

**Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Prof. Dr. Oliver Kurzai

**Invasive *Haemophilus influenzae*-Isolate in Deutschland: Methodvalidierung
des VITEK MS IVD MALDI-TOF-MS und Untersuchung von Resistenzen gegen
Imipenem und Cefotaxim**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Sebastian Nürnberg

aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2021

Referentin: Priv.-Doz. Dr. Heike Claus

Korreferentin: Prof. Dr. Kathleen Wermke

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2023

Der Promovend ist Zahnarzt

Für Melissa

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Biologie des Organismus <i>Haemophilus influenzae</i>	1
1.2	Taxonomie des Genus <i>Haemophilus</i>	3
1.2.1	Taxonomische Einteilung der Spezies <i>H. influenzae</i>	6
1.2.1.1	Serotypeinteilung.....	6
1.2.1.2	Biotypeinteilung	6
1.2.2	Nahe Verwandte von <i>H. influenzae</i>	6
1.2.2.1	<i>H. intermedius</i>	6
1.2.2.2	<i>H. aegyptius</i>	7
1.2.2.3	Cryptic genospecies biotype IV (<i>H. quentini</i>).....	7
1.2.2.4	<i>H. haemolyticus</i> und die Abgrenzung von <i>H. influenzae</i>	8
1.3	Besiedlung, Klinik und Pathogenese von <i>H. influenzae</i>	11
1.4	Epidemiologie.....	13
1.5	Labordiagnostische Nachweismethoden	21
1.5.1	Molekularbiologische Methoden	21
1.5.1.1	Nachweis Spezies-spezifische Gene durch Amplifikation	21
1.5.1.2	Speziesnachweis und Typisierung durch Sequenzierung	22
1.5.2	MALDI-TOF-MS.....	24
1.6	Behandlung von <i>H. influenzae</i> -Infektionen.....	25
1.7	Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika bei <i>H. influenzae</i>	27
1.7.1	Heteroresistenzen	31
1.7.2	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	32
1.7.2.1	Bouillon-Mikrodilutionsmethode.....	32
1.7.2.2	Gradientenagardiffusionstest.....	33
1.7.3	Epidemiologie der Antibiotikaresistenzen bei <i>H. influenzae</i>	34
1.7.3.1	Ampicillin-Resistenz	34
1.7.3.2	Imipenem-Resistenz.....	35
1.7.3.3	Cefotaxim-Resistenz	36
1.8	Wissenschaftliche Fragestellungen	38
1.8.1	MALDI-TOF-MS-Analyse.....	38
1.8.2	Vergleich der Antibiotikaresistenztestungsverfahren Gradientenagardiffusion und Bouillon-Mikrodilution	39
1.8.3	Imipenem-Resistenz.....	39
1.8.4	Cefotaxim-Resistenz.....	40
2	Materialien und Methoden	42
2.1	Bakterienstämme	42
2.1.1	Auswahl des Studienkollektivs.....	42
2.1.1.1	MALDI-TOF-MS-Analyse.....	42
2.1.1.2	Imipenem-Resistenz.....	42
2.1.1.3	Cefotaxim-Resistenz	43
2.2	Speziesidentifikation und Stammcharakterisierung	44
2.2.1	Anzucht der Bakterienstämme.....	45
2.2.2	Faktoren-Test	46
2.2.3	Gramfärbung	48
2.2.4	Oxidase-Test	49
2.2.5	Objektträgeragglutination.....	50
2.2.6	Polymerasekettenreaktion	51
2.2.7	Nachweis Spezies-spezifischer Gene.....	54

2.2.7.1	Nachweis von <i>fucK</i> und <i>ompP2</i>	54
2.2.7.2	Sequenzierung von <i>ompP6</i>	54
2.2.8	Molekulargenetische Typisierung	55
2.2.8.1	Nachweis von <i>bexA</i>	55
2.2.8.2	Serotyp-PCR	55
2.2.8.3	MLST.....	56
2.2.8.3.2	MLST im Rahmen der MALDI-TOF-MS-Analyse	56
2.2.8.4	DNA-Isolierung und Genomsequenzierung	58
2.3	MALDI-TOF-MS-Analyse	60
2.4	Antibiotikaresistenztestung.....	63
2.4.1	β -Lactamase-Test.....	63
2.4.2	Bouillon-Mikrodilutionsmethode (BMD).....	63
2.4.2.1	Testvorbereitung	64
2.4.2.2	Testdurchföhrung	67
2.4.2.3	Ablesung, Bewertung und Befundung	67
2.4.2.4	Validierung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode.....	70
2.4.2.5.1	Intraassay-Reproduzierbarkeit	70
2.4.2.5.2	Interassay-Reproduzierbarkeit	71
2.4.2.5.3	Interrater-Reliabilität.....	71
2.4.3	Gradientenagardiffusionstest (GAD).....	72
2.4.3.1	Ablesung und Bewertung der Ergebnisse	72
2.4.4	Antibiotikaresistenzgrenzwerte	74
2.5	Molekulargenetische Charakterisierung durch Sequenzierung der Antibiotikaresistenzgene	75
2.5.1	<i>ftsI</i> -Sequenzierung	75
2.5.2	<i>acrR</i> -Sequenzierung.....	76
2.6	Geographische Analyse	76
2.7	Statistische Analyse	77
3	Ergebnisse	78
3.1	Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS-Analyse	78
3.1.1	Stammauswahl und molekulare Typisierung	78
3.1.2	MALDI-TOF-MS-Messungen	80
3.2	Validierung der Bouillon-Mikrodilution	82
3.2.1	Intraassay-Reproduzierbarkeit.....	82
3.2.2	Interassay-Reproduzierbarkeit.....	84
3.2.3	Interrater-Reliabilität	85
3.3	Imipenem-Resistenz.....	86
3.3.1	Epidemiologie der untersuchten Isolate.....	86
3.3.2	Bestimmung der Antibiotikaresistenz.....	86
3.3.3	Multilocus-Sequenztypisierung	89
3.3.4	PBP3-Mutationen	92
3.3.5	AcrR-Mutationen.....	92
3.4	Cefotaxim-Resistenz	93
3.4.1	Epidemiologie aller untersuchten Isolate	93
3.4.2	Bestimmung der Antibiotikaresistenz.....	94
3.4.3	Genomsequenzierung	97
3.4.4	PBP3-Mutationen	99
3.4.5	Epidemiologie der Cefotaxim-resistenten Isolate.....	101
3.4.6	Geographische Analyse.....	101
4	Diskussion.....	103
4.1	MALDI-TOF-MS-Analyse	108

4.2	Imipenem-Resistenz.....	115
4.3	Cefotaxim-Resistenz	120
5	Zusammenfassung	126
6	Literaturverzeichnis	128
7	Anhang	143
7.1	Abkürzungsverzeichnis	154
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	157
7.3	Tabellenverzeichnis.....	159
7.4	Danksagung	160
7.5	Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen	161

1 Einleitung

Haemophilus influenzae ist ein Erreger von Blutstrominfektionen und Hirnhautentzündungen, welcher trotz bestehender Impfung und möglicher Antibiotikatherapie weltweit von Bedeutung ist.

Die Grundlage für die epidemiologische Überwachung besteht zuallererst in der eindeutigen Identifikation, was in der Praxis weiterhin eine diagnostische Herausforderung darstellt. Zur wirksamen Krankheitsbekämpfung sind zudem fundierte Resistenzdaten nötig. Diese Promotionsarbeit wurde am Nationalen Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* durchgeführt, das im Auftrag des Robert Koch-Instituts die epidemiologische Überwachung invasiver *H. influenzae*-Infektionen in Deutschland durchführt. Ziel dieser Arbeit war es, im Interesse der Laborüberwachung zur Verbesserung der Diagnostik von *H. influenzae* beizutragen und fundierte Resistenzdaten zu den wichtigsten Antibiotika im Einsatz gegen invasive *H. influenzae*-Infektionen beizutragen.

1.1 Biologie des Organismus *Haemophilus influenzae*

Haemophilus influenzae ist ein Bakterium aus der Klasse der Gammaproteobacteria und Teil der Familie der Pasteurellaceae (1). Es stellt sich als fakultativ anaerobes, Gram-negatives, pleomorphes Stäbchen dar. Es ist weder beweglich, da es nicht begeißelt ist, noch bildet es Sporen aus.

Die Erstbeschreibung dieses Bakteriums geht auf Richard Pfeiffer zurück, der es im Jahr 1892 aus dem Bronchialsekret von 31 Patientinnen und Patienten mit Influenza isolieren und beschreiben konnte. Da er das Bakterium für die Ursache der Erkrankung hielt, gab er ihm den Namen „Influenza-Bacillus“. Schon damals beschrieb er die Bakterienkolonien morphologisch als klein, rund und glasig. Mikroskopisch stellten sich ihm die Bakterien als kleine, unbewegliche Stäbchen dar, die sich nach Gram nicht anfärben ließen, also Gram-negativ waren (2).

Der Name „*Haemophilus*“ (von griechisch: haema: Blut; philos: Freund) geht auf Winslow et al. 1917 beziehungsweise 1920 zurück. Sie beschrieben, dass

Bestandteile aus Blut oder Aszites für das aerobe Wachstum des Bakteriums essenziell sind (3, 4). Schon 1893 erkannte Pfeiffer, dass *H. influenzae* den Blutbestandteil Hämoglobin für sein Wachstum benötigt (5). Im Jahr 1922 stellten Thjötta et al. zwei verschiedene im Blut enthaltene Wachstumsfaktoren dar, von welchen das hämophile Bakterium abhängig ist: zum einen der „vitamine-like factor“, später als Faktor V beziehungsweise NAD bekannt und zum anderen den Faktor X, also Hämin. Das Vorhandensein der Faktoren V und X ist für das Wachstum von *Haemophilus influenzae* essenziell (6). Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺/NADH) ist als Protonendonator/-akzeptor wichtig für die meisten Redoxreaktionen lebender Organismen. Hämin oder auch Protoporphyrin fungiert als Coenzym vieler Redoxenzyme.

1933 beschrieben Smith et al. ein Virus als eigentliche Ursache der Influenza. Der Bezug zu dieser Virusinfektion ist aber im Speziesnamen von *Haemophilus influenzae* bis heute enthalten (7).

Ein weiterer wichtiger Meilenstein in der Geschichte des Bakteriums *Haemophilus influenzae* war die erfolgreiche Sequenzierung des gesamten Genoms des *H. influenzae*-Stamms Rd KW20 im Jahr 1995. Es war die erste vollständige Genomsequenzierung eines lebenden Organismus (8).

Obwohl die Spezies mehr als ein Jahrhundert wohlbekannt und auch genetisch gut charakterisiert ist, lässt sie sich nur schwer von nahe verwandten, gleichwohl klinisch und epidemiologisch weniger relevanten Spezies unterscheiden. Daher soll in dieser Einleitung auf die Taxonomie der Gattung *Haemophilus* eingegangen werden, um die Schwierigkeiten bei der Abgrenzung unterschiedlicher *Haemophilus*-Spezies zu beleuchten und deren praktische Relevanz für die medizinische Diagnostik aufzuzeigen.

1.2 Taxonomie des Genus Haemophilus

Haemophilus influenzae ist ein Bakterium aus der Klasse der Gammaproteobacteria und wird seit 1984 der Familie der Pasteurellaceae zugeordnet (1). Isolate des Genus *Haemophilus* sind allesamt Gram-negativ.

Ein weiteres wichtiges Merkmal ist die Cytochrom-c-Oxidase. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Komponente der Atmungskette, die der Elektronenübertragung und damit der Reduktion von O₂ zu H₂O dient. Dieses Enzym kann sowohl bei *H. influenzae* als auch bei nahe verwandten Spezies nachgewiesen werden (9). Damit lassen sich *Haemophilus*-Isolate von anderen Gram-negativen Bakterien wie Enterobacteriaceae oder ähnlichen abgrenzen und viele andere Spezies der Familie der Pasteurellaceae ausschließen. Es gibt einige Bakterienspezies der Familie der Pasteurellaceae, die ehemals der Gattung *Haemophilus* zugeordnet wurden. Dazu gehören *Aggregatibacter aphrophilus* und *segnis*, *Avibacterium avium* und *paragallinarum* sowie *Glaesserella parasius*. Bei diesen Spezies ist die Cytochrom-c-Oxidase nicht nachweisbar, sodass diese Spezies unter anderem aufgrund dieses Merkmals mittlerweile anderen Genera zugeordnet werden. Die Cytochrom-c-Oxidase ist bei allen *Haemophilus*-Spezies vorhanden, die als *Haemophilus sensu stricto* (lat.: im engeren Sinne) bezeichnet werden. Dazu gehören *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. intermedius*, *H. quentini* und *H. aegyptius*. Die Definition dieser Gruppe geht auf DNA-Hybridisierungsdaten von Burbach und Adlam zurück, die *H. parainfluenzae* ebenfalls in diese Gruppe einordneten (10, 11). Phylogenetische Experimente von Nørskov-Lauritsen et al. mit Analyse der 16S rRNA schlossen die Spezies *H. parainfluenzae* jedoch aus dieser Definition aus (12).

Die Gattung *Haemophilus* kann zudem je nach Abhängigkeit von den Faktoren X und V in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe ist die *H. influenzae*-Gruppe mit *H. influenzae*, *H. haemolyticus* und *H. aegyptius*, welche sowohl eine Abhängigkeit von Faktor V als auch von Faktor X zeigen. Die Spezies der *H. parainfluenzae*-Gruppe sind hingegen nur von Faktor V abhängig. Zu dieser Gruppe gehören die Spezies *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. pittmaniae* und *H. sputorum*. *H. ducreyi* ist der einzige Vertreter der dritten Gruppe und ist weder von Faktor V noch von Faktor X abhängig.

Die nicht offiziell anerkannten Spezies *H. intermedius* und *H. quentini* beziehungsweise Cryptic genospecies biotype IV werden in Abschnitt 1.2.2 näher beschrieben. Die ehemals als *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* und *Haemophilus segnis* benannten Spezies werden seit 2006 der Gattung *Aggregatibacter* zugeordnet, da gezeigt wurde, dass sich genetisch nur eine geringe Verwandtschaft zum Typstamm der Haemophili *Haemophilus influenzae* zeigt, die *Aggregatibacter*-Spezies jedoch untereinander nah verwandt sind (13). Dies konnten auch Nørskov-Lauritsen et al. bei einer molekulargenetischen Untersuchung von *Haemophilus* und *Aggregatibacter* spp. nachweisen. Die Verwandtschaftsbeziehung der Spezies anhand der 16S rRNA und Fragmenten der Gene *infB*, *pgi* und *recA* ist in Abbildung 1 in einem phylogenetischen Baum dargestellt.

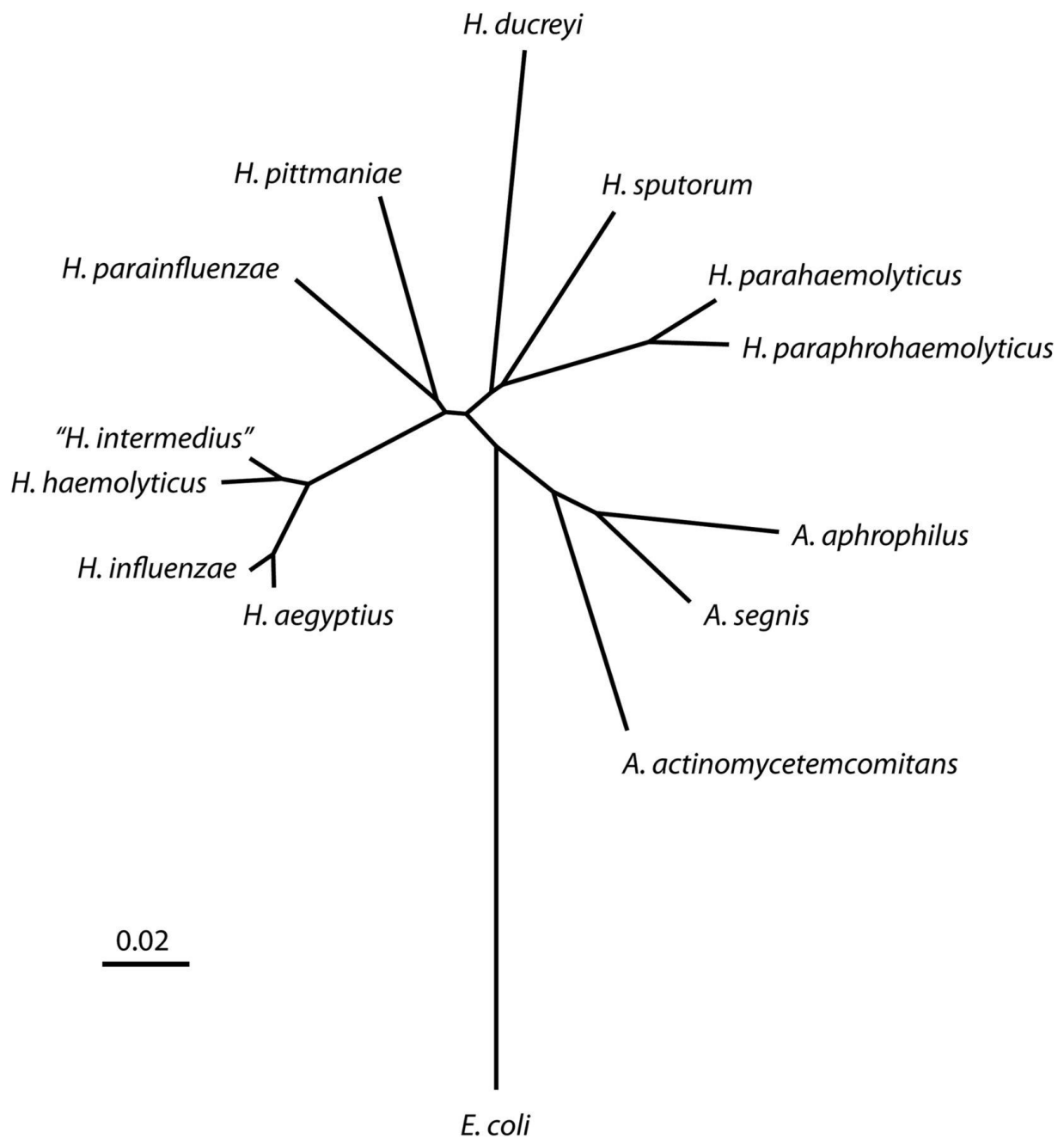


Abbildung 1: Verwandtschaft der verschiedenen *Haemophilus*- und *Aggregatibacter*-Spezies dargestellt im phylogenetischen Baum. Es wurden 16S rRNA sowie Fragmente der Gene *infB*, *pgi* und *recA* verwendet. *E. coli* diente als outgroup. Entnommen aus: Norskov-Lauritsen et al. 2014: Classification, Identification and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans (14). (Nachdruckerlaubnis liegt vor).

1.2.1 Taxonomische Einteilung der Spezies *H. influenzae*

1.2.1.1 Serotypeinteilung

Ein wichtiges Differenzierungskriterium von *H. influenzae*-Stämmen ist das Kapselpolysaccharid. Je nach Zuckeraufbau der Kapsel werden sechs verschiedene Kapselserotypen unterschieden. Diese werden mit den Buchstaben a-f bezeichnet. Darüber hinaus werden Stämme unterschieden, die keine Bekapselung vorweisen. Diese werden nicht-typisierbare *H. influenzae* (NTHi) genannt (15, 16).

1.2.1.2 Biotypeinteilung

Laut Kilian können *H. influenzae* neben der Einteilung in die sechs Kapselserotypen in acht verschiedene Biotypen eingeteilt werden. Diese Einteilung richtet sich nach dem Indol-Test (Produktion von Indol mittels Tryptophanase), dem Urease-Test und dem Ornithindecaboxylase-Test (ODC-Test). Die Einteilung ist in Tabelle 1 dargestellt (9).

Tabelle 1: Biotypeinteilung von *H. influenzae*¹

Biotyp	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Indol	+	+	-	-	+	-	+	-
Urease	+	+	+	+	-	-	-	-
ODC	+	-	-	+	+	+	-	-

¹definiert nach Kilian (9)

1.2.2 Nahe Verwandte von *H. influenzae*

1.2.2.1 *H. intermedius*

H. intermedius wurde 1987 von Burbach erstmalig beschrieben, da sich im Zuge einer DNA-Hybridisierung eine starke Ähnlichkeit zu *H. influenzae* und *H. haemolyticus* darstellte, die Stämme dieser Spezies jedoch keine Faktor-X-Abhängigkeit zeigten (11). Eine kürzlich veröffentlichte Studie befasste sich mit der phylogenetischen Verwandtschaft von *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. intermedius* und Häm-in-unabhängigen *H. haemolyticus*-Isolaten (hemin-independent *Haemophilus haemolyticus*, hiHh) auf Grundlage von Genomsequenzierungen 240 verschiedener Isolate dieser Spezies. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass die nicht offiziell anerkannte Spezies *H. intermedius* eine sehr nahe Verwandtschaft zu hiHh-Stämmen

aufweist. Daher konnten alle untersuchten *H. intermedius*-Isolate eindeutig der Spezies *H. haemolyticus* zugeordnet werden und es wurde geschlussfolgert, dass *H. intermedius* keine eigenständige Spezies ist (17).

1.2.2.2 *H. aegyptius*

H. aegyptius wurde schon 1883 von Robert Koch im Rahmen einer Untersuchung von Patientinnen und Patienten mit Konjunktivitis in Ägypten beschrieben (18) und im Jahr 1950 von Pittman und Davis benannt (19). Von einigen Autoren wurde jedoch in Frage gestellt, *H. aegyptius* als eigenständige Spezies zu bezeichnen, da phänotypische Unterscheidungsmerkmale, die in der Vergangenheit angeführt wurden, in späteren Studien widerlegt wurden (20-22). Auch Nørskov-Lauritsen et al. wiesen 2014 die sehr enge Verwandtschaft von *H. aegyptius* und *H. influenzae* durch eine MALDI-TOF-MS-Analyse nach (14). Außerdem zeigten sich in einer Multilocus-Sequenztypisierung (MLST), die ebenfalls von dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, keine zwei unterschiedlichen Spezies, sondern ein Cluster, das Stämme beider Spezies enthielt (Abbildung 23 in Abschnitt 4.1) (23). Die Vermutung liegt daher nahe, dass der ebenfalls für diese Spezies verwendete Name *H. influenzae* *biogroup aegyptius* der passendere ist.

1.2.2.3 Cryptic genospecies biotype IV (*H. quentini*)

Die Cryptic genospecies biotype IV findet sich vor allem bei Infektionen des Urogenitaltrakts, wurde erstmals in Kanada beschrieben und von Quentin et al. weiter erforscht (24). Daher ist diese Spezies auch unter dem Namen *Haemophilus quentini* bekannt. Phänotypisch haben Stämme dieser Spezies dieselben Eigenschaften wie die des *H. influenzae* Biotyps IV. Sie sind also Indol-negativ und Urease- und ODC-positiv (Tabelle 1). Genotypisch können die Isolate dieser Spezies jedoch sowohl durch Analyse der 16S rRNA (24) und wie 2018 gezeigt wurde, auch durch Vergleich der kompletten Genome (25) eindeutig einer eigenen Spezies zugeordnet werden. Diese ist zwar nah verwandt mit *H. influenzae* und *H. haemolyticus*, aber dennoch genetisch so weit entfernt, dass sie als eigene Spezies zu betrachten ist.

1.2.2.4 *H. haemolyticus* und die Abgrenzung von *H. influenzae*

H. haemolyticus wurde als Speziesname zum ersten Mal in der ersten Ausgabe des Bergey's Manual of Determinative Bacteriology im Jahre 1923 veröffentlicht und ist seitdem als eigenständige Spezies etabliert (26). Dabei handelt es sich um einen zur β -Hämolyse fähigen nahen Verwandten von *H. influenzae*. *H. influenzae* und *H. haemolyticus* lassen sich phänotypisch weder hinsichtlich makroskopischer Koloniemorphologie noch mikroskopisch unterscheiden. *H. haemolyticus* ist ebenfalls von den Faktoren V und X abhängig. Die eigentlich speziesbestimmende β -Hämolyse bei *H. haemolyticus* ist jedoch, obwohl durch den Namen der Spezies impliziert, kein zuverlässiges Unterscheidungskriterium. Zwar zeigt *H. haemolyticus* im Gegensatz zu *H. influenzae* eine β -Hämolyse auf Pferdeblut-, Rinderblut- und Kaninchenblutagar, nicht jedoch auf dem in der diagnostischen Routine verwendeten Schafblutagar (27). Außerdem wurden schon 1976 nicht-hämolisierende *H. haemolyticus*-Stämme beobachtet und das Phänomen beschrieben, dass *H. haemolyticus* die Fähigkeit zur Hämolyse nach einer oder mehreren Subkulturen verlieren kann (28). Auch Fehlidentifikationen von nicht-hämolisierenden *H. haemolyticus*-Stämmen bei Patientinnen und Patienten mit Mukoviszidose wurden in der Vergangenheit beschrieben (29).

1976 beschrieb Kilian eine Gasproduktion bei der Fermentation von Glucose sowie die Produktion von H_2S und das Fehlen der Ornithindecaboxylase als phänotypische Merkmale von *H. haemolyticus*, die ausschließlich bei dieser Spezies zu finden seien (30). Diese Merkmale wurden 2008 durch McCrea et al. evaluiert, indem sie 88 *H. influenzae*- und 109 *H. haemolyticus*-Stämme auf diese Merkmale hin untersuchten. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass sich diese phänotypischen Merkmale zwar signifikant häufiger, jedoch keineswegs ausschließlich bei *H. haemolyticus* nachweisen ließen, sodass die Testung dieser Merkmale keine zuverlässige Unterscheidung der beiden Spezies zulässt (31).

Ebenso wurde von Kilian et al. die Produktion einer IgA-Protease, die das Bakterium zur Spaltung von IgA1 befähigt, nur *H. influenzae* zugeschrieben (32). Die Produktion einer IgA-Protease als eindeutiges Unterscheidungskriterium der beiden Spezies wurde jedoch widerlegt. Hedegaard et al. fanden im Jahr 2001 *H. haemolyticus*-

Stämme mit der Fähigkeit IgA zu spalten (33). Ebenso konnten Nørskov-Lauritsen et al. 2009 zeigen, dass auch einige der von ihnen getesteten *H. haemolyticus*-Stämme in der Lage waren IgA zu spalten und sich zudem in der DNA-Hybridisierung IgA-Protease-positiv zeigten (23).

Kommerziell erhältliche biochemische Tests wie der Analytische-Profil-Index für Neisseriae und Haemophili (apiNH, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) oder die VITEK® 2 *Neisseria-Haemophilus* Identifikationskarte (VITEK® 2 NH ID, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich) sind ebenfalls nur eingeschränkt zur Unterscheidung der beiden Spezies tauglich, wie einige Autoren in der Vergangenheit zeigten (34-38). Da die VITEK® 2 NH ID card jedoch kürzlich aktualisiert wurde, steht eine neuerliche Überprüfung der Testmethode hinsichtlich dieser Fragestellung aus.

Die Schwierigkeiten bei der Differenzierung der beiden Spezies *H. influenzae* und *H. haemolyticus* durch phänotypische Merkmale, aber auch durch einige molekulargenetische Tests, sind vor allem auf die nahe Verwandtschaft dieser beiden Spezies zurückzuführen. Jedoch wird auch eine Rekombination zwischen diesen Spezies als zusätzlich erschwerender Faktor für die genaue Speziesidentifikation diskutiert. Durch besagte Rekombination entstehen Stämme, die weder der einen noch der anderen Spezies eindeutig zugeordnet werden können. Diese wurden in der Vergangenheit als „Fuzzy Species“ (31, 39, 40), „equivocal“ (41, 42) oder „Group III“ (43) bezeichnet. Der Name „Fuzzy Species“ ist hierbei der geläufigste und wurde ursprünglich bei anderen Bakterienarten wie beispielsweise einer Rekombination zwischen dem pathogenen Bakterium *Neisseria meningitidis* und dem Kommensalen *N. lactamica* verwendet (44). Der Begriff „Fuzzy“ wurde auf die Rekombination zwischen *H. influenzae* und *H. haemolyticus* übertragen.

Der Goldstandard zur Unterscheidung der beiden Spezies ist der Nachweis mittels PCR oder die Sequenzierung Spezies-spezifischer Gene. Welche Gene dafür in Frage kommen, wird in den Abschnitten 1.5.1.1 und 1.5.1.2 genauer ausgeführt.

Obwohl sich die beiden Spezies mit herkömmlichen diagnostischen Methoden kaum unterscheiden lassen, ist ihr pathogenes Potential sehr unterschiedlich. Im Gegensatz zu *H. influenzae* ist *H. haemolyticus* nur sehr selten krankheitsauslösend (45) und wird im Allgemeinen als Bestandteil der physiologischen Flora des Respirationstrakts

angesehen (46-48). Die geringere Pathogenität ist vor allem darauf zurückzuführen, dass *H. haemolyticus* im Gegensatz zu *H. influenzae* meist keine IgA-Protease synthetisiert. Außerdem konnte in verschiedenen Studien die geringe klinische Relevanz von *H. haemolyticus* nachgewiesen werden, was als Evidenz für die geringere Pathogenität der Spezies aufgeführt wird (46, 47). Da die beiden Spezies phänotypisch und biochemisch kaum unterscheidbar sind, wurden in folgenden Studien Isolate von erkrankten Patientinnen und Patienten und von Gesunden nachuntersucht, die ursprünglich der Spezies *H. influenzae* zugeordnet worden waren. Es wurde überprüft, in welcher Gruppe sich eher *H. haemolyticus*- und in welcher sich eher *H. influenzae*-Isolate nachweisen ließen. Bei der molekulargenetischen Untersuchung von Isolaten, die aus dem Nasenrachenraum gesunder Probandinnen und Probanden gewonnen wurden, wurden *H. haemolyticus*-Stämme in 12 % (41), 15 % (47) und 20 % (49) der Fälle nachgewiesen. In einer Studie von Murphy et al. wurden sogar bis zu 40 % der Isolate als *H. haemolyticus* identifiziert (46). Auf der anderen Seite wurden Isolate nachuntersucht, die Infektionen der unteren Atemwege ausgelöst hatten, also als eindeutig pathogene Krankheitserreger identifiziert wurden. Bei Betrachtung dieser Isolate wurden nur 0,5 % der Stämme als *H. haemolyticus* identifiziert (29, 50). Und auch in der zuvor zitierten Studie von Murphy et al. gab es unter Stämmen, die aus primär sterilen Proben wie Blut, Liquor et cetera isoliert wurden, keine nachweisbaren Stämme dieser Spezies (46). Diese Zahlen geben eindeutige Hinweise sowohl auf die geringere Pathogenität von *H. haemolyticus* im Gegensatz zu *H. influenzae* als auch auf die geringe Prävalenz dieser Spezies bei invasiven Infektionen.

1.3 Besiedlung, Klinik und Pathogenese von *H. influenzae*

Der Mensch ist das Hauptbioreservoir von *H. influenzae*. In den meisten Fällen kommt es zur Besiedlung des Nasopharynx, seltener ist die Besiedlung des unteren Genitaltrakts (51). Jedoch führt nicht jede Besiedlung mit *H. influenzae* zu einem Krankheitsgeschehen, weswegen bei *H. influenzae* von einem fakultativ pathogenen Keim auszugehen ist. Im Laufe der letzten 40-50 Jahre hat die Besiedlung mit *H. influenzae* deutlich abgenommen. In früheren Berichten war von einer Besiedlung bei gesunden Kindern von bis zu 80 % die Rede (52, 53). Aktuellere Studien zeigten eine Besiedlung von ca. 10-30 % in dieser Gruppe (54-56). Hinsichtlich der asymptomatischen Besiedlung von Menschen über 65 Jahren zeigte eine aktuelle Studie aus Deutschland eine deutlich geringere Prävalenz von 1,9 % (57).

H. influenzae kann lokale Infektionen verursachen. Dazu gehören unter anderem Infektionen der oberen und unteren Atemwege (58), akute Otitis media (59), Sinusitis, Konjunktivitis und Pneumonie. Außerdem kann das Bakterium Exazerbationen einer COPD (60, 61) und einer Mukoviszidose verursachen (62). Eine *H. influenzae*-Infektion kann ebenfalls eine vor allem bei Kindern auftretende Epiglottitis (63) verursachen, die wegen des hohen Erstickenrisikos einen medizinischen Notfall darstellt. Fälle dieser Erkrankung gehen jedoch seit Einführung der Impfung gegen *H. influenzae* Serotyp b (Hib) im Jahr 1990 deutlich zurück (64). Darüber hinaus kann das Bakterium zu invasiven Infektionen führen. Allen voran Sepsis und Meningitis (65), aber auch septische Arthritis, Phlegmone, Osteomyelitis sowie Endo- und Perikarditis.

Die Übertragung von *H. influenzae* erfolgt aufgrund der geringen Umweltresistenz nur direkt von Mensch zu Mensch durch eine Tröpfcheninfektion beziehungsweise durch Kontakt zu Atemwegssekreten von Infizierten (66, 67).

Der wichtigste Pathogenitätsfaktor von *H. influenzae* ist das Kapselpolysaccharid. Dieses schützt das Bakterium vor äußeren Umwelteinflüssen und vor dem Angriff des Serumkomplements und der Phagozyten des menschlichen Immunsystems (68). Eine schnelle Abwehr des Erregers durch eine unspezifische Immunantwort wird dadurch erschwert. Neben dem Kapselpolysaccharid ist auch das Lipooligosaccharid (LOS)

maßgeblich an der Anheftung der Bakterien auf der Schleimhaut und dem Übertritt des Bakteriums von der Schleimhaut in die Blutbahn beteiligt (69). Bestandteile des LOS, wie beispielsweise Lipid A, wirken bei einem Zerfall des Bakteriums als Endotoxine. Diese können eine massive Immunreaktion hervorrufen, wodurch bei einer Sepsis die Gefahr eines septischen Schocks erhöht ist.

Zur Anheftung besitzt das Bakterium außerdem Fimbrien und Pili als wichtige Pathogenitätsfaktoren der initialen Anheftungsphase. Diese Anheftung findet sowohl an Epithelzellen (70) als auch an Atemwegsmuzinen (71, 72) des Wirts statt. Darüber hinaus sind auch die Adhäsine high molecular weight adhesine proteins HMW1 und HMW2 an dieser initialen Anheftung beteiligt (73, 74).

Haemophilus influenzae ist in der Lage Biofilme auszubilden (75, 76). Dazu gehört ein Zusammenspiel aus Pili, Adhäsionsproteinen, LOS, Membranporinen und Quorum sensing (77-79). Diese Fähigkeit bewirkt eine verminderte Wirksamkeit antibiotischer Substanzen unter anderem durch die gebildete Glykokalyx und eine verminderte Zellteilungs- und Wachstumsrate (80-82). Daher spielt die Biofilmbildung bei durch *H. influenzae* verursachten therapieresistenten Otitis media-Fällen bei Kindern und bei COPD-Exazerbationen bei Erwachsenen eine entscheidende Rolle (83).

Die Expression einer IgA-Protease ist Teil der Mechanismen, die *H. influenzae* zur Umgehung des Immunsystems befähigen. Das Immunglobulin A ist der angeborenen Immunantwort des Menschen zuzuordnen und führt zur Agglutination des Keims mit der Möglichkeit zum Abtransport. Zudem bildet es eine Schnittstelle zum erworbenen Immunsystem durch Weitergabe der Antigeninformationen. Durch die bei fast allen *Haemophilus influenzae*-Stämmen vorhandene IgA-Protease wird das Immunglobulin aufgespalten und kann seine Abwehrfunktion nicht mehr ausführen (84-86). Zudem ist *H. influenzae* dazu fähig, DNA aus der Umgebung aufzunehmen und in das eigene Genom zu integrieren (87, 88). Dieser Vorgang wird als natürliche Kompetenz bezeichnet und führt dazu, dass das Bakterium vom menschlichen Immunsystem nicht als fremd erkannt wird und sich somit der immunologischen Abwehr entziehen kann („immune escape“) (68).

1.4 Epidemiologie

Epidemiologisch stellt *H. influenzae* die häufigste bakterielle Ursache von Infektionen der oberen Atemwege dar. Dazu kommen drei Millionen Fälle invasiver Infektionen pro Jahr mit Sterblichkeitsraten zwischen 5 % in hochentwickelten Ländern mit guter medizinischer Versorgung und 40 % in Entwicklungsländern (89).

Eine Infektion durch *H. influenzae* ist in Deutschland seit 2001 laut Infektionsschutzgesetz (IfSG) meldepflichtig. Es gilt laut §7 Abschnitt 3 IfsG: „18. *Haemophilus influenzae*; Meldepflicht nur für den direkten Nachweis aus Liquor oder Blut.“ Daher beschränken sich die im Weiteren aufgeführten Daten des Robert Koch-Instituts (RKI) und des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (NRZMHi) zur Epidemiologie von Infektionen durch *H. influenzae* ausschließlich auf Fälle mit Erregernachweis aus Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit. Auf Basis der gesetzlichen Meldung erhält das RKI die Meldedaten von Landesgesundheitsämtern, die die Daten wiederum direkt von den Gesundheitsdiensten erhalten. Das NRZMHi in Würzburg gewinnt seine Daten nicht über die gesetzliche Meldung, sondern über die sogenannte Laborsurveillance, welche auf der freiwilligen Weitergabe der *Haemophilus*-Stämme durch Diagnostiklabore an das Referenzzentrum beruht. Der Umfang der Erfassung invasiver *Haemophilus influenzae*-Fälle durch das NRZMHi wird jedes Jahr über einen Abgleich-Prozess mit dem RKI ermittelt. Aktuell liegt er bei 70-80 % (90).

Unter Berücksichtigung aller Serotypen wurden laut Infektionsepidemiologischem Jahrbuch des RKI im Jahr 2019 in Deutschland 954 Fälle von invasiven *Haemophilus influenzae*-Infektionen gemeldet (91). Aus Abbildung 2, welche aus den Daten des RKI über SurvStat@RKI 2.0 generiert wurde, kann man klar erkennen, dass die Fallzahlen an gemeldeten invasiven *H. influenzae*-Infektionen in Deutschland seit Jahren deutlich zunehmen. So schrieb das RKI im Infektionsepidemiologischen Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019: „Im Jahr 2019 wurden mit 954 übermittelten invasiven *Haemophilus influenzae*-Fällen die Vorjahreszahl [(851 Fälle)] erneut übertroffen und der seit 2007 (93 Fälle) beobachtete Trend steigender Fallzahlen bestätigt.“ (91) (Seite 101) Der steigende Trend beobachteter Fallzahlen schlägt sich

auch auf die Inzidenz nieder (Abbildung 2). So hat sich diese im Zeitraum von 2007 bis 2019 von 0,12 auf 1,15 nahezu verzehnfacht.

Im Jahr 2020 sanken die Fallzahlen gemeldeter invasiver *Haemophilus influenzae*-Infektionen dagegen drastisch. Das geht aus Untersuchungen hervor, die im Epidemiologischen Bulletin 7/2021 veröffentlicht wurden. Es wurden die Auswirkungen der COVID-19-Pandemie und assoziierter Public-Health-Maßnahmen auf andere meldepflichtige Infektionskrankheiten in Deutschland untersucht. Bei dem Vergleich der Meldewochen 10-32 des Jahres 2020 zu den Vorjahren 2016-2019 zeigte sich eine relative Änderung der Fallzahlen ($\Delta\%$) invasiver *Haemophilus influenzae*-Infektionen von -61,3 % (92).

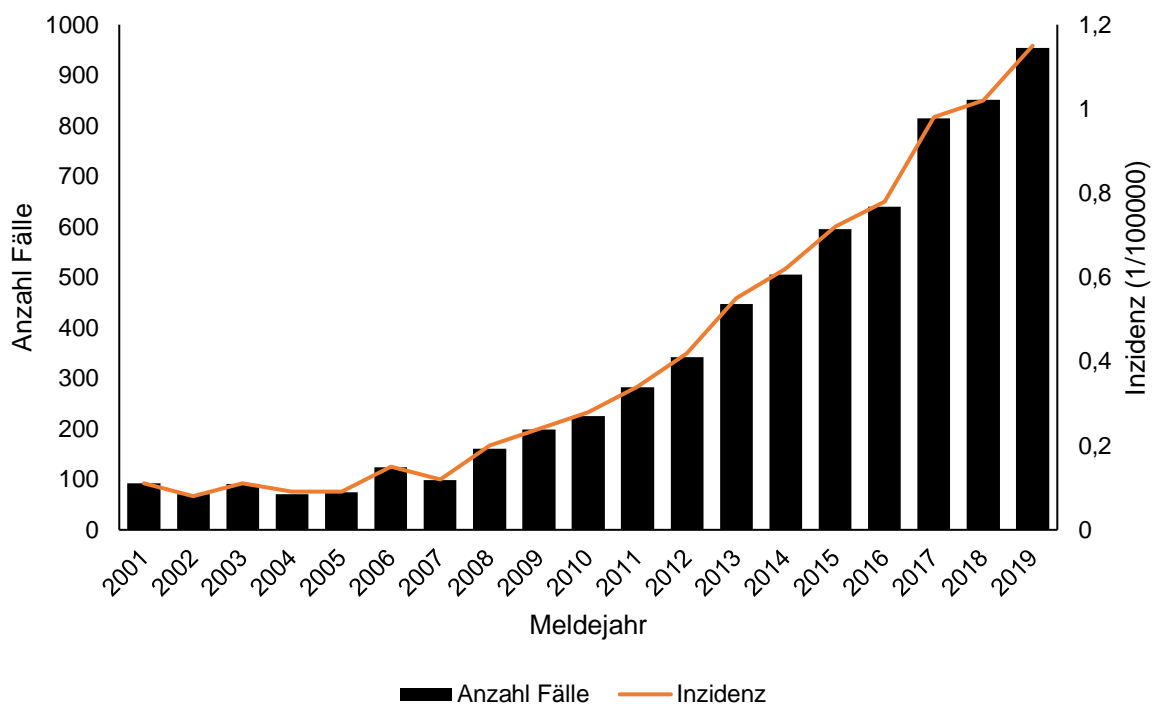


Abbildung 2: Anzahl und Inzidenz (1/10000) gemeldeter invasiver *H. influenzae*-Fälle in Deutschland 2001-2019. Die Daten stammen aus SurvStat@RKI 2.0 (03.08.2020). (Eigene Abbildung)

Auch die europäischen Daten zeigen den steigenden Trend bestätigter invasiver *H. influenzae*-Erkrankungen. So stiegen auch hier die Fallzahlen von n=2096 im Jahr 2010 auf n=3898 im Jahr 2017 stetig an. Im europäischen Vergleich ist Deutschland nach aktuellen Zahlen des European Centre for Disease Prevention and Control

(ECDC) von 2017 hinter Großbritannien das Land mit den meisten bestätigten *H. influenzae*-Fällen. Mit einer Inzidenz von 1,0 liegt Deutschland jedoch nur knapp über dem europäischen Mittel von 0,8 (Abbildung 3) (93). Hinsichtlich Alters- und Serotypverteilung decken sich die deutschen Daten mit den europäischen (93). Da jedoch nicht in allen europäischen Ländern eine Meldepflicht für invasive *H. influenzae*-Erkrankungen besteht, ist ein direkter Vergleich der Daten nur bedingt möglich.

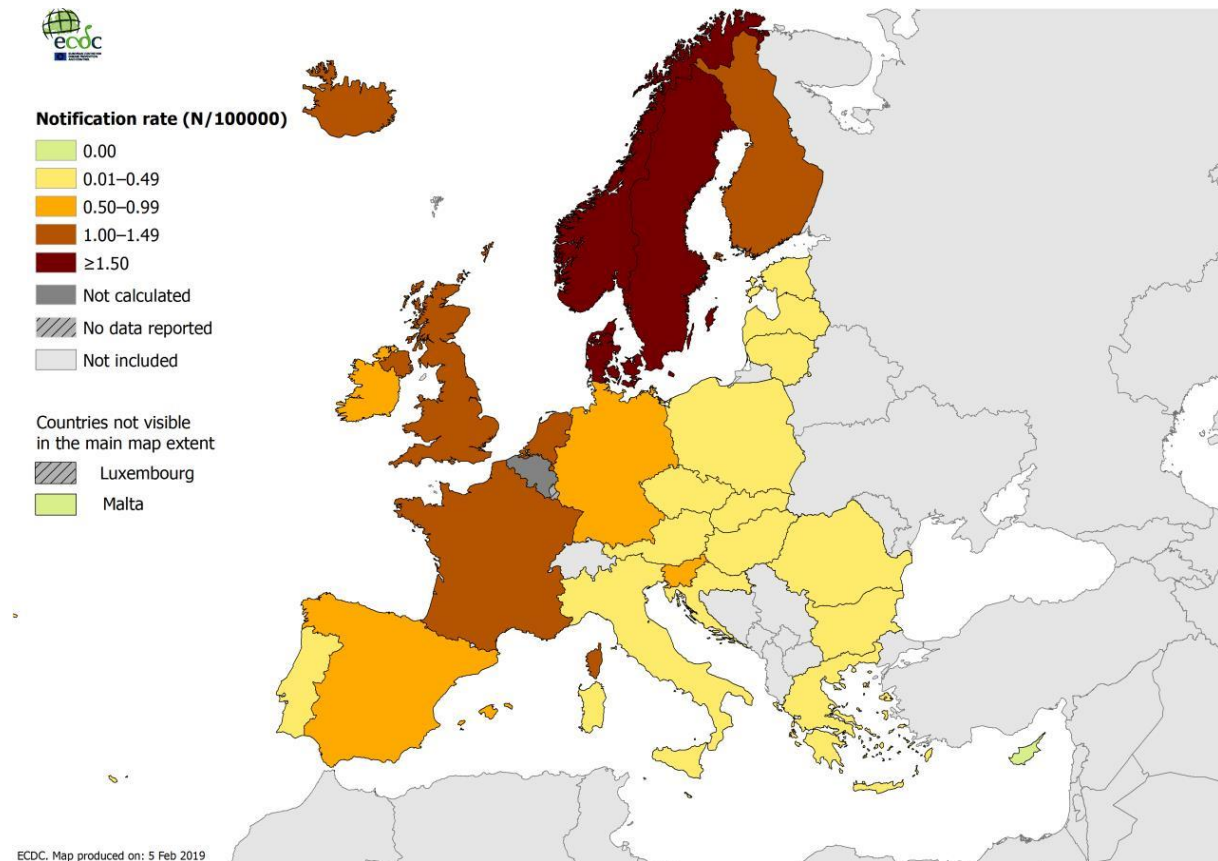


Abbildung 3: Inzidenz gemeldeter *H. influenzae*-Fälle im europäischen Vergleich.
 Entnommen aus: European Centre for Disease Prevention and Control. *Haemophilus influenzae*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019 (93).
 (Nachdruckerlaubnis liegt vor – CC BY 4.0)

Die demographische Verteilung invasiver *Haemophilus influenzae*-Infektionen in Deutschland aus dem Jahr 2019 in Abbildung 4 zeigt, dass häufig Kleinkinder und Säuglinge, vor allem aber Menschen über 59 Jahren betroffen sind.

