

CAT Critically Appraised Topic

Titel: Identificatie van *Haemophilus influenzae* en verwante *Haemophilus species* met MALDITOF-MS (microflex® BRUKER).

Author: Yolande Pypen

Supervisor: Dr. G. Coppens, Dr. E. Oris

Date: 26/03/2013

CLINICAL BOTTOM LINE

Gezien het nauwe genetische verwantschap tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus* is het niet mogelijk om via de conventionele methodes een betrouwbare identificatie te bekomen. Recente literatuur toont aan dat een relatief belangrijk percentage (10-40%) *H. haemolyticus* vroeger foutief als *H. influenzae* geïdentificeerd is met behulp van conventionele identificatietechnieken. Vooral het onderscheid tussen niet typeerbare *H. influenzae* en niet hemolytische *H. haemolyticus* zorgt voor moeilijkheden. Gezien het niet pathogene karakter van deze laatste kan deze foute identificatie leiden tot onnodig antibioticagebruik. Bijgevolg is er dringend nood aan verbetering van de identificatie tussen deze 2 species.

Op moleculair vlak blijkt uit een literatuurstudie dat er geen ondubbelzinnige identificatie kan uitgevoerd worden met het gebruik van enkel 1 single gen target. Sommige studies stellen een identificatieschema met gebruik van meerdere single gen targets voor om zo een goede identificatie te verkrijgen gezien deze PCR veel eenvoudiger is en makkelijker te interpreteren dan multi locus sequence analyse waarbij er verschillende genen worden getypeerd om deze achtereenvolgens allemaal samen te interpreteren. MLSA is een betrouwbare maar niet eenvoudige techniek om tot een goede identificatie te komen, ondanks enkele overlappende stammen.

MALDITOF-MS (microflex® BRUKER) voldoet momenteel niet aan de vereisten om het onderscheid te maken gezien tekortkomingen in de databank. Indien deze databank aangevuld wordt met een in house ontwikkelde bibliotheek is het potentieel mogelijk dat deze techniek aan de criteria kan voldoen. In een praktisch luik van deze CAT hebben we deze databank aangepast en is de validatie volop lopende. Verder onderzoek is echter nodig.

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Het genus *Haemophilus* bestaat uit gramnegatieve, niet zuurvaste, onbeweeglijke, fijne bacillen die soms ook coccobacillair kunnen voorkomen. Dit genus heeft voor zijn groei nood aan 1 of 2 groeifactoren; in het bijzonder X factor of hemine en V factor of nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD) dat voorkomt in rode bloedcellen. (1-6)

Er zijn momenteel 10 à 11 *H. species* bekend die geassocieerd worden met de mens, *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. ducreyi*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis*, *H. pittmaniae* en de minder goed gedefinieerde *H. paraphrohaemolyticus*.

H. species omvatten ongeveer 10% van de menselijke commensale flora van de bovenste respiratoire tractus, met zeker een 8-tal verschillende species die beschreven zijn als koloniserende micro-organismen in de menselijke respiratoire tractus, waaronder *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* en *H. haemolyticus* de meest prevalentie zijn. *H. influenzae* kan zowel voorkomen als commensaal maar is ook beschreven als frequente pathogeen. Hierbij is het onderscheid te maken tussen *H. influenzae* type b dat een regelmatige pathogeen is bij invasieve aandoeningen zoals meningitis, bacteriëmie, pneumonie, septicke artritis, enz. en niet typeerbare *H. influenzae* waarbij men vooral ziektebeelden van de mucosae van de bovenste luchtwegen kan verwachten zoals otitis media, sinusitis, bronchitis, conjunctivitis, enz. Deze niet- typeerbare stammen zijn ook een frequente verwekker van acute COPD exacerbaties. Terwijl *H. parainfluenzae* en *H. haemolyticus* voornamelijk als commensaal voorkomen en *H. haemolyticus* slechts zeldzaam invasieve ziekte veroorzaakt. (1-6)

Men heeft echter ondervonden dat de identificatie tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus*, beiden XV afhankelijk, echter niet zo eenvoudig en eenduidig is. Zowel met de conventionele methodes en moleculaire technieken zijn er moeilijkheden om het onderscheid tussen deze 2 species te maken. Uit deze bevindingen volgde onze vraagstelling om deze identificatie nog eens op een rij te zetten om zodanig een accuraat identificatieschema te bekomen voor deze species. Dit voornamelijk gezien de commensale *H. haemolyticus* volgens de literatuur relatief frequent foutief als *H. influenzae* wordt geïdentificeerd met als gevolg dat er patiënten overbodig met antibiotica worden behandeld. Ten deze tijde, waarin het al geen abnormaliteit is als men gekoloniseerd is met een ESBL producerende enterobacteriaceae of waarbij het opkomen van de CPE iedereen met vrees doet huiveren, is het

belang van goed en verantwoord antibioticagebruik echter eens zo duidelijk en is er toch een voordeel aan het juist identificeren van deze over het algemeen commensale kiem ten opzichte van zijn potentieel pathogene verwante species. (7-8)

Het merendeel van de identificaties van de micro-organismen in het laboratorium microbiologie van ZOL Genk wordt uitgevoerd met de MADITOF-MS (matrix assisted laser desorption ionisation time of flight massa spectrometry) (microflex® BRUKER).

Zoals de naam doet vermoeden wordt er bij MALDITOF-MS gebruik gemaakt van een UV absorberende matrix om de verschillende proteïnen van een staal te kristalliseren. Dit doet men door een kolonie van een isolaat te selecteren en uit te strijken op een stalen plaatje (Microscout target) en vervolgens te bedekken met de matrix. Hierdoor worden de proteïnen van de kolonie gekristalliseerd. Bij bestraling door een laser worden de verschillende moleculen van de matrix en het isolaat eerst losgemaakt en in de gasfase gebracht (desorptie) en daaropvolgend geïoniseerd. De UV absorberende matrix bevordert een snelle absorptie van de laserstralen en een snelle ionisatie met vermijden van ongewenste fragmentatie van de verschillende moleculen (matrix assisted laser desorption ionisation). De losgekomen ionen worden daarna versneld door gebruik te maken van een elektrisch veld, waarna ze allen met dezelfde kinetische energie in een ladingsvrij milieu op basis van hun massa/lading verhouding met een bepaalde snelheid doorheen de kolom zullen verplaatsen en zo gescheiden zullen worden van elkaar. De tijd die de verschillende ionen nodig hebben op basis van hun massa/lading verhouding om de kolom te passeren tot bij de detector wordt geregistreerd (time of flight) en op basis van deze resultaten wordt het massaspectrum bepaald van het isolaat. Dit massaspectrum zal daarna vergeleken worden met alle massaspectrums die aanwezig zijn in de databank (ook wel de bibliotheek genoemd) en zo zal men tot een identificatie komen. Alle isolaten die opgeslagen zijn in de databank van BRUKER (Maldi Biotyper 3.0) worden bewaard als Main Spectra (MSP). Een MSP is gebaseerd op multiple spectra van één welgedefinieerde stam om de biologische variabiliteit van een micro-organisme mee te dekken in deze identificatiemethode. (9)

Bij de validatie van de MALDITOF-MS (multiflex® BRUKER) in het laboratorium van ZOL Genk heeft men echter opgemerkt dat er bij de identificatie van *Haemophilus influenzae* extra criteria nodig waren die moeten voldaan zijn om tot een definitieve diagnose te komen. Gedurende de validatie werd er immers opgemerkt dat *Haemophilus parainfluenzae* soms ook geïdentificeerd werd door de MALDITOF-MS als *H. influenzae*, dit wel met scores die lager liggen dan 2.3. Daarom is er besloten om bij elke score van *H. influenzae* lager dan 2.3 toch nog conventioneel de taxonomie uit te voeren. Indien deze kiem dan toch XV afhankelijk blijkt te zijn kan men deze identificeren als *H. influenzae*, terwijl als men te maken heeft met een V en XV afhankelijke kiem wordt deze tot de commensale mondfloor beschouwd gezien men waarschijnlijk te maken heeft met een *H. parainfluenzae*.

Als we onze identificatiemethode dan toetsen, gezien de recente bevindingen in de literatuur, komen we tot de conclusie dat *H. haemolyticus* gemist kan worden met onze identificatiemethode. Er zijn namelijk geen MSP's voor *H. haemolyticus* aanwezig in onze databank van de MALDITOF-MS (multiflex® BRUKER). Met andere woorden zullen al deze kiemen eruit komen als *H. influenzae* gezien het genetische nauwe verwantschap. Daarmee kwam bij ons de vraag of er bij de *H. influenzae* die we momenteel definiëren na de XV afhankelijkheid aangetoond te hebben gezien de score op de MALDITOF-MS lager was dan 2.3 maar boven 1.9 mogelijks geen *H. haemolyticus* stammen aanwezig kunnen zijn. Aan de hand van deze bevindingen zijn er enkele vragen naar boven gekomen waarop men hierop volgend een antwoord zal trachten te evalueren. (3,7-8)

QUESTION(S)

- 1) Hoe kunnen we de identificatie van *H. species* met onder andere *H. influenzae* en *H. haemolyticus* verbeteren in ons laboratorium?
- 2) Wat is, na identificatie met de nieuwe technieken, de prevalentie van *H. haemolyticus* in de respiratoire tractus en welke pathogeniteit heeft *H. haemolyticus* ten opzichte van *H. influenzae*?
- 3) Welke moleculaire technieken kunnen van nut zijn bij de identificatie van (niet typeerbare) *H. influenzae* versus (niet hemolytische) *H. haemolyticus*?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: "Haemophilus influenza", "Haemophilus haemolyticus", "H. species", "MALDITOF-MS", "respiratory tract infections", "PFGE", "multi locus sequence analysis", "gen sequencing", "16S rRNA gen sequencing", "OMP P6", "hpd", "iga", "fucK", "sodA", "sodC"
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) Pubmed (Medline; from 1966), SUMSearch (<http://sumsearch.uthscsa.edu/>), National Guideline Clearinghouse (<http://www.ngc.org/>), Institute for Clinical Systems Improvement (<http://www.icsi.org>), The National Institute for Clinical Excellence (<http://www.nice.org.uk/>), Cochrane (<http://www.update-software.com/cochrane>), Health Technology Assessment Database (<http://www.york.ac.uk/inst/crd/htahp.htm>)

- 4) National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS; <http://www.nccls.org/>), International Federation of Clinical Chemistry (IFCC; <http://www.ifcc.org/ifcc.asp>), American Diabetes Association (ADA; <http://www.diabetes.org/home.jsp>), National Diabetes Information Clearinghouse (NDIC; <http://diabetes.niddk.nih.gov/>), Westgard QC (<http://www.westgard.com/>), Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA; <http://www.cms.hhs.gov/clial>)
- 5) UpToDate Online version 12.2 (2004)

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

- 1) Kilian M. Chapter 41. *Haemophilus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH et al. *Manual of Clinical Microbiology*, volume 1. 9th ed. ASM Press, Washington DC. 2007: p636-648.
- 2) Kilian M. Genus III *Haemophilus*. In: Granity G.M. et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Springer Verlag, New York. 2005: p883-904.
- 3) Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J. Gen. Microbiol.* 1976; 93:9-62.μ
- 4) Verhaegen J, Vandeven J en Pyckavet M. *Medische microbiologie voor laboratoriumtechnologen, deel 1*. 3^{de} herziene uitgave, Acco Leuven. 2009-2010; p119-126.
- 5) Musher DM. Chapter 30 *Haemophilus* species. In: Baron S. *Medical Microbiology*, 4th ed. Galveston, Texas. 1996.
- 6) Center for Disease Control and Prevention. Chapter 9: Identification and characterization of *Haemophilus influenzae*. In: *Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis*, 2nd ed. 2011. www.cdc.gov.
- 7) Murphy TF, Brauer AL, Sthi S et al. *Haemophilus haemolyticus*: a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J. Infect. Dis.* 2007; 195(1):81-89.
- 8) McCrean KW, Xie J, LaCross N et al. Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(2):406-416.
- 9) Murray PR. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16:1626-1630
- 10) Mukundan D, Ecevit Z, Patel M et al. Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45(10):3207-3217
- 11) Hotomi M, Kono M, Togawa A et al. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in tonsillar cultures of adults with acute pharyngotonsillitis. *Auris Nasus Larynx* 2010; 37:594-600.
- 12) Bruin JP, Kostrzewa M, Badoux P et al. Correct identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Abstract 22nd European congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2012
- 13) Kirkham L-AS, Wiertsema SP, Mowe EN et al. Nasopharyngeal carriage of *Haemophilus haemolyticus* in otitis-prone and healthy children. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(7):2557-2559.
- 14) Hare KM, Binks MJ, Grimwood BK et al. Culture and PCR detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in Australian indigenous children with bronchiectasis. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7):2444-2445.
- 15) Fenger MG, Ridderberg W, Olesen HV et al. Low occurrence of 'non-hemolytic *Haemophilus haemolyticus*' misidentified as *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis respiratory specimens, and frequent recurrence of persistent *H. influenzae* clones despite antimicrobial treatment. *Int. J. Med. Microbiol.* 2012; 302:315-319.
- 16) Morton DJ, Hempel RJ, Whitby PW et al. An invasive *Haemophilus haemolyticus* isolate. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(4):1502-1503.
- 17) Anderson R, Wang X, Briere EC et al. *Haemophilus haemolyticus* isolates causing clinical disease. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7):2462-2465.
- 18) King Jordan I, Conley AB, Antonov IV et al. Genome sequences for five strains of the emerging pathogen *Haemophilus haemolyticus*. *J. Bacteriol.* 2011; 193(20):5879-5880.

