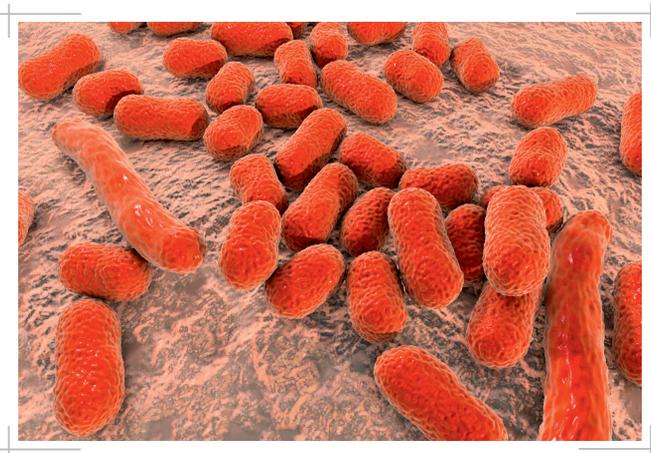

Genomische und funktionelle Charakterisierung von multiresistenten *Acinetobacter baumannii*-Isolaten aus klinischem Untersuchungsgut von Kleintieren unter besonderer Berücksichtigung der Carbapenem-Resistenz



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei der Autorin dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autorin oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2023

© 2023 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christa Ewers

**GENOMISCHE UND FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG VON
MULTIRESISTENTEN *ACINETOBACTER BAUMANNII*-ISOLATEN AUS
KLINISCHEM UNTERSUCHUNGSGUT VON KLEINTIEREN UNTER
BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DER CARBAPENEM-RESISTENZ**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

eingereicht von

LISA JACOBMEYER

Tierärztin aus Fulda

Gießen 2023

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. Christa Ewers
Prof. Dr. Natali Bauer

Prüfer: Prof. Dr. Georgios Scheiner-Bobis

Tag der Disputation: 09.08.2023

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	IV
II. Abbildungsverzeichnis	VII
III. Tabellenverzeichnis	X
IV. Publikationsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Taxonomie	3
2.2. Differenzierung von <i>Acinetobacter</i> spp.	4
2.2.1. Phänotypische Eigenschaften von <i>Acinetobacter</i> spp.	4
2.2.2. Genotypische Differenzierung von <i>Acinetobacter</i> spp.	4
2.2.3. Massenspektrometrie.....	6
2.3. Molekulare Epidemiologie von <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
2.3.1. Phylogenetische Gruppen von <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
2.3.2. Molekularbiologische Methoden zur Typisierung von <i>Acinetobacter baumannii</i>	8
2.4. Antimikrobielle Empfindlichkeit von <i>Acinetobacter</i> spp.	11
2.4.1. Intrinsische Resistenzen	13
2.4.2. Erworbene Resistenzen	16
2.4.3. Übertragung von Resistenzen.....	20
2.5. Pathogenese und Virulenz von <i>Acinetobacter</i> spp.	23
2.5.1. Virulenzeigenschaften von <i>Acinetobacter</i> spp.	23
2.5.2. Biofilmbildung von <i>Acinetobacter</i> spp.....	25
2.5.3. Methoden zur Untersuchung der Virulenz	26
2.6. Vorkommen von <i>Acinetobacter</i> spp.	28
2.6.1. <i>Acinetobacter</i> spp. in der Umwelt	28
2.6.2. <i>Acinetobacter</i> spp. beim Menschen	28
2.6.3. <i>Acinetobacter</i> spp. beim Tier.....	30
3. Ziele der Dissertation	44