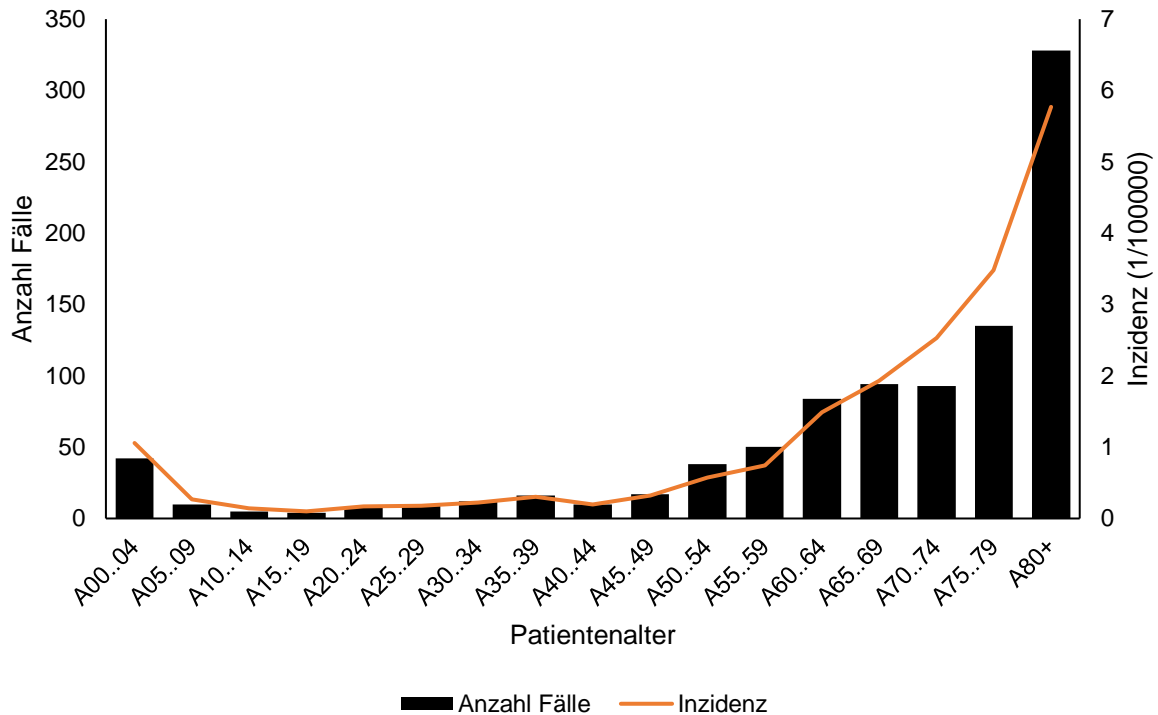


Abbildung 4: Altersverteilung invasiver *H. influenzae*-Fälle und deren Inzidenz in Deutschland 2019 in Fünfjahresintervallen. Die Daten stammen aus SurvStat@RKI 2.0 (26.02.2021). (Eigene Abbildung)

Im Jahr 2019 stammten 4 % (n=42) der gemeldeten Fälle von Kindern unter 5 Jahren. Die Zahlen für diese Altersgruppe hatten sich im Vergleich zu 2007 verdoppelt. 77 %, also 734 Fälle, stammten von Erwachsenen über 59 Jahren. Auch der zuvor dargestellte Anstieg der Inzidenz invasiver *H. influenzae*-Erkrankungen lässt sich vor allem bei älteren Patientinnen und Patienten beobachten. So stieg diese von 2007 bis zum Jahr 2019 in der Altersgruppe über 69 Jahren um den Faktor 14 an.

2019 wurden 40 Todesfälle durch invasive *H. influenzae*-Infektionen gemeldet, was einer Sterberate von 4,2 % entspricht. Der Altersmedian der Todesfälle nach invasiver *H. influenzae*-Infektion liegt bei 81 Jahren.

Die Mehrzahl aller *H. influenzae*-Infektionen werden laut RKI (2019) zu 74 % überwiegend durch die unbekapselten NTHi-Stämme verursacht. Bei Infektionen durch bekapselte Stämme dominiert mit 13 % der Serotyp f. Der impfpräventable Serotyp b (Hib) wurde nur bei 27 Fällen (4,4 %) angegeben. Stämme mit Kapseltyp e oder a sind mit 2,9 % und 2,3 % eher selten zu beobachten. Der Kapseltyp d wurde mit 0,3 % nur in zwei gemeldeten Fällen nachgewiesen. Serotyp c wurde 2019 bei invasiven Erkrankungen nicht nachgewiesen und auch in den Vorjahren finden sich nur vereinzelt Stämme der Kapseltypen c und d. Angaben zum Kapseltyp finden sich laut RKI nur bei 68 % der Fälle im Jahr 2019. Davon sind wiederum 6 % nur mit „andere/sonstige“ und 2,9 % mit „non-b“ angegeben und damit nicht weiter spezifiziert. In Abbildung 5 ist die Serotypverteilung der an das NRZMHi gesendeten *H. influenzae*-Isolate aus Blut und Liquor der Jahre 2010-2019 dargestellt. Es zeigt sich ein Rückgang des Serotyps b und eine deutliche Zunahme der NTHi beim direkten Vergleich von 2010 und 2019.

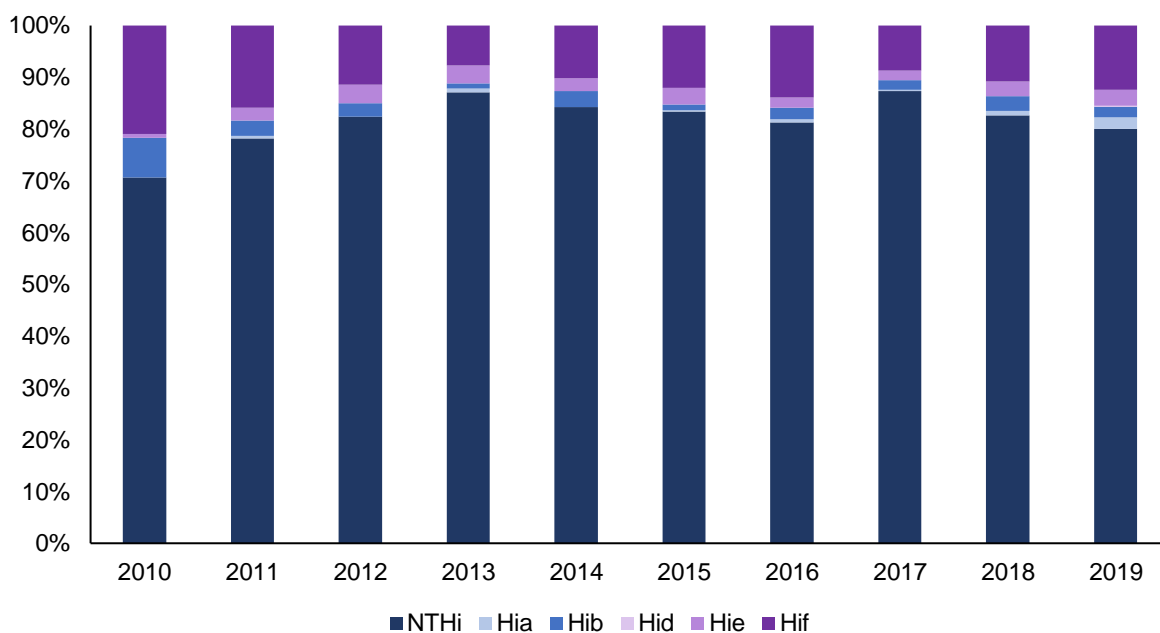


Abbildung 5: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen *H. influenzae*-Serotypen laut Daten des NRZMHi.

Berücksichtigt wurden nur Isolate von Patientinnen und Patienten mit invasiven Erkrankungen. Die Proben stammten alle aus Blut und/oder Liquor. Die Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der Daten aus den jährlichen Berichten der *H. influenzae*-Zahlen des NRZMHi (90).
(Eigene Abbildung)

Bemerkenswert ist außerdem, dass der Anteil an Serotyp b-Fällen bei Kindern deutlich höher ist als bei älteren Menschen. Dies geht aus den Daten des European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) für das Jahr 2017 hervor (Abbildung 6) (93). Dementsprechend handelt es sich bei invasiven Hib-Infektionen nach wie vor hauptsächlich um eine pädiatrische Erkrankung. Es wird spekuliert, dass der Anstieg der absoluten Zahlen an NTHi-Fällen sowie das steigende Verhältnis des Serotyps NTHi im Vergleich zu den bekapselten Serotypen bei älteren Erkrankten unter anderem auch dem demographischen Wandel in Deutschland und Europa und der steigenden Zahl multimorbider Patientinnen und Patienten zuzuschreiben sind (94).

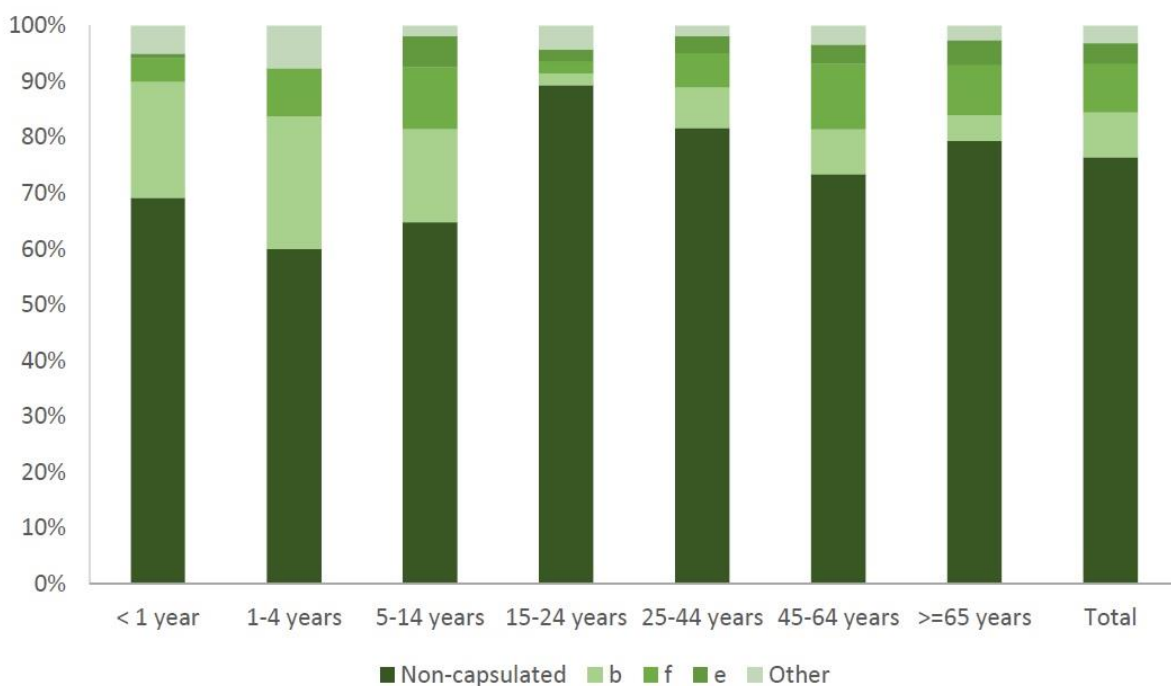


Abbildung 6: Serotypverteilung in den verschiedenen Altersgruppen laut Daten des ECDC aus dem Jahr 2017.
 Entnommen aus: European Centre for Disease Prevention and Control. *Haemophilus influenzae*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019 (93).
 (Nachdruckerlaubnis liegt vor – CC BY 4.0)

Eine Schutzimpfung gegen Hib ist seit 1990 von der STIKO empfohlen und wird üblicherweise als Konjugatimpfstoff verabreicht, welcher das Kapselpolysaccharid als spezifisch immunogene Komponente enthält. Die Grundimmunisierung erfolgt durch zwei Impfstoffdosen im Alter von zwei und vier Monaten sowie einer Boosterdosis zwischen elf und 14 Monaten. Vor Einführung der Hib-Impfung war *H. influenzae* in

Deutschland eine der Hauptursachen einer bakteriellen Meningitis bei Kindern. In Österreich war es bis dahin sogar die häufigste Ursache dieser Erkrankung (95). Durch diesen Erreger verursachte Erkrankungen gingen seit der Einführung der Schutzimpfung in Deutschland, Europa und den Vereinigten Staaten drastisch zurück (96-100). So berichtete die World Health Organization (WHO) in einer Stellungnahme zur Hib-Impfung aus dem Jahr 2013, dass in Ländern, in denen die Hib-Impfung Teil des nationalen Impfprogramms ist, die Fälle invasiver Hib-Infektionen um mehr als 90 % zurückgegangen sind (101). Außerdem konnte schon kurz nach Einführung des Hib-Impfstoffs ein klarer Rückgang der Besiedlung von Kindern mit diesem Serotyp nachgewiesen werden (102). Dagegen sinken die Infektionszahlen in Entwicklungs- und Schwellenländern weniger stark und *H. influenzae* bleibt eine der häufigsten Ursachen einer Meningitis bei Kindern (103-105).

Ein Impfdurchbruch wird bei der Hib-Impfung nur sehr selten beobachtet. Kürzlich veröffentlichten Daten von Takla et al. zufolge, die in Zusammenarbeit mit dem NRZMHi erhoben wurden, wurden 29 Hib-Infektionen bei Patientinnen und Patienten unter 27 Jahren beschrieben. Eine vollständige Immunisierung war nur bei drei der 29 Infizierten gegeben, obwohl alle Erkrankten erst nach Einführung des Hib-Impfstoffs geboren wurden. Damit sind diese drei Fälle die einzigen beschriebenen Hib-Impfdurchbrüche in Deutschland (106).

Durch die erfolgreiche flächendeckende Impfung gegen Serotyp b sind heutzutage vor allem NTHi-Stämme vorherrschend (Abbildung 5) (107). Diese Entwicklung konnte nicht nur in Deutschland, sondern in ganz Europa (108) und den Vereinigten Staaten beobachtet werden (109).

Einen Impfstoff gegen den aktuell vorherrschenden Serotyp NTHi, also unbekapselte Stämme, gibt es bisher nicht. NTHi ist der häufigste *H. influenzae*-Serotyp bei invasiven Erkrankungen. Dieser geht jedoch im Gegensatz zu Hib mit einer geringeren Mortalität einher. Im Gegensatz dazu steht jedoch die hohe Morbidität vor allem bei schweren Otitis-media-Fällen bei Kindern und COPD-Exazerbationen bei Erwachsenen. Das Ziel einer NTHi-Impfung ist daher weniger die Verhinderung von Todesfällen, sondern die Senkung der Morbidität dieser Erkrankungen und die finanzielle Entlastung des Gesundheitssystems (110). NTHi bilden jedoch keine

Polysaccharidkapsel aus, die als mögliches Zielantigen eines Impfstoffs, wie es bei Hib der Fall ist, dienen könnte. Zudem hat sich schon in den späten 80er beziehungsweise frühen 90er Jahren gezeigt, dass während bekapselte Stämme bezogen auf die verschiedenen Serotypen hochklonal sind und sich genetisch nur gering unterscheiden, die Heterogenität bei unbekapselten Stämmen deutlich höher ist (111-113). In der aktuellen Forschung an NTHi-Impfstoffen werden vor allem Oberflächenproteine wie das Outer membrane protein (OMP) P6, OMP 26 und Protein D als mögliche Zielantigene untersucht (114). Trotz vieler klinischer Studien zu diesem Thema konnten bisher noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt werden (115-118). Aus diesem Grund ist die exakte und einfache Diagnostik der Spezies *H. influenzae*, insbesondere des Serotyps NTHi, und auch der Therapieerfolg mit gängigen Antibiotika von großer Bedeutung.

1.5 Labordiagnostische Nachweismethoden

Bei invasiven Infektionen wird *H. influenzae* aus primär sterilem Material, insbesondere aus Blut oder Liquor cerebrospinalis, nachgewiesen. Zur Diagnose von lokalen Infektionen können Abstriche oder Sekrete der betroffenen Körperregionen untersucht werden, zum Beispiel Rachen-, Konjunktivalabstriche, Sputum, Bronchialsekret et cetera. Bei kulturellen Untersuchungen an primär nicht sterilem Material ist die Unterdrückung des Wachstums einer Begleitflora sinnvoll.

Die Kultivierung der Bakterienstämme, die Untersuchung des faktorenabhängigen Wachstums, die mikroskopische Untersuchung der Stämme nach erfolgter Gramfärbung und biochemische Tests, wie der Oxidase-Test und die Serotypbestimmung durch Objektträgeragglutination, sind für die Basisdiagnostik von *H. influenzae* von entscheidender Bedeutung und werden im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben.

Wie in Abschnitt 1.2 dargestellt, reichen diese Methoden nach aktuellem Kenntnisstand nicht mehr aus, um die Spezies *H. influenzae* eindeutig zu identifizieren. Letztlich ist dies nur durch molekularbiologische Methoden möglich. Molekularbiologische Tests, wie der Nachweis Spezies-spezifischer Gene oder die Sequenzierung einzelner Gene bis hin zur vollständigen Genomsequenzierung, stellen die präziseste Form der Diagnostik und Typisierung von *H. influenzae*-Isolaten dar und werden daher im Folgenden genauer erläutert.

1.5.1 Molekularbiologische Methoden

1.5.1.1 Nachweis Spezies-spezifische Gene durch Amplifikation

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR) bildet die Grundlage molekulargenetischer Tests.

Verfahren zur molekulargenetischen Analyse Spezies-spezifischer Gene stellen den Goldstandard für die Unterscheidung der verschiedenen *Haemophilus*-Spezies dar. Gene, die *H. influenzae* aufweist, sind das L-Fuculokinase-Gen *fucK* mit hoher Spezifität (50, 119) und das outer-membrane-protein-2-Gen *ompP2* mit einer analytischen Sensitivität von 80,6 % und einer Spezifität von 91,7 % (40). Andere für

den PCR-Nachweis geeignete Gene sind das Protein-D-Gen *hdp*, für welches ebenfalls eine hohe Spezifität nachgewiesen wurde (40, 120), und auch das L-Fucose-Permease-Gen *fucP* (121). Auf der anderen Seite ist es auch möglich das [Cu, Zn]-Superoxiddismutase-Gen *sodC* nachzuweisen, welches anders als die bisher genannten Gene ein Markergen für *H. haemolyticus* ist und nicht bei *H. influenzae* vorkommt (50). In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde ein Testschema evaluiert, bei dem ein Gen nachgewiesen wurde, welches spezifisch für *H. influenzae* ist und ein anderes, welches spezifisch für *H. haemolyticus* ist. Bei dem *H. influenzae*-Gen handelt es sich um das bereits oben erwähnte *hdp*-Gen, bei dem für *H. haemolyticus* um das Phosphoribosylglycinamid-formyltransferase-Gen *purT*. In dieser Studie zeigten sich mit einer Sensitivität von 96,7 % und einer Spezifität von 98,2 % sehr gute Ergebnisse dieses Testschemas zur Unterscheidung der beiden Spezies (122).

1.5.1.2 Speziesnachweis und Typisierung durch Sequenzierung

Es können nach erfolgter Sequenzierung des amplifizierten DNA-Abschnitts Mutationen der Gene analysiert werden und Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Spezies getroffen werden.

***ompP6*-Sequenzierung**

Die Möglichkeit der Diskriminierung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* durch die Sequenzierung des outer-membrane-protein-6-Gens *ompP6* wurde bereits 2007 von Murphy et al. vorgestellt. Hierbei wird die *ompP6*-Sequenz des vorliegenden Stamms auf Aminosäuresubstitutionen an vier verschiedenen Stellen der Sequenz untersucht, die von Murphy et al. als typisch für die Spezies *H. haemolyticus* nachgewiesen werden konnten (46).

16S rRNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der 16S rRNA liefert eine ausgezeichnete Diskriminierung von *H. influenzae* und *H. parainfluenzae* (123), zeigt jedoch weniger gute Ergebnisse bei der Unterscheidung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* (35).

Multilocus-Sequenztypisierung

Bei der Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) werden mehrere unterschiedliche Housekeeping-Gene, also nach einem festgelegten Schema ausgewählte Gene, die für das Überleben des Keims essenziell sind, nach Amplifikation durch eine PCR sequenziert. Für die MLST von *H. influenzae* werden die Nukleotidsequenzen der sieben Housekeeping-Gene *adh*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi* und *recA* sequenziert (124). Anhand der Sequenzen kann dem vorliegenden Stamm nach Abgleich mit der Datenbank pubmlst.org ein Sequenztyp (ST) zugeordnet werden. Dieser gibt Aufschluss über die Verwandtschaftsbeziehung zu anderen untersuchten oder in der Datenbank enthaltenen Isolaten.

Genomsequenzierung

Die Sequenzierung des vollständigen Genoms ist die mit Abstand akkurateste, wenn auch aufwändigste Methode zur Typisierung bakterieller Mikroorganismen. Anhand der Genomdaten kann die Verwandtschaft unterschiedlicher Bakterienstämme genauestens untersucht werden, um Rückschlüsse auf die lokale Ausbreitung einer Spezies ziehen zu können. Ebenso lässt die Analyse der Verwandtschaft der Stämme Rückschlüsse darauf zu, ob Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika auf die Ausbreitung eines Klons dieser Spezies zurückzuführen sind oder ob es sich bei der Entwicklung antibiotikaresistenter Stämme einer Spezies eher um sporadische Ereignisse handelt. Außerdem ersetzt die Analyse der Genomdaten die Sequenzierung von Einzelgenen. Auf Grundlage dieser Daten können auch Mutationen in Genen untersucht werden, die in der Vergangenheit bereits als ursächlich für die Entwicklung einer Antibiotikaresistenz beschrieben wurden.

1.5.2 MALDI-TOF-MS

Die Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry (MALDI-TOF-MS) dient zur massenspektrometrischen Analyse der Proteinmassen von Mikroorganismen mit dem Ziel, ein charakteristisches Massenspektrum abhängig von Ionisationsgrad und Flugzeit (Time-of-Flight) der Bestandteile des untersuchten Organismus zu erhalten. Durch Vergleich des Massenspektrums mit einer Referenzdatenbank sollte die vorliegende Bakterienprobe anschließend eindeutig einer Spezies zugeordnet werden. Es handelt sich beim MALDI-TOF-MS um eine etablierte Methode um verschiedene Bakterienspezies zu identifizieren und zu differenzieren (125-127).

Zur Analyse von bakteriellen Organismen werden Bakterien von einer Agarplatte auf eine Probenplatte gebracht. Die Bakterien werden mit einer Matrix-Lösung, meist α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, bedeckt, welche die Bakterien für die weitere Analyse kokristallisiert. Die Probenplatte wird anschließend in das MALDI-TOF-MS Gerät gebracht. Zuerst verdampft ein UV-Laser die Matrix mit den eingebetteten Bestandteilen der Bakterien explosionsartig, sodass entstehende Analytmoleküle ionisiert werden. Im Fall des VITEK® MS von der Firma bioMérieux, der für die Analysen im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, handelt es sich um einen Stickstofflaser mit 337 nm Wellenlänge, einer maximalen Pulsrate von 50 Hz und einem festen Fokus. Die Moleküle werden dann durch ein an eine Beschleunigungselektrode angelegtes E-Feld (10-30 keV) für den Eintritt in das Flugrohr beschleunigt. Beim Flugrohr handelt es sich um eine feldfreie Driftstrecke, auf welcher sich die Analytmoleküle nach Masse und Ionisierungsgrad auftrennen. Die lineare Flugröhre hat eine Länge von 1,2 m und zwei Turbomolekularpumpen halten das nötige Vakuum aufrecht. Ein nachgeschalteter Detektor misst die Flugzeit und es kann ein für den untersuchten Organismus charakteristisches Massenspektrum im Massebereich 10-12 kDa zum weiteren Vergleich mit einer Referenzdatenbank erstellt werden. Anschließend wird durch Vergleich mit der Referenzdatenbank durch die vom Hersteller bereitgestellte Software eine Bakteriengattung und -spezies mit dem jeweiligen errechneten Konfidenzwert ausgegeben.

1.6 Behandlung von *H. influenzae*-Infektionen

Durch *H. influenzae* verursachte Pneumonien und invasive Erkrankungen wie Sepsis und Meningitis werden antibiotisch behandelt. Laut S3-Leitlinie zur „Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention“ (128) und SK2-Leitlinie „Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter“ (129) werden nach erfolgter Erregeridentifizierung und getesteter *in vitro* Empfindlichkeit die Aminopenicilline Ampicillin (bei Pneumonie und bei Meningitis) oder Amoxicillin (nur bei Pneumonie) eingesetzt. Amoxicillin kann per os, Ampicillin muss, wegen der geringen Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe, meist intravenös verabreicht werden. Falls sich bei der Testung der Antibiotikaempfindlichkeit Resistenzen gegen diese Antibiotika zeigen, sollte ein Cephalosporin der 3. Generation, also Ceftriaxon oder Cefotaxim, verwendet werden. Wenn sichergestellt werden kann, dass die Resistenz ausschließlich auf die Produktion einer β -Lactamase zurückzuführen ist, kann auch eine Kombination aus einem Aminopenicillin und einem β -Lactamase-Inhibitor (z.B. Amoxicillin/Clavulansäure oder Ampicillin/Sulbactam) verabreicht werden. Die Fluorchinolone Moxifloxacin und Levofloxacin sollten ausschließlich als Reserveantibiotika eingesetzt werden.

Die Vorgaben der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) zur Behandlung einer bakteriellen Meningitis entsprechen weitestgehend denen der deutschen Leitlinie. Die einzige Ausnahme ist, dass laut deren Vorgaben bei nachgewiesener Ampicillin-Resistenz sofort und ausschließlich Drittgenerations-Cephalosporine zum Einsatz kommen sollten (130).

Bei unbekanntem Erreger der Erkrankung wird je nach Alter der Patientin oder des Patienten und klinischer Konstellation auf eine kalkulierte Antibiotikatherapie zurückgegriffen. Im Fall der Pneumonie kann diese Aminopenicilline, Fluorchinolone, Cephalosporine et cetera vorsehen und richtet sich vor allem nach dem Schweregrad der Pneumonie und dem Gesundheitszustand des oder der Erkrankten (128). Bei einer Meningitis ohne Erregersicherung wird ebenfalls das Alter sowie der Allgemeinzustand der Patientin oder des Patienten, aber auch prädisponierende Faktoren, die Hinweise auf die wahrscheinlichsten verursachenden Erreger geben, bei der Wahl des

Antibiotikums mitberücksichtigt. Empfohlen wird eine Kombination aus einem Drittgenerations-Cephalosporin und Ampicillin oder Vancomycin (129, 130).

Da bei der Behandlung einer Sepsis beziehungsweise eines septischen Schocks die antimikrobielle Therapie schnell und, zumindest vorerst, ohne Erregersicherung erfolgen muss, wird laut mehreren internationalen Leitlinien übereinstimmend zur Behandlung von Sepsis und septischem Schock ein Breitspektrumantibiotikum empfohlen (131). Carbapeneme stellen hierbei die am häufigsten verwendeten Antibiotika mit breitem Wirkspektrum dar. Imipenem und Meropenem sind die gängigsten Substanzen dieser Klasse und werden daher oft zur kalkulierten Therapie einer Sepsis eingesetzt. Auch in der S3 Leitlinie „Sepsis – Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge“ (132) wird ein Dritt- bzw. Viertgenerations-Cephalosporin oder eines der oben genannten Carbapeneme empfohlen.

1.7 Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika bei *H. influenzae*

Erstmals wurden Resistenzen gegen das Aminopenicillin Ampicillin bei *H. influenzae*-Stämmen im Jahre 1974 beschrieben (133). Die Stämme, die dabei von Thornsberry et al. untersucht wurden, waren zwar fast ausschließlich β -Lactamase-positiv, dennoch wurden schon hier zwei Ampicillin-resistente *H. influenzae*-Stämme beschrieben, bei denen keine β -Lactamase nachgewiesen werden konnte.

Da man in den 80er Jahren noch davon ausging, dass eine Resistenz gegen Ampicillin bei *H. influenzae* sehr selten und außerdem nahezu ausschließlich auf die Produktion einer β -Lactamase zurückzuführen sei, wurde der Nachweis der β -Lactamase als ausreichend angesehen und eine genaue Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Ampicillin nicht empfohlen (134).

Im Jahr 1980 wiesen Bell et al. Ampicillin-Resistenzen bei 13 von 100 *H. influenzae*-Stämmen nach (135). Außerdem zeigten sie, dass sieben dieser Stämme mit einer Ampicillin-MHK von 1 μ g/ml oder höher keine β -Lactamase produzierten und kontrastierten damit die Arbeit ihrer Vorgänger. Dementsprechend isolierte auch Markowitz im selben Jahr einen β -Lactamase-negativen Ampicillin-resistenten *H. influenzae*-Stamm (136).

Tatsächlich liegen einer Ampicillin-Resistenz zwei verschiedene Mechanismen zugrunde. Der erste ist die Produktion einer Plasmid-codierten β -Lactamase, bei welcher es sich im Fall von *Haemophilus influenzae* meist um die β -Lactamasen des TEM-1- (134, 137) und in selteneren Fällen des ROB-1-Typs (138) handelt. Die β -Lactamase ist ein Enzym, das in der Lage ist, den für die β -Lactam-Antibiotika namensgebenden β -Lactam-Ring zu spalten, sodass das Antibiotikum seine bakterizide Wirkung verliert. Die von *H. influenzae* gebildeten β -Lactamasen sind zwar in der Lage den β -Lactam-Ring von Aminopenicillinen anzugreifen, nicht jedoch den von Cephalosporinen und Carbapenemen. Die Expression einer Cephalosporinase oder Carbapenemase wurde bei *H. influenzae* bisher noch nicht beschrieben. Zur Bestimmung, ob ein *H. influenzae*-Stamm eine β -Lactamase exprimiert, hat sich der Nitrocefin-disk-Test etabliert (139). Hierbei hydrolysiert die β -Lactamase die

Amid-Bindung des β -Lactam-Rings von Nitrocefin, was zu einem Farbumschlag von gelb zu rosa führt. Die Charakterisierung der β -Lactamase bezüglich der Unterscheidung zwischen TEM-1 und ROB-1 kann mittels PCR erfolgen (140).

Der zweite wichtige Mechanismus ist die Veränderung der Transpeptidase durch Punktmutationen. Dieses Enzym dient dem Bakterium zur Vernetzung von N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin zum Aufbau der Peptidoglycanschicht als Zellwand. Zudem bildet es die Angriffsstelle für die β -Lactam-Antibiotika und wird daher auch Penicillin-Bindeprotein (PBP) genannt. Bei *H. influenzae* sind vor allem Veränderungen im *ftsI*-Gen von besonderer Bedeutung. Mutationen in diesem Gen führen zu einer Veränderung des PBP3, sodass ein Antibiotikum, welches das PBP als Zielstruktur hat, seine Bindungsstelle verliert und somit seine bakterizide Wirkung nicht entfalten kann (141).

Hinsichtlich der Ampicillin-Resistenz und der beiden dargestellten Resistenzmechanismen hat sich eine Einteilung von *H. influenzae*-Stämmen in vier verschiedene Phänotypen etabliert. Diese richtet sich danach, ob eine β -Lactamase exprimiert wird und ob der getestete Stamm als Ampicillin-sensibel oder -resistent getestet wurde. Es ergeben sich die Typen BLNAS (Beta-Lactamase-negativ, Ampicillin-sensibel) ohne β -Lactamase und sensibel ansprechend bei der Resistenztestung auf Ampicillin, BLPAR (Beta-Lactamase-positiv, Ampicillin-resistent) mit β -Lactamase-Produktion und damit resistent auf Ampicillin, BLNAR (Beta-Lactamase-negativ, Ampicillin-resistent) ohne β -Lactamase-Bildung, aber durch die PBP-Veränderung resistent auf Ampicillin, und zuletzt BLPACR (Beta-Lactamase-positiv, Amoxiclav-resistent) (141). Die Stämme des letztgenannten Phänotyps produzieren eine β -Lactamase und weisen zudem ein verändertes PBP3 vor, sodass sie selbst dann auf das Aminopenicillin Amoxicillin resistent reagieren, wenn es in einer Kombination mit dem β -Lactamase-Inhibitor Clavulansäure eingesetzt wird. Ebenfalls ist es möglich, dass sich bei der molekulargenetischen Analyse für einer Ampicillin-Resistenz relevante Mutationen im *ftsI*-Gen beziehungsweise Aminosäuresubstitutionen im PBP3 zeigen, sich bei der Resistenzbestimmung *in vitro* jedoch eine MHK unterhalb des Grenzwerts für die Beurteilung „resistent“ ergibt. In diesem Fall werden die Isolate als genetische BLNAR (gBLNAR), bzw. genetische BLPACR (gBLPACR) bezeichnet (142).

Vor allem Stämme, die nicht oder nicht nur aufgrund einer β -Lactamase resistent gegen Aminopenicilline sind, also die der Phänotypen BLNAR und BLPACR, sind für die WHO von besonderem Interesse. Daher wurden Ampicillin-resistente *H. influenzae* im Jahr 2017 in die „WHO priority pathogens list for Research & Development of new antibiotics“ aufgenommen. Bei dieser Liste handelt es sich um 12 verschiedene Bakterienspezies, bei welchen die Forschung und die Entwicklung von neuen wirksamen Antibiotika dringend erforderlich ist (143).

In der Vergangenheit gab es einige Versuche, die PBP3-Mutationen je nach Veränderung der Aminosäuresequenz im Vergleich zum Referenzstamm Rd KW20 in Gruppen einzuteilen. Obwohl keine offizielle einheitliche Nomenklatur feststeht, gibt es dennoch einen gewissen Konsens, auf den sich die meisten Autoren beziehen. Unterschieden werden Gruppe I mit Histidin anstelle von Arginin an Position 517 (R517H), Gruppe II mit Lysin anstelle von Asparagin an Position 526 (N526K) und Gruppe III mit Isoleucin anstelle von Methionin an Position 377 (M377I), Threonin anstelle von Serin an Position 385 (S385T) sowie Phenylalanin statt Leucin an Position 389 (L389F) (141). Weiterhin wurde Gruppe II unterteilt in IIa, IIb, IIc und IId, je nachdem, ob zusätzlich zur N526K-Substitution noch weitere Mutationen vorliegen. Diese sind für IIb Valin statt Alanin an Position 502 (A502V), für IIc Threonin statt Alanin an Position 502 (A502T) und für IId Valin statt Isoleucin an Position 449 (I449V). Als IIa werden diejenigen bezeichnet, die nur an Position 526, nicht aber an Position 502 oder 449 mutiert sind (144). Gruppe III wurde ebenfalls unterteilt in Gruppe III und III-like, je nachdem ob zusätzlich zu den drei oben genannten Substitutionen entweder N526K oder R517H, also die Substitutionen, die für Gruppe I und II bestimmend sind, vorliegen (145). Nachdem klar wurde, dass sich nicht bei allen Stämmen mit den Substitutionen M377I und S385T auch die L389F-Substitution zeigt, wurden Stämme, bei denen die L389F-Substitution vorliegt, als Gruppe III+, bzw. III-like+ bezeichnet (146). Einige Autoren sprechen bei dieser Mutation von der dritten Stufe der *ftsI*-Mutation, wobei R517H / N526K die erste und S385T die zweite Mutationsstufe darstellen (146, 147). Eine Zusammenfassung der sich ergebenden PBP3-Gruppen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Neben den oben genannten Aminosäuresubstitutionen im PBP3 wurden bereits viele weitere Substitutionen nachgewiesen, die jedoch nicht gruppenbestimmend sind. Die

wichtigsten Aminosäuresubstitutionen über die gruppenbestimmenden hinaus sind G555E und Y557H, da diesen in einer aktuellen Arbeit von Mizoguchi et al. eine entscheidende Rolle in der Entstehung einer Cefotaxim-Resistenz bei *Haemophilus influenzae* zugeschrieben wurde (148).

Tabelle 2: Übersicht der PBP3-Gruppeneinteilung.
Entspricht Table 1 aus Nürnberg et al. 2021: Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions (149).
(Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

PBP3-Gruppe	Aminosäuresubstitutionen	Quelle
I	R517H	(141)
IIa	N526K	(141, 144)
IIb	N526K + A502V	(141, 144)
IIc	N526K + A502T	(141, 144)
IId	N526K + I449V	(141, 144)
III	M377I + S385T + N526K	(141, 145)
III+	M377I + S385T + L389F + N526K	(141, 145, 146)
III-like	M377I + S385T + R517H	(141, 145)
III-like+	M377I + S385T + L389F + R517H	(141, 145, 146)

Neben der zuvor erwähnten Mutation des *ftsI*-Gens können auch Mutationen in den Genen vorliegen, die für andere Penicillin-Bindeproteine codieren. Beispielsweise zu nennen sind die Gene *dacA* und *dacB*, die für die Penicillin-Bindeproteine 4 und 5 codieren. Die sich in der Literatur etablierte Hauptrolle des PBP3 wurde bislang wenig hinterfragt, wodurch es nicht auszuschließen ist, dass auch Mutationen in den für weitere PBP codierenden Genen einen signifikanten Einfluss auf die Entstehung von Resistenzen dieser Spezies gegen β -Lactam-Antibiotika haben. Allerdings wurde durch Cherkaoui et al. 2017 gezeigt, dass das PBP3 im Vergleich zu den anderen PBP die mit Abstand höchste Bindungsaffinität zum β -Lactam-Antibiotikum Imipenem besitzt, was das Hauptaugenmerk auf dieses Protein bei der Betrachtung von β -Lactam-Antibiotikaresistenzen durchaus rechtfertigt (150).

Neben Veränderungen im PBP wird auch ein verstärkter Efflux des Antibiotikums durch Veränderungen im Protein AcrR diskutiert. Bei AcrR handelt es sich um das Regulatorprotein der Efflux-Pumpe AcrAB-TolC. Deletionen und Insertionen im *acrR*-Gen, welches für das oben genannte Protein codiert, können zu einem verfrühten Stopp-Codon führen, sodass die hemmende Wirkung des Regulatorproteins geschwächt wird. Die Folge ist eine Überexpression der Efflux-Pumpe. Dieser Mechanismus ist erwiesenermaßen an der Entwicklung einer Clarithromycin-Resistenz (151) und einer Imipenem-Resistenz beteiligt (150).

1.7.1 Heteroresistenzen

Bis heute gibt es keine eindeutige und einheitliche Definition für das Phänomen der Heteroresistenzen. Im Allgemeinen bezeichnet eine Heteroresistenz das Auftreten antibiotikaresistenter Subpopulationen in einem Bakterienstamm, wohingegen die Hauptpopulation dieses Stamms sensibel auf das getestete Antibiotikum ist oder zumindest eine deutlich geringere MHK aufweist. Wie weit die getesteten Hemmkonzentrationen voneinander entfernt sein müssen, ist nicht klar definiert und variiert stark von Studie zu Studie. In einer kürzlich veröffentlichten Übersichtsstudie von Andersson et al. wird jedoch empfohlen, den Begriff „Heteroresistenz“ nur zu verwenden, wenn die MHK der resistenten Subpopulation mindestens dem Achtfachen der MHK der sensiblen Hauptpopulation entspricht (152).

Die zugrundeliegenden Mechanismen für das Auftreten von Heteroresistenzen sind sehr unterschiedlich, jedoch nahezu ausschließlich auf genetische Mechanismen zurückzuführen (152). Diskutiert werden je nach untersuchtem Organismus und Antibiotikum vor allem der genetisch regulierte Efflux und/oder Influx eines Antibiotikums. So zeigten Untersuchungen an *Acinetobacter baumannii*-Stämmen eine Überexpression von Efflux-Pumpen (153). Eine erhöhte Expression von Regulatorproteinen für Efflux-Pumpen und die verringerte Expression von Porinen spielen bei Heteroresistenzen von *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen eine entscheidende Rolle (154).

Zum ersten Mal wurde das Phänomen einer heterogenen Antibiotikaempfindlichkeit im Jahre 1947 beschrieben, als Alexander et al. unterschiedliche Streptomycin-MHK-Werte für verschiedene Populationen eines *H. influenzae* Typ b-Stamms feststellten

(155). In jüngerer Vergangenheit beschrieben sowohl Cerquetti et al. 2007 als auch Cherkaoui et al. 2017 bei *H. influenzae* das Phänomen, dass bei der Resistenztestung von Imipenem mittels Gradientenagardiffusionstest (GAD) bei manchen Stämmen entweder einzelne Kolonien in der Hemmhofellipse wachsen oder es zu sogenannten Doppelhemmhöfen kommt (150, 156). Laut Cherkaoui et al. ist dieses Phänomen eindeutig auf das Vorliegen von Heteroresistenzen zurückzuführen. Auch Nicoloff et al. teilen diese Ansicht und schreiben: „either isolated colonies grew in the inhibition zone or a halo of lower cell density was observed“ (157) (Seite 512). Cherkaoui et al. beschrieben, dass unter anderem die Efflux-Pumpe AcrAB-TolC, genauer gesagt ihr Regulatorprotein *acrR*, für die Entstehung von Imipenem-Resistenzen bei *H. influenzae* mitverantwortlich ist. Ob diese Efflux-Pumpe auch eine Rolle bei der Entstehung von Heteroresistenzen spielt, müsse jedoch durch eine Untersuchung des Transkriptionslevels des *acrR* durch eine real time quantitative PCR an den Stämmen, welche in der Hemmhofellipse wachsen, bestätigt werden (150).

1.7.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

1.7.2.1 Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Die Bouillon-Mikrodilutionsmethode (BMD) stellt nach Vorgaben des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) den Goldstandard zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von Antibiotika bei Bakterien dar. Die MHK ist definiert als die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, die das mikrobielle Wachstum verhindert. Sie wird bei der Bouillon-Mikrodilutionsmethode durch visuelle Kontrolle des Bakterienwachstums in Flüssigkulturen bestimmt. Dabei wird eine Keimsuspension mit vorgegebener Bakterienmenge zu einem Antibiotikum in aufsteigender Verdünnung gegeben. Wenn es nach Bebrütung zur Trübung, zu einem Farbumschlag oder zur so genannten „Knopfbildung“ kommt, ist von keiner Wachstumshemmung auszugehen. Bleibt die Suspension klar und farblich unverändert, konnte ein Wachstum unterdrückt werden. Die MHK wird bei der ersten Suspension der Verdünnungsreihe, die klar bleibt, abgelesen. Der Keim kann anhand der MHK gemäß den Grenzwerten des EUCAST als sensibel (S), sensibel bei erhöhter therapeutischer Dosis (I) oder resistent (R) gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum interpretiert werden.

1.7.2.2 Gradientenagardiffusionstest

Bei der Gradientenagardiffusion (GAD) wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) mittels eines Teststreifens bestimmt. Dieser Teststreifen ist so aufgebaut, dass auf der einen Seite ein definierter Antibiotikagradiant aufgetragen ist und auf der anderen Seite eine dem Gradienten entsprechende Skala der MHK-Werte aufgezeichnet ist. Der Teststreifen wird auf eine mit dem zu testenden Stamm beimpfte Agarplatte aufgelegt, sodass auf dem Agar per Diffusion ein kontinuierlicher Gradient der Antibiotikakonzentration entsteht. Nach einer festgelegten Inkubationszeit entsteht auf der Agarplatte ein sogenannter Hemmhof, also ein Bereich, in dem kein Bakterienwachstum stattfindet. Die MHK wird am Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit der Skala des Teststreifens abgelesen.

1.7.3 Epidemiologie der Antibiotikaresistenzen bei *H. influenzae*

1.7.3.1 Ampicillin-Resistenz

Epidemiologisch sind laut Daten des NRZMHi zur Ampicillin-Resistenz von invasiven *H. influenzae*-Isolaten in Deutschland (2019) ca. 23 % der Stämme resistent gegen Ampicillin. Davon sind 15 % β -Lactamase-positiv und 8 % β -Lactamase-negativ. Damit hat sich der Anteil an Ampicillin-resistenten *H. influenzae* im Vergleich zum Jahr 2010, als resistente *H. influenzae* unter 10 % aller Stämme ausmachten, mehr als verdoppelt. Vor allem ist der Anteil und die Anzahl β -Lactamase-negativer Ampicillin-resistenter *H. influenzae*-Isolate (BLNAR) in diesem Zeitraum drastisch angestiegen. Die Phänotypverteilung aller invasiven Isolate ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Daten stammen aus den jährlichen Berichten des NRZMHi zu invasiven *H. influenzae*-Isolaten (90).

Die beschriebene Prävalenz einer Ampicillin-Resistenz bei invasiven *H. influenzae* deckt sich mit aktuellen Zahlen aus Frankreich (24 %) (158). Nicht-invasive *H. influenzae*-Isolate haben jedoch laut aktueller Studienlage eine deutlich höhere Prävalenz einer Ampicillin-Resistenz. Diese bewegt sich je nach Land und Autor zwischen 36 % (159), 51 % (158), 58 % (160) und 69 % (161).