- 19) Theodore MJ, Anderson RD, Wang X et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(4):1422-1424.
- 20) Binks MJ, Temple B, Kirkham L-A et al. Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. *PLoS One.* 2012; 7(3): e34083. doi:10.1371/journal.pone.0034083.
- 21) Sandstedt SA, Zhang L, Patel M et al. Comparison of laboratory-based and phylogenetic methods to distinguish between *Haemophilus influenzae* and *H. haemolyticus*. *J. Microbiol. Methods.* 2008; 75(2):369-371.
- 22) Chang A, Adlowitz DG, Yellamattay E et al. *Haemophilus influenzae* outer membrane protein P6 molecular characterization may not differentiate all strains of *H. influenzae* from *H. haemolyticus*. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(10):3756-3757.
- 23) Wang X, Mair R, Hatcher C et al. Detection of bacterial pathogens in Mongolia meningitis surveillance with a new real-time PCR assay to detect *Haemophilus influenzae*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2011; 301:303-309.
- 24) Cattoir V, Lemenand O, Avril JL et al. The *sodA* gene as a target for phylogenetic dissection of the genus *Haemophilus* and accurate identification of human clinical isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* 2006; 296:531-540.
- 25) Sandstedt SA, Marrs CF, Patel M et al. Prevalence of *Haemophilus influenzae* type b genetic islands among clinical and commensal *H. influenzae* and *H. haemolyticus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(7):2565-2568.

APPRAISAL

1) Hoe kunnen we de identificatie van *H. species* met onder andere *H. influenzae* en *H. haemolyticus* verbeteren in ons laboratorium?

Zoals eerder vermeld zijn *H. species* fijne, onbeweeglijke gramnegatieve (cocco)bacillen die voor hun groei afhankelijk zijn van 1 of 2 groeifactoren, X en V factor. Ze groeien het best in een milieu dat verrijkt is met 5% CO₂ op 35-37°C. Het standaard medium dat gebruikt wordt voor de groei van *H. species* is een chocolade agar dat gemaakt wordt met door hitte gelyseerd paardenbloed. Maar er zijn ook gecommmercialiseerde voedingsbodems op de markt die specifiek voor groei van *H. species* geproduceerd worden. Verder kan men voedingsbodems gebruiken waarop supplementen worden toegevoegd waardoor men kan nagaan welke factoren nodig zijn voor de groei van het gekweekte micro-organisme (taxonomie). (1-6)

In de hierop volgende uiteenzetting gaan we ons vooral toespitsen op de identificatie van *H. influenzae* versus *H. haemolyticus*.

H. influenzae is voornamelijk een commensaal van de bovenste respiratoire tractus, maar deze species is zowel op jonge leeftijd als op volwassen leeftijd tevens een zeer belangrijke pathogeen. Epidemiologisch is het belangrijk een onderscheid te maken tussen omkapselde types en niet omkapselde types, ook wel de niet typeerbare *H. influenzae* genoemd. Er zijn 7 serotypes gebaseerd op een capsulair polysaccharide antigen. Oorspronkelijk waren er 6 serotypes a, b, c, d, e en f, welke later aangevuld zijn met serotype e' dat nauw verwant is aan serotype e. Deze serotypes kan men opsporen met behulp van agglutinatie (met antisera) of door middel van immuno-elektroforese. Tegenwoordig kan met ook gebruik maken van moleculaire technieken voor de typering van *H. influenzae*. (1-6)

Van al de omkapselde *H. influenzae* is type b *H. influenzae* de pathogeen die voornamelijk invasieve aandoeningen veroorzaakt zoals meningitis en bacteriëmie. Dit serotype bevat een polyribosyl ribitol fosfaat (PRP) in zijn kapsel dat een belangrijke virulentiefactor is waardoor type b *H. influenzae* immuun is aan fagocytose door polymorf nucleaire leukocyten tenzij er een specifiek antilichaam aanwezig is.

Niet typeerbare *H. influenzae* is minder virulent en veroorzaakt voornamelijk mucosale infecties zoals otitis media, sinusitis, bronchitis en acute COPD exacerbaties. (5,10-11)

H. influenzae is ook in te delen in verschillende biotypes waarbij type b *H. influenzae* voornamelijk terug te vinden is als biotype I of II terwijl niet typeerbare *H. influenzae* meestal in te delen is onder biotype III tot VI. (1-2,4)

H. haemolyticus is een commensaal van de bovenste respiratoire tractus, meer specifiek voornamelijk van de oropharynx. Deze species werd als eerste beschreven in 1919 als Bacillus X waarbij men merkte dat deze kiem β hemolyse vertoonde op een voedingsbodem met paardenbloed in tegenstelling tot *H. influenzae* die deze eigenschap niet vertoont. Het principe van deze β hemolyse is niet helemaal begrepen. In 1976 kwam Kilian et al. echter tot de conclusie dat er ook γ hemolytische *H. haemolyticus* bestaan. Ofwel zijn de stammen γ hemolytisch maar er zijn ook *H. haemolyticus* stammen die hun capaciteit om bloed te hemolysen verliezen bij overentingen. Dit fenomeen bemoeilijkt echter de identificatie tussen niet typeerbare *H. influenzae* en niet hemolytische *H. haemolyticus*. Tot dusver baseerde men zich namelijk op de mogelijkheid tot hemolyse voor het onderscheid te maken. (1-3,8)

Vroeger kon men enkel afgaan op de conventionele methodes voor de identificatie van *H. species*, hierbij werd er gekeken naar de afhankelijkheid van groeifactoren, hemolyse, fermentatie van bepaalde suikers, indol productie, urease en ornithine decarboxylase activiteit, agglutinatie (tabel 1).

Species	Growth factor requirement		Hemolysis	Fermentation of:					Presence of catalase	β-Galactosidase (ONPG ^b test ^a)	CO ₂ enhances growth
	X ^a	V		Glucose	Sucrose	Lactose	Mannose	Xylose			
<i>H. influenzae</i> ^c	+	+	-	+	-	-	-	+ ^d	+	-	-
<i>H. aegyptius</i> ^c	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+ ^e	+/-	+	-	-	-	+ ^d	+	-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	- ^f	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	D ^g	D	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+ ^e	+	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	w ^h	w	-	-	-	D	*	-
<i>H. paraprothophilus</i> ⁱ	-	+	-	+	+	+	+	D	-	-	+
<i>H. aphrophilus</i> ⁱ	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>H. pittmaniae</i>	-	+ ^e	+	+	+	-	+	-	-/w	+	-

^aAs determined by the porphyrin test.

^bONPG, o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside.

^cFor further characteristics, see Table 2.

^dMore than 90% of isolates are positive.

^eDue to V factor being released from blood cells in blood agar (bovine, horse, and rabbit blood) by the bacterial hemolysin, symbiosis can be demonstrated only on blood-free media.

^fDetection requires special media; see text.

^gD, differences encountered.

^hw, weak reaction.

ⁱFor further characteristics, see Table 3.

Tabel 1: Voornaamste differentiatie karakteristieken van *Haemophilus species*. (1)

Er zijn enkele bevindingen waarbij men rekening moet houden bij de identificatie van *H. species* met behulp van conventionele methodes:

- *H. influenzae* groeit op een CHOC plaat in de vorm van grote ronde, gladde convexe, kleurloze tot lichtgrijze kolonies, net zoals *H. haemolyticus*.
- De rode bloedcellen van schapen bevat zowel X als V factor maar het bevat eveneens enzymen die V factor hydrolyseren en inactiveren waardoor voedingsbodems op basis van schapenbloed minder geschikt zijn voor isolatie van *H. species* tenzij er supplementen aan toegevoegd zouden worden.
- Er zijn 3 species die XV afhankelijk zijn; met name *H. influenzae*, *H. aegyptius* en *H. haemolyticus*.
- Tevens zijn er 3 species die hemolyse kunnen vertonen op voedingsbodems gemaakt van paardenbloed, konijnenbloed en runderenbloed. Op schapenbloed vertonen deze *H. species* geen hemolyse. Het betreft *H. haemolyticus*, *H. para-haemolyticus* en *H. pittmaniae*.

Ondertussen wordt de identificatie van *H. species* ook uitgevoerd met behulp van andere methodes zoals MALDITOF-MS en moleculaire technieken zoals PFGE (pulsed field gel electroforesis), DNA-DNA hybridisatie, MLSA (Multi locus sequence analysis) en PCR (poly chain reaction). (1-8)

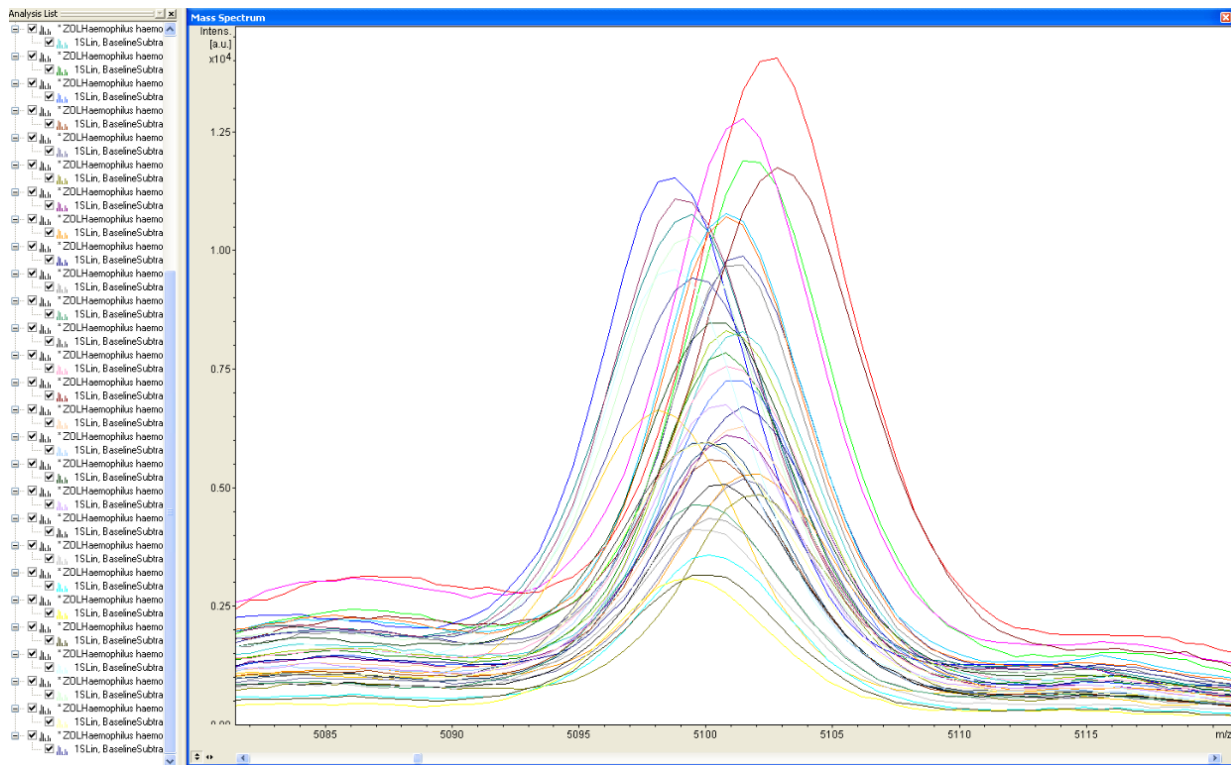
Zoals eerder besproken is er bij de huidige identificatie van *H. influenzae* in het laboratorium microbiologie van ZOL Genk een vermoedelijke overschatting van het aantal *H. influenzae* stammen doordat de identificatie van *H. haemolyticus* gemist wordt, gezien er geen MSP's aanwezig zijn in onze databank (of bibliotheek) van de Malditof Biotyper 3.0. Dus alle isolaten die we als XV afhankelijk bevestigen met identificatie van *H. influenzae* op de malditof met een score > 1.9 en < 2.3 wordt aanvaard. Maar hierbij wordt geen rekening gehouden dat *H. haemolyticus* ook XV afhankelijk is en gezien de genetische nauwe verwantschap zal deze op de malditof ook geïdentificeerd worden als *H. influenzae*. Bij het principe van de malditof wordt immers het massaspectrum dat bekomen wordt van de "ongekende" kiem vergeleken met alle MSP's van alle kiemen die in de databank zitten. Hierbij gaat men dan op zoek naar welke MSP's het meest overeenkomen en zo zullen, met een score van overeenkomst, de 10 beste resultaten gerapporteerd worden. Gezien de nauwe genetische verwantschap van *H. influenzae* en *H. haemolyticus* is het ook logisch dat als men deze als target aanbrengt in de malditof dat deze massaspectrums ook zeer dicht bij elkaar zullen liggen en dat men toch nog "goede" scores kan bekomen voor een *H. haemolyticus* stam met de identificatie van een *H. influenzae*. (1-6,9)

Voor het praktisch deel van mijn CAT is het de bedoeling om de databank van de Malditof Biotyper 3.0 uit te breiden met MSP's van welgedefinieerde *H. haemolyticus* stammen zodat deze ook kunnen geïdentificeerd worden met de MALDITOF-MS (microflex® BRUKER) en eveneens de verschillende identificatiemethodes voor *H. species* te evalueren. (9)

Hiervoor hebben we via het ZNA Middelheim 5 *H. haemolyticus* stammen ontvangen die door het nationaal referentiecentrum in Lille (Frankrijk) gedefinieerd zijn met behulp van MLS analyse (multi locus sequencing) en *recA*, *sodA* en *pgi*. Tevens is de referentiestam ATCC 33390 *H. Haemolyticus* stam aangekocht. Van deze 6 stammen hebben we verschillende identificatiemethodes uitgetest.

