی برای تایید مکانیزم های مقاومت نسبت به BLNAR ، نشان داد که از میان ۷۸ نمونه ی باکتری انفولانزا که در سال ۲۰۱۲ به دست آمده بود، تمام ۵۸ نمونه ای که به عنوان gBLNAR شناسایی شده بودند متعلق به گروه ۲ بودند (IIa, n = 7; IIb, n = 43; IIc, n = 2; and IId, n = 6) (unpublished data)). این موضوع مطابق با یک مطالعه ی سوئدی توسط Resman و همکارانش و یک مطالعه ی اسپانیایی توسط Puig و همکارانش میباشد. یکی از نمونه ها در مطالعه ی فعلی نیز یک MIC به مقدار 4 mg/L برای آمپیسیلین بدون هیچ الگوی جهش که نشان دهنده ی دسته های بالای BLNAR باشد را نشان دادند. در این مورد، جایگزین های مشابه مطابق با نمونه های gBLNAR حساس به آمپیسلین شناسایی شدند. این یافته ها نشان دهنده ی حضور دیگر مکانیزم های مقاومت هستند که کمتر رایج هستند و باید بیشتر مورد بررسی قرار بگیرند.

Group	n	Amino acid substitutions for:											
		K344	D350	T352	K355	L356	M377	I449	G490	A502	V511	N526	A530
IIa	7		N						E			K	S
IIb	7		N				I			V		K	
	1		N				I		E	V		K	
IIc	1									V		K	
IId	3							V				K	
M[b]	1	R	N	G	T	V	I		E		A	K	

gBLNAR, genetically β-lactamase-negative, ampicillin-resistant.
[a] Isolates with mutations in the *ftsI* gene were classified into four groups: II (a, b, c and d) according to Dabernat et al. [10].
[b] One isolate with additional mutations in the *ftsI* gene.

جدول ۳ جایگزین های آمینو اسید در ژن های ftsI در نمونه های gBLNAR (n=20) مطابق با طبقه بندی های مولکولی

از میان تمام نمونه هایی که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته اند، مشخص شد که همه ی آن ها نسبت به سفتریاکسون حساس هستند که برای تمام باکتری های انفولانزای H لهستانی شناسایی شده تا اکنون مشابه میباشد (داده های متاثر نشده از NRCST و NRCBM). اما، تمام نمونه های gBLNAR تقریبا به صورت مشابه MIC_{50} و MIC_{60} دو برابر بیشتر برای تمام آنتی بیوتیک های تست شده نشان دادند که شامل نسل سوم سفالوسپورین ، در مقایسه با نمونه های gBLNAS بودند. ازین رو، حتی در صورتی که مقاومت نسبت به یک طیف گسترده تر از سفالوسپورین ها خارج از ژاپن و کره ی جنوبی نادر باشد، این پدیده نیازمند نظارت دقیق میباشد. این موضوع همچنین در اروپا نیز اهمیت زیادی دارد زیرا در نروژ نمونه های مشابه مشاهده شده است.

این مطالعه نشان داد که تفاوت هایی در دسته بندی حساسیت نمونه ها بر اساس تکنیک های آزمایشگاهی مورد استفاده وجود دارد. شدید ترین تفاوت ها در دسته ی gBLNAR دیده میشود که به صورت شفاف نشان دهنده ی این است که BMD و روش نشر دیسک به صورت کامل نتایج مشابه را نشان نمیدهند (جدول ۲). این مسئله پیش از این نیز توسط دیر بررسی ها مشخص شده بود. این موضوع نشان میدهد که چرا باید این موضوع را در نظر گرفت که آیا افزایش مقاومت نسبت به لاکتام بتا را میتوان با استفاده از روش های درمانی مورد استفاده در یک مطالعه ی خاص، تغییر داد یا خیر. در بیشتر مطالعه ها روش نشر دیسک به عنوان روش مورد ترجیح مورد استفاده قرار گرفته است. بر اساس تجربه ی ما، الگوریتم پیشنهاد شده توسط NordicAST با دیسک های بنزیل پنیسلین (1U) ، که همچنین توسط EUCAST هم شناسایی شده است، میتواند یک روش خوب باشد زیرا مراحل اولیه ی مقاومت نسبت به لاکتام بتا را هم نشان میدهد. بر اساس این الگوریتم، بر اساس ناحیه ی بازدارندگی سفاکلور (30ug)، ، نمونه های تولید