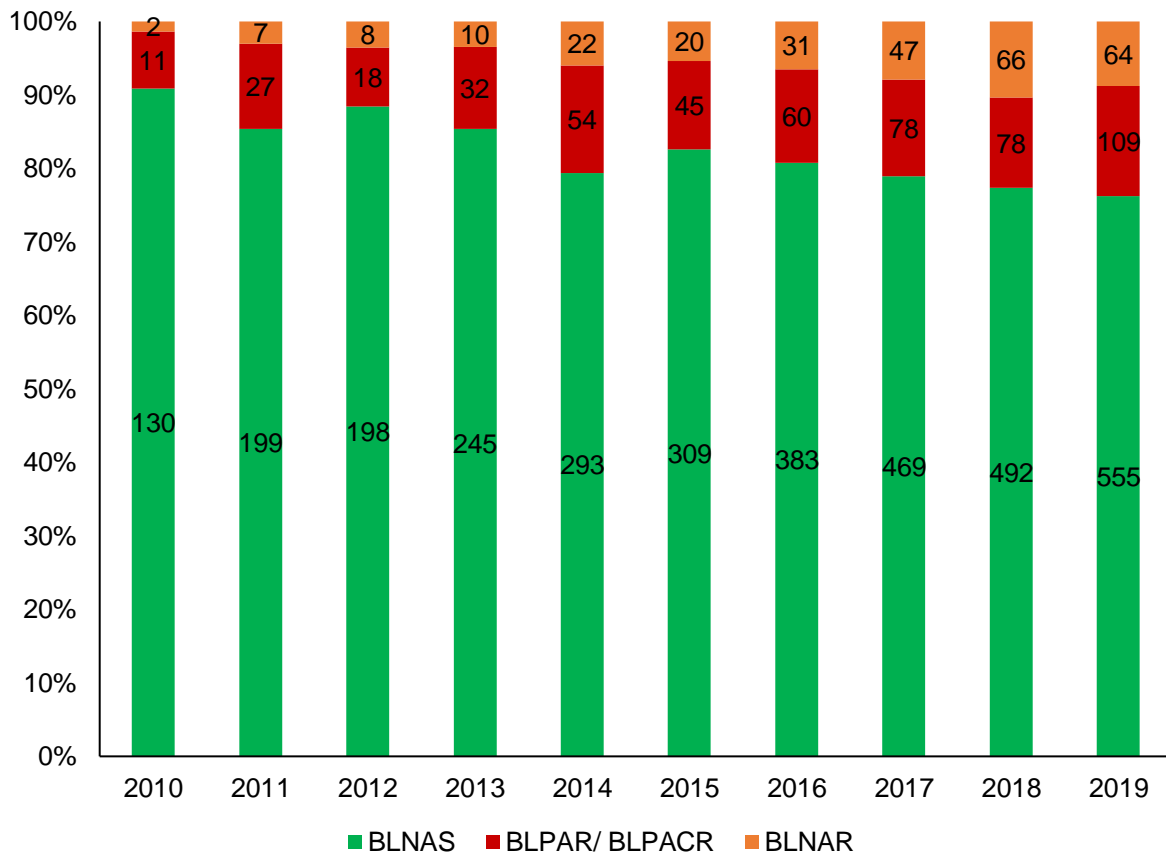


Abbildung 7: Phänotyp aller invasiver *H. influenzae*-Isolate hinsichtlich Ampicillin-Resistenz und β -Lactamase-Produktion.
 Berücksichtigt wurden alle invasiven Isolate aus Blut und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), die im Zeitraum von 2010 bis 2019 an das NRZMHi gesendet wurden. Die Daten sind zusammengefasst aus den jährlichen Berichten des NRZMHi (90).
 (Eigene Abbildung)

1.7.3.2 Imipenem-Resistenz

Die erste Charakterisierung eines Imipenem-resistenten *H. influenzae* geht auf Cerquetti et al. 2007 zurück (156). Systematische Studien zu Antibiotikaresistenzen bei invasiven *Haemophilus influenzae*-Isolaten, in denen Imipenem in die Testungen eingeschlossen wurde, sind jedoch äußerst selten. Diese Fragestellung betreffend wurde zuletzt eine große Anzahl an invasiven Stämmen von Garcia-Cobos et al. im Jahr 2014 untersucht (162). Sie untersuchten in ihrer Arbeit die Empfindlichkeit von 307 invasiven Isolaten gegenüber sieben verschiedenen Antibiotika. Unter diesen Antibiotika befand sich auch Imipenem. Eine Resistenz gegen diese Substanz konnte jedoch für keinen der Stämme nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnten

Cardines et al. im Jahr 2012 bei der Untersuchung von Kindern mit Mukoviszidose eine Imipenem-Resistenz bei 17,7 % ihrer untersuchten Isolate nachweisen (163). Jedoch handelte es sich in dieser Arbeit nicht um invasive Isolate, sondern um *H. influenzae*, die aus dem Nasenrachenraum isoliert wurden. Auch Cherkaoui et al. konnten 2017 eine Imipenem-Resistenz bei 46 von 124 getesteten Isolaten (37 %) nachweisen (150). Das Studienkollektiv in dieser Arbeit war jedoch epidemiologisch nicht näher definiert und nur ein sehr kleiner Teil der Proben stammte aus Blut oder Liquor, sodass keine Rückschlüsse auf die Prävalenz einer Imipenem-Resistenz bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten gezogen werden können.

1.7.3.3 Cefotaxim-Resistenz

Es gibt bis heute nur sehr wenige Veröffentlichungen zur Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten in Europa. In einer Veröffentlichung von Garcia-Cobos et al. aus Spanien aus dem Jahr 2007 wurde bei der Testung von 354 Isolaten nur bei einem einzigen Stamm eine MHK über dem Resistenzgrenzwert gemessen (145). In einer aktuelleren Langzeitstudie derselben Arbeitsgruppe wurde bei der Testung von 307 invasiven Isolaten eine sehr geringe Prävalenz von 0,7 % nachgewiesen (162). Dem entgegen zeigte eine Studie aus Frankreich aus dem Jahr 2019 bei der Untersuchung von 136 invasiven Isolaten eine Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz von 5,8 % (158). Neben diesen beiden Arbeiten gibt es kaum systematische Studien, die sich mit der Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten befassen und ein epidemiologisch genau definiertes Studienkollektiv der Untersuchung zugrunde legen.

Es sei erwähnt, dass der EUCAST-Grenzwert für eine Cefotaxim-Resistenz bei $>0,125 \mu\text{g/ml}$ liegt (164). Dieser Wert unterscheidet sich stark von dem vom Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) festgelegten Wert, welcher bei $>2 \mu\text{g/ml}$ liegt (165). Der enorme Größenunterschied der Grenzwerte von EUCAST und CLSI ist darauf zurückzuführen, dass die beiden Institute zwei verschiedene Herangehensweisen an die Festlegung des Grenzwertes verfolgten. Der Grenzwert, der von dem CLSI festgelegt wurde, richtet sich streng nach den pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Berechnungen zu Cefotaxim bei einer üblichen Dosis von 2 g dreimal täglich. Der nicht Spezies-spezifische Cefotaxim-Grenzwert, der von

EUCAST festgelegt wurde, liegt ebenfalls bei 2 µg/ml. Für die Spezies *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Haemophilus influenzae* wurde der Grenzwert allerdings herabgesetzt, da diese Stämme sehr selten seien und das klinische Ergebnis daher nicht sicher voraussagen sei (166). Der schlussendlich festgelegte Grenzwert von 0,125 µg/ml ergibt sich aus dem epidemiologischen cut-off Wert (epidemiological cut-off value, ECOFF), der sich bei der Untersuchung der Cefotaxim-MHK von über 13000 *H. influenzae*-Stämmen durch EUCAST zeigte (166).

1.8 Wissenschaftliche Fragestellungen

Da sich diese Arbeit mit drei unterschiedlichen Schwerpunkten rund um die Epidemiologie des Bakteriums *Haemophilus influenzae* beschäftigt, deren Ergebnisse jeweils als einzelne Veröffentlichungen in *peer-reviewed* Zeitschriften erschienen sind, wird auch die jeweilige zugrundeliegende wissenschaftliche Fragestellung getrennt betrachtet.

1.8.1 MALDI-TOF-MS-Analyse

Im ersten Teil dieser Arbeit wird eine Methodvalidierung des VITEK® MS MALDI-TOF-MS von bioMérieux (Marcy l'Etoile, Frankreich) unter Verwendung der CE-zertifizierten IVD Datenbank durchgeführt.

Da sich die beiden Spezies *H. influenzae* und *H. haemolyticus* hinsichtlich ihres pathogenen Potentials stark unterscheiden, hätte eine Fehlidentifikation von *H. influenzae* als *H. haemolyticus* das Ausbleiben einer nötigen antibiotischen Therapie und die Fehlidentifikation von *H. haemolyticus* als *H. influenzae* eine unnötige antibiotische Therapie zur Folge. Deshalb soll geklärt werden, ob das VITEK® MS IVD für den Einsatz in der Routinediagnostik zur sicheren Erregeridentifikation und -diskriminierung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* geeignet ist.

Zum ersten Mal wird eine große Anzahl an Stämmen beider Spezies retrospektiv mit dem VITEK® MS IVD untersucht, um das Diskriminierungspotential dieses Systems zu ermitteln. Die zu untersuchenden Stämme wurden zuvor durch geeignete biochemische und molekulargenetische Tests eindeutig einer der beiden Spezies zugeordnet.

Die VITEK®-MS-Ergebnisse werden denen der Referenzmethoden (biochemische und molekulargenetische Tests) gegenübergestellt, um zu analysieren, ob es sich bei den durch das VITEK® MS ausgegebenen Ergebnissen um korrekte oder inkorrekte Identifikationen der untersuchten Isolate handelt.

Durch die molekulargenetische Untersuchung von sechs der sieben Loci des *H. influenzae*-MLST-Schemas wird an einer Auswahl der Stämme die

Spezieszugehörigkeit der Stämme noch einmal überprüft und die genetische Diversität untersucht.

1.8.2 Vergleich der Antibiotikaresistenztestungsverfahren Gradientenagardiffusion und Bouillon-Mikrodilution

Im Zuge der Untersuchung der Imipenem- und Cefotaxim-Resistenzen werden die Resistenztestungsverfahren Gradientenagardiffusion (GAD) und Bouillon-Mikrodilution (BMD) verglichen und validiert.

Im ersten Schritt wird durch wiederholte Testung geeigneter Referenzstämmen und einiger *H. influenzae*-Stämme die Intraassay-Reproduzierbarkeit überprüft.

Im nächsten Schritt wird die Interassay-Reproduzierbarkeit der beiden Methoden überprüft. Dies wird durch eine Resistenztestung von *H. influenzae*-Stämmen mit Imipenem und Cefotaxim durchgeführt. Die Ergebnisse, die in der Routinediagnostik mittels GAD bestimmt wurden, werden mittels BMD, dem Goldstandard zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK), auf Reproduzierbarkeit überprüft und die Ergebnisse der beiden Methoden verglichen.

1.8.3 Imipenem-Resistenz

Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Epidemiologie von Imipenem-Resistenzen bei *H. influenzae*. Dieses Antibiotikum aus der Klasse der Carbapeneme wird vor allem in der kalkulierten Therapie einer Sepsis eingesetzt.

Es wird untersucht, mit welcher Prävalenz Imipenem-Resistenzen bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten in Deutschland auftreten. Dafür werden alle im Jahr 2016 an das NRZMHi gesendeten Isolate berücksichtigt, die invasive Infektionen verursacht haben und bei denen der Erreger im Blut und/oder in Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen wurde.

In diesem Rahmen wird eine epidemiologische Untersuchung aller invasiven Isolate aus dem Jahr 2016 durchgeführt. Diese umfasst das Patientenalter und -geschlecht, den Serotyp und den Phänotyp. Der Phänotyp richtet sich dabei nach einer Resistenz gegen Ampicillin und der Produktion einer β -Lactamase.

Des Weiteren wird eine molekulargenetische Analyse des für das Penicillin-Bindeprotein 3 (PBP3) codierende Resistenzgen *ftsI* durchgeführt. Diese soll zeigen, ob sich bei den Imipenem-resistenten Isolaten Aminosäuresubstitutionen nachweisen lassen, die in der Vergangenheit mit einer Resistenzentwicklung gegen Carbapeneme in Zusammenhang gebracht wurden.

Da auch die Rolle der Efflux-Pumpe AcrAB-TolC bei der Entwicklung von Imipenem-Resistenzen diskutiert wird, wird bei Stämmen mit Resistenzen gegen diese Substanz ebenfalls das *acrR*-Gen, welches für das Regulatorprotein dieser Efflux-Pumpe codiert, sequenziert und analysiert. Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf Deletionen und/oder Insertionen, die zu einem verfrühten Stopp-Codon führen, sodass die hemmende Funktion des Regulators kompromittiert wird.

Die Verwandtschaftsbeziehung der Imipenem-resistenten Isolate wird über eine Multilocus-Sequenztypisierung (MLST) ermittelt. Dabei wird untersucht, ob Imipenem-resistente Stämme nah verwandt sind beziehungsweise gleiche Sequenztypen aufweisen. Darauf aufbauend soll eine geographische Analyse der resistenten Isolate zeigen, ob sich bestimmte Sequenztypen mit vermehrter Häufigkeit in bestimmten Bereichen in Deutschland verbreiten und ob bei der Entwicklung von Imipenem-Resistenzen eher von der Verbreitung eines oder weniger resistenter Klone auszugehen ist oder es sich dabei um sporadisch auftretende Resistenzen handelt.

1.8.4 Cefotaxim-Resistenz

Der dritte Teil der Arbeit befasst sich mit der Epidemiologie von Cefotaxim-Resistenzen bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten. Dieses Drittgenerations-Cephalosporin wird zur Behandlung von schweren durch dieses Bakterium ausgelösten invasiven Erkrankungen eingesetzt, wenn ein gesicherter Erregernachweis aus Blut und/oder Cerebrospinalflüssigkeit erfolgen konnte.

Es gibt nur sehr wenige Daten zur Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten in Europa. Zudem gibt es bei den in der Vergangenheit ermittelten Prävalenzwerten eine deutliche Diskrepanz von 0,7 % bis 5,8 %. Das zeigt, dass eine genaue Untersuchung dieser Fragestellung mit einer großen Anzahl an

invasiven Stämmen nachgegangen werden muss, um ein klareres Bild von der aktuellen Lage der Cefotaxim-Resistenz bei *H. influenzae* zu erhalten.

Da die Empfindlichkeit gegenüber diesem Antibiotikum seit 2016 routinemäßig bei allen an das NRZMHi gesendeten *H. influenzae*-Stämmen bestimmt wird, umfasst diese Arbeit alle Stämme, die in den Jahren 2016 bis 2019 durch das Referenzzentrum untersucht wurden. Um ein klar definiertes Studienkollektiv zu erhalten, werden ausschließlich Isolate berücksichtigt, die invasive Infektionen verursacht haben und bei denen der Erreger in Blut und/oder in Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden konnte. Da es sich hierbei um eine Untersuchung europäischer Stämme handelt, wird der EUCAST-Grenzwert von 0,125 µg/ml zugrunde gelegt, um die Daten mit denen anderer europäischer Studien vergleichen zu können.

Die epidemiologische Untersuchung der über den Vier-Jahreszeitraum gesammelten Isolate umfasst neben der Cefotaxim-Empfindlichkeit auch das Patientenalter und -geschlecht, die Erfassung des Kapselserotyps und des sich aus Ampicillin-Empfindlichkeit und β -Lactamase-Produktion abgeleiteten Phänotyps.

Die Sequenzierung des vollständigen Genoms aller Cefotaxim-resistenten Isolate soll Aufschluss über die Verwandtschaftsbeziehung dieser Isolate geben.

Eine Analyse der geographischen Verteilung der Cefotaxim-resistenten Stämme im Vergleich zu der Bevölkerungsdichte in Deutschland soll ergänzend zu den Genomdaten Aufschluss darüber geben, ob es sich bei den resistenten Stämmen um einzelne oder wenige Klone handelt, die die Resistenzen verursachen, oder ob es sich bei der Resistenzentwicklung eher um sporadische Ereignisse handelt.

Eine genaue molekulargenetische Untersuchung des Resistenzgens *ftsI*, welches für das Penicillin-Bindeprotein 3 (PBP3) codiert, soll zeigen, ob es einen Zusammenhang zwischen bestimmten Substitutionen in der Aminosäuresequenz des PBP3 und der Entwicklung von Resistenzen gibt. Im Fall von Cefotaxim wurde in der Vergangenheit gezeigt, dass insbesondere die L389F-, die G555E- und die Y557H-Substitution mit einer erhöhten Cefotaxim-MHK in Zusammenhang stehen. Daher soll die Frage der epidemiologischen Relevanz dieser Substitutionen geklärt werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Bakterienstämme

Die *H. influenzae*-Isolate, die zur Datenerhebung in dieser Arbeit untersucht wurden, stammten nahezu ausschließlich aus der *H. influenzae*-Sammlung des Nationalen Referenzzentrums für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (NRZMHi) in Würzburg. Im Zuge der nationalen Laborsurveillance in Deutschland werden alle Labore dazu angehalten, *H. influenzae*-Isolate aus primär sterilem Material, insbesondere aus Blutkulturen und Liquor cerebrospinalis, an das NRZMHi zu senden. Das Referenzzentrum erhält zudem Isolate aus nicht sterilem Material für konsiliarische Untersuchungen wie der Speziesbestätigung oder Überprüfung ungewöhnlicher Resistenzen. Für die epidemiologische Analyse von Antibiotikaresistenzen bei den Substanzen Imipenem und Cefotaxim wurden nur invasive Isolate aus Cerebrospinalflüssigkeit und/oder Blut in die Analyse eingeschlossen, um repräsentative und mit anderen Studien vergleichbare Werte zu erhalten.

2.1.1 Auswahl des Studienkollektivs

2.1.1.1 MALDI-TOF-MS-Analyse

Für die Validierung des VITEK® MS IVD MALDI-TOF-MS wurde eine Auswahl an *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Stämmen aus der Stammsammlung des NRZMHi ausgewählt, um ein repräsentatives Studienkollektiv zu testen. Die Speziesidentifikation erfolgte durch geeignete Referenzmethoden. Diese werden im Abschnitt 2.2 aufgeführt. Somit konnte jeder Bakterienstamm zuvor eindeutig der Spezies *H. influenzae* oder *H. haemolyticus* zugeordnet werden.

2.1.1.2 Imipenem-Resistenz

Im Jahr 2016 wurde routinemäßig an allen invasiven *H. influenzae*-Stämmen, die an das NRZMHi gesendet wurden, eine Bestimmung der Imipenem-MHK durchgeführt. Alle Imipenem-resistenten *H. influenzae*-Isolate wurden zur weiteren Analyse in den Teil dieser Arbeit aufgenommen, der sich mit der Untersuchung von Imipenem-Resistenzen befasst.

2.1.1.3 Cefotaxim-Resistenz

Im Zeitraum 2016-2019 wurden die Cefotaxim-MHK und die Ampicillin-MHK aller invasiver *H. influenzae*-Isolate, die an das NRZMHi gesendet wurden, bestimmt. Für eine vergleichende statistische Analyse wurden alle Cefotaxim-resistenten *H. influenzae* sowie eine vergleichbare Anzahl Ampicillin-resistenter, Cefotaxim-sensibler Stämme ausgewählt und weiter untersucht.

2.2 Speziesidentifikation und Stammcharakterisierung

Die Speziesidentifikation aller Bakterienstämme, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurde anhand der Untersuchung der Kolonienmorphologie, des Verhaltens in der Gram-Färbung, des Oxidase-Tests und des Faktorenverhaltens durchgeführt. Die für *H. influenzae* Spezies-spezifischen Gene *fucK* und *ompP2* wurden untersucht, um *H. influenzae* als vorliegende Spezies zu bestätigen. Wenn sich beide Gene mittels PCR nicht amplifizieren ließen, wurde eine Sequenzierung des *ompP6*-Gens durchgeführt, um das Vorliegen eines *H. haemolyticus*-Isolates zu bestätigen oder auszuschließen. Die Diagnosekriterien waren demnach die Folgenden: Die Spezies *H. influenzae* wurde dann angenommen, wenn sich der vorliegende Stamm auf Kochblutagar anzüchten ließ und sich die Kolonien klein (1-2 mm) und glasig darstellten. Im Faktorentest musste eine Faktor V- und X-Abhängigkeit nachweisbar sein. Der Oxidase-Test musste positiv ausfallen und unter dem Mikroskop sollten sich Gram-negative pleomorphe Stäbchen zeigen. Die Spezies-spezifischen Gene *ompP2* und *fucK* mussten nachweisbar sein. *H. haemolyticus* wurde angenommen, wenn alle genannten Kriterien erfüllt waren, *ompP2* und *fucK* jedoch nicht nachweisbar waren und die *ompP6*-Sequenz die charakteristischen Merkmale der Spezies *H. haemolyticus* aufwies.

Die Kapselserotypisierung erfolgte durch eine Objektträgeragglutination mittels Antiseren sowie der Untersuchung des *bexA*-Gens, welches für alle bekapselten Stämme nachweisbar ist. Der Nachweis des charakteristischen Gens des jeweiligen Kapselserotyps sicherte die Typisierung bei uneindeutiger Agglutinationsreaktion. Demnach müssen bekapselte Stämme eine Agglutinationsreaktion bei der Objektträgeragglutination, einen positiven *bexA*-Nachweis und gegebenenfalls einen positiven Nachweis des jeweiligen Kapselgens zeigen. Nicht-bekapselte Stämme (NTHi) agglutinieren weder mit einem der Antiseren bei durchgeführter Objektträgeragglutination noch lassen sich das *bexA*-Gen oder die Kapselgene mittels PCR nachweisen.

2.2.1 Anzucht der Bakterienstämme

Geräte

- Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Klasse 2, Modell: Safe 2020 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- CO₂-Brutschrank, Modell: Heraeus Instruments Hera Cell CO₂-Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- -80 °C-Tiefkühltruhe

Reagenzien, Nährmedien und Materialien

- Kochblutagar:
 - BD Mueller Hinton Chocolate Agar (BD, Heidelberg, Deutschland)
 - Chocolate Agar PolyViteX (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- Stammkulturen: Bakteriensuspension in Einfriermedium (enthält pro Liter: 770 ml destilliertes Wasser, 230 ml 87 %iges Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 25 g Standard-I-Nährbouillon (Merck, Darmstadt, Deutschland))
- Impfschlingen (10 µl) (Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland)

Durchführung

Alle Haemophilus-Isolate wurden auf Kochblutagar angezüchtet. Dieser enthält die beiden Wachstumsfaktoren V (NAD) und X (Hämin), die für das Wachstum von *H. influenzae* essenziell sind. Dafür wurde eine kleine Portion der Stammkultur aus dem Kryoröhrchen entnommen und mittels Drei-Ösenausstrich auf der Kochblutagarplatte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei (35±1) °C und 5 % CO₂-Spannung im Brutschrank. Nach dieser Inkubation stellen sich die Kolonien morphologisch glatt, rund, flach und durchscheinend dar. Der Durchmesser einer einzelnen Kolonie beträgt 1-2 mm. Die Kolonien bekapselter Stämme sind in der Regel etwas größer als die der unbekapselten Isolate und eher weißlich und mukoid.

2.2.2 Faktoren-Test

Geräte

- Vitek-Densicheck® Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Materialien und Reagenzien

- Quad Platte (BBL Hemo ID Quad (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Brain-Heart-Infusion (BHI)
- Polystyrol-Röhrchen, 5 ml (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Sterile Wattetupfer

Durchführung

Haemophilus parainfluenzae unterscheidet sich morphologisch kaum von *H. influenzae*, benötigt jedoch für sein Wachstum nur Faktor V (NAD) und nicht Faktor X (Hämin) (167). Zur faktorenabhängigen Unterscheidung der verschiedenen *Haemophilus spp.* werden spezielle Agarplatten verwendet. Diese sind in vier Quadranten aufgeteilt. Drei Quadranten enthalten einen blutfreien Agar mit jeweils Faktor X, Faktor V oder beiden kombiniert. Ein vierter Quadrant enthält einen pferdebluthaltigen Agar mit den beiden Faktoren. Dadurch kann die Faktorenabhängigkeit eindeutig durch Wachstum oder ausbleibendes Wachstum im jeweiligen Quadranten sowie das Hämolyseverhalten als Abgrenzung zur β -hämolisierenden Spezies *H. haemolyticus* ermittelt werden.

Eine 18 bis 24 Stunden bei (35 ± 1) °C und 5 % CO₂-Spannung bebrütete Kultur eines *H. influenzae*-Stamms diente als Untersuchungsmaterial. Das Koloniematerial wurde in 2 ml BHI suspendiert, mittels des Vitek-Densicheck® Plus eine Trübung von McFarland 0,5 eingestellt und mit phosphatgepufferter Salzlösung im Verhältnis 1:10 verdünnt. Mit einem sterilen Wattetupfer wurde die Suspension auf dem Agar aller vier Quadranten der Quad Platte verstrichen. Die Inkubation erfolgte für 24 Stunden bei (35 ± 1) °C und 5 % CO₂-Spannung im Brutschrank. Die Auswertung wurde wie folgt vorgenommen:

**Tabelle 3: Auswertung des Bakterienwachstums auf der Quad Platte mit Rückschluss auf die vorliegende Spezies.
 „+“ = Wachstum, „-“ = kein Wachstum**

	I (X)	II (V)	III (VX)	IV (Hämolyse)
<i>H. influenzae</i>	-	-	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	-	-	+	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	-

2.2.3 Gramfärbung

(Analyse)geräte und Reagenzien

- Binokularmikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland)
- Bunsenbrenner
- Objektträger
- Sterile Holzstäbchen
- Kristallviolett-Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Lugol'sche Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (96 %)
- Safraninrot-Lösung (Safranin-O) (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Durchführung

Einige wenige Kolonien des zu untersuchenden Bakterienstamms wurden zunächst mit einem sterilen Holzstäbchen auf einem Objektträger ausgestrichen und über der Flamme eines Bunsenbrenners hitzefixiert. Anschließend wurde das Präparat für drei Minuten mit Kristallviolettlösung gefärbt und danach mit Lugol'scher Lösung abgespült, sodass sich größere Farbkomplexe bildeten. Nach Entfärben mit 96 %igem Ethanol wurde das Präparat für eine Minute mit einer Safraninlösung gegengefärbt. Das Präparat wurde abgespült, getrocknet und mikroskopisch analysiert. Je nachdem, ob sich blaue oder rote Strukturen darstellten, wurde auf grampositive oder gramnegative Erreger geschlossen. Das Färbeverhalten beruht hierbei auf dem unterschiedlichen Zellwandaufbau der Mikroorganismen. Durch die dickere Mureinschicht lassen sich Gram-positive Bakterien nicht durch Alkohol entfärben, sodass die Farbkomplexe erhalten bleiben und sich die Bakterien unter dem Mikroskop bläulich oder violett darstellen. Gram-negative Bakterien mit einer deutlich dünneren Mureinschicht und äußerer Lipidmembran werden hingegen durch Alkohol entfärbt und im nächsten Schritt durch Safraninlösung rot angefärbt. Sie stellen sich unter dem Mikroskop in rötlicher Farbe dar (168).

2.2.4 Oxidase-Test

Materialien und Reagenzien

- Tetramethyl-paraphenylendiamin-dihydrochlorid-Lösung (1 %)
- Steriles Holzstäbchen
- Filterpapier
- Objektträger

Durchführung

Der Oxidase-Test weist das von *H. influenzae* exprimierte Enzym Cytochrom-C-Oxidase nach, durch welches das farblose Tetramethyl-paraphenylendiamin-dihydrochlorid zum blauen Tetramethyl-paraphenyldiamin-dihydrochlorid-Radikal umgesetzt wird, was mit dem bloßen Auge erkennbar ist (169). Für den Oxidase-Test wurde ein Tropfen des Oxidase-Reagenzes (Tetramethyl-paraphenylendiamin-dihydrochlorid-Lösung (1 %)) auf ein Filterpapier gebracht und mit einem Holzstäbchen mit dem zu testenden Koloniematerial bestrichen. Falls sich innerhalb weniger Sekunden ein Farbumschlag zu blau zeigte, wurde von einem positiven Testergebnis ausgegangen.

2.2.5 Objektträgeragglutination

Materialien und Reagenzien

- *Haemophilus influenzae* Poly-Agglutinationsserum (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- *Haemophilus influenzae* Antiserum Typ a, b, c, d, e und f (Oxoid, Wesel, Deutschland)
- NaCl-Lösung (0,9 %)
- Objektträger
- Sterile Holzstäbchen

Durchführung

Die Serotypbestimmung mittels Objektträgeragglutination dient dem schnellen Nachweis des Kapselserotyps eines vorliegenden *H. influenzae*-Stamms. Hierbei stehen als Nachweisreagenzien Antiseren gegen die sechs verschiedenen Kapselserotypen von *H. influenzae* (a-f) zur Verfügung. Kommt es beim Verrühren des Koloniematerials mit einem der Antiseren auf dem Objektträger zu einer Agglutinationsreaktion, dient dies als Nachweis für den vorliegenden Kapselserotyp. Unbekapselte Stämme rufen bei keinem der sechs Antiseren eine Agglutinationsreaktion hervor.

Im ersten Schritt wurde ein Tropfen NaCl-Lösung auf einen Objektträger geträufelt und anschließend zwei bis drei Kolonien des zu untersuchenden Stamms mittels eines sterilen Holzstäbchens in den Tropfen eingerieben, bis eine homogene Suspension entstand. Diese wurde für 30 Sekunden geschwenkt und anschließend wurde visuell beurteilt, ob es zu einer Agglutinationsreaktion kam. Dieser Schritt diente als Negativkontrolle und zur besseren Beurteilung der späteren Reaktionen. Als Nächstes wurde auf gleiche Weise mit dem Poly-Antiserum verfahren, welches die Antikörper gegen alle sechs Kapselserotypen enthält. Zeigte sich hierbei eine Agglutinationsreaktion, wurde die Testung zunächst mit den Antiseren gegen die am häufigsten vorkommenden Serotypen b, e und f durchgeführt. Bei ausbleibender Agglutinationsreaktion wurden die Antiseren gegen die Serotypen a, c und d getestet.

2.2.6 Polymerasekettenreaktion

Geräte

- Thermocycler:
 - Thermocycler Primus 96 (MWG Europe, Ebersberg, Deutschland)
 - 2720 Thermal Cycler (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Heizblock (Liebisch, Bielefeld, Deutschland)
- CO8000 Cell Density Meter (WPA, Cambridge, UK)
- Flachgelelektrophoresekammer (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch, Deutschland)
- Geldokumentationssystem ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Eppendorf Pipette verstellbar zwischen 10-100 µl
- Eppendorf Pipette verstellbar zwischen 100-1000 µl
- Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 ml
- Reaktionsgefäß 200 µl (PCR-Tubes)

Reagenzien

- ThermoPol Puffer (10x) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- dNTPs (2 mM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Primer 1 (20 µM) ("Forward-Primer", setzt am 5'-Ende an)
- Primer 2 (20 µM) ("Reverse-Primer", setzt am 3'-Ende an)
- Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA)
- Bakteriensuspension
- dH₂O
- TBE-Puffer (100 mM Tris, 100 mM Borat, 2,5 mM EDTA) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- UltraPure™ Agarose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- MIDORI^{Green} Direct (NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland)

- GEBS (20 % Glycerin, 50 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Sarcosyl)
- Smart-Ladder 200 bp-10kb (Kaneka Eurogentec, Seraing, Belgien)

Durchführung

Der diagnostische Zweck der Polymerasekettenreaktion ist der direkte Nachweis von Genen, wie im Falle von *H. influenzae* beispielsweise erregerspezifischer Gene, um ein *H. influenzae*-Isolat eindeutig von nahe verwandten Spezies unterscheiden zu können. Auch die Gene, die für die Synthese der Polysaccharidkapsel codieren, können nachgewiesen werden, sodass eine Bekapselung des Isolats und der Kapselserotyp bestimmt werden können.

Im ersten Schritt wurde eine Bakteriensuspension hergestellt. Dafür wurde das Koloniematerial nach Inkubation mit einem sterilen Wattetupfer von der Agarplatte entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß in 1 ml 0,9 % NaCl eingerieben und anschließend für 15 Minuten bei 100 °C im Heizblock lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit Hilfe des Cell Density Meters auf eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,1 eingestellt. Die Lagerung der Bakteriensuspension erfolgte bei -20 °C.

Zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion von Genen von Haemophilus-Stämmen wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

- 5 µl ThermoPol Puffer (10x)
- 5 µl dNTPs (2 mM)
- 1 µl Primer 1 (20 µM)
- 1 µl Primer 2 (20 µM)
- 0,4 µl Taq DNA Polymerase (5 U/ µl)
- 2 µl Bakteriensuspension
- 35,6 µl dH₂O

Gemäß diesem Ansatz wurden die Reagenzien in einem 200 µl Reaktionsgefäß zusammengebracht und die Reaktion lief in einem der genannten Thermocycler ab. Die verwendeten PCR-Primer sind je nach Gen und Zweck der PCR in den entsprechenden folgenden Abschnitten dargestellt.

Das PCR-Programm lief für alle Gene, mit Ausnahme von *ftsI*, wie folgt ab: zuerst die initiale Denaturierung bei 94 °C für 10 Minuten; anschließend 36 Zyklen mit je 1 Minute Dauer pro Zwischenschritt von 50 °C (Annealing), 72 °C (Elongation), 94 °C (Denaturierung); abschließend die finale Elongation bei 72 °C für 10 Minuten. Für die Amplifikation des *ftsI*-Gens wurde die Annealingtemperatur auf 55 °C angehoben.

Zur Beurteilung der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese mit folgendem Versuchsaufbau durchgeführt: Das 1,5 % Agarose-Gel war in der Gelkammer vollständig mit dem 1x TBE-Puffer bedeckt. Es wurde ein Probenansatz für die Geltaschen angesetzt. Dieser enthielt für jede Geltasche 10 µl PCR-Produkt, 5 µl GEBS als Ladepuffer und 0,5 µl MIDORI^{Green} Direct als Fluoreszenzfarbstoff. Zur Größenkontrolle wurden 10 µl Smart-Ladder mit 0,5 µl MIDORI^{Green} Direct verwendet.

Zur Auftrennung der Proben wurde für 45 Minuten eine Spannung von 170-200 V an die Gelkammer angelegt und das Ergebnis mit dem UV-Licht-Transilluminator sichtbar gemacht und anschließend ausgewertet.

2.2.7 Nachweis Spezies-spezifischer Gene

2.2.7.1 Nachweis von *fucK* und *ompP2*

Tabelle 4: Für den Nachweis der Gene *fucK* und *ompP2* verwendete PCR-Primer

Primer	Primersequenz	Quelle
fucK-up	5'-ACCACTTTCGGCGTGGATGG-3'	(124)
fucK-dn	5'-AAGATTTCCCAGGTGCCAGA-3'	(124)
Hi-ompP2-O1	5'-ATAACAACGAAGGCACTAACG-3'	(39)
Hi-ompP2-O3	5'-ACCTACACCCACTGATTTTTTC-3'	(39)

Der Nachweis des *fucK*- und *ompP2*-Gens wurde unter Verwendung der obenstehenden Primer an allen *H. influenzae*-Stämmen durchgeführt. Ein positives Ergebnis sprach neben den anderen diagnostischen Kriterien für das Vorliegen der Spezies *H. influenzae*. Bei einem negativen Ergebnis wurde anschließend das *ompP6*-Gen sequenziert um *H. haemolyticus* als vorliegende Spezies zu bestätigen.

2.2.7.2 Sequenzierung von *ompP6*

Tabelle 5: Für die Amplifizierung und Sequenzierung des *ompP6*-Gens verwendete PCR-Primer

Primer	Primersequenz	Quelle
ompP6-F	5'-ATGAACAAATTTGTAAATCA-3'	(46)
ompP6-R	5'-TTAGTACGCTAACACTGC-3'	(46)

Die Sequenzierung des *ompP6*-Gens sprach bei Übereinstimmung mit der für *H. haemolyticus* charakteristischen Sequenz beziehungsweise bei Nachweis der charakteristischen Aminosäuresubstitutionen für das Vorliegen dieser Spezies.

2.2.8 Molekulargenetische Typisierung

2.2.8.1 Nachweis von *bexA*

Tabelle 6: Für den Nachweis des *bexA*-Gens verwendete PCR-Primer

Primer	Primersequenz	Quelle
Hi-bexA-F2	5'-CGTTTTRTATGATGTTGATCCWGAM-3'	(170, 171)
Hi-bexA-2	5'-TGTCCATGTCTTCAAATGATG-3'	(170)

Die *bexA*-PCR weist das *bexA*-Gen nach, welches nur bei Stämmen mit ausgebildeter Polysaccharidkapsel vorhanden ist. Daher wurde an allen *H. influenzae*-Stämmen das *bexA*-Gen mittels PCR unter Verwendung der obenstehenden Primer untersucht. Ein positives Ergebnis sprach für eine Bekapselung des Stamms, ein negatives Ergebnis für das Vorliegen eines NTHi.

2.2.8.2 Serotyp-PCR

Tabelle 7: Für die Serotyp-PCR verwendete PCR-Primer

Primer	Primersequenz	Quelle
Hi-a1	5'-CTACTCATTGCAGCATTTGC-3'	(172)
Hi-a2	5'-GAATATGACCTGATCTTCTG-3'	(172)
Hi-b1	5'-GCGAAAGTGAACCTTTATCTCTC-3'	(172)
Hi-b2	5'-GCTTACGCTTCTATCTCGGTGAA-3'	(172)
Hi-c1	5'-TCTGTGTAGATGATGGTTCA-3'	(172)
Hi-c2	5'-CAGAGGCAAGCTATTAGTGA-3'	(172)
Hi-d1	5'-TGATGACGATACAACCTGT-3'	(172)
Hi-d2	5'-TCCACTCTTCAAACCATTCT-3'	(172)
TTL63 (Hi-e1)	5'-GAGCAATTCATCGTAGTAAC-3'	(173)
TTL64 (Hi-e2)	5'-TTCTTCATATCCTCGCAATTG-3'	(173)
Hi-f1	5'-GCTACTATCAAGTCCAAATC-3'	(172)
Hi-f2	5'-CGCAATTATGGAAGAAAGCT-3'	(172)

Der Nachweis des Kapsellocus mittels Serotyp-PCR wurde unter Verwendung der obenstehenden Primer an den *H. influenzae*-Stämmen durchgeführt, bei denen durch die Objektträgeragglutination kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden konnte. Der Nachweis des jeweiligen Kapselgens spricht für den jeweiligen Serotyp. Kann keines der Kapselgene nachgewiesen werden, spricht dies für das Vorliegen eines NTHi (172).

2.2.8.3 MLST

Tabelle 8: Für die MLST verwendete PCR-Primer

Gen	Protein	Primername	Primersequenz	Quelle
<i>adk</i>	Adenylatkinase	adk-F2	5'-GCACTCAAGCACAATTTA-3'	(174)
		adk-R3	5'-GCCTAAGATTTTATCTAACTCTT-3'	(174)
<i>atpG</i>	ATP-Synthase F1 Untereinheit Gamma	atpG-neu	5'-CGAATAGTGCTTGGTAGTACC-3'	
		atpG-mod	5'-TTGYACAACAGGYTTTTGCG-3'	(124)
<i>frdB</i>	Fumaratreduktase Eisen-Schwefel Protein	frdB-up	5'-CTTATCGTTGGTCTTGCCGT-3'	(124)
		frdB-dn	5'-TTGGCACTTTCCACTTTTCC-3'	(124)
<i>fucK</i>	Fuculokinase	fucK-up	5'-ACCACTTTTCGGCGTGGATGG-3'	(124)
		fucK-dn	5'-AAGATTTCCCAGGTGCCAGA-3'	(124)
<i>mdh</i>	Malatdehydrogenase	mdh-up	5'-TCATTGTATGATATTGCCCC-3'	(124)
		mdh-dn	5'-ACTTCTGTACCTGCATTTTG-3'	(124)
<i>pgi</i>	Glukose-6-Phosphat-Isomerase	pgi-up	5'-GGTGAAAAAATCAATCGTAC-3'	(124)
		pgi-dn	5'-ATTGAAAGACCAATAGCTGA-3'	(124)
<i>recA</i>	RecA	recA-up	5'-ATGGCAACTCAAGAAGAAAA-3'	(124)
		recA-dn	5'-TTACCAAACATCACGCCTAT-3'	(124)

Eine MLST wurde 2016 vor Beginn dieser Arbeit an allen Imipenem-resistenten Isolaten durchgeführt. Dafür wurden bei allen Stämmen die oben aufgeführten Gene mit den in Tabelle 8 aufgeführten Primern amplifiziert und sequenziert. Nach Abgleich mit der pubmlst.org-Datenbank konnte so jedem Stamm ein Sequenztyp zugeordnet werden. Den Einzelsequenzen der jeweiligen Loci konnten durch die pubmlst.org-Datenbank ebenfalls Sequenztypen zugeordnet werden.

2.2.8.3.2 MLST im Rahmen der MALDI-TOF-MS-Analyse

Für die Untersuchung des Diskriminierungspotentials des VITEK® MS wurde ein Vergleich der Sequenzen der MLST-Loci einiger *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Stämme durchgeführt. Die MLST wurde demnach nicht zur Typisierung durchgeführt, sondern hatte die Visualisierung der Verwandtschaftsbeziehungen durch ein „Neighbor-joining-net“ zum Ziel. Da das Gen *fucK* für *H. influenzae* Spezies-spezifisch ist und die Abwesenheit dieses Gens ein wichtiges Unterscheidungskriterium von *H. haemolyticus* gegenüber *H. influenzae* darstellt, wurde es bei dieser Untersuchung aus dem MLST-Schema ausgenommen, um nicht von vornherein vollkommen unterschiedliche konkatenierte Sequenzen zu erhalten.

Für die Untersuchung wurden 108 *H. influenzae*-Stämme aus der NRZMHi-Stammsammlung für diese Arbeit ausgewählt, bei denen bereits eine MLST durchgeführt worden war. Außerdem wurde eine Multilocus-Sequenzierung an 43 *H. haemolyticus*-Isolaten durchgeführt.

Die Sequenzen der sechs untersuchten Loci wurden konkateniert und es wurde mit der MEGA-X Software (175) ein Alignment aller Sequenzen durchgeführt. Dieses Alignment wurde genutzt, um die Verwandtschaftsbeziehung der Stämme in einem „Neighbor-joining-net“ mittels der SplitTree4 Software (176) darstellen zu können. Zur Verifizierung der jeweiligen Spezies wurden Sequenzen von Referenzstämmen der beiden Spezies in die Untersuchung eingeschlossen, die aus der öffentlich zugänglichen Nucleotide-Datenbank des National Center for Biotechnology (NCBI) stammten (177). Bei den Referenzstämmen handelte es sich um *H. influenzae* ATCC 49766, NCTC 8143, NCTC 11873 und NCTC 12194 sowie *H. haemolyticus* NCTC 10839, M19345, M19346 und M28486.

Die Sequenz des *H. parainfluenzae*-Stamms ATCC 33392 diente bei der Analyse der Verwandtschaftsbeziehung als outgroup.

2.2.8.4 DNA-Isolierung und Genomsequenzierung

Geräte

- NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Reagenzien

- Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega GmbH, Walldorf, Germany)

Software

- Ridom SeqSphere+ (Version 6.0.2) (Ridom GmbH, Münster, Deutschland)

Durchführung

Es wurde das komplette Genom aller Cefotaxim-resistenter Stämme sequenziert und anschließend analysiert.

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde das Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega GmbH, Walldorf, Germany) verwendet. Das Vorgehen entsprach dabei den Angaben des Herstellers.

Zum Nachweis des Erfolgs der DNA-Isolierung wurde im ersten Schritt eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden Quantität und Qualität des Produkts ermittelt. Dazu wurde die Probe sowohl mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spectrophotometers als auch des Qubit Fluorometers 2.0, analysiert.

Die Sequenzierung des Genoms erfolgte durch die Core Unit Systemmedizin, einer gemeinsamen Einrichtung der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg und des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) des Universitätsklinikums Würzburg (UKW). Die Generierung der Genbibliotheken erfolgte unter Verwendung der Nextera XT-Chemie (Illumina Inc., San Diego, CA) mittels eines 150-bp-Sequenzierungslaufs mit gepaarten Enden. Für die Sequenzierung wurde das Gerät Illumina NextSeq 500 Sequencer (Illumina Inc., San Diego, CA) verwendet.

Die Auswertung der Sequenzdateien im FASTQ-Format erfolgte mit dem Velvet assembler (178), welcher ein Modul der Software Ridom SeqSphere+ in der Version 6.0.2. (Ridom GmbH, Münster, Germany) (179) ist. Zur anschließenden Einteilung der Stämme wurde der cgMLST (core genome Multilocus-Sequenztypisierung) Gensatz verwendet, der als Standardeinstellung bei Ridom SeqSphere vorliegt. Dabei dient der Stamm *H. influenzae* NCTC 8143 als Referenz. Mit dieser Einstellung wurden 1178 verschiedene Gentargets untersucht. Die daraus resultierenden Allelprofile der Stämme sollten in einem so genannten „Minimum spanning tree“ visualisiert werden. Außerdem wurden die Genomdaten dazu verwendet, jedem Stamm einen Sequenztyp gemäß dem MLST-Schema von *H. influenzae* und der pubmlst.org-Datenbank zuzuordnen.

2.3 MALDI-TOF-MS-Analyse

Geräte

- VITEK® MS MALDI-TOF (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Software

- VITEK® MS Prep Station (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- VITEK® MS Acquisition Station (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- MYLA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Materialien und Reagenzien

- Kochblutagar (Chocolate agar PolyViteX, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- Matrixlösung: α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (VITEK® MS CHCA, bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)
- Sterile Holzstäbchen

Durchführung der MALDI-TOF-MS-Analyse

Die massenspektrometrische Analyse wurde mit dem VITEK® MS MALDI-TOF Gerät, der CE-zertifizierten Referenzdatenbank VITEK® MS IVD V3 und den zugehörigen Softwares durchgeführt. Zur Unterscheidung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* enthält diese aktuelle Version der IVD-Datenbank Spektren von 210 *H. influenzae*- und 26 *H. haemolyticus*-Stämmen.