- Zoals verwacht gaf identificatie met de malditof voor de 6 isolaten de identificatie van *H. influenzae* met goede scores gaande van 1.873 tot 2.295. De scores kwamen nooit hoger dan 2.3 na herhaaldelijke pogingen.
- Na taxonomie bleek dat de 5 stammen afkomstig van het ZNA Middelheim echter V en XV afhankelijk bleken en niet alleen XV afhankelijk in tegenstelling tot de referentiestam ATCC 33390 die wel duidelijk XV afhankelijk is. Na contact met Prof. Dr. Gaillot van het referentiecentrum te Lille is ons bevestigd dat deze eigenschap vaker voorkomt bij *H. haemolyticus*. Bij literatuuronderzoek naar deze bevinding is er echter geen enkel artikel dat deze eigenschap beschrijft. Onze verdere bevindingen voeren we uit in de veronderstelling dat het referentiecentrum te Lille de identificatie van *H. haemolyticus* voor deze stammen bevestigd heeft.
- Een ID QUAD plaat is verdeeld in 4 kwadranten, waarbij elk kwadrant een bepaalde eigenschap bevat. Kwadrant I bevat X factor, kwadrant II bevat V factor, kwadrant III bevat X+V factor en kwadrant IV bevat X+V factor en is ook aangerijkt met paardenbloed om eventuele hemolyse te zien. Bij gebruik van deze ID QUAD platen (BD) krijgt men vergelijkbare resultaten met groei op kwadrant II en III voor de 5 *H. haemolyticus* stammen terwijl de ATCC 33390 stam wel degelijk enkel groei geeft op kwadrant III. Bij deze stam zien we ook een heel duidelijke β hemolyse terwijl de overige 5 stammen slechts een zeer lichte β hemolyse vertonen.
- In een volgende stap is het de bedoeling om ook via moleculaire technieken deze stammen te evalueren.

Hierop volgend hebben we in een aparte ZOL bibliotheek voor deze 6 *H. haemolyticus* stammen MSP's aangemaakt. Dit is gedaan volgens de handleiding van de MALDITOF-MS (microflex® BRUKER) waarbij er uitgegaan wordt van 5 kolonies van dezelfde stam nadat deze 2 maal overgeënt is van 1 kolonie. Men start met een speciale extractieprocedure waarna er voor elke extractie 2 spots worden aangebracht op het target. Elke spot wordt vervolgens 4 maal beshoten. De 40 verschillende spectra die hiermee bekomen worden, moeten daarna geëvalueerd worden en op basis van enkele criteria worden er bepaalde spectra uit de MSP geëlimineerd. Na de eliminatie van de te excluseren spectra moet men minstens 20 spectra overhouden voor een goede MSP te bekomen. Indien men dit niet behaald mag men dit niet gebruiken en moet er opnieuw begonnen worden. Dan is er mogelijk iets misgelopen met de extractieprocedure of is er misschien een contaminatie opgetreden (figuur 1).



Figuur I: MSP spectra op de MALDITOF-MS (Microflex® BRUKER)

In een volgende fase zijn we alle stammen die geïdentificeerd worden als *H. influenzae* volgens de huidige gebruikte methode aan het verzamelen. Al deze stammen zullen dan via verschillende identificatiemethodes vergeleken worden om zo een poging te doen om uit te zoeken hoeveel stammen eigenlijk *H. haemolyticus* zijn in plaats van *H. influenzae*. De volgende identificatiemethodes worden of zullen uitgetest worden:

- De verschillende isolaten worden met dezelfde spot op het target geïdentificeerd met de standaard Bruker Biotyper databank en met een eigen gemaakte “universele” bibliotheek. Een opmerking die hierbij gemaakt moet worden is dat de 6 nieuwe MSP's toegevoegd zijn aan een “universele” bibliotheek waaraan ook alle MSP's van de Bruker Biotyper 3.0 databank zijn toegevoegd. Want als men zich beperkt tot een eigen *H. haemolyticus* bibliotheek, creëer je dezelfde problemen als eerder besproken bij de Bruker Biotyper 3.0 databank, waarbij *H. influenzae* foutief als *H. haemolyticus* zou geïdentificeerd worden. Dit fenomeen is ook nagegaan en bevestigd met de referentiestam ATCC 49247 *H. influenzae*.
- Tevens gaan we de XV afhankelijkheid na van de verschillende species. Hierbij hopen we tot voldoende data te komen waarin voor ons eveneens het bewijs kan geleverd worden dat *H. haemolyticus* ook enkel V afhankelijk kan zijn zoals ons meegedeeld is door Prof. Dr. Gaillot.
- Er zijn ook ID QUAD platen (BD) aangekocht om mogelijke hemolyse na te gaan. Hierbij mag er niet vergeten worden dat er ook niet hemolytische *H. haemolyticus* stammen zijn, die met deze platen eveneens gemist zullen worden.
- Verder gaan we de mogelijkheid na of de verschillende isolaten groei vertonen op een chocolade agar en een selectieve Haemophilus plaat (Biomerieux) die ook in ons laboratorium gebruikt wordt voor de isolatie van *H. species* uit respiratoire stalen. De referentiestam ATCC 33390 vertoont immers geen groei op deze selectieve plaat.
- In een volgende stap is het ook de bedoeling om enkele moleculaire methodes uit te testen. Daarom worden alle stammen bewaard in onze microbank.

Afhankelijk van al deze data gaat de validatie van de aangepaste bibliotheek uitgevoerd worden. Verder willen we ook een moleculaire techniek in huis halen om bij dubieuze isolaten verdere identificatie uit te voeren.

Na evaluatie van de eerste voorlopige data kunnen we het volgende bemerken (zie bijlage I voor de resultaten):

- Na uittesten van 55 stalen hebben we 3 β hemolytische stammen geïsoleerd met de ID QUAD platen die ondubbelzinnig al als *H. haemolyticus* kunnen geïdentificeerd worden. Dus in onze populatie lopende over een periode van 1/02/2013 tot 11/03/2013 is er 5.45% eigenlijk *H. haemolyticus* in de populatie oorspronkelijk geïdentificeerd als *H. influenzae*. Dit zonder rekening te houden met de niet hemolytische *H. haemolyticus* stammen. Het percentage van de niet hemolytische *H. haemolyticus* stammen kan pas berekend worden nadat al de isolaten ook moleculair geïdentificeerd zijn, gezien deze stammen ook gemist worden met gebruik van de conventionele methodes.
- De MSP's van *H. influenzae* en *H. haemolyticus* liggen inderdaad zeer dicht bij elkaar gezien men bij de meeste identificaties (83.63%) in de top 10 resultaten de beide identificaties tegen komt, weliswaar met verschillende scores. Deze data zullen achteraf nog voldoende moeten geïnterpreteerd worden nadat ook de moleculaire resultaten gekend zijn. Om zo eventueel een minimumscore vast te leggen die

behaald moet worden alvorens er een definitieve identificatie kan bekomen worden met MALDITOF-MS. Na de interpretatie van alle resultaten is het ook mogelijk dat er kan geconcludeerd worden dat gezien de genetische verwantschap te nauw is, er misschien geen goed onderscheid mogelijk is met MALDITOF-MS. Van de 3 β hemolytische *H. haemolyticus* isolaten die we reeds geïdentificeerd hebben, werd er slechts 1, met gebruik van de aangepaste databank, door de MALDITOF-MS geïdentificeerd als *H. haemolyticus* op de eerste positie met een goede score. De overige twee werden op de eerste plaats geïdentificeerd als *H. influenzae* en op de 2^{de} plaats als *H. haemolyticus*. Men moet hier wel bij merken dat de score telkens < 2.3 lag, wat dus nog kan pleiten voor het invoeren van een minimumscore die behaald moet worden. En bij een lagere score kan men dan overgaan tot verdere identificatiemethodes.

Bruin et al. (2012) beweren in een kleinschalige studie dat deze techniek wel voldoet aan de vereisten om het onderscheid tussen *H. haemolyticus* en *H. influenzae* te maken. Hiervoor hebben ze 33 isolaten die op basis van XV taxonomie en morfologie als *H. influenzae* geïdentificeerd worden getoetst aan een nieuwe databank op de Malditof Biotyper 2, waarbij bleek dat er 42% *H. influenzae* stammen waren en 58% *H. haemolyticus* stammen. Deze identificaties werden voor 100% bevestigd met moleculaire diagnostiek (MLST en aanwezigheid van OMP P6). (12)

Indien we gelijkaardige resultaten kunnen bekomen is de identificatie via MALDI-TOF MS een goedkopere en snelle manier om tot een betrouwbare identificatie te komen.

- Om de prevalentie van eventuele enkel V afhankelijke *H. haemolyticus* stammen op te sporen, gaan we eventueel, nadat de moleculaire diagnostiek op punt gezet is, een uitgebreider onderzoek doen op alle *H. species* die in het ZOL Genk geïsoleerd worden in een opvolgend luik.

2) Wat is, na identificatie met nieuwe technieken, de prevalentie van *H. haemolyticus* in de respiratoire tractus en welke pathogeniteit heeft *H. haemolyticus* ten opzichte van *H. influenzae*?

Ongeveer 10% van de humane commensale bacteriële flora van de bovenste luchtwegen bestaat uit *H. species*. Minstens 8 verschillende *H. species* zijn beschreven in de commensale flora van de oro- en nasopharynx. Hierbij zijn *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* en *H. haemolyticus* de meest prevalentie species. Het dragerschap van *H. influenzae* stijgt tijdens de eerste levensjaren waarbij ongeveer 20% van de populatie gekoloniseerd is tijdens het eerste levensjaar en al > 50% op een leeftijd van 5-6 jaar. Zoals eerder vermeld kan *H. influenzae* ook een belangrijke pathogeen zijn, hierbij is niet typeerbare *H. influenzae* een belangrijke verwekker van otitis media, sinusitis, bronchitis en acute COPD exacerbatie, zowel bij jonge kinderen als volwassenen. (1-2,4,10-11)

Een accurate identificatie van deze niet typeerbare *H. influenzae* is belangrijk, aangezien niet hemolytische *H. haemolyticus* foutief als *H. influenzae* kan geïdentificeerd worden op basis van fenotypische conventionele technieken die gebruikt worden in de meeste laboratoria.

Enkele studies zijn op zoek gegaan naar het percentage van deze foutieve identificatie om zo een meer betrouwbaar inzicht te kunnen krijgen op de prevalentie en het dragerschap van beide kiemen in de oro- en nasopharynx. Tevens zijn er enkele casussen beschreven waarbij men toch een invasief karakter toekent aan *H. haemolyticus* dat verder altijd als commensaal beschreven wordt (zie bijlage 2 +3 voor een overzicht). (3,7-8,10-11,13-18)

Murphy et al. (2007) wilden in een studie het aandeel van *H. haemolyticus* in respiratoire stalen aantonen en eveneens de potentiële pathogeniteit nagaan van deze species. Deze studie bestond uit 2 delen waarbij men in 1 deel 490 stammen die via conventionele methoden als *H. influenzae* geïdentificeerd waren ging herevalueren op basis van 2 bijkomende methodes, in het bijzonder PCR met gebruik van 16S rRNA primers en immunoblot assays met antilichamen 7F3 gericht tegen een epitoom van OMP P6. In het andere deel werden 258 verschillende stammen geïsoleerd van sputum stalen van COPD patiënten over een periode van 56 maanden om de potentiële pathogeniteit na te gaan. Hieruit konden Murphy et al. concluderen dat er uit de stalen die afgenomen waren op lichaamsplaatsen die normaal steriel horen te zijn geen *H. haemolyticus* stammen konden geïsoleerd worden terwijl in contrast bij de nasopharyngeale stalen en de sputum stalen respectievelijk 27.3% en 39.5% eigenlijk *H. haemolyticus* bleek te zijn. Dit groot verschil tussen stalen van de respiratoire tractus en normaal steriele sites sluit aan bij de conclusie dat *H. haemolyticus* voornamelijk een commensaal is van de bovenste luchtwegen (tabel 2).

Strain collection	Clinical source of isolates	Haemophilus isolates identified, no.		Reference
		Nontypeable <i>H. influenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i>	
National collection	Invasive strains ^a	54	4 ^b	[13, 14]
Buffalo, NY	Sputum of adults with COPD	156	102	[5]
Michigan day care centers	Nasopharynx of children	32	12	[15]
Various centers ^c	MEF samples ^d	130	0	[16–18]
ATCC	Type strains of <i>H. influenzae</i> and <i>H. haemolyticus</i> ^e	1	1	...

NOTE. *Haemophilus* strains were initially identified as *H. influenzae* on the basis of standard, accepted methods. ATCC, American Type Culture Collection; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; MEF, middle ear fluid.

^a From blood, cerebrospinal fluid, and MEF.

^b Biotype 4 invasive isolates previously identified as a cryptic genospecies [19].

^c Strains recovered from individuals with otitis media at various centers in Buffalo, NY; Rochester, NY; Seattle, WA; Dallas, TX; St. Louis, MO; Columbus, OH; and Beer Shiva, Israel.

^d Obtained by tympanocentesis.