کننده ی لاکتاماز بتا به عنوان گروه های BLPAR و BLPACR تقسیم بندی میشوند. اما ممکن است در این قسمت به اشتباه طبقه بندی انجام شد. ؛ بر اساس این الگوریتم، یک نمونه در این مطالعه به عنوان BLPACR شناسایی شده بود در حالی که پویش های PCR و همچنین توالی سازی ها این طبقه بندی را تایید نکرد. ازین رو، از نظر ما، این الگوریتم را میتوان در کار های روتین آزمایشگاهی مورد استفاده قرار داد در حالی که توالی سازی های ftsI میتواند در مطالعه های همه گیر شناسی مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها به صورت پیوسته تکامل پیدا میکند ازین رو نظارت دقیق نسبت به آن ها برای شرایط همه گیر شناسی، اهمیت زیادی دارد. در مورد نمونه های تفکیک شده ی H انفولانزا ، این موضوع از نظر مقاومت نسبت به لاکتام بتا که به عنوان اولین خط درمانی مورد استفاده قرار میگیرد بسیار مهم میباشد، و شناسایی روش های موثر و سیاست های منطقی برای استفاده از آنتی بیوتیک ها ، امری ضروری است.

References

[1] Medeiros AA, O'Brien TF. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM-type β-lactamase but little permeability barrier to ampicillin. Lancet 1975;1:716–9.

[2] Slack MP, Jordens JZ. Haemophilus. 9th ed. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. Topley and Wilson's Microbiology and microbial infections, Vol. 2. London, UK: Arnold; 1998. p. 1167–90.

[3] Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1630–9.

[4] Clairoux N, Picard M, Brochu A, Rousseau N, Gourde P, Beauchamp D, et al. Molecular basis of the non-β-lactamase-mediated resistance to β-lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:1504–13.

[5] Ubukata K, Chiba N, Hasegawa K, Shibasaki Y, Sunakawa K, Nonoyama M, et al. Differentiation of β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* from other *H. influenzae* strains by a disc method. J Infect Chemother 2002;8:50–8.

[6] Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microb Drug Resist 2003;9:39–46.

[7] Thornsberry C, Kirven LA. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for β-lactamase production. Antimicrob Agents Chemother 1974;6:653–4.

[8] Cerquetti M, Giufre M, Cardines R, Mastrantonio P. First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3155–61.

[9] García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, et al. Ampicillin-resistant non-β-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:2564–73.

[10] Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of β-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:2208–18.

[11] Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:3969–76.

[12] Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European β-lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. J Antimicrob Chemother 2005;56:133–8.

[13] Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 2006;58:873–7.

[14] Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of β-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2487–92.

[15] Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 2007;20:368–89.

[16] Resman F, Ristovski M, Forsgren A, Kaijser B, Kronvall G, Medstrand P, et al. Increase of β-lactam-resistant invasive *Haemophilus influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:4408–15.

[17] Felmingham D, White AR, Jacobs MR, Appelbaum PC, Poupard J, Miller LA, et al. The Alexander Project: the benefits from a decade of surveillance. J Antimicrob Chemother 2005;56(Suppl 2):ii3–21.

[18] Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, editors. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: ASM Press; 2007.

[19] Hobson RP, Williams A, Rawal K, Pennington TH, Forbes KJ. Incidence and spread of *Haemophilus influenzae* on an Antarctic base determined using the polymerase chain reaction. Epidemiol Infect 1995;114:93–103.