Für die Messung wurden die Stämme auf Kochblutagar ausgestrichen und zur kulturellen Anzucht bei 35 °C und 5 % CO₂-Spannung für 24 Stunden im CO₂-Brutschrank inkubiert. Zur massenspektrometrischen Analyse wurde ein Teil einer Kolonie (10⁴ bis 10⁶ Bakterien) mit einem sterilen Holzstäbchen auf einen Spot des VITEK® MS disposable target slides (VITEK® MS-DS target slide) gebracht und direkt mit 1 μ l α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure bedeckt und luftgetrocknet. Beim VITEK® MS-DS target slide handelt es sich um eine Bestimmungsplatte mit insgesamt 48

Probenspots und drei Kalibratorsports. Die Kalibratorsports befinden sich jeweils in der Mitte einer sogenannten „acquisition group“ oder auch Erfassungsgruppe. Eine Erfassungsgruppe umfasst also 16 Messspots. Das Target (Abbildung 8) ist zur eindeutigen Zuordnung der Proben am oberen Rand von 1 bis 4 und am seitlichen Rand von A bis K beschriftet. Als Kalibratorstamm wird vom Hersteller *Escherichia coli* ATCC 8739 vorgegeben. Für die Kalibrationsmessung zu Beginn eines jeden Messvorgangs wurde eine kleine Portion einer Kolonie dieses Stamms auf den Kalibratorsport, also den Spot in der Mitte jeder Erfassungsgruppe, aufgetragen, mit der Matrixlösung bedeckt und getrocknet. Die Messung jedes Stamms wurde wie auch in anderen Studien, die sich in der Vergangenheit mit der Performance des VITEK® MS befassten, jeweils zwei Mal, also in Duplikaten, auf einem Target durchgeführt (180-184). Für die Duplikatmessung wurde für beide Messspots eine vergleichbare Menge Koloniematerial verwendet und wie oben beschrieben aufgetragen.

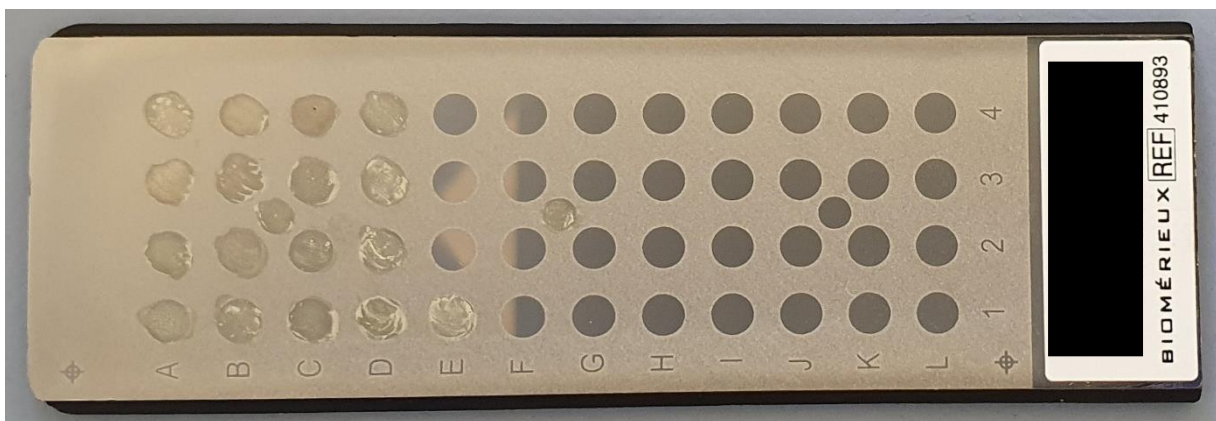


Abbildung 8: Fotografie eines VITEK® MS disposable target slides.
Auf den Messspots A1-E1 und den Kalibratorsports wurden Bakterienproben aufgetragen.
(Eigene Abbildung)

Die jeweiligen Stamminformationen wurden in die Prepstation Software eingegeben und mithilfe des sich an dem target slide befindlichen Barcodes auf die Acquisition Software übertragen. Das Target wurde mittels einer Messschiene in das MALDI-TOF-MS-Gerät gebracht. Durch das Gerät wurde ein Vakuum in dem Bereich, der Ionisationskammer, Laserquelle und Flugzeitröhre umfasst, aufgebaut und die

Messung jedes Spots einer Bestimmungsgruppe, angefangen mit dem Kalibratorsput, erfolgte.

Das VITEK® MS-Gerät generiert Spektren zwischen 2 und 20 kDa. Diese werden mit der MYLA Software (bioMérieux) im Abgleich mit der Referenzdatenbank VITEK® MS IVD Version 3.0 analysiert. Dadurch ergibt sich ein Konfidenzwert zwischen 0 und 99,9 für die jeweilig vorliegende Spezies. Nach Angaben des Herstellers liegt eine „sichere Identifizierung“ vor, wenn der Konfidenzwert zwischen 60,0 und 99,9 liegt. Konfidenzwerte unter 60,0 werden vom System als „unsichere Identifizierung“ angegeben (185). Die Angabe unsicherer Ergebnisse wird meist mit der Identifizierung zweier unterschiedlicher Spezies mit einem jeweiligen Konfidenzwert von ca. 50 angegeben, zwischen denen das System keine sichere Entscheidung treffen kann. Findet das System keine Übereinstimmung des vorliegenden Massenspektrums mit der Referenzdatenbank, ergibt sich „keine Identifizierung“. Für die Auswertung wurde bei abweichenden Ergebnissen der Duplikatmessung eines Stamms das Ergebnis mit dem höheren Konfidenzwert berücksichtigt. Nachdem die Messergebnisse für alle untersuchten Isolate vorlagen, wurden diese je nach angegebenem Konfidenzwert in die zwei Kategorien „sichere Identifizierung“ und „unsichere Identifizierung“ eingeteilt. Anschließend wurden die Ergebnisse des VITEK® MS mit denen der Referenzmethode verglichen. Die sich daraus ergebende Übereinstimmung mit der Referenzmethode gab an, ob die untersuchten Isolate durch das VITEK® MS korrekt oder inkorrekt identifiziert wurden. Hieraus wurde anschließend die Konkordanz berechnet.

2.4 Antibiotikaresistenztestung

2.4.1 β -Lactamase-Test

Materialien und Reagenzien

- Nitrocefin disks (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- Steriles destilliertes Wasser (Aqua B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Objektträger
- Holzstäbchen/ Impfschlingen (10 μ l)

Durchführung

Zur Testdurchführung wurde die Nitrocefin disk auf einen Objektträger aufgelegt und mit einem Tropfen (10 μ l) sterilem destilliertem Wasser befeuchtet. Mittels eines Holzstäbchens oder einer Impfschlinge wurden nun 1-2 Kolonien des zu testenden Bakterienstamms darauf verrieben. Nach 30-60 Sekunden wurde die Reaktionsfläche hinsichtlich eines Farbumschlags beurteilt. Nur bei Vorliegen eines β -Lactamase-positiven Bakterienstamms kommt es zum Farbumschlag von gelb zu rot / rosa.

2.4.2 Bouillon-Mikrodilutionsmethode (BMD)

(Analyse)geräte

- Sorvall RC 5B Plus Zentrifuge, Rotor: Sorvall SS-34 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Analysenwaage Kern ABT 120-5 DM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland)
- Sartorius eline multichannel electronic pipette 10 μ l (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
- Eppendorf Pipette verstellbar zwischen 10-100 μ l
- Eppendorf Pipette verstellbar zwischen 100-1000 μ l
- Accujet-pro Pipettierhelfer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Vitek-Densitcheck® Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Reagenzien

- PP-Röhrchen 15 ml, 50 ml (Greiner bio-one, Kremmünster, Österreich)
- Zentrifugenröhrchen 25 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Sarstedt-Röhrchen 5 ml (Polystyrol) (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- 96-well Polystyrol-Mikrotitrationsplatten mit Rundboden (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Sterile Kochsalzlösung (0,85 %, pH 5,5 - 6,5)
- Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon 450 ml (2-8 °C)
- Defibriniertes Pferdeblut (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- β -NAD (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Phosphatpuffer 0,01 mol/l, pH 7,2
- dH₂O (steriles, destilliertes Wasser, Aqua B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Imipenem-Monohydrat (86,6 %) (Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
- Cefotaxim-Natrium (95,42 %) (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland)

2.4.2.1 Testvorbereitung

Herstellung 50 % lysierten Pferdebluts

Zur Herstellung des 50 % lysierten Pferdebluts wurde defibriniertes Pferdeblut zu gleichen Teilen mit sterilem dH₂O in ein 50 ml-PP-Röhrchen gegeben und gevortext. Das Gemisch aus Wasser und Pferdeblut wurde nun bei -20 °C über Nacht eingefroren und am folgenden Tag bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt. Nachdem das Gemisch zum dritten Mal aufgetaut war, wurde es mit der Accujet-pro Pipettierhilfe gleichmäßig auf 25 ml Zentrifugenröhrchen verteilt. Das Gemisch wurde bei 8 °C und 15000 rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung in 50 ml-PP-Röhrchen in 25 ml Aliquots bei -20 °C eingefroren. Das Pellet, welches nach dem Zentrifugieren zurückblieb, wurde verworfen.

Herstellung der β -NAD-Lösung

Mit einer Zielkonzentration von 20 mg/ml wurde das β -NAD in sterilem destilliertem Wasser gelöst. Dazu wurden 100 mg β -NAD zu 5 ml dH₂O in ein 15 ml-PP-Röhrchen gegeben und gevortext bis eine klare Lösung entstand. Die Lösung wurde nun durch einen Sterilfilter mit einer Membran mit 0,2 μ m Porengröße steril filtriert. Abschließend wurde die Lösung zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung in Eppendorf Reaktionsgefäßen in 500 μ l Aliquots bei -20 °C eingefroren.

Herstellung der Mueller-Hinton-fastidious-Bouillon (MHF)

Zur Bestimmung der MHK von *H. influenzae*-Isolaten mittels BMD wurde Mueller-Hinton-fastidious-Bouillon (MHF) verwendet. Diese besteht aus neun Teilen Kationen-adjustierter Mueller-Hinton-Bouillon (450 ml) und einem Teil 50 % lysierten Pferdebluts. Zusätzlich wird im Verhältnis 1/1000 die β -NAD-Lösung dazu gegeben.

Herstellung der Antibiotikastammlösung

Eine Antibiotikastammlösung wurde für die weitere Verdünnung mit der MHF-Bouillon nach den Vorgaben hergestellt, die in DIN-EN-ISO20776-1 aufgeführt sind. Die Konzentration des Antibiotikums in der Stammlösung muss gemäß den Vorgaben der DIN zwingend über 1000 μ g/ml liegen. Das zu verwendende Lösungsmittel unterscheidet sich je nach Antibiotikum und ist in der DIN-EN-ISO20776-1 aufgeführt. Zur Berechnung der Konzentration unter Berücksichtigung der Potenz des Präparats wurde folgende Gleichung verwendet:

$$m = \frac{V \times \rho}{P}$$

Dabei ist

- ρ die Konzentration der Stammlösung in μ g/ml
- m die Masse der Trockensubstanz in g
- P die Potenz des Präparats in mg/g
- V das Lösungsmittelvolumen in l

Imipenem-Stammlösung:

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \rightarrow \frac{0,05l * 1280 \frac{mg}{l}}{0,866} = 73,9 mg$$

Die Zielkonzentration der Stammlösung wurde auf 1280 µg/ml festgelegt. Das Imipenempräparat lag als Imipenem-Monohydrat in einer Reinheit (entspricht der Potenz) von 86,6 % vor. Als Lösungsmittel wurde Phosphatpuffer 0,01 mol/l, pH 7,2 verwendet. Damit ergaben sich 73,9 mg des Imipenempräparats auf 50 ml Lösungsmittel. Die Stammlösung wurde zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung in Eppendorf Reaktionsgefäßen zu 1 ml aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Cefotaxim-Stammlösung:

$$m = \frac{V \times \rho}{P} \rightarrow \frac{0,05l * 1280 \frac{mg}{l}}{0,9542} = 67,07 mg$$

Die Zielkonzentration der Stammlösung wurde auf 1280 µg/ml festgelegt. Das Cefotaximpräparat lag als Cefotaxim-Natrium in einer Reinheit von 95,42 % vor. Als Lösungsmittel wurde steriles destilliertes Wasser verwendet. Damit ergeben sich 67,07 mg des Cefotaximpräparats auf 50 ml Lösungsmittel. Die Stammlösung wurde zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung in Eppendorf Reaktionsgefäßen als 1 ml Aliquots bei -20 °C eingefroren.

Herstellung des Inokulums

Von einer 18 bis 24 Stunden bei (35±1) °C und 5 % CO₂-Spannung bebrüteten Kultur wurde ein Inokulum hergestellt. Dafür wurden 2 ml sterile Kochsalzlösung (0,85 %) in Sarstedt-Röhrchen gefüllt. In diese wurden einige isolierte Kolonien gleichen Morphotyps mit einem sterilen Wattetupfer eingerieben. Mit Hilfe des Vitek-Densichek® Plus wurde eine Keimsuspension von McFarland 0,5 hergestellt. Zudem wurden 9,9 ml MHF-Medium mit der accujet-pro Pipettierhilfe in ein 15 ml-PP-Röhrchen gefüllt. Die Keimsuspension wurde im Verhältnis 1:100 in der MHF-Bouillon im 15 ml-PP-Röhrchen verdünnt (100 µl der Suspension zu 9,9 ml MHF) und gevortext.

2.4.2.2 Testdurchführung

Zu Beginn wurde die Arbeitslösung des Antibiotikums (Antibiotikum in MHF) aus der Antibiotikastammlösung hergestellt. Dazu wurde die Stammlösung, falls nötig, in einem Zwischenschritt mit dem Verdünnungsmittel (aus DIN-EN-ISO20776-1: für Imipenem Phosphatpuffer 0,01 mol/l pH 7,2 und für Cefotaxim dH₂O) und anschließend mit dem MHF-Medium verdünnt. Die Zielkonzentration der Arbeitslösung, also Antibiotikum in Nährmedium (MHF), war dabei doppelt so hoch wie die höchste Antibiotikakonzentration, die später beurteilt werden sollte.

Im nächsten Schritt wurden 100 µl der Arbeitslösung des zu testenden Antibiotikums mit einer Eppendorf Pipette in das erste Well der Mikrotitrationsplatte pipettiert. Well 2 bis 11 wurden jeweils mit 50 µl MHF-Medium befüllt. Well 12 (Leerwert/Negativkontrolle) wurde mit 100 µl MHF Medium befüllt. Zur Herstellung einer 1:2-Verdünnungsreihe des Antibiotikums wurden nun aus dem ersten Well 50 µl der Arbeitslösung abgenommen und auf das nächste Well überführt. Nach mehrmaligem Resuspendieren mit der Pipette wurden nun vom zweiten Well 50 µl der verdünnten Antibiotikaarbeitslösung auf das nächste Well übertragen. Auf die gleiche Weise wurde bis Well 10 weiter verfahren. Aus Well 10 wurden 50 µl verworfen. Well 11 diente als Positivkontrolle und enthielt daher kein Antibiotikum.

Nun wurden vom zuvor vorbereiteten Inokulum jeweils 50 µl in jedes Well der Mikrotitrationsplatte pipettiert, außer in Well 12, welches als Negativkontrolle diente.

Zur Inkubation wurde die Mikrotitrationsplatte mit dem Deckel verschlossen, um eine Austrocknung zu verhindern. Die Mikrotitrationsplatte wurde bei (35±1 °C) für 18-20 Stunden bei 5 % CO₂-Spannung im Brutschrank inkubiert.

2.4.2.3 Ablesung, Bewertung und Befundung

Da sich bei der MHK-Bestimmung bei *Haemophilus influenzae* mittels Mikrodilution mitunter nur eine geringe Trübung zeigt, hat es sich im Laufe dieser Arbeit bewährt, die vollen 20 Stunden zu inkubieren und die Trübung auf einem Ablesetisch mit Spiegel und unter dem Licht einer Tischleuchte zu beurteilen (Abbildung 9). Eine mit bloßem Auge erkennbare Trübung des Mediums im Well, ein Farbumschlag oder eine

sogenannte Knopf-Bildung wurden als Wachstum der Bakterien gewertet (Abbildung 10). blieb das Medium klar und farblich unverändert, sprach dies gegen ein Wachstum. Als minimale Hemmkonzentration (MHK) wird die niedrigste Wirkstoffkonzentration bezeichnet, bei der kein sichtbares Wachstum der Bakterien feststellbar ist (letztes klares Well). Die Ergebnisse der Ablesung wurden in eine Tabelle eingetragen (+ Wachstum, - kein Wachstum) und die MHK ermittelt.

Damit die jeweiligen Messungen als auswertbar angenommen werden konnten, musste die Wachstums-Kontrolle (Positivkontrolle, 11. Well) eine Trübung, also Wachstum, aufweisen. Die Negativkontrolle (12. Well) musste klar sein, also kein Wachstum zeigen. Zudem wurden die Referenzstämme *H. influenzae* ATCC 49766 und *S. pneumoniae* ATCC 49619 bei jeder Testung mitgeführt. Hierbei mussten die Ableseergebnisse stets den von EUCAST festgelegten Grenzwerten entsprechen.

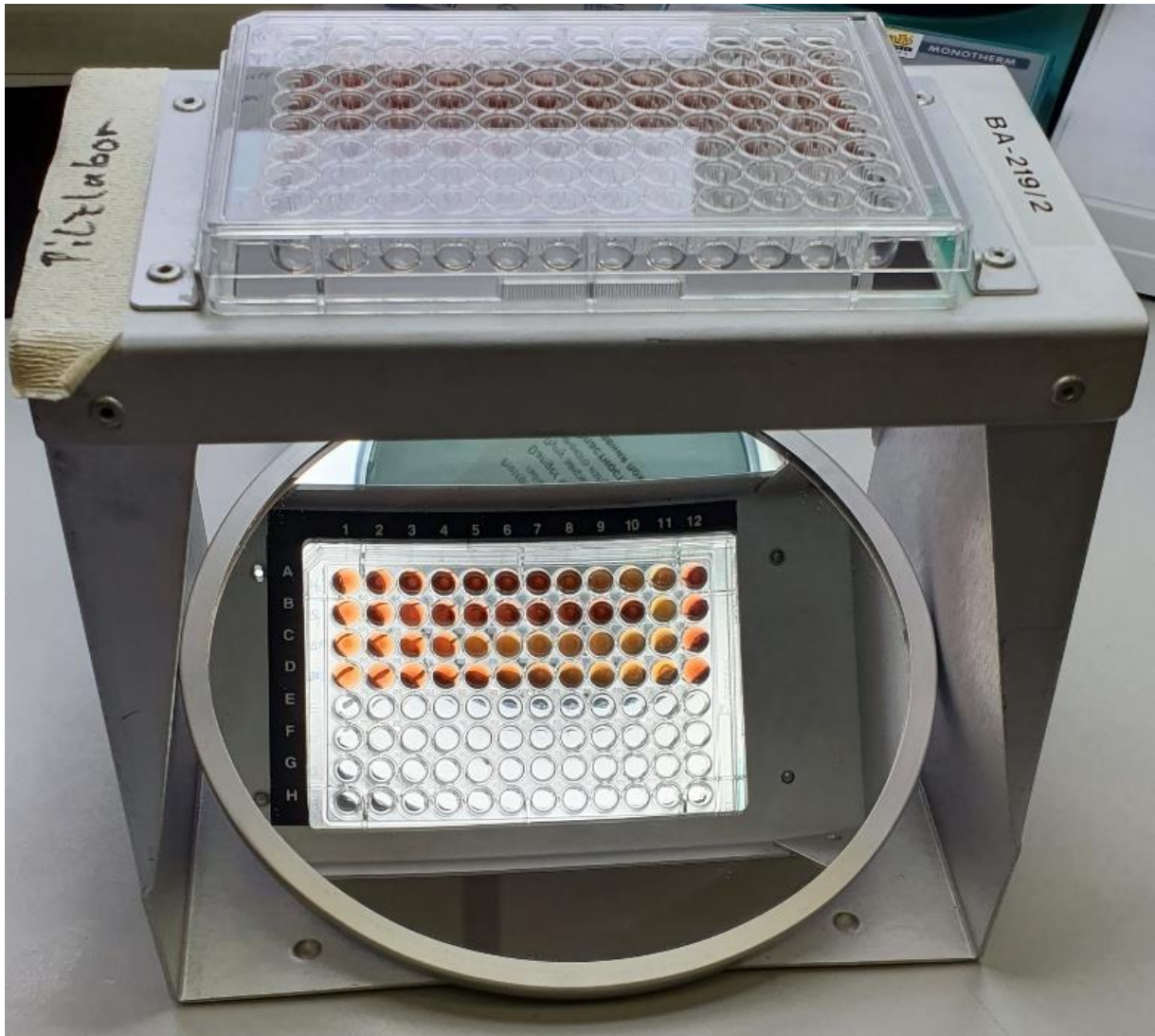


Abbildung 9: Bouillon-Mikrodilution: Ablesen der Ergebnisse mittels Ablesetisch und Spiegel sowie einer Tischleuchte. (Eigene Abbildung)

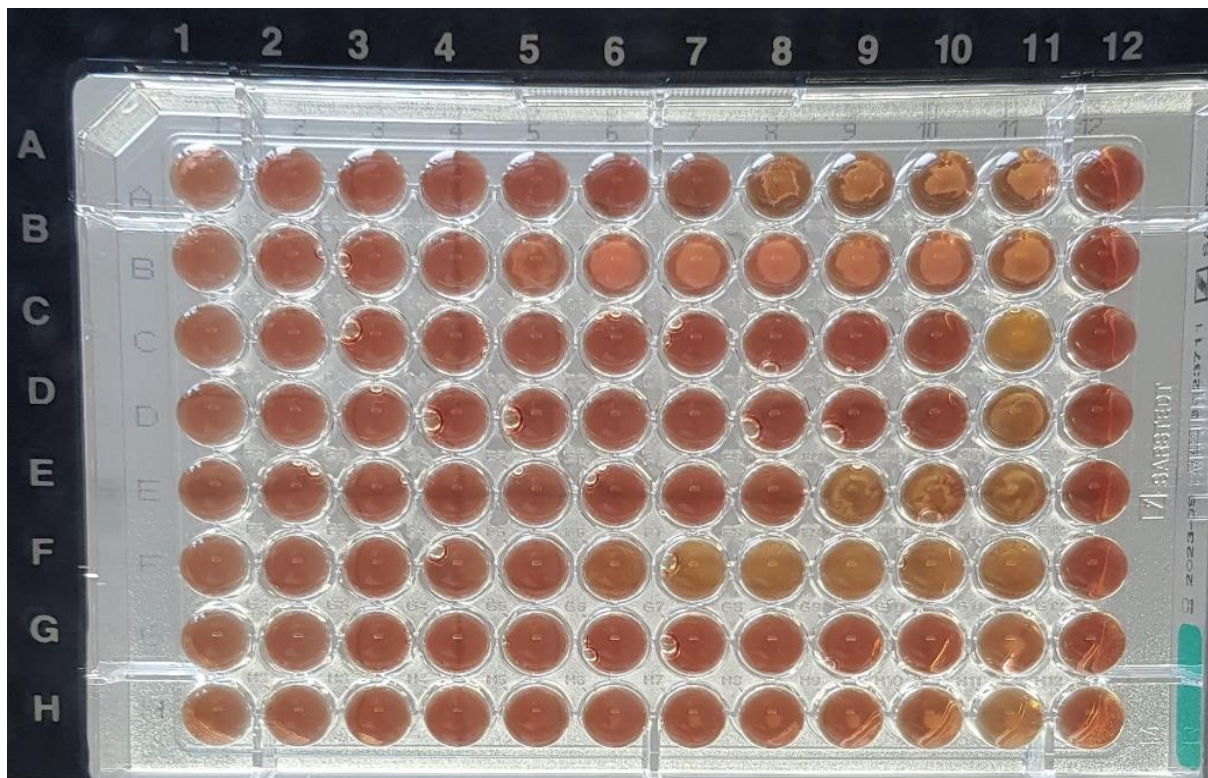


Abbildung 10: Bouillon-Mikrodilution: Zeichen für ein Bakterienwachstum.
 Die Zeichen für ein Bakterienwachstum sind Trübungen (z.B.: A8-11, B5-11, E9-11), Farbumschläge (z.B.: C10-11, D10-11, E8-9) und sogenannte Knopfbildungen (z.B.: C11, G11, H6-11).
 (Eigene Abbildung)

2.4.2.4 Validierung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode

Die Bouillon-Mikrodilutionsmethode wurde validiert, indem die Intra- und Interassay-Reproduzierbarkeit und die Interrater-Reliabilität überprüft wurden.

2.4.2.5.1 Intraassay-Reproduzierbarkeit

Die Validierung der Intraassay-Reproduzierbarkeit erfolgte durch die wiederholte Testung von Referenzstämmen im Vergleich zu den von EUCAST für diese Stämme festgelegten MHK-Grenzwerten. Es wurden die MHK-Werte der Referenzstämme *H. influenzae* ATCC 49766, *S. pneumoniae* ATCC 49169, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 und *P. aeruginosa* ATCC 28753 (nur für Imipenem) für Ampicillin und Imipenem überprüft.

Außerdem wurden Wiederholungsmessungen an einer Auswahl an *H. influenzae*-Stämmen aus der NRZMHi Haemophilus-Stammsammlung mit Imipenem und Cefotaxim durchgeführt. Dazu wurde an drei verschiedenen Tagen die MHK derselben Stämme mittels BMD überprüft.

2.4.2.5.2 Interassay-Reproduzierbarkeit

Die Validierung der Interassay-Reproduzierbarkeit erfolgte durch Vergleich der MHK-Werte, die durch die Bouillon-Mikrodilution (BMD) und die Gradientenagardiffusion erhoben wurden. Laut Literatur sollten bei der Verwendung von Cefotaxim beide Verfahren eine starke Korrelation aufweisen (186, 187). Anders verhält sich die Korrelation beider Verfahren bei der Verwendung von Imipenem. Mehrere Autoren stimmen darin überein, dass sich durch das für die BMD (Inokulum entspricht circa $5 \cdot 10^5$ CFU/ml) verwendete geringere Inokulum deutlich geringere MHK-Werte im Vergleich zur GAD (Inokulum entspricht circa $5 \cdot 10^8$ CFU/ml) zeigen, da resistente Subpopulationen nur durch die GAD, nicht aber durch BMD, detektierbar sind (156, 188).

2.4.2.5.3 Interrater-Reliabilität

Jede durchgeführte BMD wurde von zwei Personen unabhängig voneinander beurteilt. Zur Erhebung von Cohens Kappa wurden daher die Ableseergebnisse von Dr. med. Thiên-Trí Lâm (Facharzt) und Sebastian Nürnberg (Doktorand) bei 110 *H. influenzae*-Stämmen unter Verwendung von Cefotaxim beurteilt und verglichen. Die Einordnung des mittels dieser Daten erhobenen κ -Werts erfolgte anhand der von Landis & Koch festgelegten Grenzwerte (189).

2.4.3 Gradientenagardiffusionstest (GAD)

Geräte

- Vitek-Densicheck® Plus (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Frankreich)

Materialien und Reagenzien

- Mueller-Hinton-Fastidious-Agar (MHF) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- MIC Test Strips AMPICILLIN; IMIPENEM; CEFOTAXIME (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien)
- Mueller-Hinton-Bouillon (MHB)
- Polystyrol-Röhrchen, 5 ml (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Sterile Wattetupfer

Durchführung

Eine 18 bis 24 Stunden bei (35 ± 1) °C und 5 % CO₂-Spannung bebrütete Kultur eines *H. influenzae*-Stamms diente als Untersuchungsmaterial. Das Koloniematerial wurde in 2 ml Mueller-Hinten-Bouillon (MHB) suspendiert und mittels des Vitek-Densicheck® Plus eine Trübung von McFarland 0,5 eingestellt. Mit einem sterilen Wattetupfer wurde die Suspension auf einer Mueller-Hinton-Fastidious (MHF) Agarplatte verstrichen. Dies erfolgte in drei verschiedenen Richtungen, um eine vollständige und gleichmäßige Verteilung der Suspension auf der Agarplatte zu gewährleisten. Anschließend wurde der oben genannte Teststreifen mit einer Pinzette mittig auf die Agarplatte gebracht und angedrückt. Die Inkubation erfolgte bei (35 ± 1) °C für 18-20 Stunden bei 5 % CO₂-Spannung im Brutschrank.

2.4.3.1 Ablesung und Bewertung der Ergebnisse

Die MHK ist bei der GAD definiert als Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit der Skala des Teststreifens (Abbildung 11). Abgelesen wird die vollständige Wachstumshemmung. Auch Einzelkolonien zählen als Wachstum. Falls sich der Schnittpunkt zwischen zwei Werten befand, wurde der höhere Wert als MHK angenommen. Die MHK der als Qualitätskontrolle mitgeführten Referenzstämme, in

unserem Fall *H. influenzae* ATCC 49766 und *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, sollte sich innerhalb der in „Routine and extended internal quality control for MIC determination and disc diffusion as recommended by EUCAST“ festgelegten Grenzwerte bewegen (190).



Abbildung 11: MHF-Agarplatte mit aufgelegtem Teststreifen nach Inkubation. Die Hemmhofellipse schneidet die Skala des Teststreifens bei 1 µg/ml Cefotaxim-Konzentration (Pfeil). Dieser Wert entspricht der gemessenen MHK. (Eigene Abbildung)

2.4.4 Antibiotikaresistenzgrenzwerte

Die Interpretation der Messergebnisse der BMD und GAD erfolgte anhand der EUCAST-Grenzwerte in die Kategorien resistent (R), intermediär (I) und sensibel (S). Die in dieser Arbeit verwendeten Grenzwerte für die Beurteilung „resistent“ waren 1 µg/ml für Ampicillin, 2 µg/ml für Amoxicillin/Clavulansäure, 2 µg/ml für Imipenem und 0,125 µg/ml für Cefotaxim (164).

2.5 Molekulargenetische Charakterisierung durch Sequenzierung der Antibiotikaresistenzgene

2.5.1 *ftsI*-Sequenzierung

Tabelle 9: Für die Amplifizierung und Sequenzierung des *ftsI*-Gens verwendete PCR-Primer. Die Primer *ftsI*-F und -R wurden zur Untersuchung der Imipenem-Resistenz, *ftsI*frw und *ftsI*rev zur Untersuchung der Cefotaxim-Resistenzen verwendet.

Primer	Primersequenz	Quelle
<i>ftsI</i> -F	5'-GTTGCACATATCTCCGATGAG-3'	(141)
<i>ftsI</i> -R	5'-CAGCTGCTTCAGCATCTTGC-3'	(141)
<i>ftsI</i> frw	5'-GACGATTTGGATAACCCATA-3'	(156)
<i>ftsI</i> rev	5'-CTGGATAATTCTGTCTCAGA-3'	(156)

Das Gen *ftsI* codiert für PBP3. Amplifizierung und Sequenzierung des *ftsI*-Gens erfolgten, um Aminosäuresubstitutionen, die in den Studienstämmen aber nicht im Referenzstamm Rd KW20 vorliegen, untersuchen zu können. Zur Untersuchung der Imipenem-Resistenz und Cefotaxim-Resistenz wurden zwei verschiedene Primerpaare zur Durchführung der *ftsI*-PCR verwendet (Tabelle 9). Für die Untersuchung der Cefotaxim-resistenten Stämme musste ein größerer Genbereich amplifiziert werden, um sicherzustellen, dass alle in der Vergangenheit als ursächlich beschriebenen Aminosäuresubstitutionen analysiert werden konnten.

Anschließend wurden die untersuchten Stämme in die in Tabelle 2 dargestellten PBP3-Gruppen eingeteilt. Außerdem wurden die Substitutionen, die einschließlich der gruppenbestimmenden Aminosäuresubstitutionen gehäuft vorkamen, in einem Einbuchstaben-Code für die Aminosäuren dargestellt.

2.5.2 *acrR*-Sequenzierung

Tabelle 10: Für die Amplifizierung und Sequenzierung des *acrR*-Gens verwendete PCR-Primer

Primer	Sequenz Primer	Quelle
acrR_F	5'-TTGTGGGTTTACGGCTTACC-3'	(150)
acrR_R	5'-CCGATGACACCGACAAAAAT-3'	(150)

Das Gen *acrR* codiert für AcrR, dem Regulatorprotein der AcrAB-TolC-Efflux-Pumpe. Das Protein hat eine hemmende Wirkung auf die Transkription der Efflux-Pumpe. Amplifizierung und Sequenzierung des *acrR*-Gens erfolgten, um Aminosäuresubstitutionen, die in den Studienstämmen, aber nicht im Referenzstamm Rd KW20 vorliegen, untersuchen zu können und Insertionen und Deletionen zu detektieren, die zu einem verfrühten Stopp-Codon führen.

2.6 Geographische Analyse

Zur Analyse der geographischen Verteilung Cefotaxim-resistenter *H. influenzae*-Isolate in Deutschland wurde das Programm QGIS (Version 3.10.2) (191) verwendet. Die Software-Erweiterung mmqgis (version 2020.1.16) (192) diente zur Geocodierung der resistenten Stämme anhand der Angaben zum Landkreis, aus welchem diese stammten. Mit den Kartendaten von OpenStreetMap (193) und einer entsprechenden .geojson-Datei (194) wurde eine Deutschlandkarte in die verschiedenen Postleitzahlgebiete unterteilt und die Bevölkerungsdichte in den verschiedenen Regionen anhand der Daten für die Postleitzahlgebiete in Graustufen dargestellt. Somit konnte die Verteilung der Cefotaxim-resistenten Stämme in Relation zur Bevölkerungsdichte in den entsprechenden Regionen dargestellt werden.

2.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten zur Cefotaxim-Resistenz wurde mit SPSS (Version 25) (IMB Corp., Armonk, New York, US) durchgeführt. In diese Analyse wurden alle Cefotaxim-resistenten Stämme eingeschlossen. Außerdem wurde eine vergleichbare Anzahl Cefotaxim-sensibler Stämme gleichen Phänotyps aus demselben Zeitraum (2016-2019) zufällig ausgewählt. Somit ergab sich eine „Fallgruppe“ (Cefotaxim-resistent) und eine „Kontrollgruppe“ (Cefotaxim-sensibel) vergleichbarer *H. influenzae*-Stämme an denen sowohl die Cefotaxim-MHK-Testung mittels Mikrodilution und GAD als auch die Sequenzierung des *ftsI*-Gens durchgeführt wurde, um den folgenden statistischen Fragestellungen nachzugehen.

Zur Untersuchung der Korrelation der beiden Antibiotikaresistenztestungsverfahren BMD und GAD wurde Pearsons Korrelationskoeffizient erhoben. Dieser wurde auch für die Untersuchung, ob das Patientenalter signifikant mit einer erhöhten Cefotaxim-MHK korreliert, berechnet. Die statistische Signifikanz wurde jeweils mittels des Exakten Tests nach Fisher bestimmt, wobei mit $p < 0,05$ ein signifikantes Ergebnis angenommen wurde. Der ϕ -Koeffizient diente der Untersuchung des Zusammenhangs der PBP3-Gruppen beziehungsweise bestimmter einzelner Aminosäuresubstitutionen (L389F, Y557H) und der Cefotaxim-Resistenz (eingeteilt in S (sensibel) und R (resistent)). Außerdem wurde zur Untersuchung desselben Zusammenhangs der η -Koeffizient bestimmt, wobei in diesem Fall die konkret gemessene Cefotaxim-MHK in $\mu\text{g/ml}$ für die Analyse zugrunde gelegt wurde. Auf dieselbe Weise wurde der Zusammenhang zwischen Geschlecht und einer Cefotaxim-Resistenz untersucht, indem auch hier sowohl ϕ als auch η erhoben wurden.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde für die Untersuchungen mit Erhebung des ϕ -Koeffizient der Exakte Test nach Fisher verwendet. Ein signifikantes Ergebnis wurde mit $p < 0,05$ angenommen. Bei der Bestimmung des η -Koeffizienten wurde ein T-Test beziehungsweise eine einseitige Varianzanalyse (ANOVA) zur Bestimmung der statistischen Signifikanz durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Speziesidentifizierung mittels MALDI-TOF-MS-Analyse

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Jahr 2020 im Journal of Clinical Microbiology der American Society for Microbiology (Copyright © 2022 American Society for Microbiology) als Letter to the Editor veröffentlicht (195).

Der Doktorand ist Erstautor der Veröffentlichung.

Strukturelle Ähnlichkeiten zu der Veröffentlichung ergeben sich aufgrund der inhaltsgleichen Ergebnisse.

3.1.1 Stammauswahl und molekulare Typisierung

Alle getesteten Stämme konnten im Vorfeld auf Grundlage des Nachweises von *fucK* und *ompP2* beziehungsweise der Sequenzierung von *ompP6* eindeutig der jeweiligen Spezies zugeordnet werden. Die über diese Methodik durchgeführte Speziesidentifikation diente als Referenzmethode für die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Messungen. Zudem wurden sechs Loci des *H. influenzae*-MLST-Schemas (*adk*, *atpG*, *frdB*, *mdh*, *pgi* und *recA*) von einer Auswahl der *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Stämme, die später durch das VITEK® MS untersucht werden sollten, zur Erstellung eines „Neighbor-joining-net“ sequenziert und konkateniert. Es handelte sich dabei um 112 *H. influenzae*- und 47 *H. haemolyticus*-Stämme inklusive der unten genannten Referenzstämme. Die folgende Visualisierung der erhobenen Daten im „Neighbor-joining-net“ (Abbildung 12) zeigt zwei klar voneinander abgrenzbare Gruppen. Die 112 *H. influenzae*-Stämme inklusive der vier Referenzstämme *H. influenzae* ATCC 49766, NCTC 8143, NCTC 11873 und NCTC 12194 bilden eine Gruppe. Die 47 *H. haemolyticus*-Stämme inklusive der vier Referenzstämme *H. haemolyticus* NCTC 10839, M19345, M19346 und M28486 bilden die andere Gruppe. Der Vergleich der konkatenierten MLST-Sequenzen bestätigte die jeweilige Spezieszugehörigkeit bei allen auf diese Weise typisierten Isolaten. Zudem zeigt das „Neighbor-joining-net“ eine hohe genetische Diversität innerhalb der Stämme beider Spezies.

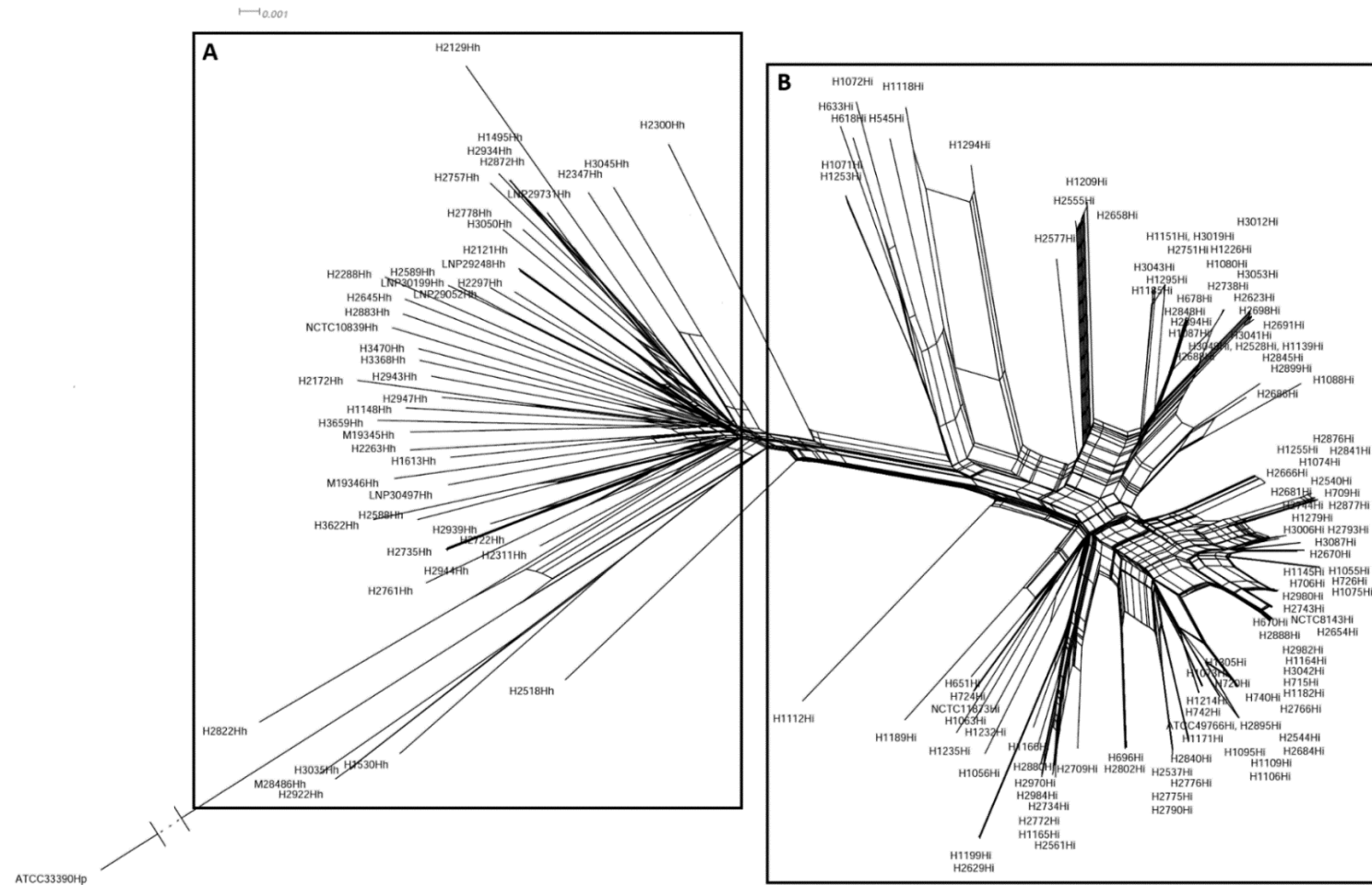


Abbildung 12: „Neighbor-joining-net“ der konkatenierten MLST-Sequenzen der *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Stämme. Die Stammnummern sind mit Hh für *H. haemolyticus*, Hi für *H. influenzae* und Hp für *H. parainfluenzae* markiert. Die Boxen A und B zeigen die Unterteilung in *H. haemolyticus*- (A) und *H. influenzae*-Stämme (B).
 Entspricht Figure 1 aus Nürnberg et al. 2020: Discriminative Potential of the Vitek MS In Vitro Diagnostic Device Regarding *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* (195).
 (Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

3.1.2 MALDI-TOF-MS-Messungen

Die MALDI-TOF-MS-Messungen erfolgten mittels des VITEK® MS MALDI-TOF-MS-Geräts und der zugehörigen Software.

Insgesamt wurden 286 Bakterienstämme, darunter 236 *H. influenzae* und 50 *H. haemolyticus*-Isolate, zur Analyse durch das MALDI-TOF-MS Gerät VITEK® MS für diesen Teil der Arbeit ausgewählt. Die meisten Stämme (n=281) wurden der *H. influenzae*-Stammsammlung des NRZMHi entnommen. Darüber hinaus wurden fünf *H. haemolyticus*-Isolate freundlicherweise durch Muhamed Taha vom französischen Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* des Pasteur Instituts in Paris zur Verfügung gestellt. Alle *H. influenzae*-Isolate wurden aus Blut (206/236) und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF, 30/236) isoliert. Die *H. haemolyticus*-Isolate stammen aus unterschiedlicher klinischer Herkunft. Darunter waren Blut (5/50), Rachenabstriche (23/50), Sputum (11/50), bronchoalveoläre Lavages (7/50), Konjunktivalabstriche (3/50) und Vaginalabstriche (1/50).

Alle 286 vorliegenden Isolate (236 *H. influenzae*- und 50 *H. haemolyticus*-Isolate) wurden auf jeweils zwei Messspots, also in Duplikaten, gemessen. Der Abgleich der gewonnen Massenspektren erfolgte durch die CE-zertifizierte VITEK® MS IVD V3 Datenbank. Von den 286 untersuchten Isolaten zeigten 277 eine „sichere Identifizierung“ und neun Isolate eine „unsichere Identifizierung“ (Tabelle 11).

Hinsichtlich der Konkordanz zur Referenzmethode wurden 236/236 (100 %) der *H. influenzae*-Stämme „sicher“ und auch korrekt als diese Spezies erkannt. Von den 50 *H. haemolyticus*-Isolaten wurden 19/50 (38 %) korrekt erkannt. Bei 22/50 (44 %) *H. haemolyticus*-Isolaten stimmte das VITEK® MS-Ergebnis nicht mit der Referenzmethode überein (Tabelle 11). Es wurden 21/50 (42 %) durch das VITEK® MS als *H. influenzae* und ein Isolat als *H. parainfluenzae* erkannt. Bei 9/50 (18 %) *H. haemolyticus*-Isolaten lag keine eindeutige Identifizierung vor. Eine detaillierte Übersicht aller *H. haemolyticus*-Isolate einschließlich der genauen Konfidenzwerte, die durch das VITEK® MS ausgegeben wurden, findet sich im Anhang in Tabelle 17.

Der Vergleich der MLST-Auswertung und der VITEK® MS-Ergebnisse ergab keine Auffälligkeiten bei den Sequenzen der Stämme, die korrekt, inkorrekt oder nicht eindeutig durch das VITEK® MS erkannt wurden.

Tabelle 11: Zusammenfassung der VITEK® MS-Ergebnisse.
Entspricht Table 2 aus: Nürnberg et al. 2020: Discriminative Potential of the Vitek MS In Vitro Diagnostic Device Regarding *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* (195).
(Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

Spezies (Referenzmethode)	„sichere Identifizierung“	„unsichere Identifizierung“	Übereinstimmung mit der Referenzmethode	Abweichung von der Referenzmethode
<i>H. influenzae</i> (n=236)	236	0	236	0
<i>H. haemolyticus</i> (n=50)	41	9	19	22
Insgesamt (n=286)	277	9	255	22

3.2 Validierung der Bouillon-Mikrodilution

3.2.1 Intraassay-Reproduzierbarkeit

Die Referenzstämme *H. influenzae* ATCC 49766 und *S. pneumoniae* ATCC 49619 wurden bei jeder Testung mitgeführt. Die Ableseergebnisse entsprachen bei diesen Stämmen stets den von EUCAST festgelegten Grenzwerten.

Bei der Überprüfung der MHK-Werte der verwendeten Referenzstämme *H. influenzae* ATCC 49766, *S. pneumoniae* ATCC 49619, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 und *P. aeruginosa* ATCC 28753 (nur Imipenem) für Ampicillin und Imipenem durch Mikrodilutionstests an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen lagen die gemessenen MHK-Werte stets in den von EUCAST festgelegten Grenzwerten (Tabelle 12 und Tabelle 13).