^e *H. influenzae* ATCC 33391 and *H. haemolyticus* ATCC 33390.

Tabel 2: Bron van *Haemophilus* stammen en analyse resultaten (16S rRNA PCR en Ab 7F3) (7)

Van de 114 *H. haemolyticus* stammen waren er 52 (45.6%) β hemolytisch. In het tweede deel konden Murphy et al. aantonen dat isolatie van een nieuwe *H. haemolyticus* stam bij een COPD patiënt geen aanleiding geeft tot acute COPD exacerbaties terwijl nieuwe *H. influenzae* stammen bij 45% tot een exacerbatie kunnen leiden. Dit bevestigt nogmaals het commensale karakter van *H. haemolyticus*. (7)

Mukandan et al. (2007) hebben de dynamiek beschreven van de pharyngeale kolonisatie met *H. influenzae* en *H. haemolyticus*. Hiervoor hebben ze van 4 gezonde volwassenen gedurende 6 maanden regelmatig stalen onderzocht, hieruit konden 412 isolaten verzameld worden waarvan er 84% *H. influenzae*, 47% β hemolytische *H. haemolyticus* en 18% niet hemolytische *H. haemolyticus* bleken te zijn. Dit werd onderzocht met het gebruik van enkele conventionele methodes, een immunoblot assay met Ab 7F3 tegen OMP P6 en een dotblot hybridisatie analyse voor de aanwezigheid van het *iga* gen. Verder hebben ze van 358 isolaten ook het genotype bepaald via PFGE. Hieruit kon men concluderen dat een gezonde volwassene gekoloniseerd is met meerdere genotypes tegelijk en dat bepaalde genotypes > 150 dagen aanwezig kunnen blijven in de respiratoire tractus. Deze resultaten kunnen reflecteren in de grote recombinatie en DNA opname van *H. influenzae*, gezien ze bijna nooit alleen voorkomen in de respiratoire tractus. In bijkomend onderzoek bij patiënten kan men zo misschien aanwijzingen vinden over virulentiefactoren die ervoor kunnen zorgen dat *H. influenzae* mogelijk zich als een pathogeen gaat gedragen. (10)

In een andere studie hebben Hotomi et al. (2010) getracht om de klinische implicatie van *H. haemolyticus* te evalueren bij acute pharyngotonsillitis. Hierbij werden 199 *H. species*, geïsoleerd bij patiënten met acute pharyngotonsillitis, onderzocht met behulp van hemolyse, taxonomie, PCR voor 16S rRNA en *iga*, waarvan 24.3% *H. influenzae* en 10.7% *H. haemolyticus* bleek te zijn (tabel 3).

	<i>H. influenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i>
16S	16S Nor +	16S Pro +
<i>Iga</i>	+ (> 90%)	- (>90%)
Taxonomie	XV	XV
Hemolyse	-	+

Tabel 3: Uitgeteste analyses met te verwachten resultaten voor *H. influenzae* en *H. haemolyticus*. (11)

De patiënten waarbij men *H. influenzae* kon isoleren bleken duidelijk een hoger aantal WBC te hebben en een hoger CRP ten opzichte van de patiënten waarbij men *H. haemolyticus* kon isoleren. Hieruit concludeert men dat *H. haemolyticus* toch eerder een commensaal is van de orale flora. Bij deze stammen werd ook PFGE uitgevoerd om een beter zicht te kunnen krijgen op de genetische verwantschap, waaruit bleek dat er overlappende clusters aanwezig zijn die vermoedelijk het gevolg zijn van DNA recombinatie. Een opmerking die gemaakt diende te worden is dat er geen γ hemolytische *H. haemolyticus* kon teruggevonden worden in tegenstelling tot voorgaande studies. Men kent dit mogelijk toe aan de geografische regio waar de stammen verzameld zijn. (11)

In 2010 toonden Kirkham et al. aan in een studie, waarbij het dragerschap van *H. haemolyticus* vergeleken werd tussen gezonde kinderen en kinderen met recidiverende otitis media, dat het dragerschap van *H. influenzae* bij kinderen eigenlijk overschat is. Na PCR met specifieke 16S rRNA primers bleek er van de 266 *H. influenzae* like isolaten respectievelijk 78.9%, 11.7% en 9.4% *H. influenzae*, *H. haemolyticus* en niet identificeerbare stammen te zijn. Met andere woorden bedraagt het dragerschap van kinderen met recidiverende otitis media 20.5% *H. haemolyticus* en 55.9% *H. influenzae* versus 11.8% *H. haemolyticus* en 18.5% *H. influenzae* bij gezonde kinderen.

Terwijl voordien er een dragerschap van 65.6% en 21.0% *H. influenzae* bij kinderen met recidiverende otitis media en gezonde kinderen respectievelijk werd geschat (tabel 4). (13)

n = 266 isolaten dragerschap	<i>H. influenzae</i> like	Na moleculaire diagnostiek	
		<i>H. influenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i>
Gezonde kinderen	21.0 %	18.5%	11.8%
Kinderen met rec. OM	65.6%	55.9%	20.5%

Tabel 4: Dragerschap van *H. influenzae* en *H. haemolyticus* bij gezonde kinderen versus kinderen met recidiverende otitis media. (13)

Bij een onderzoek waarbij Hare et al (2012) de proportie van *H. haemolyticus* wilde nagaan bij Australische autochtone kinderen met bronchiectasis kon men aantonen dat na moleculair onderzoek naar *hpd3* het merendeel van de nasopharyngeale stalen en BAL-vochten inderdaad gekoloniseerd waren met *H. influenzae* met een bevestiging van respectievelijk 87% en 88%. Terwijl er in de oropharynx 65% van de stammen vermoedelijk *H. haemolyticus* bleek te zijn. Hiermee concludeert men dat de nasopharynx voornamelijk gekoloniseerd is met niet typeerbare *H. influenzae* terwijl er in de commensale flora van de oropharynx ook een groot aandeel *H. haemolyticus* aanwezig blijkt te zijn. Verder toonde men aan dat de identificatie van alle stammen geïsoleerd uit infectieuze BAL vochten ($> 10^4$ CFU) bevestigd werden als niet typeerbare *H. influenzae*, waaruit men kan bevestigen dat niet typeerbare *H. influenzae* een belangrijke pathogeen is bij bronchiectasis. Men maakt de opmerking dat de *hpd3* negatieve isolaten vermoedelijk *H. haemolyticus* is en niet *H. aegyptius* (de enige andere XV afhankelijke *H. species*) aangezien deze species normaal niet in de luchtwegen terug te vinden is, extra groeifactoren vereist, een andere morfologie vertoont en voornamelijk conjunctivitis veroorzaakt. (14)

In tegenstelling tot de vorige studies toonden Fenger et al. (2012) aan dat het aandeel van niet hemolytische *H. haemolyticus* volgens hen zwaar overschat wordt. Hij onderzocht hiervoor een populatie van patiënten met cystische fibrose en uit 192 stammen die op basis van fenotypische testen als *H. influenzae* geïdentificeerd waren was er slechts 0.5% (oftewel 1 stam) die na moleculair onderzoek (single gen analyse voor *sodC* en *fucK* en MLSA) kon geïdentificeerd worden als niet hemolytische *H. haemolyticus*. Dit zijn grote verschillen met de voorgaande studies. Een opmerking die ze aanhalen is dat men aangezien men voedingsbodems gebruikt die optimaal zijn voor cultuur van *H. influenzae*, men niet weet of deze voedingsbodem eventueel minder adequaat is voor de isolatie van *H. haemolyticus*. (15)

Uit deze verschillende studies kan er geconcludeerd worden dat er na gebruik van de nieuwe beschikbare moleculaire technieken toch een relatief belangrijke groep *H. haemolyticus* foutief als niet typeerbare *H. influenzae* geïdentificeerd wordt als men enkel gebruik maakt van conventionele methodes. De prevalentie van foutief geïdentificeerde *H. haemolyticus* kan oplopen van $\pm 10\%$ tot $\pm 40\%$. Dit toont nogmaals het belang aan van een goede betrouwbare identificatie van deze species om onnodig antibioticaverbruik te kunnen reduceren. (7,10-11,13-15)

3 studies rapporteren het voorkomen van *H. haemolyticus* als pathogeen. Zo beschrijven King Jordan et al. (2011) het volledige genoom van 5 *H. haemolyticus* isolaten waarvan er 3 pathogene stammen bleken te zijn. Men beschrijft hier het hele genoom om zo eventueel meer inzicht te kunnen krijgen over mogelijke virulentiefactoren. Terwijl Anderson et al. (2012) 7 casussen beschrijven waarbij *H. haemolyticus* een invasieve aandoening veroorzaakte bij patiënten uit de USA. Deze stammen waren initieel foutief geïdentificeerd als niet typeerbare *H. influenzae*. Alle casussen hadden verschillende symptomen en een verschillende pathologie. Maar met hun studie wil men aantonen dat er nood is aan een betrouwbaar moleculair schema dat gebruikt kan worden om de identificatie van *H. haemolyticus* te verbeteren. Zo wordt er door Morton et al. (2012) ook notie gemaakt van een invasieve *H. haemolyticus* die initieel foutief geïdentificeerd was. (16-18)

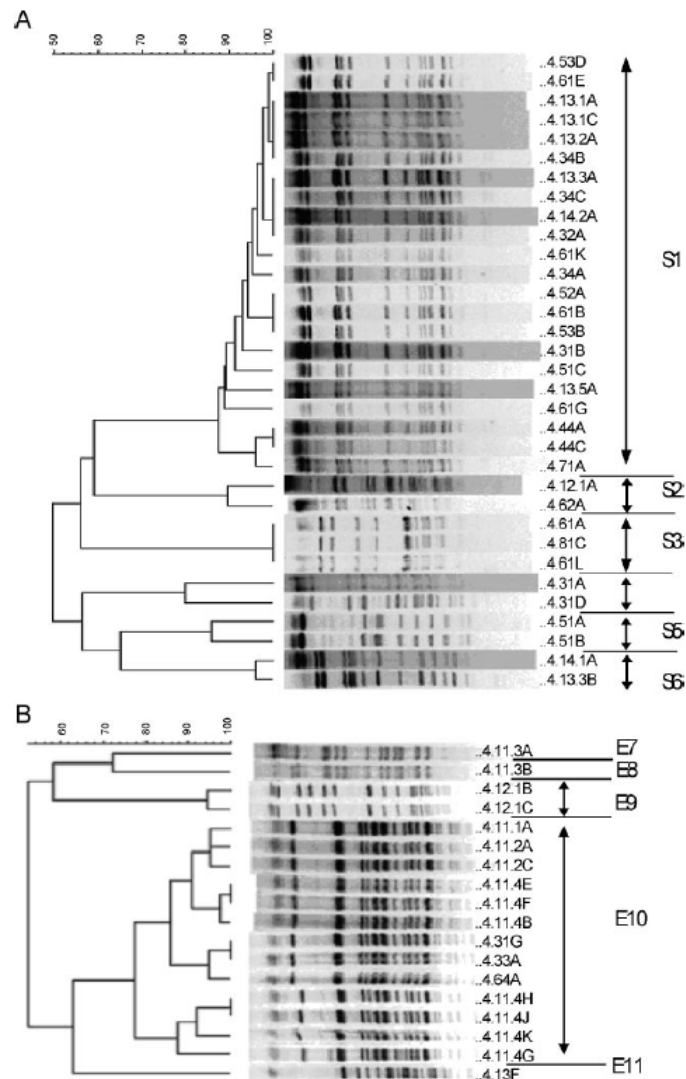
Hieruit komt weer eens naar boven dat het toch belangrijk is om een betrouwbare identificatie te bekomen. Misschien kan men na verder onderzoek concluderen dat bepaalde *H. haemolyticus* stammen toch een zekere pathogeniteit kunnen bezitten, idealiter kan men met meer onderzoek naar de genetische achtergrond ook achterhalen wat de virulentiefactoren zijn die hier eventueel een rol bij spelen waardoor men beter kan evalueren welke stammen van *H. species* aanleiding kunnen geven tot pathologie. (16-18)

3) Welke moleculaire technieken kunnen van nut zijn bij de identificatie van niet typeerbare *H. influenzae* versus (niet hemolytische) *H. haemolyticus*?

Gezien uit de vorige vraagstelling duidelijk naar voor komt dat er nood is aan een betrouwbare identificatie van niet typeerbare *H. influenzae* versus niet hemolytische *H. haemolyticus* heb ik in dit deel een poging gedaan om alle moleculaire technieken, die reeds beschreven zijn voor het onderscheid tussen deze 2 species te maken, op een rij te zetten en te evalueren. Om zo hopelijk tot een accuraat identificatieschema te komen dat betrouwbare resultaten kan opleveren (bijlage 4). (7,10-11,13-18)

PFGE

Pulsed field gel electroforese wordt beschouwd als een goede en betrouwbare techniek voor het bepalen van het genotype van een isolaat. Hierbij migreren grote DNA fragmenten over de gel door een elektrisch veld met alternerende polariteit. Zo verkrijgt je een genetische "fingerprint" die dan kan vergeleken worden tussen verschillende isolaten om zo de genetische verwantschap te vergelijken. Met deze techniek kan men ook een dendrogram opstellen waaruit het verwantschap tussen verschillende kiemen ook duidelijk gemaakt kan worden. In praktijk worden de cellen eerst gelyseerd en behandeld met enzymen zodat de DNA fragmenten kunnen vrijkomen. Daarna wordt het DNA gemigreerd over een gel door middel van een alternerend elektrisch veld. Vervolgens zullen de verschillende genetische vingerafdrukken via software met elkaar vergeleken worden om zo tot een goed dendrogram te komen (figuur 2).