[20] Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 1994;32:2382–6.
[21] Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, et al. Rapidly increasing prevalence of β-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1509–14.
[22] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-sixth informational supplement. Document M100-S26. Wayne, PA: CLSI; 2016.
[23] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretations of MICs and zone diameters. Version 6.0. 2016 http://www.eucast.org. [Accessed 24 October 2017].
[24] Søndergaard A, Petersen MT, Fuursted K, Nørskov-Lauritsen N. Detection of N526K-substituted penicillin-binding protein 3 conferring low-level mutational resistance to β-lactam antibiotics in *Haemophilus influenzae* by disc diffusion testing on Mueller–Hinton agar according to EUCAST guidelines. J Antimicrob Chemother 2012;67:1401–4.
[25] *Haemophilus influenzae* MLST Database. Identification of PBP3 mutations in invasive *Haemophilus influenzae* isolates. http://pubmlst.org/hinfluenzae/info/ftsI_sequencing_protocol_v3_01-02-2014.pdf. [Accessed 20 December 2016].
[26] Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β-lactam resistance in β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:1693–9.
[27] Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β-lactamases in *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 2005;56:773–6.
[28] García-Cobos S, Campos J, Román F, Carrera C, Pérez-Vázquez M, Aracil B, et al. Low β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. Antimicrob Agents Chemother 2008;52:2407–14.
[29] Nordic Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (NordicAST). *Haemophilus influenzae* and β-lactam resistance (English version). http://www.nordicast.org/d/2549?store_referer=true . [Accessed 20 December 2016].
[30] Skoczynska A, Kadlubowski M, Wasko I, Fiett J, Hryniewicz W. Resistance patterns of selected respiratory tract pathogens in Poland. Clin Microbiol Infect 2007;13:377–83.
[31] Setchanova LP, Kostyanev T, Markovska R, Miloshev G, Mitov IG. Serotypes, antimicrobial susceptibility, and β-lactam resistance mechanisms of clinical *Haemophilus influenzae* isolates from Bulgaria in a pre-vaccination period. Scand J Infect Dis 2013;45:81–7.
[32] Lâm TT, Claus H, Elias J, Frosch M, Vogel U. Ampicillin resistance of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2009–2012. Int J Med Microbiol 2015;305:748–55.
[33] Barbosa AR, Giufrè M, Cerquetti M, Bajanca-Lavado MP. Polymorphism in *ftsI* gene and β-lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. J Antimicrob Chemother 2011;66:788–96.
[34] Dabernat H, Delmas C. Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 year of age or less in France, 2001–2008: a retrospective database analysis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012;31:2745–53.
[35] Skaare D, Anthonisen IL, Kahlmeter G, Matuschek E, Natás OB, Steinbakk M, et al. Emergence of clonally related multidrug resistant *Haemophilus influenzae* with penicillin-binding protein 3-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins, Norway, 2006 to 2013. Euro Surveill 201419: pii: 20986.
[36] Puig C, Calatayud L, Martí S, Tubau F, Garcia-Vidal C, Carratalà J, et al. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. PLoS One 20138:e82515.
[37] Cherkaoui A, Diene SM, Emonet S, Renzi G, Francois P, Schrenzel J. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in Geneva: serotype, antimicrobial susceptibility, and β-lactam resistance mechanisms. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015;34:1937–45.
[38] Park C, Kim KH, Shin NY, Byun JH, Kwon EY, Lee JW, et al. Genetic diversity of the *ftsI* gene in β-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and β-lactamase-producing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. Microb Drug Resist 2013;19:224–30.
[39] García-Cobos S, Arroyo M, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Oteo J, Campos J. Evaluation of the EUCAST disc diffusion susceptibility testing method for *Haemophilus influenzae* based on the resistance mechanism to β-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 2013;68:159–63.
[40] Nørskov-Lauritsen N, Ridderberg W, Erikstrup LT, Fuursted K. Evaluation of disk diffusion methods to detect low-level β-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. APMIS 2011;119:385–92.