Tabelle 12: Bestimmung der Ampicillin-MHK [$\mu\text{g/ml}$] mit BMD von vier Referenzstämmen an acht verschiedenen Tagen

Stammnummer	EUCAST MHK [$\mu\text{g/ml}$]	1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	5. Tag	6. Tag	7. Tag	8. Tag
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1 (0,5-2)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>E. coli</i> ATCC 25922	4 (2-8)	4	4	4	4	4	4	4	8
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,125 (0,25-0,06)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	0,125 (0,25-0,06)	0,06	0,06	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125

Tabelle 13: Bestimmung der Imipenem-MHK [$\mu\text{g/ml}$] mit BMD von fünf Referenzstämmen an drei verschiedenen Tagen

Stammnummer	EUCAST MIC [$\mu\text{g/ml}$]	1. Tag	2. Tag	3. Tag
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1 (0,5-2)	0,5	0,5	0,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 28753	2 (1-4)	2	2	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,125 (0,06-0,25)	0,125	0,125	0,125
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619	0,06 (0,03-0,125)	0,06	0,06	0,06
<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	0,5 (0,25-1)	0,5	0,5	0,5

Zur weiteren Überprüfung der Intraassay-Reproduzierbarkeit wurden an einer Auswahl von *H. influenzae*-Stämmen aus der NRZMHi Haemophilus-Stammsammlung mehrmalige Messungen mit Imipenem und Cefotaxim durchgeführt. Dazu wurde an drei verschiedenen Tagen die MHK derselben Stämme mittels BMD überprüft. Abweichungen waren selten und die Unterschiede bei den Messungen waren nie größer als eine Verdünnungsstufe (Tabelle 14 und Tabelle 15).

Tabelle 14: Bestimmung der Imipenem-MHK [$\mu\text{g/ml}$] mit BMD von zehn Stämmen des NRZMHi an drei verschiedenen Tagen

Stammnummer	1. Tag	2. Tag	3. Tag
H2540	0,5	0,5	0,5
H2670	2	1	2
H2732	2	4	2
H2876	1	1	1
H2877	0,5	1	1
H2924	1	1	1
H2972	2	2	1
H3032	1	1	0,5
H3043	2	1	1
H3070	0,5	0,5	0,5

Tabelle 15: Bestimmung der Cefotaxim-MHK [$\mu\text{g/ml}$] mit BMD von sieben Stämmen des NRZMHi an drei verschiedenen Tagen

Stammnummer	1. Tag	2. Tag	3. Tag
H1677	2	2	1
H2151	2	2	2
H2570	0,25	0,25	0,25
H2753	0,5	1	1
H2754	0,5	1	0,5
H2894	0,5	1	1
H3664	0,125	0,125	0,125

3.2.2 Interassay-Reproduzierbarkeit

Es wurden die Cefotaxim-MHK-Werte 64 verschiedener *H. influenzae*-Stämme verglichen, die sowohl mit BMD als auch mit GAD ermittelt wurden (Abbildung 13). Es ergab sich eine Korrelation nach Pearson von 0,94, was einer sehr starken Korrelation entspricht. Mit $p < 0,001$ ist das Ergebnis hochsignifikant.

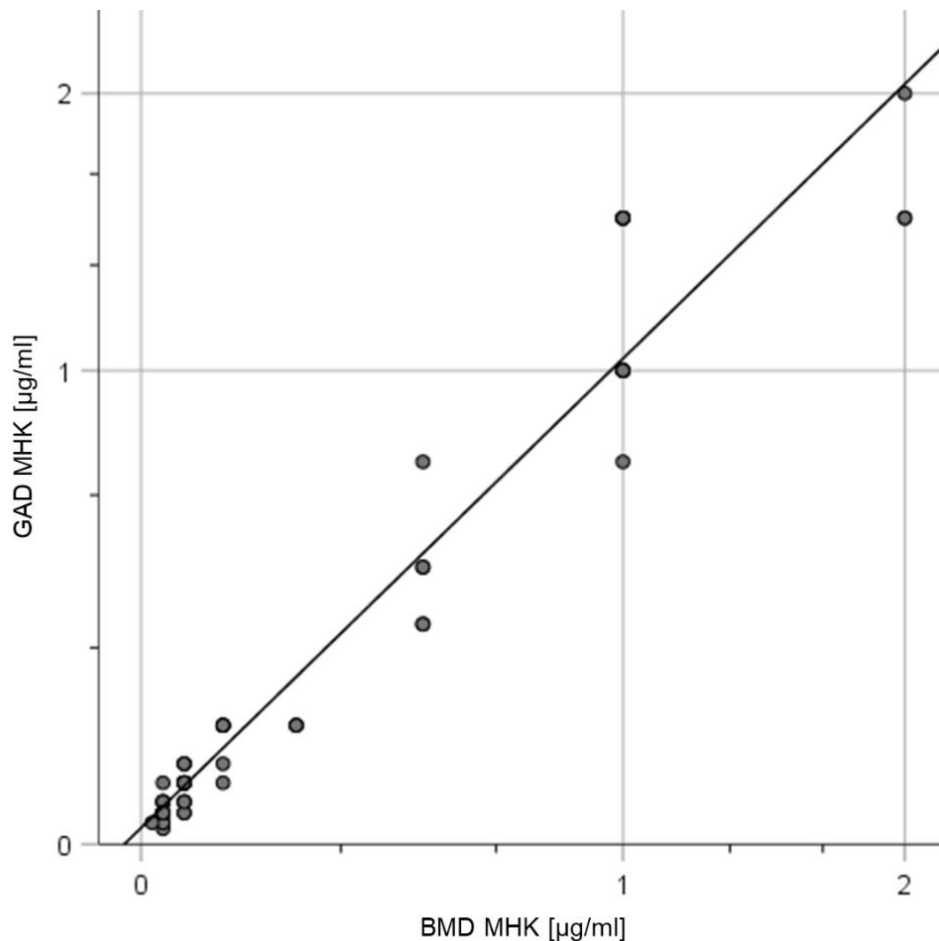


Abbildung 13: Bestimmung der Cefotaxim-MHK 64 verschiedener *H. influenzae*-Stämme mit BMD und GAD.
Entspricht Figure 2 aus Nürnberg et al. 2021: Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions (149).
(Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

Zudem wurden die Imipenem-MHK-Werte von 72 verschiedenen *H. influenzae*-Stämmen mittels BMD und GAD ermittelt und verglichen (Abbildung 14). Pearsons Korrelationskoeffizient lag bei dieser Untersuchung bei 0,453 mit $p < 0.001$.

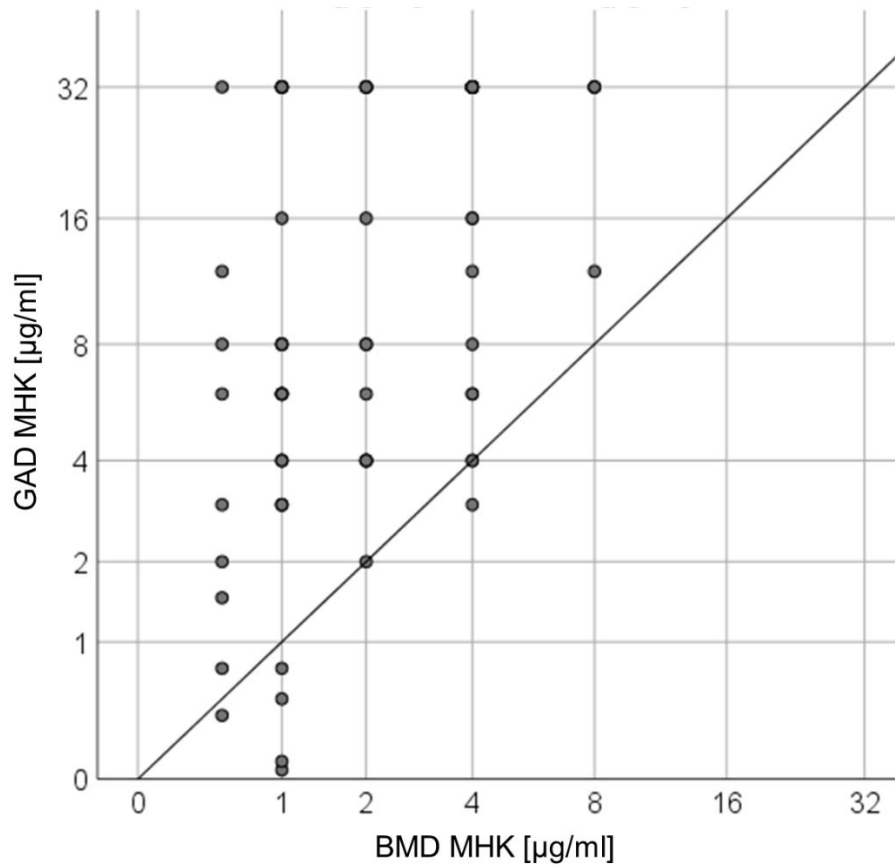


Abbildung 14: Bestimmung der Imipenem-MHK 72 verschiedener *H. influenzae*-Stämme mit BMD und GAD. (Eigene Abbildung)

3.2.3 Interrater-Reliabilität

Die Ableseergebnisse von 110 *H. influenzae*-Stämmen unter Verwendung von Cefotaxim wurden von Dr. med. Thiên-Trí Lâm (Facharzt) und Sebastian Nürnberg (Doktorand) beurteilt. Beim Vergleich der abgelesenen Werte ergab sich $\kappa=0,84$.

3.3 Imipenem-Resistenz

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Jahr 2020 im Journal of Antimicrobial Chemotherapy der British Society for Antimicrobial Chemotherapy und Oxford Academics als original article veröffentlicht (196).

Der Doktorand ist Zweitautor der Veröffentlichung.

Strukturelle Ähnlichkeiten zu der Veröffentlichung ergeben sich aufgrund der inhaltsgleichen Ergebnisse.

3.3.1 Epidemiologie der untersuchten Isolate

Im Jahr 2016 wurden 474 invasive *H. influenzae*-Isolate im Rahmen der Referenzdiagnostik des NRZMHi untersucht. Die folgende Auswertung stützt sich auf diese Daten. Von den untersuchten Isolaten stammten 440 aus Blutproben und 30 aus Liquor cerebrospinalis (Cerebrospinalflüssigkeit, CSF). Drei Isolate stammten sowohl aus Blut als auch aus CSF. Darüber hinaus wurde ein Stamm aus einem Gehirnabszess isoliert und daher mit in die Untersuchung aufgenommen. Das durchschnittliche Patientenalter betrug 74 Jahre. Das Geschlechterverhältnis männlich zu weiblich betrug genau 1,0.

Der Großteil der untersuchten Stämme, 385/474 (81,2 %), waren NTHi. Von den bekapselten Stämmen waren 66/474 (13,9 %) Hif, 11/474 (2,3 %) Hib, 9/474 (1,9 %) Hie und 3/474 (0,6 %) Hia. Die Serotypen c und d konnten nicht nachgewiesen werden.

3.3.2 Bestimmung der Antibiotikaresistenz

Im Zuge der Referenzdiagnostik wurden alle Isolate auf das Vorhandensein von β -Lactamasen, die Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin und Imipenem sowie beim Vorhandensein einer β -Lactamase auf die Empfindlichkeit gegenüber Amoxicillin-Clavulansäure untersucht. Die Phänotypverteilung stellte sich wie folgt dar: Von den 474 untersuchten Isolaten waren 383 (80,8 %) Ampicillin-sensibel ohne β -Lactamase-Produktion. Sie waren also vom Phänotyp BLNAS. 60 (12,7 %) Isolate waren vom Phänotyp BLPAR, acht (1,7 %) vom Phänotyp BLPACR und 31 (6,5 %) konnten dem Phänotyp BLNAR zugeordnet werden (Abbildung 15).

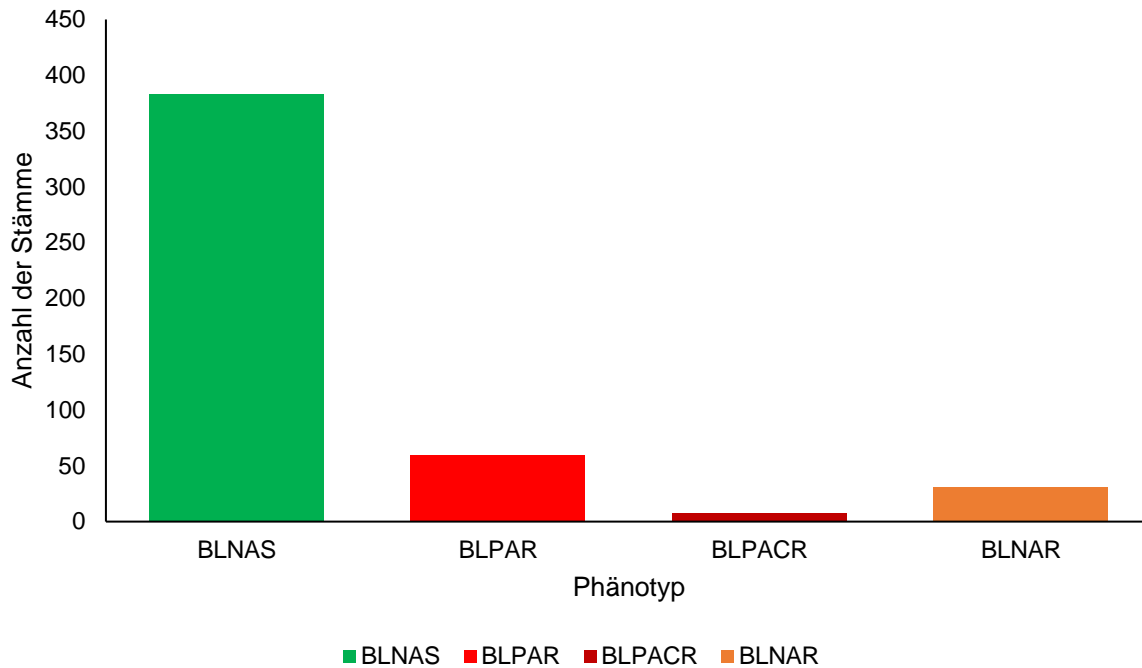


Abbildung 15: Phänotyp invasiver *H. influenzae*-Isolate des Jahres 2016 hinsichtlich Ampicillin-Resistenz und β -Lactamase-Produktion. (Eigene Abbildung)

Bei der routinemäßig durchgeführten Imipenem-MHK-Testung des NRZMHi mittels GAD zeigten 64 Isolate eine Resistenz gegen diese Substanz. An 63 dieser 64 Stämme wurde die MHK-Testung mittels BMD wiederholt, da diese Methode laut EUCAST den Goldstandard der Antibiotikaresistenztestung darstellt. Bei 26 der 63 Isolate konnte eine Imipenem-Resistenz bestätigt werden. Zudem lag die gemessene MHK bei 12 Isolaten auf dem Resistenzgrenzwert von 2 $\mu\text{g/ml}$ und für 20 Isolate konnte eine erhöhte Imipenem-MHK von 1 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Entsprechend der BMD-Ergebnisse ergibt sich eine 5,5 %ige Prävalenz einer Imipenem-Resistenz bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten in Deutschland im Jahr 2016.

Molekulargenetische Untersuchungen wurden an den 64 Stämmen durchgeführt, bei denen sich eine Imipenem-Resistenz mittels GAD nachweisen ließ. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da sich bei den meisten dieser Isolate beim Ablesen der Ergebnisse eindeutige Doppelhemmhöfe zeigten oder einzelne Kolonien innerhalb der Hemmhofellipse wuchsen (Abbildung 16). Dies war ein Hinweis auf das Vorliegen

einer Heteroresistenz. Da bereits in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, dass die GAD die sensitivere Methode für das Detektieren heteroresistenter *H. influenzae*-Isolate ist (188), richtete sich die Auswahl der Stämme für diesen Teil der Arbeit nach den durch GAD bestimmten MHK-Ergebnissen.

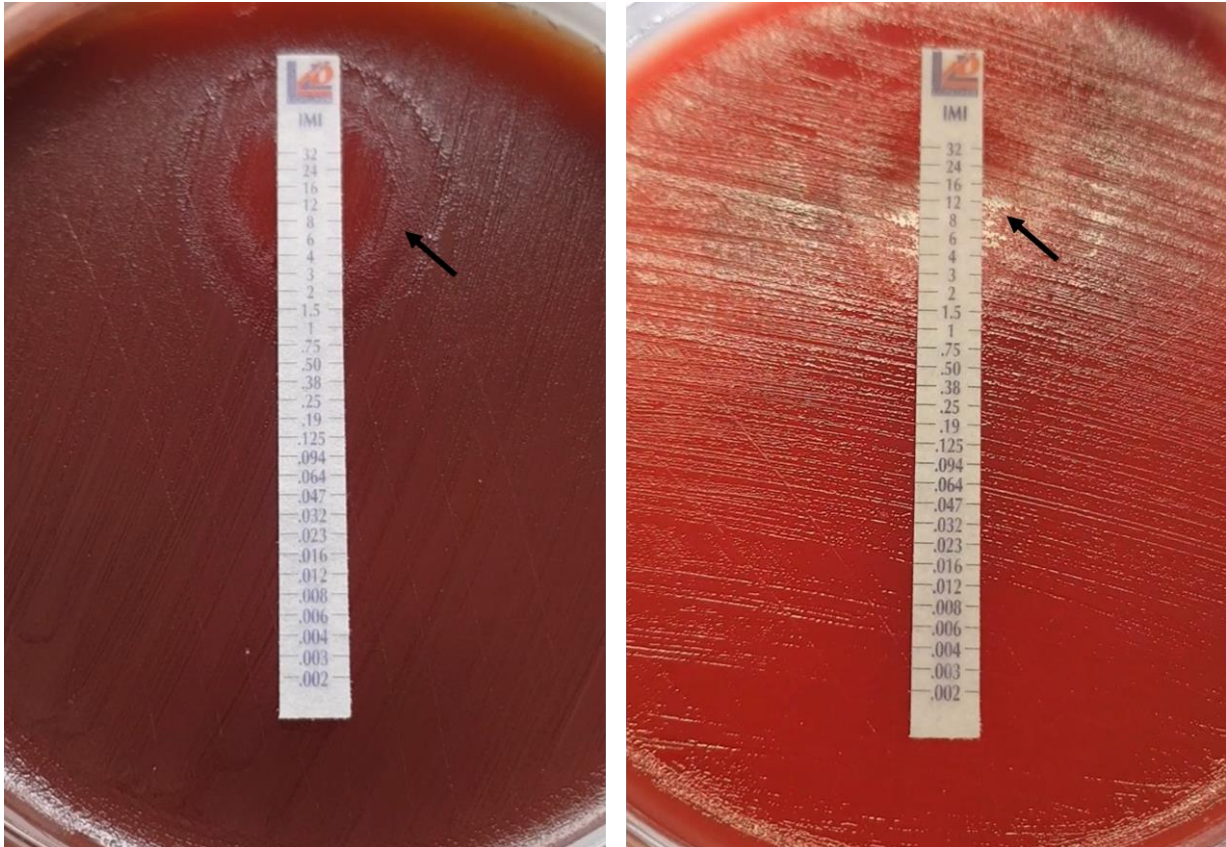


Abbildung 16: Exemplarische Darstellung eines Doppelhemmhofs (links) und von Einzelkolonien, die innerhalb der Hemmhofellipse wachsen (rechts), als Zeichen einer Heteroresistenz. (Eigene Abbildung)

3.3.3 Multilocus-Sequenztypisierung

Die MLST der Imipenem-resistenten Stämme war zu einem dieser Arbeit vorausgehenden Zeitpunkt im NRZMHi durchgeführt worden. Da die nachfolgenden Ergebnisse einschließlich der Abbildung 17 für die Diskussion der Ergebnisse essenziell sind und Teil der Veröffentlichung im Journal of Antimicrobial Chemotherapy zur Epidemiologie von Imipenem-resistenten *H. influenzae* sind (196), werden sie hier aus Gründen der Vollständigkeit aufgeführt.

Die Loci des *H. influenzae*-MLST-Schemas wurden an allen 64 laut GAD Imipenem-resistenten Stämmen amplifiziert und sequenziert. Nach Analyse der Sequenzen ließen sich die 64 Stämme in 29 verschiedene Sequenztypen (ST) einteilen. Die einzelnen Sequenztypen und die Häufigkeit, mit der sie bei den 64 Stämmen auftraten, ist in Tabelle 16 dargestellt. Sequenztyp 107 (n=9) war am häufigsten zu finden. Außerdem wurden Stämme, bei denen sechs von sieben Sequenzen der einzelnen Loci identisch waren, in Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 (n=11) und Gruppe 5 (n=7) traten gehäuft auf. Neun Sequenztypen, die sich zu keiner der Gruppen zuordnen ließen, konnten nur ein einziges Mal nachgewiesen werden. Sieben der aufgeführten Sequenztypen konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben werden. Bei einem Stamm (ST1892) konnte das *fucK*-Gen nicht nachgewiesen werden. Die geographische Herkunft aller Stämme mit dem jeweiligen Sequenztyp als Bezeichnung ist in Abbildung 17 dargestellt. Eine lokale Häufung zeigte sich ausschließlich bei ST1461. Nach Rücksprache mit den zuständigen Gesundheitsämtern zeigte sich, dass es sich bei den entsprechenden Erkrankten um Bewohnerinnen desselben Pflegeheims handelte. Daher ist hierbei von einer direkten Übertragung des Bakterienstamms auszugehen.

Tabelle 16: Sequenztypen und Allelnummern der Imipenem-resistenten *H. influenzae*-Isolate aus dem Jahr 2016, erhoben über die MLST. Stämme, die sich nur in einem Allel unterschieden, wurden in die Gruppen 1-6 eingeteilt. Sequenztypen, die in dieser Arbeit zum ersten Mal beschrieben wurden, sind mit einem * markiert. Verändert nach Table 2 aus Lâm et al. 2020: Molecular epidemiology of imipenem resistance in invasive *H. influenzae* in Germany in 2016 (196). (Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

ST	<i>adk</i>	<i>atpG</i>	<i>frdB</i>	<i>fucK</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>recA</i>	Gruppe	Anzahl
14	5	1	1	1	1	2	5	1	5
1034	125	1	1	1	1	2	5	1	5
1885*	125	1	1	137	1	2	5	1	1
1202	131	2	15	8	141	61	3	2	3
1890*	131	2	15	8	141	1	3	2	1
834	55	11	16	14	89	113	3	3	1
1881*	55	11	16	14	65	113	3	3	1
136	1	1	1	1	67	42	5	4	2
1882*	1	1	1	1	67	61	5	4	1
165	44	2	16	37	17	2	3	5	6
1891*	44	11	16	37	17	2	3	5	1
396	10	2	15	8	26	61	3	6	1
1461	42	2	15	8	26	61	3	6	2
12	1	1	1	13	13	25	16	-	3
34	11	2	15	8	28	26	3	-	1
85	30	2	15	7	22	38	3	-	1
107	33	8	16	16	49	2	3	-	9
142	1	1	1	35	15	53	38	-	2
145	1	8	1	14	22	14	13	-	1
159	33	8	16	16	17	2	29	-	1
183	14	44	1	1	22	1	5	-	2
196	14	8	18	11	17	2	3	-	1
203	52	1	1	14	89	62	37	-	3
388	60	51	16	48	15	1	31	-	1
422	14	7	1	30	1	21	1	-	1
836	1	11	18	18	62	1	5	-	3
925	37	35	57	8	7	183	13	-	1
1889*	33	8	8	135	1	2	3	-	3
1892*	132	1	38	0	60	44	5	-	1

3.3.4 PBP3-Mutationen

Die von den *ftsI*-Sequenzen der Imipenem-resistenten Isolate abgeleitete PBP3-Aminosäure-Sequenz wurde mit der des Referenzstamms *H. influenzae* Rd KW20 verglichen. Bei 61 der 64 Stämme wurden Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen, die an der Entwicklung von Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika beteiligt sind. Bezogen auf die PBP3-Mutationsgruppen ergab sich folgende Verteilung: 1 I, 16 IIa, 32 IIb, 4 IIc, 7 IId, 1 III+. Bei zwei Stämmen konnten zwar Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen werden, diese waren jedoch nicht bestimmend für eine PBP3-Mutationsgruppe. Bei einem Stamm konnten keine Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen werden, es war also ein Wildtyp (WT)-Stamm (Tabelle 18 im Anhang).

3.3.5 AcrR-Mutationen

Das *acrR*-Gen codiert für AcrR, welches als Regulatorprotein der AcrAB-TolC Effluxpumpe in Funktion tritt. Alle Stämme zeigten Mutationen in diesem Gen beziehungsweise Protein. Bei den meisten Stämmen lag eine Kombination der Substitutionen L31H und I121V oder S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D und Q134K vor. Vorzeitige Stopp-Codons konnten bei vier Stämmen nachgewiesen werden. Außerdem wurde bei zwei Stämmen eine Aminosäureinsertion und bei einem Stamm eine Aminosäuredeletion nachgewiesen (Tabelle 18 im Anhang).

3.4 Cefotaxim-Resistenz

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Jahr 2021 im Journal of Antimicrobial Chemotherapy der British Society for Antimicrobial Chemotherapy und Oxford Academics als original article veröffentlicht (149).

Der Doktorand ist Erstautor der Veröffentlichung.

Strukturelle Ähnlichkeiten zu der Veröffentlichung ergeben sich aufgrund der inhaltsgleichen Ergebnisse.

3.4.1 Epidemiologie aller untersuchten Isolate

Im Zeitraum 2016-2019 wurden 2432 invasive *H. influenzae*-Isolate von 2427 verschiedenen Patientinnen und Patienten durch das NRZMHi analysiert und diese Daten werden im Folgenden ausgewertet. Doppelseinsendungen einer Patientin oder eines Patienten wurden nur in die Datenerhebung mit aufgenommen, wenn die Einsendeadaten mehr als sechs Monate auseinander lagen. In diesen Fällen kann man von einer erneuten Infektion ausgehen, die durch einen anderen *H. influenzae*-Stamm verursacht wurde.

Hinsichtlich klinischer Herkunft stammten die meisten Isolate aus Blutproben (n=2311). Weitere 112 Isolate stammten von Proben aus CSF und 9 sowohl aus Blut als auch aus CSF.

Der Altersmedian der entsprechenden Patientinnen und Patienten lag bei 74 Jahren, wobei die Patientinnen und Patienten zwischen 0 und 101 Jahre alt waren. Von den 2432 untersuchten Isolaten stammten 75/2432 (3,1 %) von Patientinnen und Patienten unter einem Jahr, 137/2432 (5,6 %) stammten von Patientinnen und Patienten zwischen 1-18 Jahren. Der überwiegende Teil der Isolate (1644/2432, 67,6 %) stammte jedoch von Patientinnen und Patienten die älter als 65 Jahre waren. Das Geschlechterverhältnis von Patienten zu Patientinnen lag bei 1,02.

Im genannten Zeitraum hat das NRZMHi Isolate aus allen 16 Bundesländern erhalten. Die meisten Isolate stammten hierbei aus Nordrhein-Westfalen, bei welchem es sich um das bevölkerungsreichste Bundesland handelt.

Klinische Daten, Informationen zum Impfstatus der Patientinnen und Patienten, zur zugrundeliegenden Erkrankung oder zum Krankheitsverlauf standen dem NRZMHi nicht zur Verfügung.

Die Kapselserotypverteilung der untersuchten Isolate stellte sich wie folgt dar: 2007/2432 nicht-typisierbar (NTHi, 82,5 %), 278/2432 Hif (11,4 %), 57/2432 Hib (2,3 %), 25/2432 Hia (1,0 %), 63/2432 Hie (2,6 %), 1/2432 Hic und 1/2432 Hid.

3.4.2 Bestimmung der Antibiotikaresistenz

Alle eingesendeten Isolate wurden im Rahmen der Referenzdiagnostik hinsichtlich der Produktion einer β -Lactamase untersucht. Es wurde für jeden Stamm die Ampicillin-MHK mittels GAD bestimmt. Bei Stämmen mit nachgewiesener β -Lactamase-Produktion wurde zudem die Empfindlichkeit auf Amoxicillin in Kombination mit Clavulansäure ermittelt. Gemäß diesen beiden Tests konnten die Stämme in die in Abschnitt 1.7 dargestellten Phänotypen eingeteilt werden. Es ergaben sich folgende Daten: 1899/2432 (78,1 %) BLNAS, 286/2432 (11,8 %) BLPAR, 41/2432 (1,7 %) BLPACR, 206/2432 (8,5 %) BLNAR (Abbildung 18).

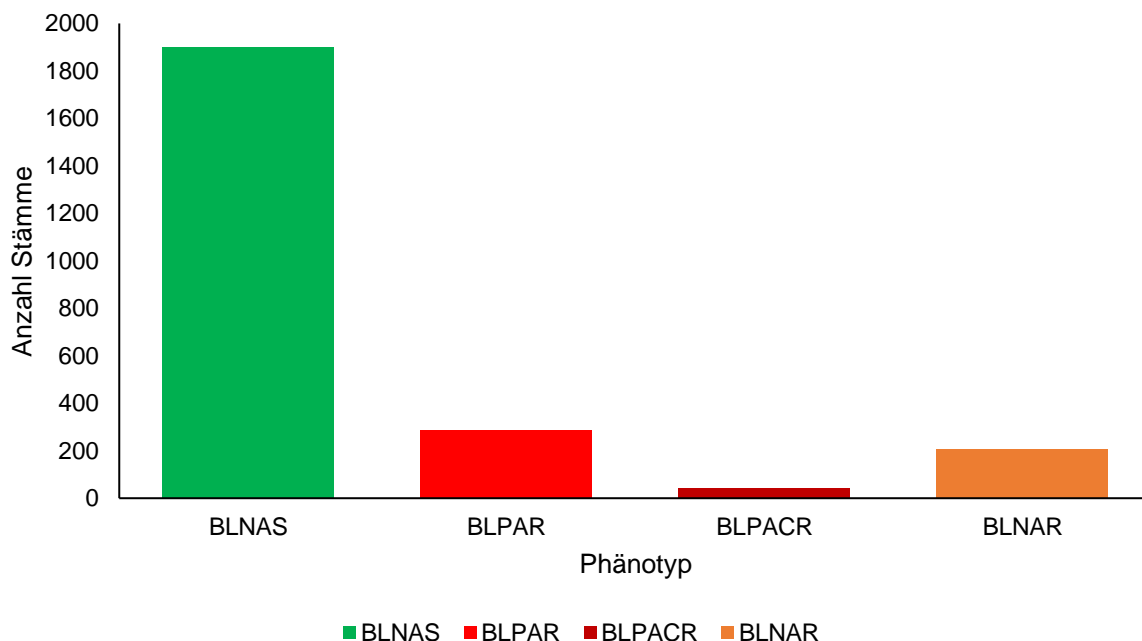


Abbildung 18: Phänotyp invasiver *H. influenzae*-Isolate hinsichtlich Ampicillin-Resistenz und β -Lactamase-Produktion im Zeitraum 2016–2019. (Eigene Abbildung)

Seit 2016 wird die Cefotaxim-MHK-Bestimmung mittels GAD an allen invasiven *H. influenzae* als Teil der Routineuntersuchungen des NRZMHi durchgeführt. Abbildung 19 zeigt die Häufigkeitsverteilung der gemessenen MHK-Werte. Im Zeitraum 2016-2019 zeigten 27/2432 (1,1 %) Stämme eine MHK die über dem Resistenzgrenzwert liegt. Die Cefotaxim-MHK von 26 dieser 27 Stämme wurde zusätzlich mit der BMD bestimmt. Dabei konnte eine Cefotaxim-Resistenz für 22 Isolate bestätigt werden. Die Cefotaxim-MHK bei den übrigen vier Stämmen lag genau beim Grenzwert von 0,125 µg/ml. Gemessen an den MHK-Werten, die über den Goldstandard Mikrodilution erhoben wurden, liegt eine Cefotaxim-Resistenz invasiver *H. influenzae* in Deutschland mit einer Prävalenz von 0,90 % vor. Von den mittels GAD als resistent getesteten Stämmen waren 24/27 (88,9 %) NTHi und 3/27 (11,1 %) vom Serotyp f. Somit stimmt die Serotypverteilung der resistenten Stämme mit der aller Stämme aus diesem Zeitraum weitestgehend überein.

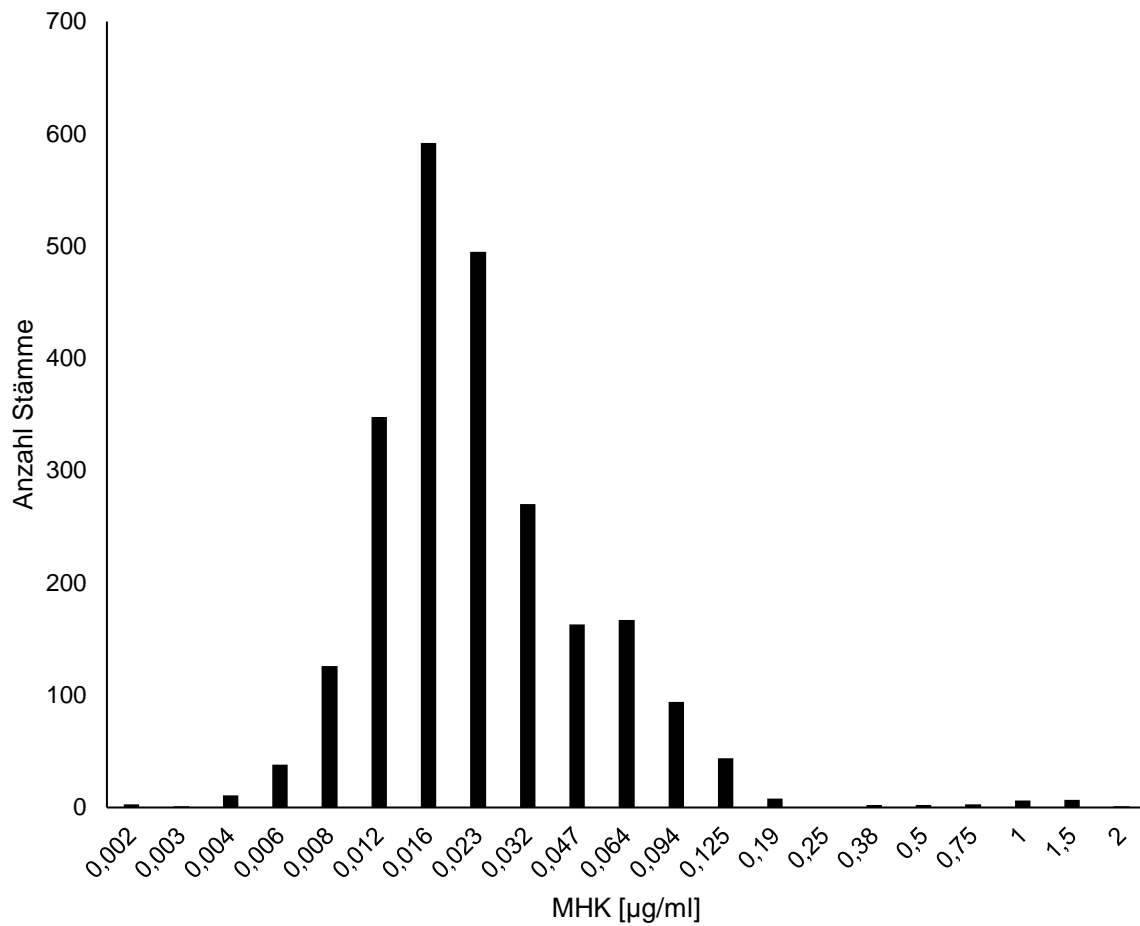


Abbildung 19: Häufigkeit gemessener Cefotaxim-MHK-Werte invasiver *H. influenzae*-Stämme aus dem Zeitraum 2016-2019. (Eigene Abbildung)

3.4.3 Genomsequenzierung

Zur Ermittlung, ob die Cefotaxim-resistenten Isolate einen gemeinsamen genetischen Hintergrund aufwiesen, wurden 25 der 27 Stämme genomsequenziert und auf der Basis einer cgMLST analysiert. Dabei wurden 918 verschiedene Loci analysiert, welche bei allen 25 Stämmen nachgewiesen wurden. Es zeigten sich drei Cluster mit ähnlichen Allelprofilen, das heißt, dass in weniger als sechs Allelen Unterschiede nachweisbar waren (Abbildung 20). Bei zwei Stämmen (H4494 & H4503; ST142) waren die Profile sogar vollkommen identisch. Die Probenentnahme dieser beiden Stämme erfolgte innerhalb einer Woche. Da die entsprechenden Erkrankten jedoch über 200 km voneinander entfernt wohnten und sich auch nach Rücksprache mit den zuständigen Gesundheitsämtern kein weiterer Zusammenhang zwischen den beiden Personen feststellen ließ, ist eine Übertragung zwar wahrscheinlich, konnte aber nicht mit Sicherheit bestätigt werden.

Insgesamt wurden 13 verschiedene Sequenztypen nachgewiesen: am häufigsten waren ST103 (n=4), ST107 (n=3), ST142 (n=3) und ST2031 (n=3). Die drei Hif-Isolate konnten alle dem Sequenztyp ST598 zugeordnet werden (Abbildung 20, Tabelle 19 im Anhang).

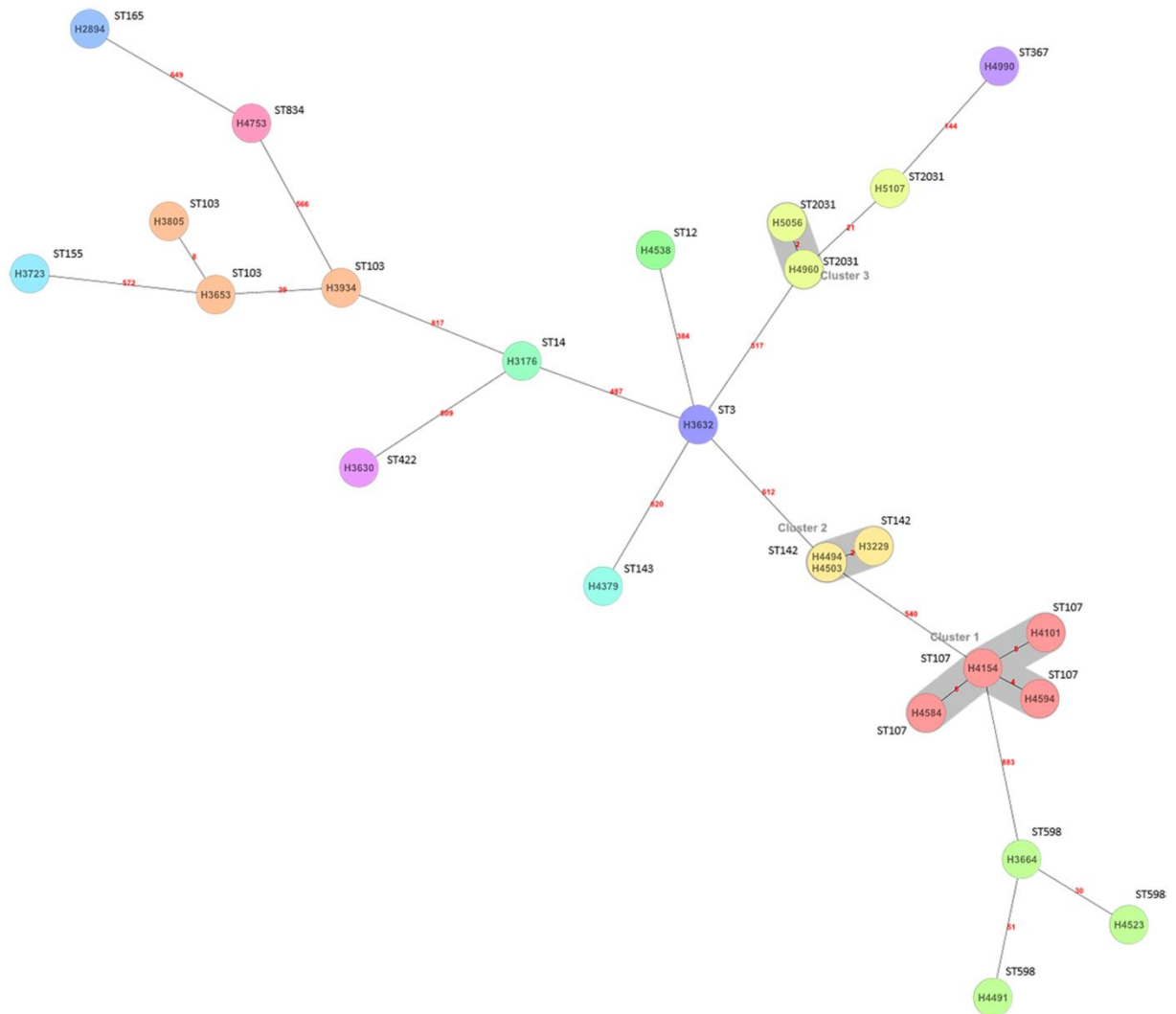


Abbildung 20: Darstellung eines Minimum-spanning-tree basierend auf den cgMLST-Daten von 25 Cefotaxim-resistenten *H. influenzae*-Isolaten. Es ist jeweils die Stammbezeichnung und der Sequenztyp angegeben. Ein Cluster liegt vor, wenn Unterschiede (rote Zahlen) in weniger als sechs Allelen vorliegen. Die resultierenden Cluster sind grau markiert. Entspricht Figure 3 aus Nürnberg et al. 2021: Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions (149). (Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

3.4.4 PBP3-Mutationen

Durch die Sequenzierung des *ftsI*-Gens aller Cefotaxim-resistenten Isolate konnten nach Abgleich mit der *ftsI*-Sequenz des Referenzstamms *H. influenzae* Rd KW20 Aminosäuresubstitutionen im PBP3 nachgewiesen werden. Anschließend wurden alle Stämme je nach vorhandenen Substitutionen in die zuvor dargestellten PBP3-Gruppen (Tabelle 2) eingeteilt. Die meisten Cefotaxim-resistenten Stämme ließen sich Gruppe III+ (n=8) und III-like+ (n=10) zuordnen. Zwei Isolate zeigten sich zu Gruppe IIa, eines zu III-like und ein weiteres zu Gruppe IIb zugehörig. Alle mehrfach vorkommenden Aminosäuresubstitutionen sind in Tabelle 19 (im Anhang) mit einem Einbuchstaben-Code dargestellt.

Für die Untersuchung, ob bestimmte PBP3-Mutationen in Zusammenhang mit einer Cefotaxim-Resistenz stehen, wurden die PBP-Gruppen der Cefotaxim-resistenten Stämme (n=22) mit denen einer Cefotaxim-sensiblen Kontrollgruppe (n=36) verglichen. Zusätzlich wurden die 4 Stämme in die Analyse aufgenommen, bei denen der MHK-Wert genau bei 0,125 µg/ml lag, die aber mittels GAD als Cefotaxim-resistent getestet wurden. Es wurde zum einen der ϕ -Koeffizient für die Einteilung S, R und zum anderen der η -Koeffizient für die konkreten MHK-Werte erhoben. Es ergab sich $\phi=0,87$ und $\eta=0,88$. Sowohl der exakte Test nach Fisher als auch die durchgeführte ANOVA zeigten eine hohe Signifikanz mit $p < 0,001$. Der Zusammenhang von PBP3-Gruppe und Cefotaxim-MHK ist in Abbildung 21 graphisch dargestellt.

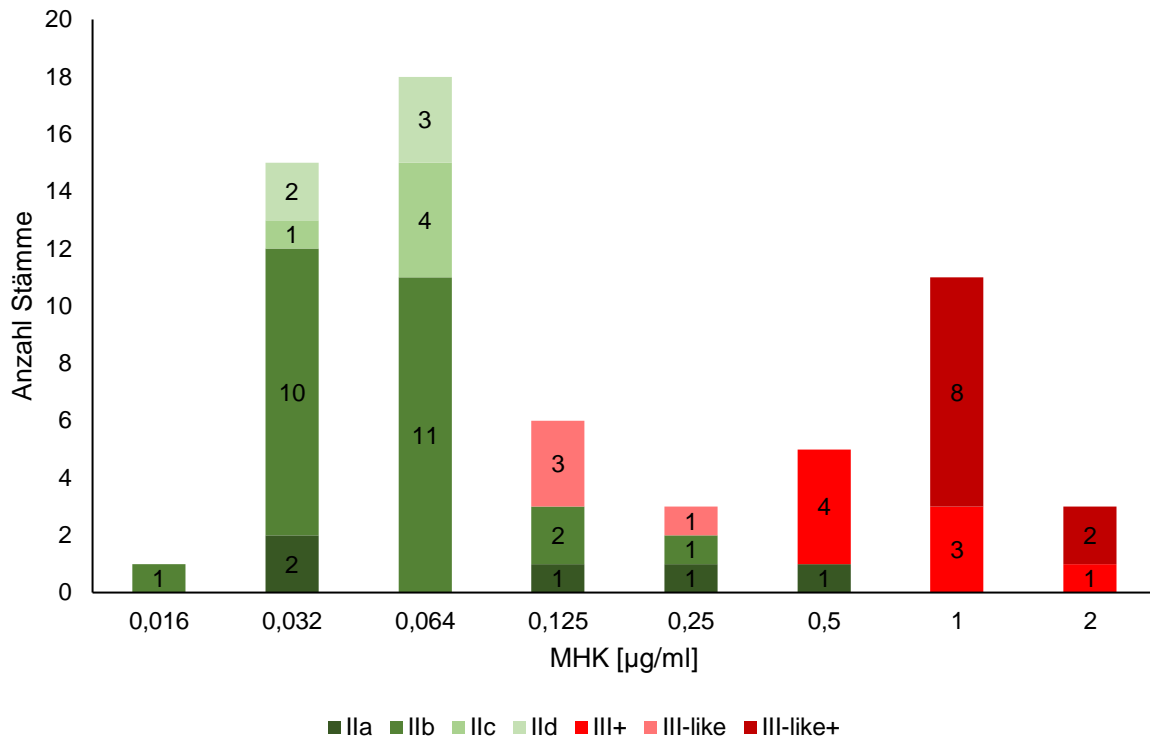


Abbildung 21: PBP3-Gruppen der untersuchten Cefotaxim-resistenten (>0,125 µg/ml) und Cefotaxim-sensiblen (≤0,125 µg/ml) Stämme.
 Entspricht Figure 4 aus Nürnberg et al. 2021: Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions (149).
 (Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

Zur Analyse des Zusammenhangs der verschiedenen PBP3-Gruppen und einer Cefotaxim-Resistenz wurde bei der Untersuchung der einzelnen Aminosäuresubstitutionen L389F und Y557H analog vorgegangen. Hierbei ergab sich für L389F $\phi=0,86$ und $\eta=0,86$ und für Y557H $\phi=0,56$ und $\eta=0,53$. Sowohl der exakte Test nach Fisher als auch der T-Test zeigten hochsignifikante Ergebnisse mit $p < 0,001$.