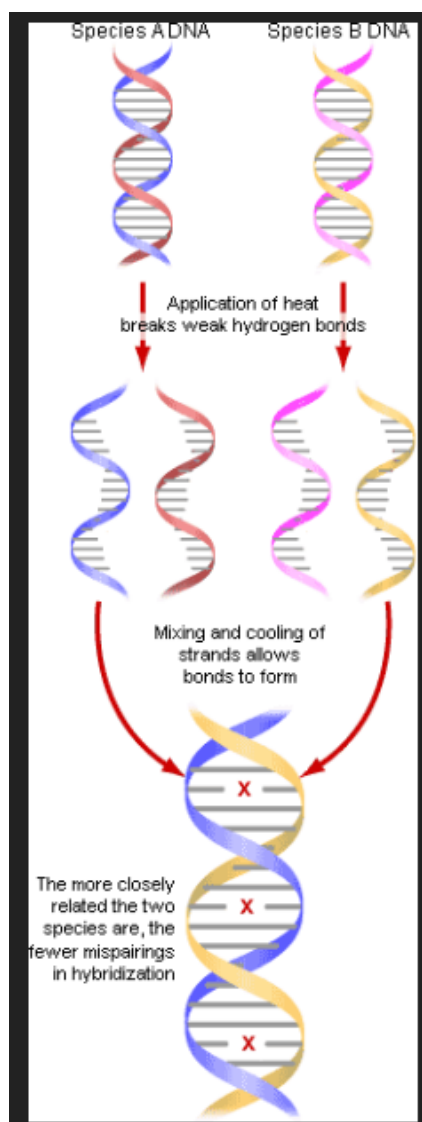


Figuur 2: Dendrogram op basis van PFGE. (10)

Ondanks er ondertussen verschillende andere moleculaire technieken in de handel zijn blijft PFGE de gouden standaard voor de genotypering van verschillende micro-organismen. Meerdere studies die onderzoek gedaan hebben naar nieuwe moleculaire technieken voor de identificatie van *H. species*, maken ook regelmatig gebruik van PFGE bij dubieuze resultaten met de nieuwe technieken om hun data te kunnen vervolledigen. Deze techniek wordt echter eerder gebruikt om het genotype te bepalen en niet zozeer voor eenvoudige identificatie, gezien de omslachtige procedure en gezien men over de software moet beschikken voor alle resultaten aan een goede data-analyse te onderwerpen. (10-11,15)

DNA-DNA hybridisatie

Voor de identificatie van verschillende bacteriën is DNA-DNA hybridisatie de gouden standaard. Bij deze techniek worden het DNA van 2 organismen met elkaar vergeleken door na te gaan in welke mate er een DNA hybridisatie (het samenvoegen van 2 complementaire DNA strengen tot een dubbele helix) kan optreden. Als er een grote gelijkheid is tussen de 2 isolaten zal dit stevige bindingen opleveren, terwijl men bij aanwezigheid van grote verschillen tussen het DNA, te maken zal hebben met een instabiele binding. Door deze dubbele helices dan weer los te maken kan men informatie bekomen over de stabiliteit van deze binding en over de genetische verwantschap tussen de 2 species (figuur 3).



Figuur 3: DNA-DNA hybridisatie

Omwille van de complexiteit van DNA-DNA hybridisatie wordt 16SrRNA gen sequencing wereldwijd gebruikt als standaard techniek om bacteriën te identificeren tot op species niveau met moleculaire diagnostiek. (19)

16S rRNA sequencing

Bij 16S rRNA gen sequencing wordt een stabiel stuk van de genetische code van een isolaat bepaald waarna dit vergeleken kan worden met een grote databank op de NCBI website. 16S rRNA gen sequenties zijn reeds beschikbaar voor een zeer grote groep van bacteriën. CLSI heeft voor deze techniek ook reeds verschillende richtlijnen opgesteld die terug te vinden zijn in het CLSI document MM18-A "Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline".

Microorganism or Group	Appropriateness of 16S rRNA	Comments for 16S rRNA	Alternative DNA Targets	Indications for Speciation and Recommendations for Resolution	Citations
<i>Haemophilus</i> spp. <i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	Resolution to genus and usually species	Poor separation between <i>A. aphrophilus</i> and <i>H. paraphrophilus</i> . No reference sequence for <i>H. parahemolyticus</i> . <i>H. influenzae</i> is clearly separated from the other species.	16S-23S region or <i>rpoB</i> gene provides better resolution to species.	Phenotypic characteristics can resolve to species (eg. growth on sheep blood, requirement for X or V factors)	

Tabel 5: CLSI MM18-A: richtlijnen voor *H. species*.

Ondanks de grote voordelen van deze techniek zijn er ook nog moeilijkheden die 16S rRNA gen sequencing met zich meebrengt.

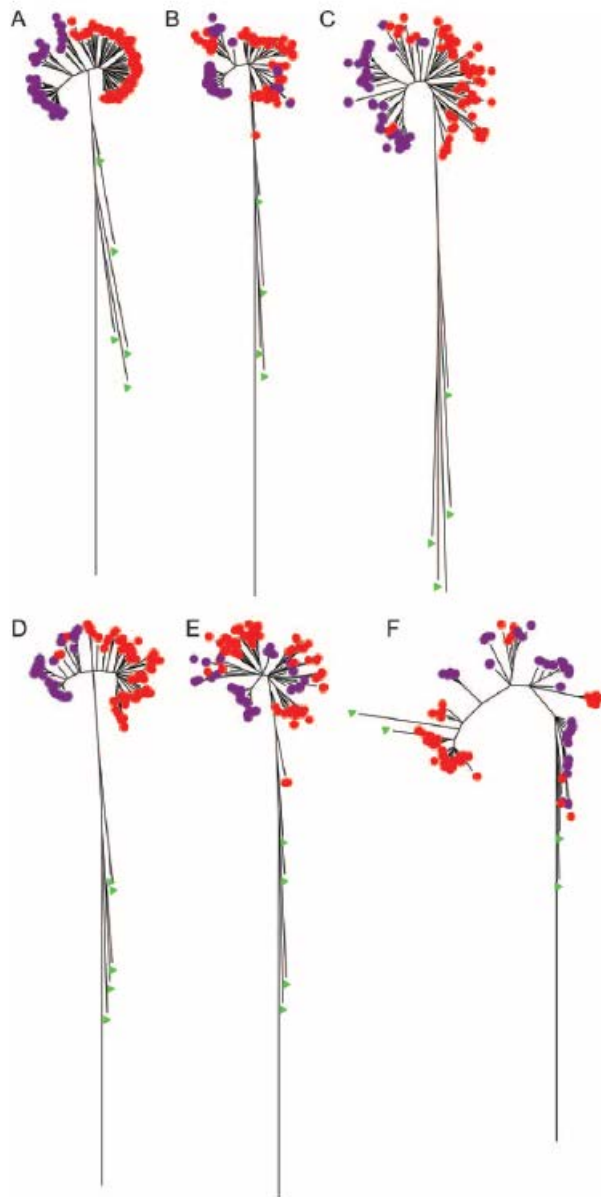
- Het is een relatief dure techniek
- Voor verschillende bacteriën worden alternatieve primers voorgesteld gezien men toch niet zo een goede resolutie kan bekomen tot op species niveau. Zo zegt CLSI dat er voor *H. species* alternatieve primers zijn die een betere resolutie kunnen geven tot op species niveau.

- De interpretatie van de 16S rRNA gen sequenties vereist een goede ervaring.
- Verschillende databanken die ter beschikking zijn, zijn publieke databanken waar iedereen sequenties kan aan toevoegen, waardoor men niet altijd zeker kan zijn of de sequentie die men in de databank geplaatst heeft ook werkelijk die stam betreft.

Verschillende studies die de identificatie van *H. influenzae* versus *H. haemolyticus* onderzocht hebben, hebben ook gebruik gemaakt van deze techniek in hun onderzoek. (7-8,11,13,16-17,19-20)

MLSA

Multi locus sequence analyse maakt gebruik van verschillende genloci waarvan de sequentie wordt bepaald en die vervolgens opeenvolgend aan elkaar worden geïnterpreteerd om zo tot een identificatie te komen. (8) Zo hebben McCrea et al. (2008) voor een groep gedefinieerde isolaten (n=202) MLSA en single gen target analyse uitgevoerd. Voor hun MLSA hebben ze gebruik gemaakt van de sequentie van *adk*, *pgi*, *recA*, *infB* en 16SrRNA. Op basis hiervan hebben ze de populatie *H. influenzae* en *H. haemolyticus* ingedeeld en hun verwantschap aangetoond in een fylogenetische stamboom. Ze hebben ook geprobeerd om de verschillende sequenties apart te evalueren maar daaruit blijkt dat deze nooit alle stammen volledig konden onderscheiden (figuur 4).



Figuur 4: Multiple en single DNA sequentie analyse van *H. influenzae* en *H. haemolyticus* stammen. Stamboom van (A) de 5 opeenvolgende sequentie analyse en individuele (B) *adk*, (C) *pgi*, (D) *recA*, (E) *infB*, en (F) 16S rRNA gen sequentie. *H. influenzae* (paarse punten) en *h. haemolyticus* (rode punten) stammen worden getoond samen met andere leden van de *Pasteurellaceae* familie (groene driehoeken). (8)

Vervolgens hebben ze verschillende conventionele en moleculaire single target gen analyses uitgetest op deze populatie, waarvan de resultaten verder besproken worden. In verband met MLSA kon men wel concluderen dat MLSA op basis van de 5 genen: *adk*, *pgi*, *recA*, *infB* en 16SrRNA een goed onderscheid kan maken tussen niet

typeerbare *H. influenzae* en *H. haemolyticus*. Deze 2 stammen worden ook ingedeeld in een *Haemophilus sensu stricto* cluster waarbij ze onderscheiden worden van andere *H. species*, maar er is ook een zekere groep van dubieuze stammen die niet perfect in te delen zijn. Dit is waarschijnlijk te wijten aan recombinatie tussen de 2 species. (8)

Deze techniek is in verschillende studies ook gebruikt als standaard om zo een identificatie te bekomen waarna men dan verschillende andere technieken zoals single gen target analyses kon vergelijken met de resultaten van MLSA. (7-8,15-16,21)

Single gen target analyse

Gezien MLSA nog steeds een complexe en ervaringsgebonden techniek is, is men ook op zoek gegaan of er single gen targets zijn die men kan gebruiken om een onderscheid te maken tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus*. (7-8,19-25)

Zo onderzochten McCrea et al. (2008) op hun populatie ook de aanwezigheid van het *iga* gen via PCR en *OMP P6* gen via een immunoassay met Ab 7F3 tegen een epitoom op het *OMP P6*, welke beide positief zouden zijn bij *H. influenzae* en negatief bij *H. haemolyticus*. Verder heeft men hier ook onderzocht of er significante verschillen zouden zijn tussen de 2 species van enkele virulentie geassocieerde genen (*licA*, *lic2A* en *lgtC*) (tabel 6).

Trait	No. (%) of isolates ^a		PR ^b	Result of χ^2 analysis (P value ^d)
	<i>H. influenzae</i> (n = 88)	<i>H. haemolyticus</i> (n = 109)		
Molecular-based traits				
<i>iga</i> gene probe hybridization	88 (100)	0 (0.0)	Referent	
MAb 7F3 reactivity	85 (96.6)	13 (11.9)	8.10	<0.0001
Classical traits				
H ₂ S production	11 (12.5)	75 (68.8)	0.18	<0.0001
Gas production	5 (5.7)	96 (88.1)	0.06	<0.0001
Indole production	73 (83.0)	68 (62.4)	1.33	0.0015
Urease activity	74 (84.1)	77 (70.6)	1.19	0.0265
ODC activity	24 (27.3)	8 (7.3)	3.72	0.0002
Biotype I	18 (20.5)	4 (3.7)	5.57	0.0002
Biotype II	44 (50.0)	43 (39.4)	1.27	0.1382
Biotype III	12 (13.6)	28 (25.7)	0.53	0.0366
Biotype IV	0 (0) ^c	2 (1.8)	0.31	0.2015
Biotype V	5 (5.7)	2 (1.8)	3.10	0.1470
Biotype VI	1 (1.1)	0 (0) ^c	2.48	0.2645
Biotype VII	6 (6.8)	19 (17.4)	0.39	0.0261
Biotype VIII	2 (2.3)	11 (10.1)	0.23	0.0280
LOS gene virulence traits				
<i>licA</i>	84 (95.5)	46 (42.2)	2.26	<0.0001
<i>lic2A</i>	80 (90.0)	17 (15.6)	5.83	<0.0001
<i>lgtC</i>	88 (100.0)	2 (1.8)	54.50	<0.0001

^a The species designation is based on the stratification of strains in the MLSA dendrogram of Fig. 1 and on the presence or absence of hybridization with an *iga* gene probe.

^b PR, prevalence ratio. The prevalence ratios were calculated for *H. influenzae* by using *H. haemolyticus* as the referent group.

^c Logit, 0.5 was used in place of 0 for prevalence ratio and statistical calculations.

^d A P value of <0.05 is considered statistically significant.

Tabel 6: Verdeling van taxonomische eigenschappen tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus* isolaten. (8)

Uit dit onderzoek kan men concluderen dat *iga* PCR een duidelijk verschil geeft tussen de 2 species en dat de onderzochte virulentie geassocieerde genen een significant hogere prevalentie hebben bij *H. influenzae* dan bij *H. haemolyticus*, waarbij *lgtC* de grootste verschillen vertonen. (8)

Eerder had Murphy et al. (2007) al aangetoond waarom men ook gebruik kan maken van een immunoassay met monoklonale antistoffen 7F3 tegen een epitoom van *OMP P6* in plaats van een *OMP P6* PCR uit te voeren. Het *OMP P6* gen codeert immers bij *H. influenzae* op sommige posities voor andere aminozuren dan bij *H. haemolyticus*. Terwijl Ab 7F3 net gericht is tegen een epitoom dat afhankelijk is van positie 59 en 61, 2 posities die verschillend vertaald worden (tabel 7). (7)

Amino acid position	Translated amino acid sequence, by strain		
	<i>H. influenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i> ^a	Invasive urogenital
33	Ala	Gly	Gly
42	Ala	Ser	Ser
59 ^b	Asn	Asp	Asp
61 ^b	Thr	Glu	Glu
152	Ala	Ala	Ser

^a The sequence of the gene that encodes outer membrane protein P6 was determined for 12 strains of *H. haemolyticus*.

^b Monoclonal antibody 7F3 binds to an epitope whose conformation depends on amino acids Asn and Thr in positions 59 and 61 [34].

Tabel 7: Amino zuur sequentie vertaald van het gen dat codeert voor OMP P6 van *Haemophilus* stammen. (7)

Chang et al. (2010) toonden echter aan dat niet alle *H. influenzae* stammen betrouwbaar onderscheiden kunnen worden van *H. haemolyticus* gebaseerd op Ab 7F3 activiteit, gezien er ook OMP P6 negatieve *H. influenzae* blijkt te zijn. In hun onderzoek had ongeveer 10% van de *H. influenzae* een andere amino zuursequentie als besproken bij Murphy et al. Bijgevolg beslisten ze dat onderzoek op OMP P6 alleen, onvoldoende is. Men adviseert om voor een goed onderscheid te kunnen maken ook rekening gehouden wordt met aanwezigheid van andere genen (bv *iga*, *sodC*, *fuck*). (22)

Sandstedt et al. (2008) hebben getracht om een snelle methode te ontwikkelen waarbij men probeert om de aanwezigheid van het *iga* gen na te gaan. Hiervoor hebben ze een dot blot hybridisatie ontwikkeld voor het variabele deel van het *iga* gen en een microarray met als probe diezelfde regio, gezien microarray een snelle en goedkopere manier is om dit te onderzoeken (korte hands-on-time tijd, in batch uit te voeren). Deze werden daarna geëvalueerd aan de hand van en vergeleken met de MLSA stamboom die ontwikkeld is door McCrea et al. (2008). Hieruit kon men concluderen dat de dot blot hybridisatie techniek een betere accuraatheid vertoonde in de onderzochte populatie (100% juiste identificatie), ten opzichte van de microarray (96% juiste identificatie). (8,21)

In 2011 publiceerde Wang et al. een studie waarin ze een “nieuwe” real-time PCR hadden ontwikkeld voor de detectie van *H. influenzae* in cerebrospinaal vocht bij kinderen met klinisch vermoeden van meningitis. Ze voerde een rtPCR uit voor de detectie van *hpd1* en *hpd3* en beiden lijken een goede specificiteit en sensitiviteit te vertonen (tabel 8) voor *H. influenzae*.

	TP/TP + FN ^a	Sensitivity ^a	(95% CI)	TN/TN + FP ^b	Specificity	(95% CI)
CSF culture standard ^c						
<i>Detection of Hi</i>						
<i>bexA</i> assay	14/15	93%	(68–100%)	80/91	88%	(79–94%)
<i>hpd #3</i> assay	14/15	93%	(68–100%)	79/91	87%	(78–93%)
<i>Detection of Nm</i>						
<i>ctrA</i> assay	10/10	100%	(69–100%)	70/96	73%	(63–81%)
<i>Detection of Sp</i>						
<i>lytA</i> assay	8/8	100%	(63–100%)	91/98	93%	(86–97%)
Composite reference standard ^d						
<i>Detection of Hi</i>						
<i>bexA</i> assay	18/19	95%	(74–100%)	83/90	92%	(85–97%)
<i>hpd #3</i> assay	18/19	95%	(74–100%)	82/90	91%	(83–96%)
<i>Detection of Nm</i>						
<i>ctrA</i> assay	21/24	87.5%	(68–97%)	68/85	80%	(70–88%)
<i>Detection of Sp</i>						
<i>lytA</i> assay	13/13	100%	(75–100%)	94/96	98%	(93–100%)

^a TP, number of true positives; FN, number of false negatives.

^b TN, number of true negatives; FP, number of false positives.

^c 5 specimens with missing CSF culture results were excluded from this analysis.

^d 2 specimens missing CSF culture, blood culture and CSF latex agglutination results were excluded from this analysis.

Tabel 8: Real-time PCR sensitiviteit en specificiteit voor detectie van *H. influenzae*, *N. meningitidis* en *S. pneumoniae* in CSV stalen verzameld gedurende een Mongoolse bacteriële meningitis surveillance, 2004-2007. (23)

Eveneens werd deze nieuwe techniek geëvalueerd in een onderzoek waarbij 111 CSV stalen van kinderen met klinische verdenking van meningitis werden, onderzocht met klassieke cultuur en een rtPCR voor *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* en *Neisseria meningitidis*. Hieruit bleek dat men door gebruik van deze rtPCR rechtstreeks op het CSV de bevestiging van een bacteriële meningitis kon verhogen van 50% naar ongeveer 75% ten opzichte van de gewone cultuur (tabel 9). (23)

	CSF culture and/or latex -positive (n = 56)			CSF culture and latex-negative (n = 55)		
	Hi	Nm	Sp	Hi	Nm	Sp
Total positive by culture and/or latex	19	24	13	0	0	0
Real-time PCR						
<i>hpd</i> #3	19	1 ^a	0	8	0	0
<i>bexA</i>	19	1 ^a	0	7	0	0
<i>ctrA</i>	1 ^b	21	0	0	17	0
<i>lytA</i>	0	0	13	0	0	2
CSF Culture	15	10	8			
Latex agglutination	19	19	13			
Blood culture	9	7	4			

^a These specimens were Nm by latex agglutination, but NmB and Hib by rt-PCR.

^b This specimen was Hib by culture and latex agglutination, but NmB by rt-PCR.

Tabel 9: Detectie van *H. influenzae*, *N. meningitidis* en *S. pneumoniae* in 111 CSF stalen verzameld gedurende een Mongoolse bacteriële meningitis surveillance, 2004-2007. (23)

Theodore et al. (2012) stellen met hun onderzoek een alternatief identificatieschema voor om tot een betrouwbare identificatie van *H. influenzae* versus *H. haemolyticus* te komen. Ze hebben aangetoond op een populatie van 122 stammen dat PCR voor de detectie van het *hpd* gen (proteïne D) en *fucK* gen (fuculose kinase) een goede sensitiviteit en specificiteit vertoont van respectievelijk 88.5% en 97.7% voor *hpd* en 64.1% en 100% voor *fucK* (tabel 10 en 11).

Species	No. of isolates:				
	Identified by 16S rRNA	<i>hpd</i> positive and <i>fucK</i> positive	<i>hpd</i> positive and <i>fucK</i> negative	<i>hpd</i> negative and <i>fucK</i> positive	<i>hpd</i> negative and <i>fucK</i> negative
<i>H. influenzae</i>	78 ^a	47	22	3	6
<i>H. haemolyticus</i>	44	0	1	0	43

^a A total of 77 nontypeable isolates and 1 serotype e isolate were identified by slide agglutination serotyping.

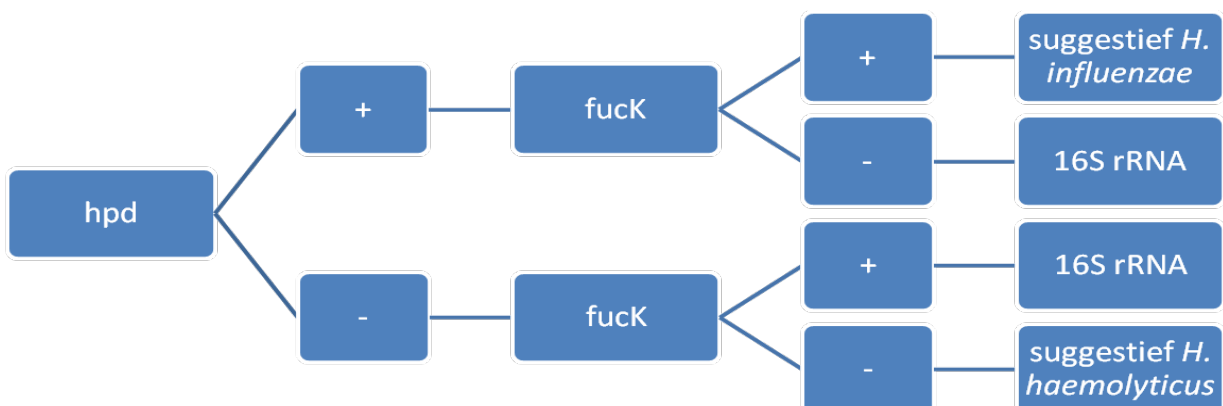
Tabel 10: Genotype van de isolaten gedefinieerd door *hpd* en *fucK* PCR assay. (19)

Assay	No. of <i>H. influenzae</i> isolates with positive result/total no. of isolates tested	% sensitivity (95% CI)	No. of <i>H. haemolyticus</i> isolates with negative result/total no. of isolates tested	% specificity (95% CI)
<i>hpd</i> PCR	69/78	88.5 (0.79–0.95)	43/44	97.7 (0.88–1.00)
<i>fucK</i> PCR	50/78	64.1 (0.52–0.75)	44/44	100 (0.92–1.00)
<i>hpd</i> or <i>fucK</i> PCR	72/78	92.3 (0.84–0.97)	43/44	97.7 (0.88–1.00)

^a 16S rRNA gene sequencing was used as the reference standard to confirm the identity of the isolates. CI, confidence interval.

Tabel 11: Sensitiviteit en specificiteit voor detectie van *H. influenzae*. (19)

Op basis hiervan stellen ze een flowchart voor waarbij PCR voor de detectie van beide genen wordt gecombineerd waardoor je een sensitiviteit en specificiteit van respectievelijk 92.3% en 97.7% bereikt. (figuur 5). (19)



Figuur 5: Flowchart voor detectie van *H. influenzae* via PCR. (19)

In een overkoepelend onderzoek hebben Binks et al. (2012) verschillende eerder gepubliceerde PCR gebaseerde methodes voor het onderscheid tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus*, met elkaar vergeleken om zo aan te tonen welke methode en primers de beste sensitiviteit en specificiteit vertonen. Hiervoor hebben ze op een populatie van 60 fenotypisch geïdentificeerde *H. influenzae* verschillende single gen targets uitgetest, waarbij *hpd1*, *hpd3* en *iga* de beste sensitiviteit en specificiteit vertoonden (88.9%, 91.7% respectievelijk) om *H. influenzae* te onderscheiden van andere *H. species* ten opzichte van de overig uitgeteste single gen target analyses (tabel 12).

n = 60	<i>omp P2</i>	<i>omp P6</i>	<i>omp P6 HRM</i>	<i>lgtC</i>	<i>hpd#1</i>	<i>hpd#3</i>	16S	<i>fucK</i>	<i>iga</i>
Sensitivity	80.6	94.4	94.4	80.6	88.9	88.9	69.4	75	88.9
Specificity	91.7	62.5	66.7	94.8	91.7	91.7	87.5	75	91.7
ROC area	0.86	0.78	0.81	0.88	0.90	0.90	0.78	0.75	0.90
[95% CI]	[0.77; 0.94]	[0.68; 0.89]	[0.70; 0.91]	[0.80; 0.96]	[0.83; 0.98]	[0.83; 0.98]	[0.68; 0.89]	[0.63; 0.86]	[0.83; 0.98]

Tabel 12: Sensitiviteit, specificiteit en ROC curve area van verschillende PCR assays voor niet typeerbare *H. influenzae*. (20)

Verder suggereren Binks et al. dat *hpd3* een zeker voorkeur geniet, aangezien deze test een veel lagere detectielimiet heeft dan de andere twee testen (< 10 copies/reactie). (20)

In een ander onderzoek hebben Cattoir et al. (2006) een bibliotheek aangemaakt op basis van alle referentiestammen van *H. species* van *sodA* gen sequencing, gezien 16S rRNA gen sequencing vaak niet voldoende blijkt te zijn voor het onderscheid tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus* te maken omwille van de grote genetische verwantschap en de minieme verschillen in het 16S rRNA gen. Op basis van deze *sodA* gen sequencing hebben ze dan een fylogenetische stamboom opgesteld. Nadien hebben ze 38 klinische stalen met *sodA* gen sequentie trachten te identificeren en voor 37 stalen kwam men een duidelijke identificatie uit. In hun onderzoek konden ze aantonen dat het *sodA* gen grotere verschillen vertoonde tussen de verschillende *H. species* dan het 16S rRNA gen. (24)

Sandstedt et al. hebben in 2010 ook onderzoek gedaan om te kijken of er genetische verschillen zijn tussen niet typeerbare *H. influenzae* stammen die voorkomen met kinderen met recidiverende otitis media versus niet typeerbare *H. influenzae* stammen geïsoleerd bij gezonde kinderen. Hieruit bleek dat de *H. influenzae* stammen bij recidiverende otitis media meer overeenkomst hadden in bepaalde genetische elementen met type B *H. influenzae* dan die stammen geïsoleerd bij gezonde kinderen. Hiermee wilde men aantonen dat er op basis van de genetische samenstelling veel gezegd kan worden over het pathogeen karakter van bepaalde *H. influenzae* stammen. Dit is misschien nuttig om in de toekomst wanneer er nog meer over begrepen is profylactisch in te grijpen bij kolonisatie met meer pathogene stammen. (25)

Uit deze literatuurstudie kunnen we concluderen dat er op moleculair niveau verschillende methodes bruikbaar zijn om de identificatie van *H. influenzae* te verbeteren. Zo kan men via multi locus gen analyse regelmatig tot een goede identificatie komen, deze methode is echter niet eenvoudig en tijdrovend. Om deze problemen uit de weg te gaan kan men met behulp van single gen target analyse ook een identificatieschema opstellen. Algemeen lijken *hpd* en *iga* de beste sensitiviteit en specificiteit te bereiken. Maar er dient opgemerkt te worden dat 1 single gen target PCR onvoldoende is om een ondubbelzinnige identificatie te bekomen. Dit omdat er door de grote genetische verwantschap en door de mogelijkheid van recombinatie tussen *H. influenzae* en *H. haemolyticus* er steeds stammen zijn die voor een moeilijke identificatie zullen zorgen gezien ze niet volledig voldoen aan alle criteria die opgesteld zijn voor het onderscheid te kunnen maken.