3.4.5 Epidemiologie der Cefotaxim-resistenten Isolate

Über die Jahre 2016-2019 bewegte sich die Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz, ermittelt über die Ergebnisse der BMD, durchweg auf einem niedrigen Niveau (2016, $n=2/474$, 0,42 %; 2017, $n=6/594$, 1,01 %; 2018, $n=8/636$, 1,26 %; 2019, $n=6/728$, 0,82 %).

Der Altersmedian der Patientinnen und Patienten mit Cefotaxim-resistenten Stämmen lag bei 76 Jahren. Das Verhältnis von Patienten zu Patientinnen lag bei 0,69. Beim Vergleich der Patientinnen und Patienten mit Cefotaxim-resistenten Stämmen ($n=26$) mit denen der Kontrollgruppe mit Cefotaxim-sensiblen Stämmen ($n=36$) ergab sich weder ein signifikanter Zusammenhang von Alter ($r=0,05$, $p=0,68$) noch von Geschlecht ($\varphi=0,09$, $p=0,6$; $\eta=0,13$, $p=0,31$) mit einer Cefotaxim-Resistenz.

Von denen als Cefotaxim-resistent getesteten Isolaten stammten 26/27 (96,3 %) aus Blutproben und 1/27 (3,7 %) aus einer Liquorprobe.

3.4.6 Geographische Analyse

Die Darstellung aller Cefotaxim-resistenten Stämme im Vergleich zur Bevölkerungsdichte erfolgte unter Verwendung des Programms QGIS mit dem Plugin mmqgis und der Kartendaten von OpenStreetMap.

Die geographische Analyse zeigt, dass die Cefotaxim-resistenten Stämme vor allem aus bevölkerungsreichen Regionen stammten und dass die Häufigkeit, mit der die Stämme auftauchen, mit der Bevölkerungsdichte in diesen Gebieten korreliert. Spatio-temporale Cluster konnten nicht nachgewiesen werden (Abbildung 22).

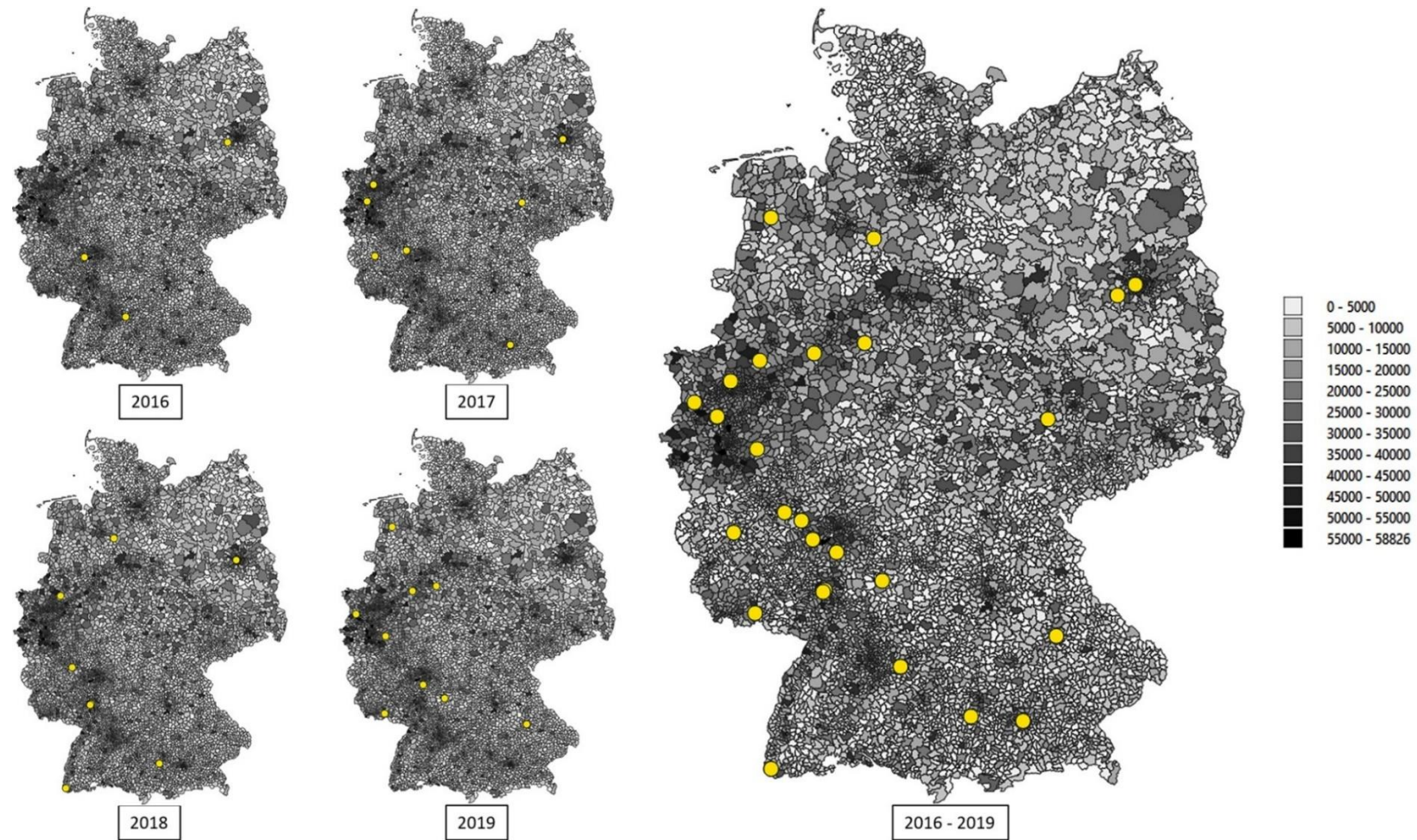


Abbildung 22: Geografische Verteilung der Cefotaxim-resistenten *H. influenzae*-Isolate in Deutschland (2016-2019) im Vergleich zur Bevölkerungsdichte.
 Die Bevölkerungszahlen in den jeweiligen Postleitzahlgebieten sind in der Legende auf der rechten Seite angegeben.
 Verändert nach Figure 5 aus Nürnberg et al. 2021: Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions (149).
 (Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

4 Diskussion

Diese Promotionsarbeit umfasst drei verschiedene ineinandergreifende Studien zur Epidemiologie des Bakteriums *Haemophilus influenzae* und bietet damit eine umfangreiche Arbeit zur Diagnostik, Antibiotikaresistenztestung und Epidemiologie relevanter Antibiotikaresistenzen dieses Bakteriums.

Technische Validierungen des diagnostischen Potentials der MALDI-TOF-MS-Technik wurden zwar bereits früher durchgeführt (197-199). Es ist jedoch die erste Studie, die eine so große und molekularbiologisch charakterisierte Sammlung an Stämmen der Gattung *Haemophilus* zur Validierung eingesetzt hat.

Die Epidemiologie der Imipenem-Resistenz wurde noch nie so umfassend bei *H. influenzae* untersucht. Auch zur Cefotaxim-Resistenz existierten bislang keine vergleichbaren Daten einer gut definierten Studienpopulation.

H. influenzae kann schwere invasive Infektionen wie eine Sepsis oder Meningitis verursachen. Die Fallzahlen invasiver *H. influenzae*-Infektionen steigt seit Jahren deutlich an (91). Seit Beginn der Meldepflicht sind zwar impfpräventable Hib-Infektionen zurückgegangen (96-101), Erkrankungen, die die unbekapselten NTHi als Ursache haben, steigen jedoch drastisch (91). Gegen NTHi gibt es bis heute noch keinen Impfstoff, weswegen die Erforschung von Diagnostik und Therapie der durch dieses Bakterium verursachten Infektionen von großer Bedeutung ist.

Für die Behandlung einer *H. influenzae*-Infektion ist eine schnelle und präzise Diagnostik unverzichtbar. Wie bereits in den einleitenden Kapiteln dargestellt, wird die Unterscheidung von *H. influenzae* von seinen nahen Verwandten durch eine starke Ähnlichkeit erschwert. Vor allem die Unterscheidung von *H. haemolyticus* und *H. influenzae* stellt hierbei eine besondere Herausforderung dar (200-202).

Die MALDI-TOF-MS ist eines der fortschrittlichsten Diagnostikverfahren der heutigen Zeit. Sie ermöglicht einen sicheren Erregernachweis in kürzester Zeit und hat sich daher in der Routinediagnostik verschiedener Bakterienarten etabliert (125-127). Für den Nachweis von *H. influenzae* durch das untersuchte MALDI-TOF-MS-System wurden exzellente Ergebnisse erzielt, da alle durch das VITEK® MS System

getesteten Erreger dieser Spezies korrekt und eindeutig erkannt wurden. Dennoch wurden auch Einschränkungen festgestellt, da 42 % der untersuchten *H. haemolyticus*-Stämme vom System fälschlicherweise als *H. influenzae* erkannt wurden.

Die Brücke zwischen Diagnostik und Therapie stellen die Antibiotikaresistenztestungsverfahren dar. Daher wurde in dieser Arbeit im Zuge der Resistenztestung der antibiotischen Substanzen Imipenem und Cefotaxim eine Methodvalidierung der beiden gängigsten Testungsverfahren BMD und GAD durchgeführt. Die BMD stellt den von EUCAST vorgegebenen Goldstandard zur Resistenztestung dar und die GAD wird in der Routinediagnostik aufgrund schneller und einfacher Durchführung bevorzugt. Die Untersuchungen konnten zeigen, dass bei der Testung von Cefotaxim die beiden Verfahren nahezu ebenbürtig sind und die gemessenen Werte eine sehr starke und hochsignifikante Korrelation ($r=0,94$, $p < 0,001$) aufwiesen. Für die Substanz Imipenem zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede beim Vergleich der beiden Verfahren. So waren die durch die GAD ermittelten Werte für die minimale Hemmkonzentration deutlich höher und mehr Stämme wurden als Imipenem-resistent eingestuft. Diese höheren Werte ließen sich durch typisches Wachstum auf den Agarplatten mit Doppelhemmhöfen oder einzelnen Kolonien innerhalb der Hemmhofellipse eindeutig mit dem Phänomen der Heteroresistenzen in Zusammenhang bringen (157). Welches der jeweiligen *in vitro* Ergebnisse den *in vivo* Bedingungen am ehesten entspricht und welche Werte einer Therapieempfehlung zugrunde gelegt werden sollten, konnte noch nicht geklärt werden. Diese Fragestellung bildet die Grundlage für weiterführende prospektive klinische Studien.

Des Weiteren wurde die Epidemiologie von Resistenzen gegen die beiden genannten antibiotischen Substanzen Imipenem und Cefotaxim untersucht. Ohne Erregersicherung sind Carbapeneme zur schnellen kalkulierten Therapie einer Sepsis essenziell (131, 132). Für einen sicheren Therapieerfolg spielen hierbei vor allem Resistenzen gegen Imipenem, einem der Hauptvertreter der Carbapeneme, eine wichtige Rolle. Wenn *H. influenzae* als Ursache einer Sepsis oder Meningitis nachgewiesen wird, ist das Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim das Antibiotikum der ersten Wahl. Das gilt im Besonderen, wenn der nachgewiesene

Stamm als Ampicillin-resistent getestet wurde (129, 130). Da die Prävalenz Ampicillin-resistenter *H. influenzae*-Isolate in den letzten Jahren stark angestiegen ist (158, 160, 162, 203), ist die Überwachung einer flächendeckenden Wirksamkeit der genannten Substanzen und die Erforschung von Ursachen von Resistenzen gegen Carbapeneme und Drittgenerations-Cephalosporine von großer und wachsender Bedeutung.

Bei der Untersuchung der Epidemiologie von Imipenem-Resistenzen bei *H. influenzae* in Deutschland wurde eine hohe Prävalenz von 5,5 % nachgewiesen. Für Cefotaxim konnte mit 0,90 % eine sehr geringe Prävalenz nachgewiesen werden. Das hat zur Folge, dass die Prävalenz von Imipenem-resistenten *H. influenzae*-Isolaten in der Zukunft weiter überwacht werden sollte. Zudem konnte gezeigt werden, dass Cefotaxim nach wie vor ein wirksames Therapeutikum darstellt, um schwere *H. influenzae*-Infektionen zu behandeln.

Um der Ursache der Resistenzen auf den Grund zu gehen, wurde das *ftsI*-Gen aller Imipenem- beziehungsweise Cefotaxim-resistenten Stämme untersucht. Dieses Gen codiert für PBP3, eines der wichtigsten Penicillin-Bindeproteine für die Wirksamkeit von β -Lactam-Antibiotika.

Bei den Imipenem-resistenten Stämmen konnten weitestgehend dieselben Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen werden, die bereits in der Vergangenheit bei Imipenem-resistenten Stämmen beschrieben wurden (150, 156). Dennoch konnte, wie schon bei den genannten Studien, keine einzelne Aminosäuresubstitution direkt mit erhöhten Imipenem-MHK-Werten in Zusammenhang gebracht werden. Bei den Cefotaxim-resistenten Stämmen konnte dagegen eine signifikante Korrelation der PBP3-Substitutionen L389F ($\phi=0,86$, $\eta=0,86$, $p < 0,001$) und Y557H ($\phi=0,56$, $\eta=0,53$, $p < 0,001$) mit der Entwicklung einer Cefotaxim-Resistenz nachgewiesen werden. Diese Substitutionen wurden auch schon in vorherigen Studien durch Transformations-Experimente als ursächlich für eine erhöhte Cefotaxim-MHK nachgewiesen (146-148). Dennoch sind die in dieser Arbeit gemessenen MHK-Werte für Cefotaxim deutlich höher als die in den genannten Arbeiten ermittelten Werte. Daher kann angenommen werden, dass auch andere Resistenzmechanismen eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegen die beiden Substanzen spielen.

Für Imipenem wurde ergänzend das Gen *acrR* untersucht, welches für das Regulatorprotein der AcrAB-TolC-Efflux-Pumpe, AcrR, codiert. Hier konnten Mutationen festgestellt werden, die auch schon durch Cherkaoui et al. beschrieben wurden (150). Zudem konnten bei manchen Stämmen im *acrR*-Gen verfrühte Stopp-Codons nachgewiesen werden, wodurch die die Transkription der Efflux-Pumpen regulierende Funktion des Proteins kompromittiert wird (151).

Trotz der umfangreichen Untersuchungsergebnisse dieser Promotionsarbeit ist es wahrscheinlich, dass noch andere Mechanismen beziehungsweise Mutationen in anderen Resistenzgenen an der Resistenzentwicklung beteiligt sind. Diese sollten in weiterführenden Studien, beispielsweise durch Transformation-Experimente, untersucht werden. Mögliche Ansatzpunkte für diese Experimente wären Gene, die für andere Penicillin-Bindeproteine codieren oder auch Gene für Membranporine oder Efflux-Pumpen.

Damit bleibt auch die weiter unten genauer diskutierte Frage offen, ob die L389F-Substitution im PBP3 ursächlich für die Entwicklung einer Resistenz ist oder ob sie nur einen Marker für einen auch in anderen Genen hochmutierten Stamm darstellt.

Um die Frage zu klären, ob einzelne Mutanten oder Stämme mit einer hohen genetischen Verwandtschaft für die Imipenem- und Cefotaxim-Resistenzen in Deutschland verantwortlich sind, wurde an den Imipenem-resistenten Stämmen eine MLST und an den Cefotaxim-resistenten Stämmen eine Sequenzierung des vollständigen Genoms durchgeführt. Hierbei konnten jeweils kleine, bis zu 5 Stämme starke Gruppen mit gleichen Sequenztypen beziehungsweise ähnlicher Genomsequenz mit geringen Allelunterschieden nachgewiesen werden. Durch die insgesamt hohe genetische Diversität der Stämme ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass einzelne Mutanten oder nahe verwandte Stämme für die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in Deutschland verantwortlich gemacht werden können. Auch durch die geographische Analyse der resistenten Stämme konnten weder bei den Imipenem-, noch bei den Cefotaxim-resistenten Stämmen spatio-temporale Cluster nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei der Entwicklung von Resistenzen gegen die genannten Substanzen eher um zufällige, sporadisch auftretende Mutationen handelt.

Nach dieser zusammenführenden Übersicht über die drei Teile dieser Arbeit und den wichtigsten Erkenntnissen werden die Ergebnisse der einzelnen Projekte wegen ihres großen Umfangs im Weiteren getrennt im Detail diskutiert.

4.1 MALDI-TOF-MS-Analyse

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Jahr 2020 im Journal of Clinical Microbiology der American Society for Microbiology (Copyright © 2022 American Society for Microbiology) als Letter to the Editor veröffentlicht (195).

Der Doktorand ist Erstautor der Veröffentlichung.

Im Folgenden werden die Ergebnisse noch einmal ausführlicher diskutiert, als es in der Veröffentlichung möglich war.

Aufgrund der starken Ähnlichkeit und dem unterschiedlichen pathogenen Potential der Spezies *H. influenzae* und *H. haemolyticus* ist es von großer Bedeutung, die beiden Spezies in der Routinediagnostik eindeutig voneinander unterscheiden zu können (200-202). Die schlimmstmögliche Folge einer Verwechslung der beiden Spezies wäre das Ausbleiben einer adäquaten antibiotischen Therapie. Das wäre der Fall, wenn ein krankheitsauslösender *H. influenzae* in der Diagnostik fälschlicherweise als der Kommensale *H. haemolyticus* erkannt werden würde. Aber auch der umgekehrte Fall würde Folgen nach sich ziehen, die sich negativ auf das Patientenwohl auswirken würden. Ein denkbares Szenario bei der Fehlidentifikation eines *H. haemolyticus*-Stamms als *H. influenzae* wäre eine nicht erforderliche antibiotische Therapie. Außerdem würde diese Fehlidentifikation von einer anderen möglichen Infektionsursache ablenken, sei es durch eine andere Bakterienspezies oder durch eine Virusinfektion.

Die Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry (MALDI-TOF-MS) stellt als massenspektrometrisches Verfahren eine vielversprechende Methode zur schnellen Identifikation verschiedener Bakterienspezies dar (125-127). Bezogen auf die beiden in dieser Arbeit untersuchten Spezies konnte jedoch schon in Studien in der Vergangenheit gezeigt werden, dass durch dieses Verfahren *H. influenzae* und *H. haemolyticus* oft nur eingeschränkt unterschieden werden können. Die Ergebnisse dieser früheren Untersuchungen werden im Folgenden näher erläutert.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde zum ersten Mal mit einer großen Anzahl an Stämmen der Fragestellung nachgegangen, ob das VITEK® MS unter Verwendung der CE-zertifizierten IVD Datenbank *H. influenzae* und *H. haemolyticus* sicher voneinander unterscheiden kann. Die Spezies der getesteten Stämme konnte im Vorhinein eindeutig bestimmt werden, indem die Stämme sowohl phänotypisch als auch genotypisch durch Amplifizierung und Sequenzierung Spezies-spezifischer Gene der jeweiligen Spezies zugeordnet wurden. Darüber hinaus wurde diese Spezieszugehörigkeit eines Großteils der Stämme noch einmal mittels Sequenzierung der Gene des *H. influenzae*-MLST-Schemas bestätigt und die genetische Diversität der getesteten Stämme durch diese Sequenzierungsmethode sichergestellt.

Die Ergebnisse der MALDI-TOF-MS-Analyse zeigten, dass alle *H. influenzae*-Stämme korrekt erkannt wurden, jedoch 42 % der *H. haemolyticus*-Isolate falsch als *H. influenzae* identifiziert wurden. Das bedeutet, dass ein Stamm, der durch das VITEK® MS als *H. influenzae* erkannt wird, nicht unbedingt ein *H. influenzae*, sondern potenziell ein *H. haemolyticus* ist.

Auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten kann geschlussfolgert werden, dass das VITEK® MS IVD die Spezies *H. influenzae* in 100 % der Fälle korrekt erkennt. Das Ausbleiben einer nötigen antibiotischen Therapie kann daher ausgeschlossen werden. Dennoch muss, wenn das System *H. influenzae* als zugrunde liegende Spezies angibt, damit gerechnet werden, dass ein gewisser Anteil dieser Stämme eigentlich der Spezies *H. haemolyticus* angehören und somit nicht therapiebedürftig ist.

Den Goldstandard zur Unterscheidung der beiden Spezies stellen momentan molekulargenetische Tests und Sequenzierungsmethoden dar. Diese Tests sind zum einen der Nachweis der Spezies-spezifischen Gene *fucK*, *fucP*, *hpd*, *sodC* oder *ompP2*, zum anderen sind sie die Sequenzierung von *ompP6* oder der 16S rRNA. Diese molekulargenetischen Untersuchungen sind jedoch stets mit einem hohen Arbeits- und Kostenaufwand verbunden. Darüber hinaus ist die Sequenzierung einzelner Gene meist nicht ausreichend präzise, weshalb ein geeigneter PCR-Assay immer den Nachweis einer Kombination von mindestens zwei Genen vorsieht (40). Untersuchungen in der Vergangenheit haben gezeigt, dass durch Sequenzierung der

16S rRNA zwar *H. influenzae* und *H. parainfluenzae* unterschieden werden können (123), eine Differenzierung von *H. haemolyticus* und *H. influenzae* jedoch nicht einwandfrei möglich ist (35). Durch den enormen zeitlichen und finanziellen Aufwand sind diese Verfahren jedoch für die schnelle Speziesidentifikation in der Routinediagnostik kaum einsetzbar und können nur in Einzelfällen zum Einsatz kommen.

Für diese Arbeit wurde die Speziesidentifikation durch Nachweis des *fucK*- und *ompP2*-Gens und gegebenenfalls der Sequenzierung des *ompP6*-Gens durchgeführt, um die vorliegenden Isolate sicher und eindeutig der Spezies *H. influenzae* oder *H. haemolyticus* zuordnen zu können. Die Sequenzen von 6 der 7 MLST-Loci wurden zur phylogenetischen Analyse sequenziert und konkateniert, um die Spezieszugehörigkeit zu bestätigen und eine genetische Diversität sicherzustellen. Die gleiche Methodik bei einer ähnlichen Fragestellung wurde bereits in der Vergangenheit von Nørskov-Lauritsen et al. im Jahr 2014 durchgeführt. Damals konnte gezeigt werden, dass sich im phylogenetischen Baum zwei eindeutig unterscheidbare Gruppen bildeten, in die sich die Stämme der jeweiligen Spezies eingliederten (Abbildung 23) (14). Und auch eine spätere Studie von Bruin et al., die sich mit dem Diskriminierungspotential des Bruker Biotypers beschäftigte, kam bei phylogenetischen Analysen zu ähnlichen Ergebnissen (204).

Auch bei der in dieser Promotionsarbeit auf diese Weise durchgeführten phylogenetischen Analyse der *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Isolate stellten sich zwei klar voneinander abgrenzbare phylogenetische Gruppen dar, bei der die eine alle untersuchten *H. influenzae*- und die andere alle untersuchten *H. haemolyticus*-Stämme inklusive der jeweiligen Referenzstämme enthielt (Abbildung 12). Rekombinationen zwischen *H. influenzae* und *H. haemolyticus*, also die so genannten „Fuzzy species“, konnten nicht nachgewiesen werden. Zudem zeigte sich eine starke genetische Diversität der untersuchten Stämme, was belegt, dass das Studienkollektiv als repräsentativ für die getesteten Spezies anzusehen ist und nicht nur einzelne eng verwandte Isolate getestet wurden. Es können also Rückschlüsse auf die Performance des VITEK® MS IVD, auf die gesamte Spezies bezogen, getroffen werden.

Ein Zusammenhang von bestimmten MLST-Sequenzen beziehungsweise Sequenztypen und der korrekten oder inkorrekten Identifikation dieser Stämme durch das VITEK® MS konnte nicht festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Spezies selbst und nicht das jeweilige genetische Profil innerhalb einer Spezies einen Einfluss darauf hat, ob die jeweiligen Stämme durch das VITEK® MS korrekt erkannt werden.

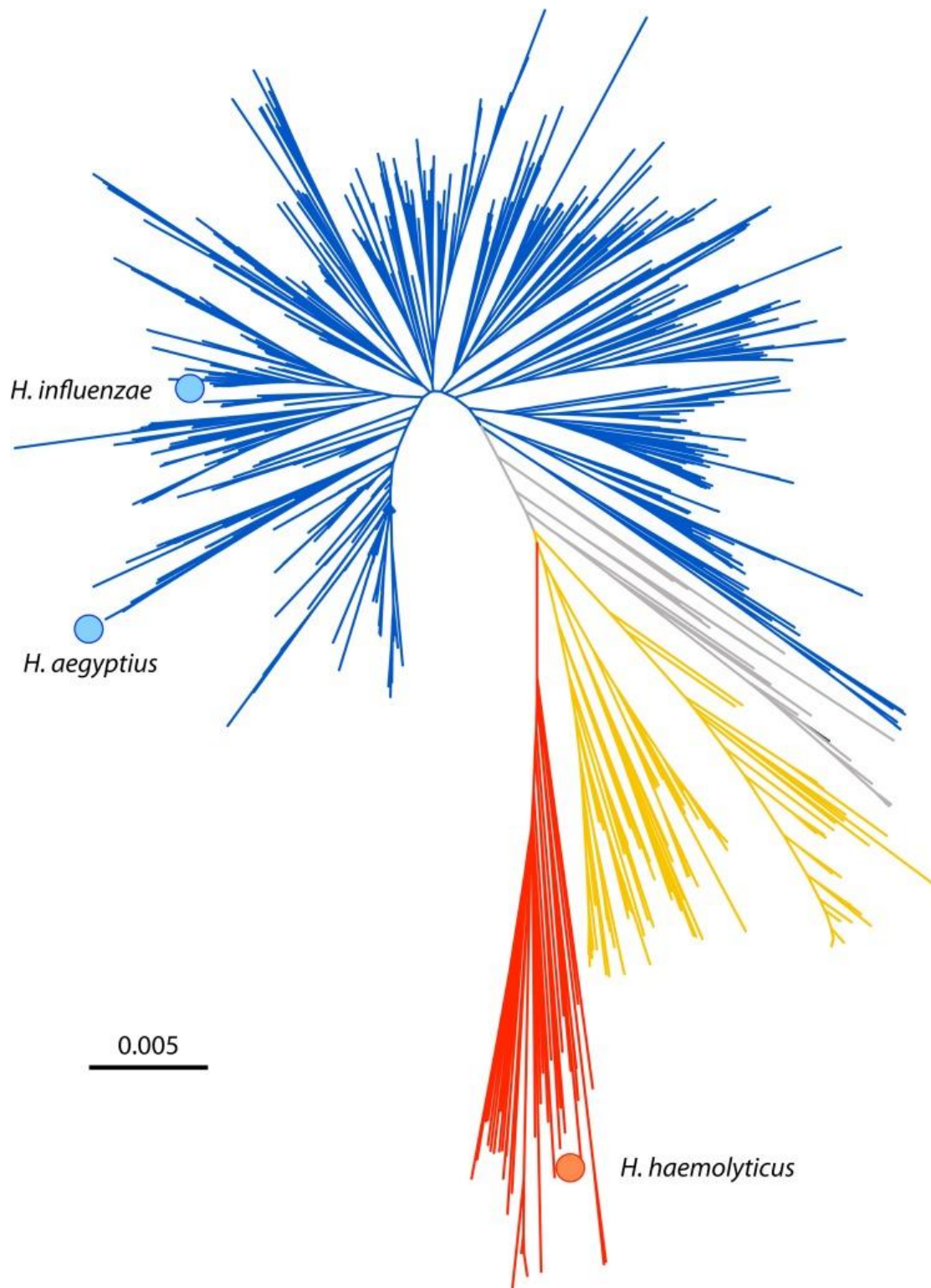


Abbildung 23: Sequenzierung von *H. influenzae*- (blau) und *H. haemolyticus*-Isolaten (rot) dargestellt im phylogenetischen Baum unter Verwendung des *H. influenzae*-MLST-Schemas.
 Es zeigt sich eine klare Unterscheidung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus*.
 Entnommen aus: Norskov-Lauritsen 2014 et al.: Classification, Identification and Clinical Significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* Species with Host Specificity for Humans (14).
 (Nachdruckerlaubnis liegt vor)

Massenspektrometrische Untersuchungen der beiden Spezies wurden in der Vergangenheit meist mit dem MALDI Biotyper von Bruker (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Deutschland) durchgeführt. Diese Studien zeigten, dass das Gerät *H. influenzae* zwar meist korrekt erkannte, *H. haemolyticus*-Isolate jedoch oft nicht oder nicht korrekt erkannte. So stellten Zhu et al. (182) fest, dass unter Verwendung der original reference database (ORD) des Bruker Biotypers 76.9 % der von ihnen getesteten *H. influenzae*-Stämme korrekt erkannt wurden. Von den getesteten *H. haemolyticus*-Stämmen wurde kein einziger Stamm korrekt erkannt. Und auch bei Untersuchungen von Chen et al. (205) wurden nur 86,9 % der getesteten Haemophilus-Stämme korrekt erkannt. Frickmann et al. testeten 50 *H. influenzae*- und 7 *H. haemolyticus*-Stämme. Hier wurde jeder *H. influenzae*-Stamm und keiner der *H. haemolyticus*-Stämme korrekt erkannt (206).

Für das VITEK® MS lagen vor dieser Arbeit noch kaum Daten zum Diskriminierungspotential der Spezies *H. influenzae* und *H. haemolyticus* vor. In den meisten Arbeiten, in denen diese Spezies untersucht wurden, waren sie nur ein kleiner Teil eines großen Studienkollektivs verschiedener Genera und Spezies. Daher wurde meist nur eine sehr geringe Anzahl an Isolaten der Gattung *Haemophilus* getestet. Da außerdem in diesen Studien keine geeignete Referenzmethode zur Unterscheidung der Stämme der beiden Spezies zum Einsatz kam, können daraus keine eindeutigen Schlüsse zum Diskriminierungspotential des VITEK® MS getroffen werden. Dennoch finden sich auch in diesen Studien vereinzelte Hinweise auf mögliche Einschränkungen, die bei der Diskriminierung der Spezies *H. influenzae* und *H. haemolyticus* für das MALDI-TOF-MS Gerät VITEK® MS von bioMérieux bestehen. So wurden in einer Arbeit zum VITEK® MS von Powell et al. (197) alle getesteten *H. influenzae*-Isolate (n=26) korrekt durch das Gerät erkannt. Von den getesteten *H. haemolyticus*-Isolaten (n=11) wurde jedoch keines korrekt identifiziert. Und auch in der aktuellsten Arbeit zu diesem Thema von Broyer et al. (198) aus dem Jahr 2018 wurden von 8 getesteten *H. haemolyticus*-Isolaten 7 nicht identifiziert und eines fälschlicherweise als *H. influenzae* erkannt. Auf der anderen Seite wurden bei Untersuchungen durch López-Fabal et al. (199) mittels des VITEK® MS 51 *H. influenzae*, 12 *H. parainfluenzae* und ein *H. haemolyticus* durch das System untersucht. Die Ergebnisse stimmten hierbei alle mit den Ergebnissen einer 16S rRNA-

Sequenzierung überein, weswegen diese Arbeitsgruppe zu der Schlussfolgerung kam, dass das VITEK® MS die *H. influenzae*-Spezies mit einer Genauigkeit von 100 % erkennen könne.

Die vereinzelt Hinweise auf die eingeschränkte Aussagekraft der Messergebnisse des VITEK® MS bei der Unterscheidung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* konnte durch die umfangreiche Analyse in dieser Arbeit an einer großen Anzahl an eindeutig der jeweiligen Spezies zugeordneten Stämme bestätigt werden.

Eine mögliche Lösung der Einschränkungen des VITEK® MS *H. influenzae* und *H. haemolyticus* zu unterscheiden, findet sich in den Studien zum MALDI Biotyper von Zhu et al. (182), Chen et al. (205) und Bruin et al. (204). Hierbei wurde die für den Abgleich der Massenspektren zur Verfügung stehende Referenzdatenbank durch zusätzliche *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Spektren erweitert. Die Folge dieser Datenbankerweiterung war eine korrekte Identifizierung aller *H. influenzae*- und *H. haemolyticus*-Isolate mit diesem MALDI-TOF-MS Gerät. Es ist plausibel, dass diese Beobachtung auf das VITEK® MS beziehungsweise die IVD-Datenbank übertragbar ist. Da sich die in der Routinediagnostik verwendete CE-zertifizierte IVD-Datenbank jedoch nicht auf Seiten des Endnutzers manipulieren lässt, konnte dieser Hypothese in dieser Arbeit nicht nachgegangen werden. Die Möglichkeit zur Datenbankerweiterung bietet im Fall des VITEK® MS ausschließlich die Saramis RUO (Research Use Only)-Datenbank. Der Zugang zu dieser Datenbank war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Mögliche Updates der Datenbank zur verbesserten Unterscheidung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* könnten in künftigen Studien untersucht werden.

4.2 Imipenem-Resistenz

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Jahr 2020 im Journal of Antimicrobial Chemotherapy der British Society for Antimicrobial Chemotherapy und Oxford Academics als original article veröffentlicht (196).

Der Doktorand ist Zweitautor der Veröffentlichung.

Strukturelle Ähnlichkeiten zu der Veröffentlichung ergeben sich aufgrund der inhaltsgleichen Ergebnisse.

In der Vergangenheit wurden Resistenzen gegen Imipenem bei *Haemophilus influenzae* kaum beschrieben. Es gibt zwar Einzelfallbeispiele (156), dennoch wurden Resistenzen gegen dieses Carbapenem allgemein hin als Seltenheit angesehen (162). Im Jahr 2017 konnten Cherkaoui et al. eine Imipenem-Resistenz bei 46 ihrer 124 untersuchten Isolate nachweisen (150). Der epidemiologische Hintergrund dieser Stämme wurde jedoch nicht genauer definiert. Eine Aussage zur Prävalenz einer Imipenem-Resistenz war daher nie möglich. Jedoch lieferten die molekulargenetischen Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe wertvolle Rückschlüsse auf mögliche Mechanismen, die ursächlich für die Entwicklung einer Imipenem-Resistenz sind. Die Beobachtungen von Cherkaoui et al. zu *ftsI*- und *acrR*-Mutationen wurden daher den Ergebnissen dieser Arbeit gegenübergestellt, um eine epidemiologische Relevanz der dargestellten Resistenzmechanismen nachzuweisen.

Im Zuge der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde der Frage der Prävalenz einer Imipenem-Resistenz bei invasiven *H. influenzae* zum ersten Mal mit einem großen Studienkollektiv nachgegangen, welches epidemiologisch präzise definiert wurde.

Durch dieses Projekt konnte mit 5,5 % eine erstaunlich hohe Prävalenz Imipenem-resistenter *H. influenzae* nachgewiesen werden. Dieser Wert bezieht sich auf die MHK-Messung mittels BMD. Wenn man die MHK-Werte, die durch GAD gemessen wurden, als Maßstab nimmt, ergibt sich sogar eine Prävalenz von 13,5 %.

Dies ist ein wichtiges Ergebnis, da es sich bei Imipenem um ein Leitlinienantibiotikum zur kalkulierten Antibiotikatherapie einer Sepsis handelt. Zudem steigen sowohl die

Inzidenz invasiver *H. influenzae*-Infektionen als auch der Einsatz von Carbapenemen in Deutschland und Europa seit Jahren stetig an (207, 208), was die Auswirkungen der hohen Prävalenz einer Imipenem-Resistenz bei invasiven *H. influenzae* verdeutlicht.

Im Jahr 2020 kam es mutmaßlich aufgrund der für die COVID-19-Pandemie getroffenen Hygiene- und Schutzmaßnahmen zu einem deutlichen Rückgang der gemeldeten invasiven *H. influenzae*-Fälle (92). Ob sich die Zahlen an gemeldeten Fällen nach Ende der Pandemie wieder auf einem ähnlichen Niveau wie vor dem Jahr 2020 bewegen, bleibt abzuwarten.

Die Verwandtschaftsbeziehung der Imipenem-resistenten Stämme wurde mittels MLST untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stämme sehr divers sind. Bestimmte Sequenztypen sowie Gruppen von Sequenztypen, die sich nur in einem der sieben Loci unterschieden, kamen dennoch gehäuft vor. Dabei war ST107 mit neun Stämmen dieses Typs der häufigste Sequenztyp. Zur Gruppe 1 (ST14, ST1034 und ST1885) ließen sich elf und zur Gruppe 5 (ST165, ST1891) sieben Stämme zählen. Bei der Untersuchung der geographischen Verteilung der Stämme und Sequenztypen zeigte sich jedoch weder eine lokale Häufung Imipenem-resistenter Stämme, noch ließen sich regionale Cluster erkennen, die von einem Sequenztyp ausgingen. Allerdings konnte mittels MLST die Übertragung eines invasiven NTHi innerhalb eines Pflegeheims festgestellt werden, welche sich nach Rücksprache mit dem zuständigen Gesundheitsamt auch epidemiologisch bestätigen ließ.

Bekanntermaßen ist neben der Produktion einer β -Lactamase vor allem eine Veränderung des PBP3 maßgeblich an der Entwicklung einer Resistenz gegen β -Lactam-Antibiotika beteiligt (141). Aufgrund dessen erfolgte eine Sequenzierung des *ftsI*-Gens aller Imipenem-resistenten Isolate und es konnte gezeigt werden, dass relevante Veränderungen bei 61 von 64 Stämmen nachweisbar waren. Schon in der Vergangenheit konnte bei Experimenten, bei denen das *ftsI*-Gen eines Imipenem-resistenten Stamms in den Referenzstamm Rd KW20 transformiert wurde, eine Erhöhung der Imipenem-MHK festgestellt werden (156). Die nachgewiesenen PBP3-Veränderungen weisen zudem eine starke Ähnlichkeit mit denen auf, die von Cherkaoui et al. (150) aufgezeigt werden konnten. So ließen sich die meisten Stämme sowohl aus der Veröffentlichung von Cherkaoui et al. (150) als auch dieser

Promotionsarbeit der PBP3-Gruppe II zuordnen. Die häufigste Untergruppe war in beiden Untersuchungen Gruppe IIb. Diese große Übereinstimmung der Ergebnisse und der eindeutige Nachweis von Aminosäuresubstitutionen im PBP3, die an Resistenzen gegen β -Lactam-Antibiotika beteiligt sind, sprechen für einen Einfluss dieser PBP3-Veränderungen an der Entwicklung der Imipenem-Resistenz. Dennoch kann die Imipenem-Resistenz nicht ausschließlich durch diese Aminosäuresubstitutionen im PBP3 erklärt werden. Das liegt zum einen daran, dass drei resistente Stämme keine PBP3-Veränderungen zeigten und außerdem keine bestimmte Aminosäuresubstitution in einen direkten Zusammenhang mit der Imipenem-Resistenz gebracht werden konnte, da sich Substitutionen auch in Imipenem-sensiblen Stämmen zeigten.

Um den konkreten Einfluss von Veränderungen im PBP3 zu analysieren, müssten in Zukunft weitere molekulargenetische Untersuchungen dazu angestellt werden. Denkbar wäre die Transformation bestimmter *ftsI*-Mutationen in den Rd KW20 Referenzstamm mit anschließender Resistenztestung der jeweiligen Transformanten. Auch die Untersuchung anderer Resistenzgene, die einen Einfluss auf die Penicillin-Bindeproteine, die Membranporine und Influx- und Efflux-Pumpen haben, könnte mögliche Rückschlüsse auf weitere oder andere Ursachen für die Entstehung einer Imipenem-Resistenz bei *H. influenzae* geben.

Um einen weiteren möglichen Mechanismus, nämlich die gesteigerte Aktivität von Effluxpumpen zu untersuchen, wurde bei allen Imipenem-resistenten Stämmen das *acrR*-Gen amplifiziert. Das davon codierte Regulatorprotein AcrR dient zur Drosselung der AcrAB-TolC-Effluxpumpe. Falls das Protein durch Mutation dieser Funktion nicht mehr nachgehen kann, kommt es zur übermäßigen Transkription der Effluxpumpe. Der gesteigerte Efflux von Imipenem und die daraus resultierende Imipenem-Resistenz konnte schon in der zuvor beschriebenen Arbeit von Cherkaoui et al. nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der AcrR-Sequenzen konnten überwiegend die gleichen Mutationen beziehungsweise Aminosäuresubstitutionen nachgewiesen werden, die schon von Cherkaoui et al. beschrieben wurden (150). Darüber hinaus zeigten einige der Stämme dieser Arbeit verfrühte Stopp-Codons, die nachgewiesenermaßen im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Clarithromycin-Resistenz stehen (151).

Die Ergebnisse entsprechen denen von Cherkaoui et al. und auch in einer aktuellen Studie von Kitaoka et al. konnte der Einfluss von PBP3- und AcrR-Veränderungen an der Entwicklung von Imipenem-Resistenzen bestätigt werden (209). Ein klarer Zusammenhang von bestimmten Mutationen im *ftsI*- oder *acrR*-Gen oder der Kombination mehrerer bestimmter Mutationen mit einer Imipenem-Resistenz konnte nicht nachgewiesen werden. Der zusätzliche Einfluss von Veränderungen in anderen Resistenzgenen ist daher nicht auszuschließen. Aus diesem Grund ist es nötig, weiter an den möglichen zugrundeliegenden Mechanismen zu forschen und weitere epidemiologische Untersuchungen durchzuführen, um den Einfluss der bekannten Mechanismen näher zu spezifizieren.

So sollte auch untersucht werden, ob es sich bei den gezeigten Veränderungen in den Resistenzgenen um die tatsächliche Ursache für die Imipenem-Resistenz handelt oder ob die aufgeführten Mutationen nur ein Zeichen für einen auch in anderen Genen mutierten Stamm darstellen.

Abschließend sei noch einmal auf die starke Diskrepanz der MHK-Werte, die bei den beiden Antibiotikaresistenztestungsverfahren GAD und BMD gemessen wurden, hingewiesen. Eine Resistenz konnte durch BMD nur für 26 der 64 laut GAD resistenten Stämme bestätigt werden. Eine Verflüchtigung der Substanz während der Durchführung der Experimente oder bei der Inkubation kann definitiv ausgeschlossen werden, da sich die gemessenen Werte der Qualitätskontrollstämmen, die bei jeder Messung mitgeführt wurden, für die beiden Methoden nicht unterschieden. Einigen Autoren zufolge besteht die Erklärung für die allgemein geringeren MHK-Werte, die mittels BMD bei der Testung von Imipenem bei *H. influenzae* gemessen werden, aus einer Kombination von zwei Faktoren.

Der erste Faktor sei das deutlich geringere Inokulum, das bei der BMD im Vergleich zur GAD verwendet wird. Bei der BMD werden ca. $5 \cdot 10^5$ CFU/ml verwendet, bei der GAD ist das Inokulum um den Faktor 1000 höher (156, 188).

Der zweite Faktor sei das Phänomen der Heteroresistenz. Durch die unterschiedliche Amplifizierung und Expression verschiedener Gene fallen damit die einzelnen Resistenzmechanismen unterschiedlich stark ins Gewicht (152). Das Ergebnis ist, dass die einzelnen Klone eines einzigen Bakterienstamms unterschiedlich empfindlich

auf das getestete Antibiotikum reagieren. Diese Unterschiede zeigen sich laut Nicoloff et al. durch das Wachstum einzelner Bakterienkolonien innerhalb der Hemmhofellipse beziehungsweise durch doppelte Hemmhofellipsen (157). Diese einzelnen Kolonien sind somit in der BMD wegen des geringeren Inokulums bei der Ablesung nicht sichtbar, in der GAD dagegen schon. Diesem Modell zufolge wäre die GAD also besser dazu geeignet, Heteroresistenzen gegen Imipenem nachzuweisen, da auch einzelne resistente Klone in einem ansonsten sensiblen Stamm nachgewiesen werden können. Cerquetti et al. schlussfolgerten auf Grundlage ihrer Ergebnisse, dass die heterogene Resistenz gegen Imipenem in der Vergangenheit unterschätzt wurde, da sie durch den Goldstandard, die BMD, kaum nachweisbar ist (156). Wenn man die GAD-Ergebnisse, die in dieser Arbeit erhoben wurden, in Betracht zieht, würde das für eine tatsächliche Prävalenz von 13,5 % Imipenem-resistenter *H. influenzae* sprechen.

Daher müsste durch nachfolgende klinische Studien gezeigt werden, ob die heterogene Expression der Imipenem-Resistenz eine klinische Relevanz hat. Denkbar wäre, dass selbst wenn nur einzelne Kolonien des heteroresistenten Stamms bei Gabe des Antibiotikums überleben, die Infektionsursache bei dem Patienten oder der Patientin nicht beseitigt werden kann.

Die heterogene Expression einer Imipenem-Resistenz bei *H. influenzae* erschwert die molekulargenetische Analyse der zugrundeliegenden Mechanismen, die an der Entwicklung einer Imipenem-Resistenz beteiligt sind. Da sich diese Heteroresistenzen laut Andersson et al. auf unterschiedliche Transkriptions- und Amplifikationslevel verschiedener Resistenzgene zurückführen lassen, die sich in den resistenten Subpopulationen von denen des restlichen Stamms unterscheiden, ist es nötig den zugrunde liegenden Mechanismen mit aufwändigeren Analyseverfahren wie zum Beispiel der quantitative real time PCR nachzugehen (152).

4.3 Cefotaxim-Resistenz

Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit wurden im Jahr 2021 im Journal of Antimicrobial Chemotherapy der British Society for Antimicrobial Chemotherapy und Oxford Academics als original article veröffentlicht (149).

Der Doktorand ist Erstautor der Veröffentlichung.