To do/ACTIONS

- 1) Eventuele validatie (en aanvullen) van de aangepaste MALDITOF-MS bibliotheek voor betere identificatie van *H. species* via MALDITOF-MS.
- 2) Uittesten van enkele single target genen (*hpd3*, *fuck*, *iga*) om een eenvoudig en betrouwbaar identificatieschema te bekomen voor de identificatie van *H. influenzae* versus *H. haemolyticus* via moleculaire diagnostiek.

ATTACHMENTS

Attachment I

staalnummer	aard staal	BRUKER bib	score	Eigen gemaakte "universele" bib	score	HAHA in ID (positie)	HAHA in ID (aantal keer)	taxo	ID Quad plaat
ATCC33390	ATCC	HAIN	2,257	HAHA	2,358	1/7/8	3	XV	HAHA
30204023	sputum	HAIN	2,324	HAIN	2,389	9	1	nu	HAIN
30204046	oog	HAIN	2,24	HAIN	2,358	8	1	XV	HAIN
30205057	BAL	HAIN	2,411	HAIN	2,397	0	0	XV	HAIN
30205030	sputum	HAIN	2,241	HAIN	2,207	9	1	XV	HAIN of HAHA
30204040	eta	HAIN	2,056	HAHA	1,885	1	1	XV	HAIN
30205100	sputum	H.parainfluenzae	2,187	HAPA	2,198	0	0	V	HAPA
30205029	sputum	HAIN	2,32	HAIN	2,298	0	0	XV	HAIN
30204101	sputum	HAIN	2,203	HAIN	2,151	0	0	XV	?
ATCC33390	ATCC	HAIN	2,273	HAHA	2,495	1/5/6/8	4	XV	HAHA
30207020	eta	HAIN	2,301	HAIN	2,346	3/7/10/	3	XV	HAIN
30206044	sputum	HAIN	2,096	HAIN	2,016	3/4/11/	3	XV	HAIN
30208008	eta	HAIN	2,344	HAIN	2,306	7/8/	2	nu	HAIN
30205031	sputum	HAIN	2,248	HAIN	2,241	2/3/4/6	4	XV	HAHA
30208175	sputum	HAIN	2,367	HAIN	2,327	3/8/10	3	nu	HAIN
30209034	sputum	HAIN	2,375	HAIN	2,383	6/7	2	XV	HAIN
30209036	sputum	HAIN	2,41	HAIN	2,496	2/6/7	3	XV	HAIN
30211006	BA	HAIN	2,365	HAIN	2,194	4	1	XV	HAIN of HAHA
30211074	BA	HAIN	2,388	HAIN	2,25	3/4/7/	3	XV	HAIN
30215011	eta	HAIN	2,4	HAIN	2,275	7	1	nu	HAIN
30214122	oog	HAIN	2,321	HAIN	2,362	9	1	XV	HAIN
30216064	sputum	HAIN	2,455	HAIN	2,406	0	0	nu	HAIN
30217023	BA	HAIN	2,447	HAIN	2,352	2/4/6/7/10	5	XV	HAIN
30218051	eta	HAIN	2,345	HAIN	2,436	7/10/	2	XV	HAIN
30219086	BA	HAIN	2,079	HAIN	2,071	2/4/5/8/9	5	XV	HAHA

30221047	eta	HAIN	2,383	HAIN	2,344	0	0	nu	
30221045	sputum	HAIN	2,237	HAIN	2,237	0	0	XV	HAIN
30221013	sputum	HAIN	2,332	HAIN	2,32	2/9/	2	XV	?
30221044	sputum	HAIN	1,861	HAIN	2,176	1/2/4/10	4	XV	HAIN
30220060	BA	HAIN	2,362	HAIN	2,354	10	1	XV	HAIN
30220120	sputum	HAIN	2,361	HAIN	2,278	0	0	XV	HAIN
30220119	sputum	HAIN	2,327	HAIN	2,32	0	0	XV	
30223064	sputum	HAIN	2,397	HAIN	2,329	2/3/5/8/9/10	6	nu	HAIN
30225095	oor	HAIN	2,354	HAIN	2,359	4/5/9/10	4	nu	HAPA OF HAIN
30223070	sputum	HAIN	2,389	HAIN	2,333	2/5/6/9/10	5	XV	HAIN
30225103	sputum	HAIN	2,396	HAIN	2,317	2/3/4/10	4	XV	HAIN
30225039	eta	HAIN	2,473	HAIN	2,499	7	1	XV	HAPA OF HAIN
30225141	sputum	HAIN	2,286	HAIN	2,216	3/4/5/7/10	5	XV	HAPA OF HAIN
30225047	eta	HAIN	2,409	HAIN	2,402	2/7/8/9/	4	XV	HAPA OF HAIN
30225045	sputum	HAIN	2,418	HAIN	2,465	4/8/	2	XV	HAIN
30227102	eta	HAIN	2,287	HAIN	2,286	3/4/5/6/7/8/	6	XV	HAIN
30227072	eta	HAIN	2,271	HAIN	2,292	1/3/5/6/8/9/	6	XV	HAIN
30301064	BAL	HAIN	2,411	HAIN	2,471	2/7/8/9/	4	nu	HAIN
30301041	sputum	HAIN	2,451	HAIN	2,432	2/4/6/7/10	5	nu	HAIN
30227117 (1)	BA	HAIN	2,449	HAIN	2,429	4/7/8/	3	XV	HAPA OF HAIN
30227117 (2)	BA	HAIN	2,487	HAIN	2,47	2/4/7/10/	4	XV	HAPA OF HAIN
30301056	oog	HAIN	2,516	HAIN	2,482	3/4/9/	3	nu	HAIN
30227130	oor	HAIN	2,408	HAIN	2,416	7/9/	2	nu	HAIN
30302028 (1)	sputum	HAIN	2,357	HAIN	2,3	7/8/10/	3	XV	HAPA
30302028 (2)	sputum	HAIN	2,365	HAIN	2,351	4/8/10/	3	XV	HAPA
30303042	sputum	HAIN	2,486	HAIN	2,512	2/4/5/7/	4	XV	HAIN
30303024	sputum	HAIN	2,506	HAIN	2,481	2/7/8/10	4	XV	HAIN
30304060	sputum	HAIN	2,364	HAIN	2,35	8/10/	2	XV	HAIN
30304063	eta	HAIN	2,417	HAIN	2,375	2/7/8/10	4	XV	?

30304087	BA	HAIN	2,399	HAIN	2,428	2/6/9/	3	XV	HAIN
30304073	eta	HAIN	2,481	HAIN	2,508	2/4/10/	3	XV	HAIN

(afkortingen: zie bijlage 4)

Attachment 2

Studie (jaar)	Onderwerp/doel	Populatie	Uitvoering	Resultaten	Conclusie
Murphy et al. (2007) (7)	<ul style="list-style-type: none"> - aandeel van HAHA in de (commensale) flora van respiratoire stalen bepalen - mogelijke pathogeniteit van HAHA in LW aantonen 	490 schijnbare HAIN uit respiratoire stalen <ul style="list-style-type: none"> - invasieve isolaten - COPD sputum - nasofarynx kinderen - middenoor stalen - ATCC stam HAIN en HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - eerst verschillende methodes bekeken om te evalueren hoe HAHA te identificeren - 16SrRNA sequencing - MLSA - DNA-DNA hybridisatie - Ab 7F3 OMP 6 - 490 stammen ID opnieuw bekeken: <ul style="list-style-type: none"> - Ab 7F3 OMP P6 - 16S rRNA - Prevalentie van COPD opstoot geëvalueerd ikv HAHA of HAIN aanwezigheid 	<ul style="list-style-type: none"> - 39.5% sputum stalen en 27.3% nasopharyngeale isolaten eigenlijk HAHA (fout geïdentificeerd door conventionele methodes als HAIN) - Nieuwe HAHA stammen bij COPD patiënten niet gepaard met COPD exacerbatie vs 45% exacerbatie bij nieuwe HAIN - Invasieve stalen praktisch geen HAHA (wel HAIN); uitzondering biotype 4 HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - HAHA vermoedelijk eerder commensaal → niet gepaard met COPD exacerbaties - Commensale HAHA mogelijk reservoir van recombinante resistentiegenen - Onbetrouwbare ID met conventionele methodes waardoor foute ID van HAIN - Onnodig gebruik van AB bij foute identificatie
Mukundan et al. (2007) (10)	Dynamiek beschrijven van pharyngeale kolonisatie met HAIN en HAHA	4 gezonde volwassenen (A-D) waaruit verschillende <i>H. species</i> isolaten gerecupereerd werden - 860 isolaten	<ul style="list-style-type: none"> - 412 isolaten: <ul style="list-style-type: none"> - XV - Hemolyse - Ab 7F3 OMP P6 - <i>iga</i> gen - 358 isolaten: Genotype bepaald 	<ul style="list-style-type: none"> - 84% HAIN, 11% HAHA, 18% niet hem HAHA (1 variant) - 11, 15, 7 en 10 verschillende genotypes in drager A, B, C en D respectievelijk 	Dragerschap van verschillende genotypes → meer onderzoek hierop kan misschien informatie geven over virulentiefactoren en voorbeschikkende factoren voor pathogeniteit
Hotomi et al. (2010) (11)	Klinische impact van HAHA evalueren bij acute pharyngotonsillitis	199 <i>H. species</i>	<ul style="list-style-type: none"> - PCR via 16SrRNA en <i>iga</i> - Gevoeligheid tg 5 AB - PFGE 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>iga</i> + bij HAIN, - bij HAHA - 16S-Nor + bij HAIN, 16S-Pro + bij HAHA - HAIN vaker WBC > 7000/mm³ en CRP > 8 mg/dL - PFGE toont 2 overlappende clusters - Alle HAHA waren beta-hem 	<ul style="list-style-type: none"> - HAHA vermoedelijke eerder commensale flora pharynx ipv reden van acute pharyngotonsillitis - genetische uitwisseling tss HAHA en HAIN wsl reden voor overlappende clusters - In Japan vermoedelijk minder niet hemolytische HAHA
Kirkham et al. (2010) (13)	Gebruik van PCR voor differentiatie HAHA en ntHAIN in nasofaryngeale wissers van gezonde kinderen vs kinderen met recidiverende otitis media	267 nasopharyngeale wissers (lft 6-36 m) - 266 ntHAIN like isolaten	16SrRNA gen PCR met primers voor HAIN en voor HAHA → dan op gel zetten en kijken welke primers aanwezig zijn (en dus konden amplificeren)	<ul style="list-style-type: none"> - ntHAIN like isolaten van 139 kinderen - dragerschap 65.6% bij kinderen met rec OM - dragerschap 21% bij gezonde kinderen - 78.9% true ntHAIN vs 11.7% HAHA; 9.4% niet te onderscheiden (alle stalen) 	<ul style="list-style-type: none"> - Eigenlijk dragerschap true ntHAIN 55.9% bij rec OM vs 20.5% HAHA - Dragerschap true ntHAIN 18.5% bij gezonde kinderen vs 11.8% HAHA
Hare et al. (2012) (14)	Aandeel van HAHA bij Australische kinderen met bronchiectasieën bepalen	214 stalen <ul style="list-style-type: none"> - nasopharyngeale wissers (n = 84) 	108 fenotypische ntHAIN <i>hpd3</i> op getest	<ul style="list-style-type: none"> - Nasopharynx: 87% bevestigd als ntHAIN - BAL vochten: 88% bevestigd als ntHAIN - Oropharynx: 65% vermoedelijk HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - Belang van ntHAIN als OLW pathogeen bevestigd - Nasopharynx vnl gekoloniseerd met

		- BAL vocht (n = 84) - oropharyngeale wisser (n = 56) Waarvan 108 ntHAIN fenotypisch			ntHAIN - oropharynx ook kolonisatie van HAHA - kolonisatie van OLW en BLW geeft beeld over mogelijke contaminatie van stalen
Fenger et al. (2012) (15)	- voorkomen van nhHAHA die fout geïdentificeerd is herevalueren - voorkomen van herinfectie met HAIN ondanks AB therapie	192 vermoedelijke HAIN isolaten gehervalueerd	- <i>sodC</i> en <i>fucK</i> - bij ambigue resultaten MLSA uitgevoerd - PFEG van opeenvolgende stalen van zelfde patiënten gekend met HAIN	- slechts 3% (6 stammen) foute identificatie waarvan 5 enkel X afhankelijk - slechts 0.5% (1stam) nh HAHA - ondanks R/AB toch regelmatig zelfde stam HAIN	- mis identificatie van nh HAHA valt nog mee, waardoor “geruststelling” ivm agressieve R/ AB in het desbetreffende centrum - ondanks wsl effectief als behandeling voor de infectie bekomt men geen eradicatie van HAIN door 2 weken R/ AB

(afkortingen: zie bijlage 4)

Attachment 3

Studie (jaar)	Onderwerp/doel	Populatie	Uitvoering	Resultaten	Conclusie
King Jordan et al. (2011) (18)	5 whole genome sequenties gemaakt van HAHA	5 HAHA stammen (2 dragerschap en 3 pathogene stammen)	Deze 5 vgl met 19 whole genome sequenties van HAIN	54 mogelijke regio's gevonden die aanwezig zijn bij HAHA en niet bij HAIN	Potentiële nieuwe markers hier te vinden?
Anderson et al. (2012) (17)	Nagaan of HAHA invasieve ziekten gemist zijn door misidentificatie als HAIN	161 isolaten tss 2009-2010 213 isolaten tss 1999-2000	- Allen fenotypisch bekeken - allen <i>hpd</i> en <i>fucK</i> PCR - 7 stammen 16SrRNA	7 casussen bekomen die eigenlijk veroorzaakt waren door HAHA ipv HAIN	- in het verleden wsl gemiste HAHA infecties door misidentificatie als HAIN door gebrek aan voldoende goede betrouwbare methodes - single gen sequencing onvoldoende voor onderscheid te maken - schema met verschillende technieken wsl beste optie voor betrouwbaar onderscheid te maken - <i>hpd</i> en <i>iga</i> beste genen - verder <i>fucK</i> , <i>OMP P6</i> , <i>hap</i> en <i>sodC</i>
Morton et al (2012) (16)	Alle invasieve HAIN van Oklahoma OSDH PHL tss 2003-2004 onderzoeken op haem-ijzer, bijkomend identificatie uitgevoerd	Stam HI 2028 (van collectie invasieve HAIN tss 2003-2004 van OSDH PHL)	- <i>fucK</i> gen - 16S rRNA - <i>Adk</i> , <i>pgi</i> , <i>recA</i> , <i>infB</i> en 16S rRNA	Niet hemolytische HAHA (origineel benoemd als HAIN) kunnen identificeren van een patiënt met bacteriëmie	Niet hemolytische HAHA (origineel benoemd als HAIN) kunnen identificeren van een patiënt met bacteriëmie → suggestie dan HAHA soms fout geïdentificeerd is als HAIN en toch ook invasieve ziekte kan veroorzaken!

(afkortingen: zie bijlage 4)

Attachment 4

Studie (jaar)	Onderwerp/doel	Populatie	Uitvoering	Resultaten	Conclusie
McCrea et al. (2008) (8)	Evaluatie van de relatie tussen ntHAIN en HAHA door gebruik van MLSA (<i>adk</i> , <i>pgi</i> , <i>recA</i> , <i>infB</i> , <i>16SrRNA</i>), klassieke taxonomie, <i>iga</i> gen en 3 andere genen (geassocieerd met virulentie (LOS)) (<i>licA</i> , <i>lic2A</i> , <i>lgtC</i>)	<ul style="list-style-type: none"> - 4 ref stam HAIN - 1 ref stam HAHA - 88 HAIN - 109 HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - MLSA (<i>adk</i>, <i>pgi</i>, <i>recA</i>, <i>infB</i> en <i>16SrRNA</i>) - Aanwezigheid <i>iga</i> gen via PCR - Aanwezigheid <i>OMP P6</i> via immunoassay (Ab 7F3) - Virulentie geassocieerde genen (<i>licA</i>, <i>lic2A</i> en <i>lgtC</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>iga</i> 100% + bij HAIN - <i>iga</i> 0% HAHA - <i>OMP P6</i> 96.6% + bij HAIN - <i>OMP P6</i> 11.9% + bij HAHA - Zie tabel 3 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>iga</i> + bij ntHAIN, - bij HAHA - <i>lgtC</i> + bij 100% ntHAIN, + bij 2% HAHA - andere LOS genen ook hogere prevalentie bij ntHAIN - resultaten van allerlei fylogenetische en taxonomische testen zijn suggestief dat er recombinitie bestaat tussen HAIN en HAHA
Murphy et al. (2007) (7)	<ul style="list-style-type: none"> - aandeel van HAHA in de (commensale) flora van respiratoire stalen bepalen - mogelijke pathogeniteit van HAHA in LW aantonen 	490 schijnbare HAIN uit respiratoire stalen <ul style="list-style-type: none"> - invasieve isolaten - COPD sputum - nasofarynx kinderen - middenoor stalen - ATCC stam HAIN en HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - eerst verschillende methodes bekeken om te evalueren hoe HAHA te identificeren - 16SrRNA sequencing - MLSA - DNA-DNA hybridisatie - P6 gen - 490 stammen ID opnieuw bekeken: <ul style="list-style-type: none"> - P6 gen - 16S rRNA - Prevalentie van COPD opstoot geëvalueerd ikv HAHA of HAIN aanwezigheid 	<ul style="list-style-type: none"> - 39.5% sputum stalen en 27.3% nasopharyngeale isolaten eigenlijk HAHA (fout geïdentificeerd door conventionele methodes als HAIN) - Nieuwe HAHA stammen bij COPD patiënten niet gepaard met COPD exacerbatie vs 45% exacerbatie bij nieuwe HAIN - Invasieve stalen praktisch geen HAHA (wel HAIN); uitzondering biotype 4 HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - HAHA vermoedelijk eerder commensaal → niet gepaard met COPD exacerbaties - Commensale HAHA mogelijks reservoir van recombinante resistentiegenen - Onbetrouwbare ID met conventionele methodes waardoor foute ID van HAIN - Onnodig gebruik van AB bij foute ID
Chang et al. (2010) (22)	Evaluatie van <i>OMP P6</i> sequencing	163 isolaten (62 oropharynx, 50 nasopharynx, 51 middenoor)	<ul style="list-style-type: none"> - <i>OMP P6</i> sequencing uitgevoerd 	<ul style="list-style-type: none"> - Ongeveer 10% HAIN andere aminozuursequentie 	<i>OMP P6</i> alleen is niet voldoende, er zijn ntHAIN die andere <i>OMP P6</i> aminozuursequentie hebben
Sandstedt et al. (2008) (21)	Vergelijken van nieuwe snelle methode voor ntHAIN te onderscheiden van HAHA	393 <i>Haemophilus</i> stammen (keelwissers van kinderen uit kinderopvang) (3 collecties)	<ul style="list-style-type: none"> - Library-on-a-slide microarray <i>iga</i> - conserved region - variable region - Genetische dotblot <i>iga</i> (variabele regio) (McCrea et al) - Immunoblot Ab 7F3 - MLSA fylogenetische stamboom 	<ul style="list-style-type: none"> - microarray ontwikkeld voor conserved en variable regio van <i>iga</i> gen - 393 stammen - conserved: 84% + - variable: 76% + - Zie tabel 1+2 	<ul style="list-style-type: none"> - ME stamboom als gouden standaard beschouwen - <i>iga</i> gen dotblot 100% juiste categorisering - <i>iga</i> variabele microarray 96% - Microarray snelle en goedkopere manier (batch, hands-on-time- costs)
Wang et al. (2011) (23)	2 nieuwe rtPCR voor <i>hpd1</i> en <i>hpd3</i> uittesten voor identificatie van HAIN	<ul style="list-style-type: none"> - 63 niet HAIN isolaten en 237 HAIN isolaten - 111 CSV van kinderen met vermoeden van bacteriële meningitis 	<ul style="list-style-type: none"> - sensitiviteit en specificiteit van <i>hpd1</i>, <i>hpd3</i> vs <i>OMP P2</i>, <i>bexA</i> cultuur vs rtPCR (inclusief voor NEME en SRPN) gevoeligheid 	<ul style="list-style-type: none"> - tabel 3 + 4 +6 - <i>hpd1</i> en <i>hpd3</i> goede sensitiviteit > <i>OMP P2</i> en <i>bexA</i> - <i>hpd3</i> LOD < LOD van <i>hpd1</i> - tabel 5 - rtPCR verbeterde detectie van bacteriële meningitis van 50% naar 75% vergeleken met cultuur (dode stammen?) 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>hpd3</i> goede sensitiviteit en specificiteit - beter dan <i>bexA</i> gezien deze alleen omkapselde HAIN - gezien vaccinatie groter belang van ntHAIN - rtPCR gevoeliger dan enkel cultuur voor bevestiging van bacteriële meningitis
Theodore et al. (2012) (19)	<i>hpd</i> en <i>fucK</i> PCR assays vergelijken met 16S rRNA sequencing voor de identificatie	<ul style="list-style-type: none"> - 245 veronderstelde HAIN - 31 HAHA 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>hpd</i> en <i>fucK</i> PCR assay (alle isolaten) - 16s rRNA gen sequencing bij 	<ul style="list-style-type: none"> - alle HAHA en andere <i>H. species</i> waren <i>hpd</i> en <i>fucK</i> negatief 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>hpd</i> PCR alleen: sensitiviteit 88.5% specificiteit 97.7% - <i>fucK</i> PCR alleen: sensitiviteit 64.1% specificiteit

	van HAIN versus HAHA	(hemolytisch) - 128 andere <i>H. species</i>	geselecteerde groep: - 47 <i>hpd</i> en <i>fucK</i> + - 46 <i>hpd</i> en <i>fucK</i> - (van veronderstelde HAIN groep) - 26 + voor 1 vd 2 - 3 hemolytische HAHA	- van de veronderstelde HAIN: - 49.4% <i>hpd</i> en <i>fucK</i> + - 40% <i>hpd</i> en <i>fucK</i> - - 10.6% + voor 1vd 2 - 16SrRNA: - alle <i>hpd</i> en <i>fucK</i> + HAIN - 25 1 vd 2 +: HAIN - 40 <i>hpd</i> en <i>fucK</i> - HAHA	100% - <i>hpd</i> en <i>fucK</i> : sensitiviteit 92.3% specificiteit 97.7% - wanneer men 1 test gebruikt is <i>hpd</i> geprefereerd
Binks et al. (2012) (20)	Vergelijken en evalueren van de mogelijkheid van de verschillende PCR gebaseerde methodes die reeds beschreven zijn en enkele nieuwe	- 60 stammen fenotypisch ntHAIN - 2 ref stam HAIN - 1 ref stam HAHA	Verskillende PCR methods uitgetest	Zie tabel 2, tabel 3 en figuur 3	- Geen enkel singel gen target kan overduidelijk onderscheid maken - <i>hpd3</i> beste sensitiviteit, specificiteit en LOD voor nt HAIN
Cattoir et al. (2006) (24)	Constructie van een <i>sodA</i> bibliotheek van 15 <i>Haemophilus species</i> referentiestammen en aantonen van nut bij snelle identificatie van klinische isolaten	- 15 referentiestammen <i>Haemophilus species</i> - 38 onafhankelijke klinische isolaten	- <i>sodA</i> seq van alle refstammen uitgevoerd en database gemaakt - 38 stammen <i>sodA</i> op gedaan en geanalyseerd ahv gemaakte databank → slechts 1 was niet overduidelijke te benoemen	Zie tabel 3	- <i>sodA</i> gen analyse is nuttig bij de identificatie van <i>H. species</i> - beter dan <i>rrs</i> gen sequence analyse - vervollediging van de <i>sodA</i> databank volgt nog
Sandstedt et al. (2010) (25)	Voorkomen van enkele gekende genetische eilanden van HAINb vgl met ntHAIN in klinische stalen en surveillancestalen en HAHA	-HAINb -ntHAIN van kinderen met AOM - ntHAIN van kinderen gezonde kelen - HAHA	8 genetische regio's opgezocht	- HAINb alle eilanden duidelijke meer aanwezig - ntHAIN AOM duidelijk meer HiGI2 en HiGI7 dan in gezonde kelen - HAHA meet HiGI4 en HiGI1-1	- suggestief dat er genetische uitwisseling is - HiGI2 en HiGI7 coderen waarschijnlijk voor proteïnen die een rol spelen bij virulentie

Afkortingen: HAHA: *H. haemolyticus*, HAIN: *H. influenzae*, ntHAIN: niet typeerbare HAIN, nhAHA: niet hemolytische HAHA, HAINb: type b HAIN, HAPA: *H. parainfluenzae*, eta: endotrachiaal aspiraant, BA: bronchus aspiraant, BAL: broncho-alveolaire lavage, LWV: luchtwegen, ID: identificatie, AB: antibiotica, hem: hemolytisch, rec OM: recidiverende otitis media, AOM: acute otitis media, rtPCR: real time poly chain reaction, NEME: N. meningitidis, SRPN: S. pneumoniae, LOD: limit of detection, ?: niet conclusief.