Strukturelle Ähnlichkeiten zu der Veröffentlichung ergeben sich aufgrund der inhaltsgleichen Ergebnisse.

Das Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim ist nach aktuellen Leitlinien das Antibiotikum der ersten Wahl zu Behandlung Ampicillin-resistenter invasiver *H. influenzae*-Infektionen (128, 129). Die Prävalenz Ampicillin-resistenter *H. influenzae* ist in den letzten Jahren stark angestiegen. Für Deutschland konnte für die Jahre 2009-2012 eine Prävalenz einer Ampicillin-Resistenz von 11,6 % bei invasiven Isolaten festgestellt werden (203). Laut aktuellen Daten des NRZMHi ist die Prävalenz in den letzten Jahren sogar auf über 20 % angestiegen (Abbildung 7). Auch andere europäische Länder wie Frankreich und Spanien geben in den aktuellen Veröffentlichungen zu diesem Thema eine Prävalenz einer Ampicillin-Resistenz von 24 % beziehungsweise 19,2 % an (158, 162). Insbesondere Isolate der Phänotypen BLNAR und BLPACR, also diejenigen Stämme, bei denen eine Ampicillin-Resistenz nicht oder nicht ausschließlich auf die Produktion einer β -Lactamase zurückzuführen ist, sondern auch Veränderungen im PBP3 vorliegen, sind von diesem Anstieg betroffen. Daher ist es besonders wichtig, die flächendeckende Wirksamkeit von Cefotaxim gegen diese *H. influenzae*-Isolate zu verifizieren.

Zu diesem Zweck wurde die Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz bei invasiven *H. influenzae* über den Zeitraum 2016-2019 untersucht. Über diesen Vierjahreszeitraum wurden 2432 Isolate getestet, die invasive Infektionen verursacht haben und bei denen der Erreger in Blut und/oder Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen wurde. Damit stellt diese Studie die bis heute umfangreichste epidemiologische Untersuchung zu diesem Thema dar.

Es konnte eine geringe Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten von 0,90 % festgestellt werden. Wie aus den Daten für die einzelnen Jahre erkennbar, konnte im zeitlichen Verlauf 2016-2019 kein signifikanter Anstieg der Prävalenz festgestellt werden. Diese geringe Prävalenz entspricht weitestgehend den Zahlen aus Norwegen und Spanien. In diesen Ländern liegen die Werte unter einem Prozent (162, 210). Im starken Gegensatz dazu steht eine aktuelle Studie aus Frankreich, die eine Cefotaxim-Resistenz bei 5,8 % der untersuchten invasiven Isolate nachwies (158).

Der Vergleich der beiden Antibiotikaresistenztestungsverfahren BMD und GAD zur Bestimmung der Cefotaxim-MHK zeigte eine sehr starke und hochsignifikante Korrelation ($r=0,94$, $p < 0,001$) dieser beiden Verfahren. Damit konnten die Ergebnisse früherer Untersuchungen (186, 187) bestätigt werden. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass die in der Routinediagnostik verwendete GAD dem zeitlich deutlich aufwändigeren Goldstandard BMD zur Bestimmung der Cefotaxim-MHK nahezu ebenbürtig ist und damit eine durchaus verlässliche und zeitsparende Alternative darstellt.

Die Einteilung der Stämme in Cefotaxim-sensibel (S) und resistent (R) erfolgte gemäß der von EUCAST festgelegten Grenzwerten. Die Häufigkeitsverteilung der für die 2432 Stämme gemessenen Cefotaxim-MHK-Werte stimmt dabei mit den Untersuchungen des EUCAST überein, welches im Jahr 2010 13509 verschiedene Stämme untersuchte um einen epidemiologischen cut-off Wert zu ermitteln, nach welchem sich der festgelegte Resistenzgrenzwert von 0,125 µg/ml richtet (Abbildung 24). Es sei dennoch erwähnt, dass nach dem von CLSI vorgegebenen Grenzwert von 2 µg/ml keiner der in dieser Arbeit untersuchten Stämme als Cefotaxim-resistent einzuordnen gewesen wäre.

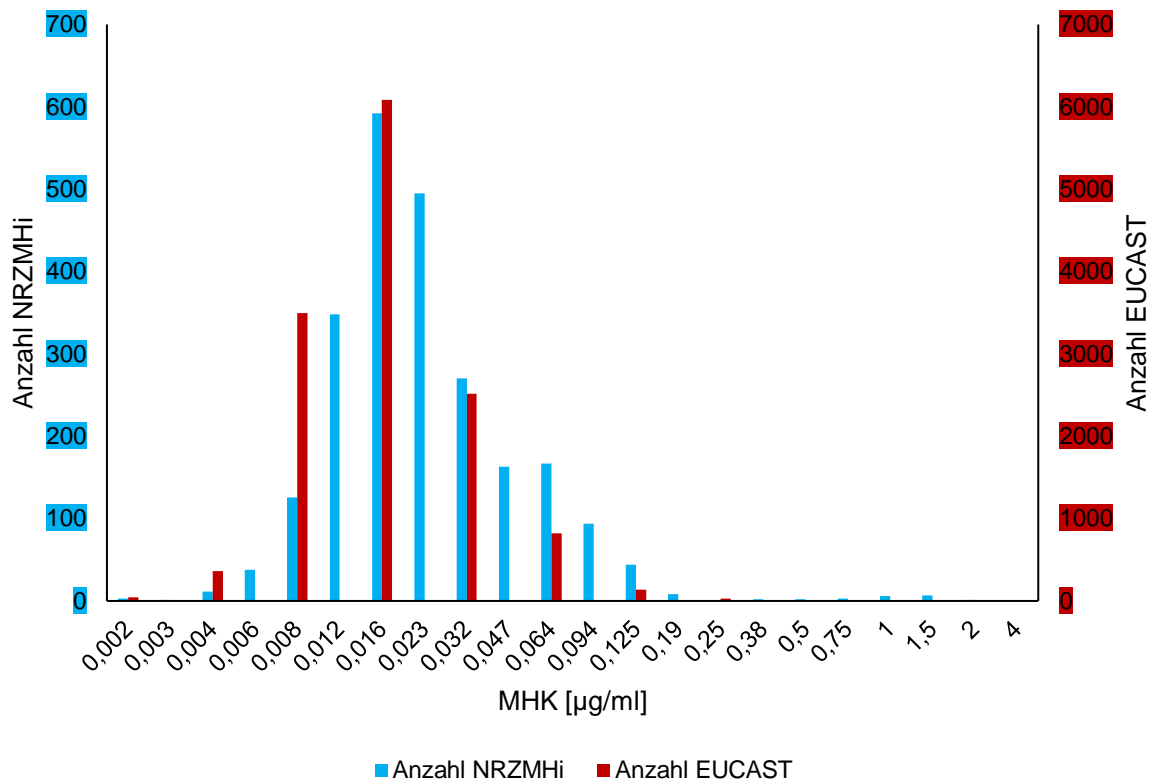


Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der Cefotaxim-MHK-Werte erhoben durch EUCAST und das NRZMHi.
 Den MHK-Werten der 13509 durch EUCAST untersuchten *H. influenzae*-Isolate (rot) sind die MHK-Werte der 2432 invasiven *H. influenzae*-Isolate aus dem Zeitraum 2016-2019, die durch das NRZMHi untersucht wurden, gegenübergestellt. Es zeigt sich eine qualitativ ähnliche Verteilung der Cefotaxim-MHK-Werte.
 (Eigene Abbildung)

In der Vergangenheit wurde die Rolle von verschiedenen Aminosäuresubstitutionen im PBP3 für die Entwicklung einer Cefotaxim-Resistenz durch Transformation dieser Mutationen in den Referenzstamm Rd KW20 nachgewiesen (146, 147). Zur Untersuchung, ob und in welchem Maße diese Aminosäuresubstitutionen eine epidemiologische Relevanz haben, wurde das PBP3 aller Cefotaxim-resistenten mit dem Cefotaxim-sensibler Stämme gleichen Ampicillin-Resistenz-Phänotyps verglichen. Die grafische Darstellung der Daten in Abbildung 21 legt nahe, dass hauptsächlich Stämme mit der Aminosäuresubstitution L389F eine verringerte Cefotaxim-Empfindlichkeit aufweisen. Diese Substitution ist gruppenbestimmend für PBP3-Gruppen III+ und III-like+. Es konnte ein hochsignifikanter Zusammenhang dieser PBP3-Veränderung mit einer erhöhten Cefotaxim-MHK ($\phi=0,86$, $\eta=0,86$,

$p < 0,001$) durch die statistische Analyse der Cefotaxim-resistenten und Cefotaxim-sensiblen Isolate nachgewiesen werden. Zudem zeigte auch die von Mizoguchi et al. (148) nachweislich an einer Cefotaxim-Resistenz beteiligte Y557H-Substitution einen signifikanten Zusammenhang mit einer erhöhten Cefotaxim-MHK ($\phi=0,56$, $\eta=0,53$, $p < 0,001$). Die zweite von Mizoguchi et al. dargestellte G555E-Substitution war in keinem der Stämme dieser Arbeit nachweisbar, weswegen bezüglich dieser Substitution keine Aussage zur epidemiologischen Relevanz getroffen werden kann.

Die Daten dieser Studie zeigen die epidemiologische Relevanz der Erkenntnisse der Arbeiten von Osaki et al. (147) und Skaare et al. (146), welche nachweisen konnten, dass sich die Cefotaxim-MHK des Rd KW20-Stamms mindestens verdoppelte, wenn die Aminosäuresubstitutionen R517H, N526K, S385T oder L389F in Rd KW20 transformiert wurden. Es konnte sogar eine Verachtfachung der Cefotaxim-MHK des Referenzstamms gemessen werden, wenn R517H oder N526K in Kombination mit S385T und L389F transformiert wurden. Aufgrund der unterschiedlichen MHK-Werte, die diese Studien ergaben, wurde angenommen, dass PBP3-Mutationen in drei aufeinanderfolgenden Stufen auftreten. Die erste Mutationsstufe ist R517H oder N526K, die zweite S385T und die dritte und letzte Stufe die L389F-Substitution. Nach diesem Stufenschema stehen Stämme mit der L389F Substitution im Zusammenhang mit einer sogenannten high-level PBP3-mediated resistance (high-rPBP3), welche unter anderem zu einer Resistenz gegen Drittgenerations-Cephalosporine führt.

In einer Studie von Pérez-Vázquez et al. konnte festgestellt werden, dass eine Fluorchinolon-Resistenz im Zusammenhang mit einer Hypermutableität steht (211). Da Skaare et al. bei Stämmen mit der L389F-Substitution eine Fluorchinolon-Resistenz nachweisen konnten, spekulierten sie, dass diese hypermutierten Stämme sehr viel wahrscheinlicher PBP3-Substitutionen vorweisen (146). Es wäre also denkbar, dass diese L389F-Substitution ein Hinweis für einen auch in anderen Genen stark mutierten Bakterienstamm darstellt und Veränderungen im PBP3 nicht der einzige Grund für die Resistenzentwicklung sind. Somit könnten auch andere Resistenzmechanismen wie Veränderungen der Membranporine oder eine durch Transkription regulierte Veränderung des Influx und/oder Efflux von antibiotischen Substanzen eine zusätzliche Rolle bei der Entwicklung einer Cefotaxim-Resistenz spielen.

Darüber hinaus wären auch Veränderungen in anderen Penicillin-Bindeproteinen denkbar. Da PBP3-Veränderungen wegen der hohen Bindungsaffinität der Substanzen an diesem Protein den größten Einfluss auf die MHK von β -Lactam-Antibiotika haben (150, 156), wurden Veränderungen in anderen Penicillin-Bindeproteinen beziehungsweise Mutationen in den Genen, die für diese Proteine codieren, in der Vergangenheit kaum untersucht. In einer Untersuchung zu PBP4-Veränderungen konnte zwar nachgewiesen werden, dass diese einen Einfluss auf die Empfindlichkeit gegen Aminopenicilline und Carbapeneme haben, die Cephalosporin-Empfindlichkeit jedoch unverändert blieb (156). Die begrenzte Datenlage zu Resistenzmechanismen, die zu einer Cephalosporin-Resistenz führen, zeigt, dass der Erforschung zugrunde liegender Mechanismen in zukünftigen Arbeiten weiter nachgegangen werden muss.

Um die Verwandtschaftsbeziehung der Cefotaxim-resistenten invasiven *H. influenzae*-Isolate zu untersuchen, wurde eine Sequenzierung des vollständigen Genoms aller Cefotaxim-resistenten Stämme durchgeführt. Die daraus erhobenen Daten zeigten eine hohe Diversität der NTHi-Isolate. Die Stämme des Serotyps f dagegen zeigten eine deutlich höhere Homogenität. Diese Beobachtungen stimmen mit früheren Untersuchungen überein, nach denen bekapselte Stämme genetisch homogen und unbekapselte NTHi genetisch heterogen sind (111-113). Die Sequenztypen ST103 (n=4) und ST107 (n=3) konnten am häufigsten nachgewiesen werden. Da diese Sequenztypen in aktuellen Studien zu invasiven *H. influenzae*-Isolaten mit großer Häufigkeit auftauchen (212-214) und in der umfangreichen pubmlst.org-Datenbank zu den Hauptsequenztypen gehören, ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei den Stämmen dieser Sequenztypen um die gleichen *H. influenzae*-Klone handelt. Auch eine Analyse der Zeitpunkte der Probenentnahme und der angegebenen Wohnorte der Erkrankten ließ keine Rückschlüsse auf eine direkte Übertragung der Stämme zu.

Die geographische Analyse ergab eine gleichmäßige Verteilung der Fälle invasiver Cefotaxim-resistenter *H. influenzae* unter Berücksichtigung der Bevölkerungsdichte. Was auf den ersten Blick als relative Häufung der Fälle im Westen Deutschlands erscheint, kann durch die verhältnismäßig hohe Bevölkerungsdichte im Metropolgebiet Rhein-Ruhr erklärt werden (Abbildung 22).

Da bei der Analyse der Genomdaten eine hohe Diversität der untersuchten Stämme nachgewiesen wurde und die geographische Verteilung der Stämme keine lokalen Häufungen zeigte, ist nicht davon auszugehen, dass Cefotaxim-Resistenzen auf einige wenige sich verbreitende Klone zurückzuführen sind, sondern dass die zur Resistenz führenden Mutationen eher sporadisch auftreten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Cefotaxim-Resistenzen bei invasiven *H. influenzae*-Isolaten in Deutschland in den Jahren 2016-2019 selten auftraten. Die niedrige Prävalenz von 0,90 % spricht dafür, dass Drittgenerations-Cephalosporine immer noch gut für die Behandlung von invasiven *H. influenzae*-Infektionen geeignet sind. Zudem wurde gezeigt, dass Cefotaxim-Resistenzen als sporadische Ereignisse auftraten, da klonale Verbreitungen resistenter Stämme ausgeschlossen wurden. Durch molekulargenetische Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass die Aminosäuresubstitutionen L389F und Y557H signifikant mit einer Cefotaxim-Resistenz assoziiert waren. Darum sollten diese Substitutionen weiter überwacht und ihre Auswirkungen weiter untersucht werden. Zur Forschung an weiteren zugrundeliegenden Resistenzmechanismen könnten die verfügbaren Genomdaten eingehend analysiert werden, um mögliche genetische Marker für eine Cefotaxim-Resistenz zu identifizieren und in weiterführenden experimentellen Studien phänotypisch zu untersuchen. Diese Studien wären ein wichtiger Schritt, um die Entstehung einer Cefotaxim-Resistenz besser verstehen und sie damit auch besser überwachen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Inzidenz invasiver *H. influenzae*-Infektionen in Deutschland steigt seit Jahren an. Die akkurate Identifizierung und Resistenztestung dieses Erregers sind von großer klinischer und epidemiologischer Bedeutung. Daher wurden im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit umfangreiche Untersuchungen zur Diagnostik und zur Epidemiologie von Antibiotikaresistenzen bei *H. influenzae* durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die in der Routinediagnostik mittlerweile weit verbreitete MALDI-TOF-MS-Diagnostik durch das VITEK MS IVD nur eingeschränkt zur sicheren Unterscheidung von *H. influenzae* und *H. haemolyticus* einsetzbar ist. *H. influenzae*-Isolate erkannte das System mit einer Genauigkeit von 100 %. Bei *H. haemolyticus*-Isolaten wurden dagegen 42 % der untersuchten Stämme fälschlicherweise als *H. influenzae* erkannt. Dieser Fragestellung wurde mit der bisher umfangreichsten molekularbiologisch charakterisierten Studienpopulation beider Bakterienspezies nachgegangen.

Die kalkulierte antibiotische Therapie einer Sepsis oder Meningitis erfolgt häufig mit Carbapenemen, die leitliniengerechte Therapie invasiver *H. influenzae*-Infektionen mit Drittgenerations-Cephalosporinen. Imipenem und Cefotaxim gehören zu den Hauptvertretern dieser Gruppen. Bezüglich der Antibiotikaresistenztestung wurde erstmalig für *H. influenzae* herausgefunden, dass die routinemäßig verwendete Gradientenagardiffusion (GAD) bei der Testung von Cefotaxim im Vergleich zum Goldstandard Bouillon-Mikrodilution gleichwertig und bei Imipenem sogar sensitiver in der Detektion von Heteroresistenzen ist.

Die Epidemiologie dieser Resistenzen wurde in dieser Arbeit erstmalig für Deutschland systematisch erfasst, indem alle verfügbaren invasiven Isolate gemeldeter *H. influenzae*-Infektionen der Jahre 2016 (Imipenem) beziehungsweise 2016-2019 (Cefotaxim) untersucht wurden. Es wurde eine hohe Prävalenz einer Imipenem-Resistenz von 13,5 % festgestellt. Die Prävalenz einer Cefotaxim-Resistenz lag bei 0,9 %.

Zur molekularen Typisierung wurde bei den Imipenem-resistenten Isolaten eine Multilocus-Sequenztypisierung, bei den Cefotaxim-resistenten Stämmen eine

Sequenzierung des vollständigen Genoms durchgeführt. Hierbei wurde eine hohe genetische Diversität der Stämme festgestellt, was die Schlussfolgerung zulässt, dass resistente Mutanten sporadisch entstehen. Die Untersuchung möglicher spatio-temporaler Cluster führte zum Nachweis einer sehr selten vorkommenden Übertragung eines Imipenem-resistenten Stamms. Durch die Sequenzierung von Resistenzgenen wurde die Epidemiologie und Relevanz bekannter Aminosäuresubstitutionen beleuchtet. Unter anderem wurde für die PBP3-Substitutionen L389F und Y557H eine hochsignifikante Korrelation mit dem Auftreten von Cefotaxim-Resistenzen nachgewiesen. Die gewonnenen Genomdaten bieten die Grundlage für die Forschung an weiteren Antibiotikaresistenzdeterminanten von *H. influenzae*.

6 Literaturverzeichnis

1. Krieg N, Don J, James TS. Bergeys Manual of Systematic Bacteriology Second Edition Volume II The Proteobacteria. Springer. USA; 1984.
2. Pfeiffer R. I. Preliminary Communication on the Exciting causes of Influenza. Br Med J. 1892;1(1620):128.
3. Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The Families and Genera of the Bacteria: Preliminary Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol. 1917;2(5):505-66.
4. Winslow CE, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol. 1920;5(3):191-229.
5. Pfeiffer R. Die Aetiologie der Influenza. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. 1893;13(1):357-86.
6. Thjötta T, Avery OT. Studies on Bacterial Nutrition : II. Growth Accessory Substances in the Cultivation Of Hemophilic Bacilli. J Exp Med. 1921;34(1):97-114.
7. Smith W, Andrewes CH, Laidlaw PP. A virus obtained from influenza patients. Lancet. 1933:66-8.
8. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd. Science. 1995;269(5223):496-512.
9. Kilian M. Genus III. Haemophilus Winslow, Bradhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 561 AL. Bergey's manual of systematic bacteriology: Springer; 2005. p. 883-904.
10. Adlam C, Rutter J. Pasteurella and pasteurellosis: Academic Press; 1989.
11. Burbach S. Reklassifizierung der Gattung Haemophilus Winslow et al. 1917 auf Grund der DNA-Basensequenzhomologie 1987.
12. Nørskov-Lauritsen N, Bruun B, Kilian M. Multilocus sequence phylogenetic study of the genus Haemophilus with description of Haemophilus pittmaniae sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2005;55(Pt 1):449-56.
13. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Haemophilus paraphrophilus and Haemophilus segnis as Aggregatibacter actinomycetemcomitans gen. nov., comb. nov., Aggregatibacter aphrophilus comb. nov. and Aggregatibacter segnis comb. nov., and emended description of Aggregatibacter aphrophilus to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56(Pt 9):2135-46.
14. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of Haemophilus and Aggregatibacter species with host specificity for humans. Clinical microbiology reviews. 2014;27(2):214-40.
15. Pittman M. Variation and Type Specificity in the Bacterial Species Hemophilus influenzae. J Exp Med. 1931;53(4):471-92.
16. Pittman M. The Action of type-specific Hemophilus influenzae Antiserum. J Exp Med. 1933;58(6):683-706.

17. Harris TM, Price EP, Sarovich DS, Nørskov-Lauritsen N, Beissbarth J, Chang AB, et al. Comparative genomic analysis identifies X-factor (haemin)-independent *Haemophilus haemolyticus*: a formal re-classification of 'Haemophilus intermedius'. *Microb Genom*. 2020;6(1).
18. Koch R. Bericht über die Thätigkeit der deutschen Cholerakommisionen in Aegypten und Ostindien. *Wien Med Wochenschr*. 1883;33:1548-51.
19. Pittman M, Davis DJ. Identification of the Koch-Weeks bacillus (*Hemophilus aegyptius*). *J Bacteriol*. 1950;59(3):413-26.
20. Carlone GM, Sottnek FO, Plikaytis BD. Comparison of outer membrane protein and biochemical profiles of *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae* biotype III. *J Clin Microbiol*. 1985;22(5):708-13.
21. Casin I, Grimont F, Grimont PA. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Haemophilus aegyptius* and *Haemophilus influenzae*. *Ann Inst Pasteur Microbiol*. 1986;137b(2):155-63.
22. Martel AY, Sottnek FO, Thomas ML, Albritton WL. Susceptibility of *Haemophilus aegyptius* to trooleandomycin: lack of taxonomic value. *Can J Microbiol*. 1986;32(4):289-93.
23. Nørskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. Delineation of the species *Haemophilus influenzae* by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. *J Bacteriol*. 2009;191(3):822-31.
24. Quentin R, Ruimy R, Rosenau A, Musser JM, Christen R. Genetic identification of cryptic genospecies of *Haemophilus* causing urogenital and neonatal infections by PCR using specific primers targeting genes coding for 16S rRNA. *J Clin Microbiol*. 1996;34(6):1380-5.
25. Hubbard ATM, Davies SEW, Baxter L, Thompson S, Collery MM, Hand DC, et al. Comparison of the first whole genome sequence of 'Haemophilus quentini' with two new strains of 'Haemophilus quentini' and other species of *Haemophilus*. *Genome*. 2018;61(5):379-85.
26. Bergey D, Harrison F, Breed R, Hammer B, Huntoon F. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1923.
27. Pittman M. A classification of the hemolytic bacteria of the genus *Haemophilus*: *Haemophilus haemolyticus* Bergey et al. and *Haemophilus parahaemolyticus* nov spec. *J Bacteriol*. 1953;65(6):750-1.
28. Kilian M. The haemolytic activity of *Haemophilus* species. *Acta Pathol Microbiol Scand B*. 1976;84b(6):339-41.
29. Fenger MG, Ridderberg W, Olesen HV, Nørskov-Lauritsen N. Low occurrence of 'non-haemolytic *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(7-8):315-9.
30. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol*. 1976;93(1):9-62.
31. McCrea KW, Xie J, LaCross N, Patel M, Mukundan D, Murphy TF, et al. Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. *J Clin Microbiol*. 2008;46(2):406-16.
32. Kilian M, Mestecky J, Schrohenloher RE. Pathogenic species of the genus *Haemophilus* and *Streptococcus pneumoniae* produce immunoglobulin A1 protease. *Infect Immun*. 1979;26(1):143-9.

33. Hedegaard J, Okkels H, Bruun B, Kilian M, Mortensen KK, Norskov-Lauritsen N. Phylogeny of the genus *Haemophilus* as determined by comparison of partial *infB* sequences. *Microbiology*. 2001;147(Pt 9):2599-609.
34. Munson EL, Doern GV. Comparison of three commercial test systems for biotyping *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):4051-3.
35. Sonksen UW, Christensen JJ, Nielsen L, Hesselbjerg A, Hansen DS, Bruun B. Fastidious Gram-Negatives: Identification by the Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* Card and by Partial 16S rRNA Gene Sequencing Analysis. *Open Microbiol J*. 2010;4:123-31.
36. Barbe G, Babolat M, Boeufgras JM, Monget D, Freney J. Evaluation of API NH, a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 1994;32(1):187-9.
37. Rennie RP, Brosnikoff C, Shokoples S, Reller LB, Mirrett S, Janda W, et al. Multicenter evaluation of the new Vitek 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2681-5.
38. Valenza G, Ruoff C, Vogel U, Frosch M, Abele-Horn M. Microbiological evaluation of the new VITEK 2 *Neisseria-Haemophilus* identification card. *J Clin Microbiol*. 2007;45(11):3493-7.
39. 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(1):93-103.
40. Binks MJ, Temple B, Kirkham LA, Wiertsema SP, Dunne EM, Richmond PC, et al. Molecular surveillance of true nontypeable *Haemophilus influenzae*: an evaluation of PCR screening assays. *PLoS One*. 2012;7(3):e34083.
41. Kirkham LA, Wiertsema SP, Mowe EN, Bowman JM, Riley TV, Richmond PC. Nasopharyngeal carriage of *Haemophilus haemolyticus* in otitis-prone and healthy children. *J Clin Microbiol*. 2010;48(7):2557-9.
42. Witherden EA, Kunde D, Tristram SG. PCR screening for the N526K substitution in isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Antimicrob Chemother*. 2013;68(10):2255-8.
43. Osman KL, Jefferies JMC, Woelk CH, Devos N, Pascal TG, Mortier MC, et al. Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease harbour a variation of *Haemophilus* species. *Sci Rep*. 2018;8(1):14734.
44. Hanage WP, Fraser C, Spratt BG. Fuzzy species among recombinogenic bacteria. *BMC Biol*. 2005;3:6.
45. Anderson R, Wang X, Briere EC, Katz LS, Cohn AC, Clark TA, et al. *Haemophilus haemolyticus* isolates causing clinical disease. *J Clin Microbiol*. 2012;50(7):2462-5.
46. Murphy TF, Brauer AL, Sethi S, Kilian M, Cai X, Lesse AJ. *Haemophilus haemolyticus*: a human respiratory tract commensal to be distinguished from *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis*. 2007;195(1):81-9.
47. Mukundan D, Ecevit Z, Patel M, Marrs CF, Gilsdorf JR. Pharyngeal colonization dynamics of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in healthy adult carriers. *J Clin Microbiol*. 2007;45(10):3207-17.
48. Hotomi M, Kono M, Togawa A, Arai J, Takei S, Ikeda Y, et al. *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* in tonsillar cultures of adults with acute pharyngotonsillitis. *Auris Nasus Larynx*. 2010;37(5):594-600.

49. Xie J, Juliao PC, Gilsdorf JR, Ghosh D, Patel M, Marrs CF. Identification of new genetic regions more prevalent in nontypeable *Haemophilus influenzae* otitis media strains than in throat strains. *J Clin Microbiol*. 2006;44(12):4316-25.
50. Norkov-Lauritsen N. Detection of cryptic genospecies misidentified as *Haemophilus influenzae* in routine clinical samples by assessment of marker genes *fucK*, *hap*, and *sodC*. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2590-2.
51. Cardines R, Daprai L, Giufre M, Torresani E, Garlaschi ML, Cerquetti M. Genital carriage of the genus *Haemophilus* in pregnancy: species distribution and antibiotic susceptibility. *J Med Microbiol*. 2015;64(7):724-30.
52. Kilian M, Heine-Jensen J, Bülow P. *Haemophilus* in the upper respiratory tract of children. A bacteriological, serological and clinical investigation. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1972;80(4):571-8.
53. Ingvarsson L, Lundgren K, Ursing J. The Bacterial Flora in the Nasopharynx in Healthy Children. *Acta Oto-Laryngologica*. 1982;93(sup386):94-6.
54. Ortiz-Romero MDM, Espejo-García MP, Alfayate-Miguel S, Ruiz-López FJ, Zapata-Hernandez D, Gonzalez-Pacanowska AJ. Epidemiology of Nasopharyngeal Carriage by *Haemophilus influenzae* in Healthy Children: A Study in the Mediterranean Coast Region. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(10):919-23.
55. Yang P, Zhang J, Peng A. The pharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* among healthy population in China: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):547.
56. Dunne EM, Murad C, Sudigdoadi S, Fadlyana E, Tarigan R, Indriyani SAK, et al. Carriage of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Staphylococcus aureus* in Indonesian children: A cross-sectional study. *PloS one*. 2018;13(4):e0195098-e.
57. Drayß M, Claus H, Hubert K, Thiel K, Berger A, Sing A, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, Group A *Streptococcus* and *Staphylococcus aureus* among adults aged 65 years and older. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212052.
58. Murphy TF. Respiratory infections caused by non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Curr Opin Infect Dis*. 2003;16(2):129-34.
59. St Geme JW, 3rd. The pathogenesis of nontypable *Haemophilus influenzae* otitis media. *Vaccine*. 2000;19 Suppl 1:S41-50.
60. Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(3):266-72.
61. Wang Z, Maschera B, Lea S, Kolsum U, Michalovich D, Van Horn S, et al. Airway host-microbiome interactions in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res*. 2019;20(1):113.
62. Gilligan PH. Microbiology of airway disease in patients with cystic fibrosis. *Clinical microbiology reviews*. 1991;4(1):35-51.
63. Trollfors B, Nylén O, Strangert K. Acute epiglottitis in children and adults in Sweden 1981-3. *Arch Dis Child*. 1990;65(5):491-4.
64. Baird SM, Marsh PA, Padiglione A, Trubiano J, Lyons B, Hays A, et al. Review of epiglottitis in the post *Haemophilus influenzae* type-b vaccine era. *ANZ J Surg*. 2018;88(11):1135-40.
65. Turk DC. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol*. 1984;18(1):1-16.

66. Murphy TV, Clements JF, Petroni M, Coury S, Stetler L. Haemophilus influenzae type b in respiratory secretions. *Pediatr Infect Dis J.* 1989;8(3):148-51.
67. Hosuru Subramanya S, Thapa S, Dwedi SK, Gokhale S, Sathian B, Nayak N, et al. Streptococcus pneumoniae and Haemophilus species colonization in health care workers: the launch of invasive infections? *BMC Res Notes.* 2016;9:66.
68. Lãm TT, Vogel U. Haemophilus. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 283-6.
69. Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg li K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, et al. Non-typeable Haemophilus influenzae adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol.* 2000;37(1):13-27.
70. van Alphen L, Geelen-van den Broek L, Blaas L, van Ham M, Dankert J. Blocking of fimbria-mediated adherence of Haemophilus influenzae by sialyl gangliosides. *Infect Immun.* 1991;59(12):4473-7.
71. Kubiet M, Ramphal R, Weber A, Smith A. Pilus-mediated adherence of Haemophilus influenzae to human respiratory mucins. *Infection and immunity.* 2000;68(6):3362-7.
72. Virkola R, Brummer M, Rauvala H, van Alphen L, Korhonen TK. Interaction of fimbriae of Haemophilus influenzae type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. *Infection and immunity.* 2000;68(10):5696-701.
73. St Geme JW, 3rd. Insights into the mechanism of respiratory tract colonization by nontypeable Haemophilus influenzae. *Pediatr Infect Dis J.* 1997;16(10):931-5.
74. St Geme JW, 3rd, Kumar VV, Cutter D, Barenkamp SJ. Prevalence and distribution of the hmw and hia genes and the HMW and Hia adhesins among genetically diverse strains of nontypeable Haemophilus influenzae. *Infect Immun.* 1998;66(1):364-8.
75. Post JC. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. 2001. *Laryngoscope.* 2015;125(9):2003-14.
76. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *Jama.* 2002;287(13):1710-5.
77. Webster P, Wu S, Gomez G, Apicella M, Plaut AG, St Geme JW, 3rd. Distribution of bacterial proteins in biofilms formed by non-typeable Haemophilus influenzae. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(7):829-42.
78. Unal CM, Singh B, Fleury C, Singh K, Chávez de Paz L, Svensäter G, et al. QseC controls biofilm formation of non-typeable Haemophilus influenzae in addition to an AI-2-dependent mechanism. *Int J Med Microbiol.* 2012;302(6):261-9.
79. Vogel AR, Szelestey BR, Raffel FK, Sharpe SW, Gearing RL, Justice SS, et al. SapF-mediated heme-iron utilization enhances persistence and coordinates biofilm architecture of Haemophilus. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:42.
80. Brown MR, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J Appl Bacteriol.* 1993;74 Suppl:87s-97s.
81. Gallaher TK, Wu S, Webster P, Aguilera R. Identification of biofilm proteins in non-typeable Haemophilus Influenzae. *BMC Microbiol.* 2006;6:65.

82. Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol.* 2007;15(8):355-62.
83. Murphy TF, Kirkham C. Biofilm formation by nontypeable *Haemophilus influenzae*: strain variability, outer membrane antigen expression and role of pili. *BMC Microbiol.* 2002;2:7.
84. Grundy FJ, Plaut AG, Wright A. Localization of the cleavage site specificity determinant of *Haemophilus influenzae* immunoglobulin A1 protease genes. *Infect Immun.* 1990;58(2):320-31.
85. Devenyi AG, Plaut AG, Grundy FJ, Wright A. Post-infectious human serum antibodies inhibit IgA1 proteinases by interaction with the cleavage site specificity determinant. *Mol Immunol.* 1993;30(14):1243-8.
86. Qiu J, Brackee GP, Plaut AG. Analysis of the specificity of bacterial immunoglobulin A (IgA) proteases by a comparative study of ape serum IgAs as substrates. *Infect Immun.* 1996;64(3):933-7.
87. Alexander HE, Leidy G. Induction of heritable new type in type specific strains of *H. influenzae*. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1951;78(2):625-6.
88. Goodgal SH, Herriott RM. Studies on transformations of *Haemophilus influenzae*. I. Competence. *J Gen Physiol.* 1961;44(6):1201-27.
89. Bijlmer HA. World-wide epidemiology of *Haemophilus influenzae* meningitis; industrialized versus non-industrialized countries. *Vaccine.* 1991;9 Suppl:S5-9; discussion S25.
90. Nationales Referenzzentrum für Meningokokken und *Haemophilus influenzae* (NRZMHI) 2020. Berichte *H. influenzae*, <https://www.hygiene.uni-wuerzburg.de/meningococcus/startseite/berichte/berichte-h-influenzae/>.
91. Robert Koch-Institut. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019, Berlin 2020.100-4.
92. Schranz M, Ullrich A, Rexroth U, Hamouda O, Schaade L, Diercke M, et al. Die Auswirkungen der COVID-19-Pandemie und assoziierter PublicHealth-Maßnahmen auf andere meldepflichtige Infektionskrankheiten in Deutschland. *Epid Bull.* 2021; 2021;7:3-7.
93. European Centre for Disease Prevention and Control. *Haemophilus influenzae*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017. Stockholm: ECDC; 2019.
94. Van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(12):1281-92.
95. Bundesministerium Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz, *Haemophilus influenzae* Typ B, 2020 <https://www.sozialministerium.at/Themen/Gesundheit/Uebertragbare-Krankheiten/Infektionskrankheiten-A-Z/Haemophilus-influenzae-Typ-B.html>, .
96. Rosenstein NE, Perkins BA. Update on *Haemophilus influenzae* serotype b and meningococcal vaccines. *Pediatr Clin North Am.* 2000;47(2):337-52, vi.
97. McIntyre PB, O'Brien KL, Greenwood B, van de Beek D. Effect of vaccines on bacterial meningitis worldwide. *Lancet.* 2012;380(9854):1703-11.
98. Watt JP, Chen S, Santosham M. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine: review of observational data on long term vaccine impact to inform recommendations for vaccine schedules. Report for World Health Organization. 2012.
99. Morris SK, Moss WJ, Halsey N. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine use and effectiveness. *Lancet Infect Dis.* 2008;8(7):435-43.

100. Martin NG, Sadarangani M, Pollard AJ, Goldacre MJ. Hospital admission rates for meningitis and septicaemia caused by *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, and *Streptococcus pneumoniae* in children in England over five decades: a population-based observational study. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(5):397-405.
101. World Health Organization. *Haemophilus influenzae* type B (Hib) Vaccination Position Paper - September 2013.
102. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, Käyhty H, Nissinen A, Pekkanen E, et al. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine. *J Infect Dis.* 1991;164(5):982-6.
103. Shrestha RG, Tandukar S, Ansari S, Subedi A, Shrestha A, Poudel R, et al. Bacterial meningitis in children under 15 years of age in Nepal. *BMC Pediatr.* 2015;15:94.
104. Zaidi AK, Khan H, Sherali AR, Lasi R. Burden of *Haemophilus influenzae* type b disease in Pakistani children. *East Mediterr Health J.* 2010;16(6):590-4.
105. Shenoy PA, Chawla K, Vishwanath S, Shaw D. Microbiological Characterization of *Haemophilus influenzae* Isolated from Patients with Lower Respiratory Tract Infections in a Tertiary Care Hospital, South India. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(5):Dc31-4.
106. Takla A, Schönfeld V, Claus H, Krone M, An der Heiden M, Koch J, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* Infections in Germany After the Introduction of Routine Childhood Immunization, 2001-2016. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(10):ofaa444.
107. Kalies H, Siedler A, Gröndahl B, Grote V, Milde-Busch A, Kries Rv. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany: impact of non-type b serotypes in the post-vaccine era. Robert Koch-Institut; 2009.
108. Ladhani S, Slack MP, Heath PT, von Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(3):455-63.
109. Centers for Disease Control and Prevention. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, *Haemophilus influenzae* 2017.
110. Murphy TF. Vaccines for Nontypeable *Haemophilus influenzae*: the Future Is Now. *Clin Vaccine Immunol.* 2015;22(5):459-66.
111. Musser JM, Barenkamp SJ, Granoff DM, Selander RK. Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Infect Immun.* 1986;52(1):183-91.
112. Musser JM, Kroll JS, Granoff DM, Moxon ER, Brodeur BR, Campos J, et al. Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis.* 1990;12(1):75-111.
113. LaCross NC, Marrs CF, Gilsdorf JR. Population structure in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol.* 2013;14:125-36.
114. Hua C-Z, Hu W-L, Shang S-Q, Li J-P, Hong L-Q, Yan J. Serum Concentrations of Antibodies against Outer Membrane Protein P6, Protein D, and T- and B-Cell Combined Antigenic Epitopes of Nontypeable *Haemophilus influenzae* in Children and Adults of Different Ages. *Clinical and vaccine immunology : CVI.* 2015;23(2):155-61.

115. Poolman JT, Bakaletz L, Cripps A, Denoel PA, Forsgren A, Kyd J, et al. Developing a nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) vaccine. *Vaccine*. 2000;19 Suppl 1:S108-15.
116. Prymula R, Schuerman L. 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* PD conjugate vaccine: Synflorix. *Expert Rev Vaccines*. 2009;8(11):1479-500.
117. van den Bergh MR, Spijkerman J, Swinnen KM, François NA, Pascal TG, Borys D, et al. Effects of the 10-valent pneumococcal nontypeable *Haemophilus influenzae* protein D-conjugate vaccine on nasopharyngeal bacterial colonization in young children: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis*. 2013;56(3):e30-9.
118. Teo E, House H, Lockhart K, Purchuri SN, Pushparajah J, Cripps AW, et al. *Haemophilus influenzae* oral vaccination for preventing acute exacerbations of chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014(9):Cd010010.
119. Theodore MJ, Anderson RD, Wang X, Katz LS, Vuong JT, Bell ME, et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1422-4.
120. Wang X, Mair R, Hatcher C, Theodore MJ, Edmond K, Wu HM, 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(4):303-9.
121. Price EP, Sarovich DS, Nosworthy E, Beissbarth J, Marsh RL, Pickering J, et al. *Haemophilus influenzae*: using comparative genomics to accurately identify a highly recombinogenic human pathogen. *BMC Genomics*. 2015;16:641.
122. Hu F, Rishishwar L, Sivadas A, Mitchell GJ, Jordan IK, Murphy TF, et al. Comparative Genomic Analysis of *Haemophilus haemolyticus* and Nontypeable *Haemophilus influenzae* and a New Testing Scheme for Their Discrimination. *J Clin Microbiol*. 2016;54(12):3010-7.
123. Tian GZ, Zhang LJ, Wang XL, Zhang L, Li SF, Gu CM, et al. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in nasopharyngeal swabs by multiplex PCR. *Biomed Environ Sci*. 2012;25(3):367-71.
124. Meats E, Feil EJ, Stringer S, Cody AJ, Goldstein R, Kroll JS, et al. Characterization of encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae* and determination of phylogenetic relationships by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2003;41(4):1623-36.
125. Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(11):1614-9.
126. Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(11):1604-13.
127. Eigner U, Holfelder M, Oberdorfer K, Betz-Wild U, Bertsch D, Fahr AM. Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory. *Clin Lab*. 2009;55(7-8):289-96.
128. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) –Ständige Kommission Leitlinien 2021. *S3-Leitlinie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener*

- Pneumonie und Prävention*. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-020I_S3_Behandlung-von-erwachsenen-Patienten-mit-ambulant-erworbener-Pneumonie__2021-05.pdf.
129. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) –Ständige Kommission Leitlinien 2021. *S2k-Leitlinie: Ambulant erworbene bakterielle (eitrige) Meningoenzephalitis im Erwachsenenalter*. https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-089I_S2k_Ambulant_erworbene_Meningoenzephalitis_2016-08-abgelaufen.pdf.
 130. van de Beek D, Cabellos C, Dzupova O, Esposito S, Klein M, Kloek AT, et al. ESCMID guideline: diagnosis and treatment of acute bacterial meningitis. *Clin Microbiol Infect*. 2016;22 Suppl 3:S37-62.
 131. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med*. 2017;45(3):486-552.
 132. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) –Ständige Kommission Leitlinien. *S3-Leitlinie: Sepsis - Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge*. 2018.
 133. Thornsberry C, Kirven LA. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for beta-lactamase production. *Antimicrob Agents Chemother*. 1974;6(5):653-4.
 134. Williams JD, Kattan S, Cavanagh P. Letter: Penicillinase production by *Haemophilus influenzae*. *Lancet*. 1974;2(7872):103.
 135. Bell SM, Plowman D. Mechanisms of ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* from respiratory tract. *Lancet*. 1980;1(8163):279-80.
 136. Markowitz SM. Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980;17(1):80-3.
 137. Sykes RB, Matthew M, O'Callaghan CH. R-factor mediated beta-lactamase production by *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol*. 1975;8(3):437-41.
 138. Rubin LG, Medeiros AA, Yolken RH, Moxon ER. Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitis due to novel beta-lactamase. *Lancet*. 1981;2(8254):1008-10.
 139. Slack MP, Wheldon DB, Turk DC. A rapid test for beta-lactamase production by *Haemophilus influenzae*. *Lancet*. 1977;2(8044):906.
 140. 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(1):39-46.
 141. 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 beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(6):1693-9.
 142. Hotomi M, Fujihara K, Billal DS, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, et al. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(11):3969-76.
 143. World Health Organization 2017. *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*.

https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf.

144. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2208-18.
145. Garcia-Cobos S, Campos J, Lazaro E, Roman F, Cercenado E, Garcia-Rey C, et al. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2564-73.
146. Skaare D, Anthonisen IL, Kahlmeter G, Matuschek E, Natas 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*. 2014;19(49).
147. Osaki Y, Sanbongi Y, Ishikawa M, Kataoka H, Suzuki T, Maeda K, et al. Genetic approach to study the relationship between penicillin-binding protein 3 mutations and *Haemophilus influenzae* beta-lactam resistance by using site-directed mutagenesis and gene recombinants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(7):2834-9.
148. Mizoguchi A, Hitomi S. Cefotaxime-non-susceptibility of *Haemophilus influenzae* induced by additional amino acid substitutions of G555E and Y557H in altered penicillin-binding protein 3. *J Infect Chemother*. 2019;25(7):509-13.
149. Nürnberg S, Claus H, Krone M, Vogel U, Lâm TT. Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016-19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(4):920-9.
150. Cherkaoui A, Diene SM, Renzoni A, Emonet S, Renzi G, Francois P, et al. Imipenem heteroresistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* is linked to a combination of altered PBP3, slow drug influx and direct efflux regulation. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(2):118 e9- e19.
151. Seyama S, Wajima T, Nakaminami H, Noguchi N. Clarithromycin Resistance Mechanisms of Epidemic β -Lactamase-Nonproducing Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* Strains in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(5):3207-10.
152. Andersson DI, Nicoloff H, Hjort K. Mechanisms and clinical relevance of bacterial heteroresistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2019;17(8):479-96.
153. Machado D, Antunes J, Simões A, Perdigão J, Couto I, McCusker M, et al. Contribution of efflux to colistin heteroresistance in a multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *J Med Microbiol*. 2018;67(6):740-9.
154. Ikonomidis A, Tsakris A, Kantzanou M, Spanakis N, Maniatis AN, Pournaras S. Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett*. 2008;279(1):36-9.
155. Alexander HE, Leidy G. Mode of Action of Streptomycin on Type b *H. influenzae* : I. Origin of Resistant Organisms. *The Journal of experimental medicine*. 1947;85(4):329-38.

156. 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(9):3155-61.
157. Nicoloff H, Hjort K, Levin BR, Andersson DI. The high prevalence of antibiotic heteroresistance in pathogenic bacteria is mainly caused by gene amplification. *Nat Microbiol*. 2019;4(3):504-14.
158. Deghmane AE, Hong E, Chehboub S, Terrade A, Falguieres M, Sort M, et al. High diversity of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of *ftsI* gene. *J Infect*. 2019;79(1):7-14.
159. Cherkaoui A, Diene SM, Emonet S, Renzi G, Francois P, Schrenzel J. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in Geneva: serotype, antimicrobial susceptibility, and beta-lactam resistance mechanisms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015;34(10):1937-45.
160. Wang HJ, Wang CQ, Hua CZ, Yu H, Zhang T, Zhang H, et al. Antibiotic Resistance Profiles of *Haemophilus influenzae* Isolates from Children in 2016: A Multicenter Study in China. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2019;2019:6456321.
161. Kakuta R, Yano H, Hidaka H, Kanamori H, Endo S, Ichimura S, et al. Molecular Epidemiology of Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* Causing Acute Otitis Media in Japanese Infants and Young Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35(5):501-6.
162. Garcia-Cobos S, Arroyo M, Perez-Vazquez M, Aracil B, Lara N, Oteo J, et al. Isolates of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing invasive infections in Spain remain susceptible to cefotaxime and imipenem. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(1):111-6.
163. Cardines R, Giufrè M, Pompilio A, Fiscarelli E, Ricciotti G, Di Bonaventura G, et al. *Haemophilus influenzae* in children with cystic fibrosis: antimicrobial susceptibility, molecular epidemiology, distribution of adhesins and biofilm formation. *Int J Med Microbiol*. 2012;302(1):45-52.
164. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
165. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-Ninth Edition*: M100. 2019.
166. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Cefotaxime: Rationale for the clinical breakpoints. Version 1.0, 2010. <http://www.eucast.org>.
167. Rivers T. Influenza-like bacilli. Growth of influenza-like bacilli on media containing only an autoclave-labile substance as an accessory food factor. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1922;33:429-31.
168. Gram C. Ueber die isolierte Faerbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpreparaten. *Fortschritte der Medicin*. 1884;2:185-9.
169. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 1956;178(4535):703.
170. van Ketel RJ, de Wever B, van Alphen L. Detection of *Haemophilus influenzae* in cerebrospinal fluids by polymerase chain reaction DNA amplification. *J Med Microbiol*. 1990;33(4):271-6.

171. Zhou J, Law DK, Sill ML, Tsang RS. Nucleotide sequence diversity of the *bexA* gene in serotypeable *Haemophilus influenzae* strains recovered from invasive disease patients in Canada. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1996-9.
172. Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(10):2382-6.
173. Lam TT, Elias J, Frosch M, Vogel U, Claus H. New diagnostic PCR for *Haemophilus influenzae* serotype e based on the *cap* locus of strain ATCC 8142. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(2):176-9.
174. Schouls LM, van der Ende A, van de Pol I, Schot C, Spanjaard L, Vauterin P, et al. Increase in genetic diversity of *Haemophilus influenzae* serotype b (Hib) strains after introduction of Hib vaccination in The Netherlands. *Journal of clinical microbiology.* 2005;43(6):2741-9.
175. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35(6):1547-9.
176. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* 2006;23(2):254-67.
177. National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2020; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
178. Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* 2008;18(5):821-9.
179. Jünemann S, Sedlazeck FJ, Prior K, Albersmeier A, John U, Kalinowski J, et al. Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat Biotechnol.* 2013;31(4):294-6.
180. AbdulWahab A, Taj-Aldeen SJ, Ibrahim EB, Talaq E, Abu-Madi M, Fotedar R. Discrepancy in MALDI-TOF MS identification of uncommon Gram-negative bacteria from lower respiratory secretions in patients with cystic fibrosis. *Infect Drug Resist.* 2015;8:83-8.
181. Levesque S, Dufresne PJ, Soualhine H, Domingo MC, Bekal S, Lefebvre B, et al. A Side by Side Comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: Utility of MALDI-TOF MS Technology for Microorganism Identification in a Public Health Reference Laboratory. *PLoS One.* 2015;10(12):e0144878.
182. Zhu B, Xiao D, Zhang H, Zhang Y, Gao Y, Xu L, et al. MALDI-TOF MS distinctly differentiates nontypable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *PLoS One.* 2013;8(2):e56139.
183. Porte L, Garcia P, Braun S, Ulloa MT, Lafourcade M, Montana A, et al. Head-to-head comparison of Microflex LT and Vitek MS systems for routine identification of microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry in Chile. *PLoS One.* 2017;12(5):e0177929.
184. Jamal WY, Ahmad S, Khan ZU, Rotimi VO. Comparative evaluation of two matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) systems for the identification of clinically significant yeasts. *Int J Infect Dis.* 2014;26:167-70.
185. Dubois D, Grare M, Prere MF, Segonds C, Marty N, Oswald E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2568-76.

186. Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N. Can the Etest correctly determine the MICs of beta-lactam and cephalosporin antibiotics for beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*? *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3463-4.
187. Tristram SG. A comparison of Etest, M.I.C.Evaluator strips and CLSI broth microdilution for determining {beta}-lactam antimicrobial susceptibility in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1464-6.
188. Cherkaoui A, Gaia N, Baud D, Leo S, Fischer A, Ruppe E, et al. Molecular characterization of fluoroquinolones, macrolides, and imipenem resistance in *Haemophilus influenzae*: analysis of the mutations in QRDRs and assessment of the extent of the AcrAB-TolC-mediated resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2018;37(11):2201-10.
189. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
190. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 10.0, 2020. <http://www.eucast.org>.
191. QGIS Development Team 2020. *QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project.* <http://qgis.osgeo.org>.
192. Michael Minn 2020. *mmqgis.* <http://michaelminn.com/linux/mmqgis>.
193. OpenStreetMap 2020. *Map data copyrighted OpenStreetMap contributors.* <https://www.openstreetmap.org>.
194. [suche-postleitzahl.org](https://www.suche-postleitzahl.org) 2020. <https://www.suche-postleitzahl.org/plz-karte-erstellen>.
195. Nürnberg S, Claus H, Krone M, Vogel U, Lâm TT. Discriminative Potential of the Vitek MS In Vitro Diagnostic Device Regarding *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 2020;58(9).
196. Lâm TT, Nürnberg S, Claus H, Vogel U. Molecular epidemiology of imipenem resistance in invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany in 2016. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(8):2076-86.
197. Powell EA, Blecker-Shelly D, Montgomery S, Mortensen JE. Application of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of the fastidious pediatric pathogens *Aggregatibacter*, *Eikenella*, *Haemophilus*, and *Kingella*. *J Clin Microbiol.* 2013;51(11):3862-4.
198. Broyer P, Perrot N, Rostaing H, Blaze J, Pinston F, Gervasi G, et al. An Automated Sample Preparation Instrument to Accelerate Positive Blood Cultures Microbial Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry (Vitek((R))MS). *Front Microbiol.* 2018;9:911.
199. Lopez-Fabal MF, Gomez-Garces JL, Lopez-Hontangas JL, Sanz N, Munoz C, Regodon M. Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identifying respiratory bacterial pathogens: a fast and efficient method. *Rev Esp Quimioter.* 2015;28(5):242-6.
200. Zhang B, Kunde D, Tristram S. *Haemophilus haemolyticus* is infrequently misidentified as *Haemophilus influenzae* in diagnostic specimens in Australia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;80(4):272-3.
201. Frickmann H, Podbielski A, Essig A, Schwarz NG, Zautner AE. Difficulties in species identification within the genus *Haemophilus* - A pilot study addressing a significant problem for routine diagnostics. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2014;4(2):99-105.

202. Hinz R, Zautner AE, Hagen RM, Frickmann H. Difficult identification of *Haemophilus influenzae*, a typical cause of upper respiratory tract infections, in the microbiological diagnostic routine. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*. 2015;5(1):62-7.
203. Lam 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(7):748-55.
204. Bruin JP, Kostrzewa M, van der Ende A, Badoux P, Jansen R, Boers SA, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(2):279-84.
205. Chen JHK, Cheng VCC, Wong CP, Wong SCY, Yam WC, Yuen KY. Rapid Differentiation of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry with ClinProTools Mass Spectrum Analysis. *J Clin Microbiol*. 2017;55(9):2679-85.
206. Frickmann H, Christner M, Donat M, Berger A, Essig A, Podbielski A, et al. Rapid discrimination of *Haemophilus influenzae*, *H. parainfluenzae*, and *H. haemolyticus* by fluorescence in situ hybridization (FISH) and two matrix-assisted laser-desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) platforms. *PLoS One*. 2013;8(4):e63222.
207. Heudorf U, Hausemann A. [Surveillance of antibiotic consumption- a new task for public health services : Data from Frankfurt's hospitals between 2012 and 2014]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2016;59(10):1351-9.
208. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial consumption in the EU/EEA, annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC. 2019.
209. Kitaoka K, Kimura K, Kitanaka H, Banno H, Jin W, Wachino JI, et al. Carbapenem-Nonsusceptible *Haemophilus influenzae* with Penicillin-Binding Protein 3 Containing an Amino Acid Insertion. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(8):e00671-18.
210. Skaare D, Allum AG, Anthonisen IL, Jenkins A, Lia A, Strand L, et al. Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein-mediated beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(8):1117-24.
211. Pérez-Vázquez M, Román F, García-Cobos S, Campos J. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(4):1566-9.
212. Heliodoro CIM, Bettencourt CR, Bajanca-Lavado MP, Portuguese Group for the Study of *Haemophilus influenzae* invasive i. Molecular epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease in Portugal: an update of the post-vaccine period, 2011–2018. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2020;39(8):1471-80.
213. McElligott M, Meyler K, Bennett D, Mulhall R, Drew RJ, Cunney R. Epidemiology of *Haemophilus influenzae* in the Republic of Ireland, 2010-2018. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020:2335–44.

214. Potts CC, Topaz N, Rodriguez-Rivera LD, Hu F, Chang HY, Whaley MJ, et al. Genomic characterization of *Haemophilus influenzae*: a focus on the capsule locus. *BMC Genomics*. 2019;20(1):733.

7 Anhang

Tabelle 17: Eigenschaften der durch das VITEK MS® IVD getesteten *H. haemolyticus*-Isolate.
Angegeben sind die klinische Herkunft, die Ergebnisse der molekulargenetischen Tests (N – negativ) und die durch das VITEK MS® IVD angegebene Spezies mit dem entsprechenden Konfidenzwert. No ID – keine Identifikation.
Entspricht Table 1 aus Nürnberg et al. 2020: Discriminative Potential of the Vitek MS In Vitro Diagnostic Device Regarding *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* (195).
(Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

Isolat- Nr.	Klinische Herkunft	Molekulargenetische Tests				VITEK MS-Ergebnisse	
		ompP2	fucK	ompP6	Spezies (Referenzmethode)	Konfidenzwert und Identifizierung	
						1. Messspot	2. Messspot
H2172	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2518	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2757	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2761	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2778	Trachealsekret	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2883	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2922	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H1148	Blood	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	No ID
H1530	Blood	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	52.8 <i>H. haemolyticus</i> ; 47.1 <i>H. influenzae</i>
H2263	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	57.5 <i>H. haemolyticus</i> ; 42.4 <i>H. influenzae</i>
H2433	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	52.8 <i>H. haemolyticus</i> ; 47.1 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2588	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	53.4 <i>H. haemolyticus</i> ; 46.5 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2589	Trachealsekret	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.7 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.2 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2872	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	99.0 <i>H. influenzae</i>
H2934	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	No ID	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H3035	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.4 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H3045	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	50.2 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.7 <i>H. influenzae</i>

Isolat- Nr.	Klinische Herkunft	Molekulargenetische Tests				VITEK MS-Ergebnisse	
		ompP2	fucK	ompP6	Spezies (Referenzmethode)	Konfidenzwert und Identifizierung	
						1. Messspot	2. Messspot
H3470	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>	53.5 <i>H. haemolyticus</i> ; 46.4 <i>H. influenzae</i>
LNP30497	Vaginalabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	45.5 <i>H. influenzae</i> ; 54.4 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. haemolyticus</i>
H1495	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.3 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.6 <i>H. influenzae</i>	53.6 <i>H. haemolyticus</i> ; 46.6 <i>H. influenzae</i>
H1613	Blood	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> , 49.9 <i>H. influenzae</i>	56.6 <i>H. haemolyticus</i> ; 43.3 <i>H. influenzae</i>
H2121	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.1 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.8 <i>H. influenzae</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.9 <i>H. influenzae</i>
H2129	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	51.2 <i>H. haemolyticus</i> ; 48.7 <i>H. influenzae</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.9 <i>H. influenzae</i>
H2735	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. influenzae</i> ; 49.9 <i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. influenzae</i> ; 49.9 <i>H. haemolyticus</i>
H2943	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	52.8 <i>H. haemolyticus</i> ; 47.1 <i>H. influenzae</i>	54.9 <i>H. haemolyticus</i> ; 45.0 <i>H. influenzae</i>
H2947	Trachealsekret	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 50.0 <i>H. influenzae</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.9 <i>H. influenzae</i>
H3050	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.9 <i>H. influenzae</i>	50.0 <i>H. influenzae</i> ; 49.9 <i>H. haemolyticus</i>
H3659	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. influenzae</i> ; 50.0 <i>H. haemolyticus</i>	49.9 <i>H. influenzae</i> ; 50.0 <i>H. haemolyticus</i>
H2288	Blood	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2297	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	96.7 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2299	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	61.5 <i>H. influenzae</i>	No ID
H2300	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2311	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	No ID	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2317	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. parainfluenzae</i>	99.9 <i>H. parainfluenzae</i>
H2331	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	49.9 <i>H. haemolyticus</i> ; 50.0 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2347	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	94.8 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2498	Blood	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	96.0 <i>H. influenzae</i>	No ID
H2645	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	49.6 <i>H. influenzae</i> ; 50.3 <i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2722	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2822	Sputum	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	45.1 <i>H. influenzae</i> ; 54.8 <i>H. haemolyticus</i>	99.6 <i>H. influenzae</i>
H2939	Trachealsekret	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H2944	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>

Isolat- Nr.	Klinische Herkunft	Molekulargenetische Tests				VITEK MS-Ergebnisse	
		ompP2	fucK	ompP6	Spezies (Referenzmethode)	Konfidenzwert und Identifizierung	
						1. Messspot	2. Messspot
H2946	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.3 <i>H. haemolyticus</i> ; 49.6 <i>H. influenzae</i>	99.4 <i>H. influenzae</i>
H2961	Trachealsekret	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H3386	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>
H3622	Rachenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	50.0 <i>H. haemolyticus</i> ; 50.0 <i>H. influenzae</i>	99.7 <i>H. influenzae</i>
LNP29052	Augenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	91.0 <i>H. influenzae</i>	60.9 <i>H. influenzae</i>
LNP29248	Bronchoalveoläre Lavage	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	97.0 <i>H. influenzae</i>	No ID
LNP29731	Augenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	No ID	83.8 <i>H. influenzae</i>
LNP30199	Augenabstrich	N	N	<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. haemolyticus</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>	99.9 <i>H. influenzae</i>

Tabelle 18: Eigenschaften der *H. influenzae*-Isolate für die Untersuchung der Imipenem-Resistenz. Angegeben sind die klinische Herkunft, die GAD-Ergebnisse für Ampicillin (AMP), Amoxicillin + Clavulansäure (AMC), Meropenem (MER), Cefotaxim (CTX) und Imipenem (IMP (GAD)) sowie die BMD-Ergebnisse für Imipenem (IMP (BMD)). Außerdem sind der entsprechende Phänotyp und Sequenztyp sowie Veränderungen im PBP3 und AcrR angegeben. Die PBP3-Veränderungen sind zum einen als Einteilung in die verschiedenen PBP3-Gruppen und zum anderen als Einbuchstabencode dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuren beziehungsweise Aminosäuresubstitutionen und deren Position in der Aminosäuresequenz des Referenzstamms RD KW20 sind die Folgenden: D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, I449V, G490E, A502T, A502V, R517H, N526K. Entspricht Table 1 aus Lâm et al. 2020: Molecular epidemiology of imipenem resistance in invasive *H. influenzae* in Germany 2016 (196).
(Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

Isolat	Herkunft	AMP	AMC	MER	CTX	IMP (GAD)	IMP (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	acrR	ST
H2754	Blut	1.5			0.38	0.5	1	BLNAR	NSISLIGVRK	Iib	L31H	n.d.
H3106	Blut	0.5		0.016	0.016	3	4	BLNAS	DSMSLVGARK	Iid	L31H, I121V	183
H3043	Blut	16	1	0.19	0.023	3	1	BLPAR	NSMSLIGARN	WT	WT	183
H2876	Blut	1.5		0.38	0.047	3	1	BLNAR	DSMSLIGARN		S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	388
H2686	Blut	1		0.38	0.094	3	1	BLNAS	NSMSLIEARK	Ila	L31H, I121V	1202
H2540	Blut	2		0.25	0.094	3	0.5	BLNAR	NSMSLIGTRK	Iib	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1889
H2848	Blut	256	3	0.25	0.032	4	4	BLPACR	NSISLIGVRK	Iib	L31H, I121V	14
H2528	Blut	0.75		0.19	0.047	4	1	BLNAS	NSMSLIEARK	Ila	L31H, I121V	14
H3099	Blut	1		0.25	0.064	4	1	BLNAS	NSMSLIEARK	Ila	L31H, I121V	14
H2888	Blut	1		0.064	0.094	4	2	BLNAS	NSISLIGVRK	Iib	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	107
H2743	Blut	1.5		0.094	0.094	4	2	BLNAR	NSISLIGVRK	Iib	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	165

Isolat	Herkunft	AMP	AMC	MER	CTX	IMP (GAD)	IMP (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	acrR	ST
H2980	Blut	1.5		0.094	0.094	4	2	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	422
H2802	Blut	0.75		0.047	0.125	4	4	BLNAS	DNMSLIGVRK	IIb	L31H, K51X (Stop A151X)	1034
H2744	Blut	1		0.125	0.125	4	2	BLNAS	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1034
H2684	Blut	1.5		0.19	0.125	4	1	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1891
H2629	Blut	0.75		0.125	0.032	6	4	BLNAS	DSMSLIGARK	IIa	L31H, I121V	34
H2877	Blut	3	3	0.25	0.047	6	1	BLPACR	NSISLIEVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	85
H3041	Blut	0.38		0.19	0.047	6	1	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	107
H2880	Blut	1		0.125	0.047	6	2	BLNAS	DSMSLIGVRK	IIb	L31H, I121V	107
H2793	Blut	1		0.38	0.047	6	1	BLNAS	NSISLIEVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	203
H2841	Blut	1.5		0.38	0.047	6	1	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	203
H2703	Blut	0.75		0.19	0.064	6	0.5	BLNAS	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	203
H2845	Blut	0.75		0.19	0.064	6	1	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	1034
H2766	Blut	1.5		0.94	0.094	6	4	BLNAR	NSISLIGVHN	I	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1882
H3053	Blut	0.5		0.19	0.064	8	0.5	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	14
H2623	CSF	0.75		0.25	0.064	8	1	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	14
H2738	Blut	1.5		0.19	0.064	8	4	BLNAR	NSMSLIGTRK	IIc	L31H, I121V, Q107X (Stop C319T)	107

Isolat	Herkunft	AMP	AMC	MER	CTX	IMP (GAD)	IMP (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	acrR	ST
H2895	CSF	1		0.38	0.094	8	1	BLNAS	NSMSLIGTRK	IIc	S14L, R22K, N26D (Ins. 79)	107
H2982	Blut	1.5		0.125	0.094	8	2	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	145
H3006	Blut	1.5		0.094	0.094	8	1	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	159
H2576	Blut	2		0.19	0.094	8	2	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1034
H2984	Blut	1		0.19	0.032	12	4	BLNAS	DSMSLVGARK	IIId	L31H, I121V	12
H3049	Blut	0.5		0.125	0.047	12	0.5	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	107
H2537	Blut	3		0.075	0.094	12	8	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V, H131D, Q134K	1461
H2899	Blut	1		0.25	0.047	16	2	BLNAS	NSMSLIGVRK	IIb	L31H	107
H2970	Blut	1		0.19	0.047	16	4	BLNAS	DSMSLVGARK	IIId	L31H, I121V	196
H2698	Blut	0.75		0.25	0.064	16	1	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	1461
H3042	Blut	1.5		0.094	0.094	16	4	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K, E53X (Stop G157T)	1885
H2654	Blut	256	4	0.38	0.023	32	4	BLPACR	NSISLIEVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	12
H3019	Blut	256	2	0.25	0.032	32	4	BLPAR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V	12
H2561	Blut	1		0.19	0.032	32	2	BLNAS	DSMSLVGARK	IIId	L31H, I121V	107
H2772	Blut	1		0.19	0.032	32	4	BLNAS	DSMSLVGARK	IIId	L31H, I121V	107
H2734	CSF	1.5		0.25	0.032	32	4	BLNAR	DSMSLVGARK	IIId	L31H, I121V	136

Isolat	Herkunft	AMP	AMC	MER	CTX	IMP (GAD)	IMP (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	acrR	ST
H2775	Blut	3		1	0.032	32	4	BLNAR	NSMSLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	136
H2688	Blut	256	2	0.19	0.047	32	4	BLPAR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V	142
H3065	Blut	256	3	0.25	0.047	32	4	BLPACR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V	142
H3101	Blut	256	3	0.19	0.047	32	8	BLPACR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V	165
H2751	Blut	256	4	0.25	0.047	32	8	BLPACR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V	165
H2660	Blut	0.75		0.25	0.047	32	1	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	1889
H2666	CSF	1		0.38	0.047	32	4	BLNAS	DSMSLIGARK	IIa	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, S110F, I121V, H131D, Q134K	165
H2681	Blut	1		0.38	0.047	32	2	BLNAS	DSMSLIGARK	IIa	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	165
H2709	Blut	1		0.19	0.047	32	4	BLNAS	DSMSLVGARK	IIId	L31H, I121V	165
H3012	Blut	1.5		0.38	0.047	32	0,5	BLNAR	NSMSLIEARK	IIa	X14F (T Ins. Pos 41)	396
H2577	Blut	0.75		0.125	0.064	32	4	BLNAS	DSMSLIGARN		R22K, L31H	834
H2840	Blut	1		0.19	0.064	32	1	BLNAS	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	836
H2691	Blut	1		0.38	0.064	32	1	BLNAS	NSMSLIEARK	IIa	L31H, I121V	836
H2555	Blut	1.5		0.38	0.064	32	2	BLNAR	NSISLIEARK	IIa	L31H, I121V, N99X (Stop A270X)	836
H2658	CSF	1.5		0.38	0.064	32	8	BLNAR	NSISLIEARK	IIa	L31H, I121V	925
H2776	Blut	1.5		0.25	0.064	32	1	BLNAR	DSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1034

Isolat	Herkunft	AMP	AMC	MER	CTX	IMP (GAD)	IMP (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	acrR	ST
H3087	Blut	1.5		0.5	0.064	32	4	BLNAR	DSMSLIGTRK	IIc	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1202
H2710	Blut	1.5		0.38	0.064	32	1	BLNAR	NSMSLIGTRK	IIc	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1202
H2790	CSF	3		0.19	0.064	32	4	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	L31H, I121V, H131D, Q134K	1464
H2670	Blut	8		0.75	0.125	32	2	BLNAR	NNMSLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1881
H2544	Blut	1.5		0.094	0.19	32	-	BLNAR	NSISLIGVRK	IIb	S14L, R22K, N26D, Q27R, L31H, L33I, T77S, I121V, H131D, Q134K	1889
H2894	Blut	32	4	0.38	0.75	32	4	BLPACR	NNITFIGARK	III+	L31H, A40X (Del. A117, G118)	1890

Tabelle 19: Eigenschaften der *H. influenzae*-Isolate für die Untersuchung der Cefotaxim-Resistenz. Angegeben sind Alter und Geschlecht der entsprechenden Patientin oder des Patienten. Außerdem sind die GAD-Ergebnisse für Ampicillin (AMP), Amoxicillin + Clavulansäure (AMC) und Meropenem (MER) aufgeführt. Für Cefotaxim (CTX) sind sowohl GAD-, als auch BMD-Ergebnisse angegeben. Außerdem sind der entsprechende Phänotyp und Sequenztyp sowie Veränderungen im PBP3 angegeben. Die PBP3-Veränderungen sind zum einen als Einteilung in die verschiedenen PBP3-Gruppen und zum anderen als Einbuchstabencode dargestellt. Die entsprechenden Aminosäuren beziehungsweise Aminosäuresubstitutionen und deren Position in der Aminosäuresequenz des Referenzstamms RD KW20 sind die Folgenden: D350N, S357N, M377I, S385T, L389F, I449V, G490E, A502T, A502V, R517H, N526K, T532S, V547I, G555E, Y557H, V562L, N569S, A586S/P, S594T, A595T, E603D. Die *ftsI*-Allelnummer und die Nummer des Sequenztyps beziehen sich auf die Nummerierung von PUBMLST. Entspricht Table 1 aus Nürnberg et al. 2021: Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions (149). (Nachdruckerlaubnis gemäß den Richtlinien des Journals)

Isolat	Alter	Geschlecht	Herkunft	Serotyp	AMP	AMC	MER	CTX (GAD)	CTX (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	<i>ftsI</i> -Allel	ST
H4753	86	m	Blut	NTHi	256	8	1	2	2	BLPACR	NNITFIGAHNSIGYVSSTTD	III-like+	6	834
H4379	79	m	Blut	NTHi	4		0,75	1,5	2	BLNAR	NNITFIGARKTVGYLNSSAE	III+	211	143
H4990	78	m	Blut	NTHi	256	16	0,38	1,5	2	BLPACR	NNITFIGAHNSIGHVSSTTD	III-like+	26	367
H4101	53	f	Blut	NTHi	256	48	0,75	1,5	1	BLPACR	NNITFIGAHNSIGHVSSTTD	III-like+	26	103
H4494	63	f	Blut	NTHi	32		0,25	1,5	1	BLNAR	NNITFIGAHNSIGHVSSTTD	III-like+	26	142
H4503	70	m	Blut	NTHi	32		0,25	1,5	1	BLNAR	NNITFIGAHNSIGHVSSTTD	III-like+	26	142
H4584	78	m	Blut	NTHi	256	64	0,5	1,5	1	BLPACR	NNITFIGAHNSIGHVSSTTD	III-like+	26	103
H4594	62	m	CSF	NTHi	256	256	0,5	1,5	1	BLPACR	NNITFIGAHNSVGHVNSTTD	III-like+	26	103
H3229	82	f	Blut	NTHi	16		0,25	1	1	BLNAR	NNITFIGAHNSVGHVSSTTD	III-like+	26	142
H3630	73	f	Blut	NTHi	6		0,38	1	1	BLNAR	NNITFIGAHNSIGHVSSAD	III-like+	26	422
H3632	74	m	Blut	NTHi	24		0,75	1	1	BLNAR	NNITFIGARKTIGYLSASAE	III+	40	3
H3805	71	m	Blut	NTHi	1,5		0,19	1	1	BLNAR	NNITFIGARKTIGYLSASAE	III+	40	107
H4154	90	f	Blut	NTHi	256	32	0,5	1	1	BLPACR	NNITFIGAHNSVGHVSSTTD	III-like+	26	103
H3653	0	f	Blut	NTHi	2		0,75	0,75	1	BLNAR	NNITFIGARKTIGYLSASAE	III+	40	107
H2894	91	f	Blut	NTHi	32	4	0,38	0,75	0,5	BLPACR	NNITFIGARKTIGYLSASAE	III+	40	165
H3176	78	f	Blut	NTHi	256	6	0,25	0,5	0,5	BLPACR	NNITFIGARKTVGYVNASAE	III+	16	14
H3723	89	f	Blut	NTHi	256	6	0,75	0,5	0,5	BLPACR	NNITFIGTRKTVGYVNASAE	III+	16	155
H2754	71	m	Blut	NTHi	1,5		0,25	0,38	0,5	BLNAR	NSISLIGARKTIGYVNSTTD	IIa	2	

Isolat	Alter	Geschlecht	Herkunft	Serotyp	AMP	AMC	MER	CTX (GAD)	CTX (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3-Gruppe	<i>fts</i> -Allel	ST
H3934	87	f	Blut	NTHi	3		2	0,38	0,5	BLNAR	NNITFIEARKTVGYVNASAE	III+	22	107
H4491	57	f	Blut	Hif	1		0,094	0,19	0,25	BLNAS	NNITLIGAHNSIGYVNASAE	III-like	33	598
H4523	43	f	Blut	Hif	0,5		0,25	0,19	0,25	BLNAS	DSMSLIGARKTIGYLNASAD	Ila	212	598
H4538	85	f	Blut	NTHi	12		0,75	0,19	0,25	BLNAR	NNMSLIGARKTIGYVNASAE	Ilb	49	12
H3664	47	m	Blut	Hif	1		0,38	0,19	0,125	BLNAS	NSMSLIGARKTVGYLNSSAE	Ila	210	598
H4960	70	f	Blut	NTHi	24		0,38	0,19	0,125	BLNAR	NNITLIGAHNSIGYVSSTTE	III-like	217	2031
H5056	81	f	Blut	NTHi	3		0,5	0,19	0,125	BLNAR	NNITLIGAHNSIGYVSSTTE	III-like	217	2031
H5107	75	m	Blut	NTHi	2		0,25	0,19	0,125	BLNAR	NNITLIGAHNSIGYVSSTTE	III-like	217	2031
H2544	85	m	Blut	NTHi	1,5		0,094	0,19	n.d.	BLNAR	NSISLIGVRK-----	Ilb	1	
H2670	81	f	Blut	NTHi	8			0,125	0,125	BLNAR	NNISLIGVRKTIGYVSASAD	Ilb	49	
H4838	45	m	Blut	NTHi	2			0,094	0,125	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	Ilb	1	
H3371	76	f	Blut	NTHi	1,5			0,125	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	Ilb	1	
H3905	87	m	Blut	NTHi	2			0,125	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	Ilb	1	
H4561	39	m	Blut	NTHi	1,5			0,125	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTD	Ilb	2	
H2527	69	m	Blut	NTHi	1,5			0,094	0,064	BLNAR	DSMSLIGARKTIGYVNASAG	Ild	20	
H2537	87	f	Blut	NTHi	3			0,094	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSASAE	Ilb	2	
H2540	77	f	Blut	NTHi	2			0,094	0,064	BLNAR	NSMSLIGTRKTIGYVNASAE	Iic	38	
H2576	80	m	Blut	NTHi	2			0,094	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	Ilb	1	
H3335	77	m	Blut	NTHi	8			0,094	0,064	BLNAR	NSMSLIEVRKTIGYVSPSAD	Ilb	23	
H3977	84	f	Blut	NTHi	2			0,094	0,064	BLNAR	NSISLIEVRKTIGYVSPSAD	Ilb	23	
H4444	67	f	CSF	NTHi	2			0,094	0,064	BLNAR	NSMSLIGTRKTIGYVSSTD	Iic	215	
H4702	78	f	Blut	NTHi	3			0,094	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVNSTTE	Ilb	1	
H4757	61	f	Blut	NTHi	2			0,094	0,064	BLNAR	DSMSLIEARKTVGYVNASAE	Ild	121	
H4883	45	m	Blut	NTHi	3			0,094	0,064	BLNAR	DSMSLIGTRKTIGYVNSSAE	Iic	216	
H2710	66	m	Blut	NTHi	1,5			0,064	0,064	BLNAR	NSMSLIGTRKTIGYVSASAN	Iic	74	
H2790	32	f	CSF	NTHi	3			0,064	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSASAE	Ilb	2	
H4531	62	f	Blut	NTHi	1,5			0,064	0,064	BLNAR	NSMSLIEARKTVGYVNASAE	Ild	43	
H2841	78	m	Blut	NTHi	1,5			0,047	0,064	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSATTE	Ilb	2	

Isolat	Alter	Geschlecht	Herkunft	Serotyp	AMP	AMC	MER	CTX (GAD)	CTX (BMD)	Phänotyp	PBP3	PBP3- Gruppe	<i>ftsI</i> -Allel	ST
H4193	42	f	Blut	NTHi	256	6		0,047	0,064	BLPACR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	IIb	1	
H3131	89	f	Blut	NTHi	1,5			0,094	0,032	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	IIb	2	
H3480	89	m	Blut	NTHi	1,5			0,064	0,032	BLNAR	NSMSLIEARKTVGYVNASAE	IIId	43	
H3857	74	f	Blut	NTHi	1,5			0,064	0,032	BLNAR	DSMSLVGARKTIGYVSSTTD	IIa	5	
H3980	71	f	Blut	NTHi	256	6		0,064	0,032	BLPACR	NSISLIEVRKTIGYVSPSAD	IIb	23	
H4023	65	m	Blut	NTHi	1,5			0,064	0,032	BLNAR	NSMSLIGTRKTIGYVSASAD	IIc	38	
H2751	77	f	Blut	NTHi	256	4		0,047	0,032	BLPACR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	IIb	1	
H3081	82	f	Blut	NTHi	256	4		0,047	0,032	BLPACR	NSISLIEVTKTIGYVSPSAD	IIb	23	
H3101	84	f	Blut	NTHi	256	3		0,047	0,032	BLPACR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	IIb	1	
H3500	58	m	Blut	NTHi	256	16		0,047	0,032	BLPACR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	IIb	1	
H4083	73	m	Blut	NTHi	1,5			0,047	0,032	BLNAR	NSISLIGVRKTIGYVSSTTE	IIb	213	
H4251	77	m	Blut	NTHi	1,5			0,047	0,032	BLNAR	DSISLVGARKTIGYVSASAD	IIa	214	
H4679	84	m	Blut	NTHi	1,5			0,047	0,032	BLNAR	NSMSLIEARKTIGYVNASAE	IIId	43	
H2775	53	m	Blut	NTHi	3			0,032	0,032	BLNAR	NSMSLIGVRKTIGYVSSTAD	IIb	9	
H2848	79	f	Blut	NTHi	256	3		0,032	0,032	BLPACR	NSISLIGVRKTIGYVSSTAE	IIb	1	
H2654	62	m	Blut	NTHi	256	4		0,023	0,032	BLPACR	NSISLIEVRKTIGYVSPSAD	IIb	73	
H3543	74	m	Blut	NTHi	1,5			0,032	0,016	BLNAR	DSMSLIGVRKTIGYVNPSAD	IIb	48	

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AMC	<i>Amoxicillin + Clavulansäure</i>
AMP	<i>Ampicillin</i>
ANOVA	<i>Einseitige Varianzanalyse</i>
apiNH	<i>Analytischer-Profil-Index für Neisseriae und Haemophili</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain-Heart-Infusion</i>
BLNAR	<i>Beta-Lactamase-negativ, Ampicillin-resistent</i>
BLNAS	<i>Beta-Lactamase-negativ, Ampicillin-sensibel</i>
BLPACR	<i>Beta-Lactamase-positiv, Amoxiclav-resistent</i>
BLPAR	<i>Beta-Lactamase-positiv, Ampicillin-resistent</i>
BMD	<i>Bouillon-Mikrodilution</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
cgMLST	<i>Core genome Multilocus-Sequenztypisierung</i>
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	<i>Kohlenstoffdioxid</i>
COPD	<i>Chronisch obstruktive Lungenerkrankung</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
CSF	<i>Cerebrospinalflüssigkeit</i>
CTX	<i>Cefotaxim</i>
dH ₂ O	<i>destilliertes Wasser</i>
DIN	<i>Deutsches Institut für Normung</i>
DNA	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ECOFF	<i>Epidemiological cut-off value</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious diseases</i>
et al.	<i>et alii</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GAD	<i>Gradientenagardiffusion</i>
H ₂ O	<i>Wasser</i>
Hia	<i>Haemophilus influenzae Serotyp a</i>

Hib	<i>Haemophilus influenzae Serotyp b</i>
Hic	<i>Haemophilus influenzae Serotyp c</i>
Hid	<i>Haemophilus influenzae Serotyp d</i>
Hie	<i>Haemophilus influenzae Serotyp e</i>
Hif	<i>Haemophilus influenzae Serotyp f</i>
hiHh	<i>hemin-independent Haemophilus influenzae</i>
HMW	<i>High molecular weight adhesine protein</i>
I	<i>Sensibel bei erhöhter therapeutischer Dosis</i>
IfSG	<i>Infektionsschutzgesetz</i>
IgA	<i>Immunglobulin A</i>
IMP	<i>Imipenem</i>
IVD	<i>In vitro diagnostic</i>
IZKF	<i>Interdisziplinäres Zentrum für Klinische Forschung</i>
LOS	<i>Lipooligosaccharid</i>
MALDI-TOF-MS	<i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry</i>
MER	<i>Meropenem</i>
MHB	<i>Mueller-Hinton-Bouillon</i>
MHF	<i>Mueller-Hinton-fastidious Bouillon</i>
MHK	<i>Minimale Hemmkonzentration</i>
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MLST	<i>Multilocus-Sequenztypisierung</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NAD	<i>Nikotinamidadenindinukleotid</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology</i>
NCTC	<i>National Collection of Type Cultures</i>
NRZMHi	<i>Nationales Referenzzentrum für Meningokokken und Haemophilus influenzae</i>
NTHi	<i>Nicht-typisierbare Haemophilus influenzae</i>
O ₂	<i>Sauerstoff</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
ODC	<i>Ornithindecaboxylase</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
ORD	<i>Original reference database</i>
PBP	<i>Penicillin-Bindeprotein</i>

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
R	<i>Resistent</i>
RKI	<i>Robert Koch-Institut</i>
rRNA	<i>Ribosomale Ribonukleinsäure</i>
RUO	<i>Research use only</i>
S	<i>Sensibel</i>
ST	<i>Sequenztyp</i>
TBE	<i>Tris-Borat-EDTA</i>
UKW	<i>Universitätsklinikum Würzburg</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wildtyp</i>

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Verwandtschaft der verschiedenen Haemophilus- und Aggregatibacter-Spezies dargestellt im phylogenetischen Baum....	5
Abbildung 2:	Anzahl und Inzidenz (1/10000) gemeldeter invasiver <i>H. influenzae</i> -Fälle in Deutschland 2001-2019.....	14
Abbildung 3:	Inzidenz gemeldeter <i>H. influenzae</i> -Fälle im europäischen Vergleich.	15
Abbildung 4:	Altersverteilung invasiver <i>H. influenzae</i> -Fälle und deren Inzidenz in Deutschland 2019 in Fünfjahresintervallen.	16
Abbildung 5:	Häufigkeitsverteilung der verschiedenen <i>H. influenzae</i> -Serotypen laut Daten des NRZMHI.	17
Abbildung 6:	Serotypverteilung in den verschiedenen Altersgruppen laut Daten des ECDC aus dem Jahr 2017.....	18
Abbildung 7:	Phänotyp aller invasiver <i>H. influenzae</i> -Isolate hinsichtlich Ampicillin-Resistenz und β -Lactamase-Produktion.	35
Abbildung 8:	Fotografie eines VITEK® MS disposable target slides.....	61
Abbildung 9:	Bouillon-Mikrodilution: Ablesen der Ergebnisse mittels Ablesetisch und Spiegel sowie einer Tischleuchte.	69
Abbildung 10:	Bouillon-Mikrodilution: Zeichen für ein Bakterienwachstum.	70
Abbildung 11:	MHF-Agarplatte mit aufgelegtem Teststreifen nach Inkubation.....	73
Abbildung 12:	„Neighbor-joining-net“ der konkatenierten MLST-Sequenzen der <i>H. influenzae</i> - und <i>H. haemolyticus</i> -Stämme.	79
Abbildung 13:	Bestimmung der Cefotaxim-MHK 64 verschiedener <i>H. influenzae</i> -Stämme mit BMD und GAD.	84
Abbildung 14:	Bestimmung der Imipenem-MHK 72 verschiedener <i>H. influenzae</i> -Stämme mit BMD und GAD.	85
Abbildung 15:	Phänotyp invasiver <i>H. influenzae</i> -Isolate des Jahres 2016 hinsichtlich Ampicillin-Resistenz und β -Lactamase-Produktion.....	87
Abbildung 16:	Exemplarische Darstellung eines Doppelhemmhofs (links) und von Einzelkolonien, die innerhalb der Hemmhofellipse wachsen (rechts), als Zeichen einer Heteroresistenz.	88
Abbildung 17:	Geographische Verteilung Imipenem-resistenter <i>H. influenzae</i> -Isolate.....	91
Abbildung 18:	Phänotyp invasiver <i>H. influenzae</i> -Isolate hinsichtlich Ampicillin-Resistenz und β -Lactamase-Produktion im Zeitraum 2016–2019.	94
Abbildung 19:	Häufigkeit gemessener Cefotaxim-MHK-Werte invasiver <i>H. influenzae</i> -Stämme aus dem Zeitraum 2016-2019.....	96

Abbildung 20:	Darstellung eines Minimum-spanning-tree basierend auf den cgMLST-Daten von 25 Cefotaxim-resistenten <i>H. influenzae</i> -Isolaten.....	98
Abbildung 21:	PBP3-Gruppen der untersuchten Cefotaxim-resistenten (>0,125 µg/ml) und Cefotaxim-sensiblen (≤0,125 µg/ml) Stämme.	100
Abbildung 22:	Geografische Verteilung der Cefotaxim-resistenten <i>H. influenzae</i> -Isolate in Deutschland (2016-2019) im Vergleich zur Bevölkerungsdichte.....	102
Abbildung 23:	Sequenzierung von <i>H. influenzae</i> - (blau) und <i>H. haemolyticus</i> -Isolaten (rot) dargestellt im phylogenetischen Baum unter Verwendung des <i>H. influenzae</i> -MLST-Schemas.....	112
Abbildung 24:	Häufigkeitsverteilung der Cefotaxim-MHK-Werte erhoben durch EUCAST und das NRZMHi.	122

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Biotypenteilung von <i>H. influenzae</i> ¹	6
Tabelle 2:	Übersicht der PBP3-Gruppeneinteilung.....	30
Tabelle 3:	Auswertung des Bakterienwachstums auf der Quad Platte mit Rückschluss auf die vorliegende Spezies.	47
Tabelle 4:	Für den Nachweis der Gene <i>fucK</i> und <i>ompP2</i> verwendete PCR-Primer	54
Tabelle 5:	Für die Amplifizierung und Sequenzierung des <i>ompP6</i> -Gens verwendete PCR-Primer.....	54
Tabelle 6:	Für den Nachweis des <i>bexA</i> -Gens verwendete PCR-Primer	55
Tabelle 7:	Für die Serotyp-PCR verwendete PCR-Primer.....	55
Tabelle 8:	Für die MLST verwendete PCR-Primer	56
Tabelle 9:	Für die Amplifizierung und Sequenzierung des <i>ftsI</i> -Gens verwendete PCR-Primer.	75
Tabelle 10:	Für die Amplifizierung und Sequenzierung des <i>acrR</i> -Gens verwendete PCR-Primer	76
Tabelle 11:	Zusammenfassung der VITEK® MS-Ergebnisse.....	81
Tabelle 12:	Bestimmung der Ampicillin-MHK [µg/ml] mit BMD von vier Referenzstämmen an acht verschiedenen Tagen	82
Tabelle 13:	Bestimmung der Imipenem-MHK [µg/ml] mit BMD von fünf Referenzstämmen an drei verschiedenen Tagen	82
Tabelle 14:	Bestimmung der Imipenem-MHK [µg/ml] mit BMD von zehn Stämmen des NRZMHi an drei verschiedenen Tagen.....	83
Tabelle 15:	Bestimmung der Cefotaxim-MHK [µg/ml] mit BMD von sieben Stämmen des NRZMHi an drei verschiedenen Tagen.....	83
Tabelle 16:	Sequenztypen und Allelnummern der Imipenem-resistenten <i>H. influenzae</i> -Isolate aus dem Jahr 2016, erhoben über die MLST.....	90
Tabelle 17:	Eigenschaften der durch das VITEK MS® IVD getesteten <i>H. haemolyticus</i> -Isolate.	143
Tabelle 18:	Eigenschaften der <i>H. influenzae</i> -Isolate für die Untersuchung der Imipenem-Resistenz.....	146
Tabelle 19:	Eigenschaften der <i>H. influenzae</i> -Isolate für die Untersuchung der Cefotaxim-Resistenz.	151

7.4 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei der Anfertigung dieser Promotionsarbeit unterstützt haben und ohne die diese Arbeit wohl nie zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Ulrich Vogel, für die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und Priv.-Doz. Dr. Heike Claus für die Betreuung meiner Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Thiên-Trí Lâm, der mir über den gesamten Zeitraum der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand, mir die Denkanstöße für die Fragestellungen dieser Arbeit gegeben hat, immer für mich Zeit hatte und sich stets für das Vorankommen der Arbeit und der Veröffentlichungen eingesetzt hat. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht wünschen können.

Des Weiteren möchte ich erneut Priv.-Doz. Dr. Heike Claus und den Mitarbeiterinnen des NRZMHi Sabrina Hebling und Alexandra Sikora danken, die mich bei der Durchführung der Experimente angeleitet und unterstützt haben und jederzeit meine vielen Fragen beantworten konnten.

Außerdem danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Varia-, Hygiene und DNA-Labors, allen voran Beate Stirzel, Lena Zubrod und Theresa Höferth für ihre Unterstützung beim MALDI-TOF-MS und der DNA-Sequenzierung.

Ich danke Prof. Dr. Kathleen Wermke für ihre Beratung und ihr Doktorandenseminar, bei dem ich die Grundlagen und das Verständnis für die schriftliche Anfertigung der Arbeit lernen konnte.

Ein großes Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir die lange Zeit der Forschung ermöglicht und mich auf unzählige weitere Arten unterstützt und bestärkt haben.

Besonders dankbar bin ich Melissa, die in der Zeit dieser Arbeit meine Freundin und Verlobte war und schließlich meine Ehefrau wurde. Ohne ihre unglaubliche Unterstützung und ihre Motivation wäre ich wohl nie an diesen Punkt gekommen.

7.5 Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Nürnberg S, Claus H, Krone M, Vogel U, Lãm TT. Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016-19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions. *J Antimicrob Chemother.* 2021;76(4):920-9.

Lãm TT, **Nürnberg S**, Claus H, Vogel U. Molecular epidemiology of imipenem resistance in invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany in 2016. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(8):2076-86.

Nürnberg S, Claus H, Krone M, Vogel U, Lãm TT. Discriminative Potential of the Vitek MS In Vitro Diagnostic Device Regarding *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. *J Clin Microbiol.* 2020;58(9).

Nürnberg S, Claus H, Krone M, Vogel U, Lãm TT. Discriminative potential of the VITEK® MS regarding *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus*. Posterpräsentation auf dem DGHM VAAM Kongress 2020 in Leipzig vom 08. bis 13. März 2020