4. Publikationen	44
4.1. 1. Publikation	44
4.1.1. Zusammenfassung (Übersetzt aus Originalpublikation).....	45
4.2. 2. Publikation	45
4.2.1. Zusammenfassung (Übersetzt aus Originalpublikation).....	46
4.3. 3. Publikation	46
4.3.1. Zusammenfassung (Übersetzt aus Originalpublikation).....	47
5. Ergänzungen und unveröffentlichte Daten	48
5.1. Unveröffentlichte Methoden	48
5.1.1. <i>Acinetobacter</i> spp.-Sammlung aus veterinärmedizinischem Probenmaterial und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung	48
5.1.2. Untersuchungen zum Vorkommen von Virulenz-assoziierten Genen bei <i>Acinetobacter baumannii</i> -Isolaten von Tieren	50
5.1.3. Generierung Resistenzplasmid-freier Varianten und Transformanten, sowie Auswahl von Triplets für funktionelle Assays.....	52
5.1.4. <i>In vitro</i> -Fitness Assay.....	53
5.1.5. Biofilm-Assay	54
5.1.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse des Biofilm-Assays.....	54
5.1.7. <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell	55
5.1.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse des <i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodells	55
5.2. Unveröffentlichte Ergebnisse	56
5.2.1. Weitere Carbapenem-resistente <i>Acinetobacter</i> spp. aus veterinärmedizinischem Probenmaterial und deren Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen	56
5.2.2. Ganzgenomsequenzierung und phylogenetischer Hintergrund Carbapenem-resistenter <i>Acinetobacter</i> spp.....	60
5.2.3. Analyse Virulenz-assoziiierter Gene Carbapenem-resistenter <i>Acinetobacter</i> spp.....	67
5.2.4. Generierung Resistenzplasmid-freier Varianten und Transformanten, sowie Auswahl von Triplets für funktionelle Assays.....	75
5.2.5. <i>In vitro</i> -Fitness Assay.....	77
5.2.6. Biofilm-Assay	78
5.2.7. <i>Galleria mellonella</i> -Infektion.....	94
6. Diskussion	96

6.1.	Carbapenem-resistente <i>Acinetobacter baumannii</i> tierischer Herkunft	97
6.2.	Carbapenem-resistente <i>Acinetobacter pittii</i> tierischer Herkunft	102
6.3.	Carbapenem-resistente <i>Acinetobacter</i> spp. tierischer Herkunft	105
6.3.1.	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	105
6.3.2.	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	107
6.3.3.	<i>Acinetobacter indicus</i>	109
6.3.4.	<i>Acinetobacter species</i>	111
6.3.5.	Zusammenfassung OXA-23- und OXA-58-positive <i>Acinetobacter</i> spp. tierischer Herkunft	112
6.4.	Einfluss der Resistenz auf bakterielle Fitness, Biofilmbildung und Virulenz	112
6.4.1.	Einfluss der CR auf die bakterielle Fitness von <i>Acinetobacter baumannii</i>	113
6.4.2.	Einfluss der CR auf die Biofilmbildung von <i>Acinetobacter baumannii</i>	114
6.4.3.	Einfluss der CR auf die <i>in vivo</i> -Virulenz von <i>Acinetobacter baumannii</i>	115
6.5.	Limitationen.....	117
7.	Zusammenfassung.....	119
8.	Summary	121
9.	Literaturverzeichnis.....	124
10.	Danksagung.....	151
11.	Selbstständigkeitserklärung	152
12.	Eigenanteil in den Publikationen	152
13.	Anhang	152

I. Abkürzungsverzeichnis

Δ	verkürzte, deletierte Gen-/Nukleotidsequenz
<i>A.</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Ab</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Ai</i>	<i>Acinetobacter indicus</i>
<i>Aj</i>	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
<i>Al</i>	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
<i>Ap</i>	<i>Acinetobacter pittii</i>
<i>As</i>	<i>Acinetobacter species</i>
<i>AbaR</i>	<i>Ab</i> -Resistenzinsel
<i>Acb</i> -Komplex	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> – <i>baumannii</i> -Komplex
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
ATCC	American Type Culture Collection
BAG	Biofilm-assoziierte Gene
BHI	Brain Heart Infusion
bzw.	Beziehungsweise
<i>C.</i>	<i>Caenorhabditis</i>
CC	Klonaler Komplex (<i>clonal complex</i>)
CFU	<i>colony-forming unit</i> (Koloniebildende Einheit)
cgMLST	Kerngenom (<i>core genome</i>) MLST
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CP	Carbapenemase
CR	Carbapenem-resistent
CS	Carbapenem-sensibel
d.h.	das heißt
DLV	Double Locus Variant
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
E-Test	Epsilometer-Test
ECDC	European Center for Disease Control and Prevention
EFSA	European Food Safety Authority
ESBL	Extended-Spektrum β -Laktamase

Abkürzungsverzeichnis

EPS	Extrazelluläre polymere Matrix
EU	Europäischer Klon
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<i>G.</i>	<i>Galleria</i>
GC	Globaler Klon (<i>global clone</i>)
GN	Gram-negativ
GP	Gram-positiv
HGT	Horizontaler Gentransfer
IC	Internationaler Klon (<i>international clone</i>)
IMP	Imipenem
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
IS	Insertionssequenz/Insertionselement
kb	Kilobasen
KbE	Koloniebildende Einheit
LB	Lysogeny Broth
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MBL	Metallo- β -Laktamase
MCG	Maximum Common Genome
MHK	Minimale Hemmstoffkonzentration
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MRGN	Multiresistente Gram-negative Stäbchen
NBI	Nährboullion-I
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OD	Optische Dichte
OXA	Oxacillinase
OX	MLST Oxford-Schema
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
Past	MLST Pasteur-Schema
PBS	Phosphathaltige Pufferlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese

Abkürzungsverzeichnis

RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA-Analyse
rep-PCR	Repetitive palindromische PCR
RKI	Robert Koch-Institut
rRNS	Ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SBF	Spezifische Biofilmbildung (<i>specific biofilm formation</i>)
SLV	Single Locus Variant
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
spp.	Species pluralis
TF	Transformante
Tn	Transposon
u.a.	unter anderem
üN	über Nacht
v.a.	vor allem
VAG	Virulenz-assoziiertes Gen
var.	Varietät
VF	Virulenzfaktor
vs.	Versus
VGT	Vertikaler Gentransfer
WGS	Ganzgenomsequenzierung (<i>whole genome sequencing</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
WT	Wildtyp
WW	Weltweiter Klon (<i>worldwide clone</i>)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Genetische Umgebung (10.497 bp) des chromosomal kodierten <i>bla</i> _{OXA-23} -Gens des <i>Ab</i> -Isolats IHIT33917 (Hund, Wunde, 2017).	62
Abbildung 2. Genetische Umgebung (10.803 bp) des chromosomal kodierten <i>bla</i> _{OXA-23} -Gens des <i>Ab</i> -Isolats IHIT36139 (Rind, Harn, 2018).	62
Abbildung 3. Genetische Umgebung (11.332 bp) des chromosomal kodierten <i>bla</i> _{OXA-23} -Gens der <i>Ai</i> -Isolate IHIT35582 (Schaf, Milz, 2017) und IHIT37103 (Kalb, Nase, 2018).	62
Abbildung 4. Genetische Umgebung (10.897 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-23} -Gens der <i>Al</i> -Isolate IHIT28445 (Meerschweinchen, Organe, 2014), IHIT29999 (Pferd, Uterus, 2015), IHIT32294 (Hund, Urin, 2016) und IHIT33541 (Katze, Auge, 2016).	63
Abbildung 5. Genetische Umgebung (6.578 bp) des chromosomal kodierten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Aj</i> -Isolats IHIT37774 (Kaninchen, Niere, 2018).	63
Abbildung 6. Genetische Umgebung (6.525 bp) des chromosomal kodierten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Al</i> -Isolats IHIT36316 (Luftsack, Pferd, 2018).	63
Abbildung 7. Genetische Umgebung (10.281 bp) des chromosomal kodierten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Ai</i> -Isolats IHIT34477 (Rind, Nase, 2017).	63
Abbildung 8. Genetische Umgebung (10.348 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Aj</i> -Isolats IHIT30696 (Hund, Wunde, 2015).	63
Abbildung 9. Genetische Umgebung (11.034 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Aj</i> -Isolats IHIT32300 (Kaninchen, Urin, 2015).	64
Abbildung 10. Genetische Umgebung (10.186 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Al</i> -Isolats IHIT33561 (Rind, Organe, 2017) und des <i>As</i> -Isolats IHIT36460 (Schaf, Organe, 2018).	64
Abbildung 11. Genetische Umgebung (8.837 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens der <i>Aj</i> -Isolate IHIT33472 (Schaf, Milz, 2017) und IHIT33552 (Rind, Lunge, 2017) sowie des <i>Al</i> -Isolats IHIT37305 (Schwein, Lunge, 2018).	64
Abbildung 12. Genetische Umgebung (10.768 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Ap</i> -Isolats IHIT35280.	64
Abbildung 13. Genetische Umgebung (10.769 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>As</i> -Isolats IHIT36143 (Rind, Harn, 2018).	65
Abbildung 14. Genetische Umgebung (14.785 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla</i> _{OXA-58} -Gens des <i>Al</i> -Isolats IHIT37764 (Hund, Lunge, 2018).	65

Abbildung 15. Genetische Umgebung (11.859 bp) des chromosomal kodierten <i>bla_{OXA-143}</i> -Gens des <i>Ap</i> -Isolats IHIT27359 (Hund, Ohr 2014).....	65
Abbildung 16. Genetische Umgebung (7.897 bp) des Plasmid-lokaliserten <i>bla_{OXA-72}</i> -Gens des <i>Ap</i> -Isolats IHIT38006 (Hund, Gingiva, 2018).....	65
Abbildung 17. <i>In vitro</i> -Fitness Assay ausgewählter <i>Ab</i> -Triplets.....	77
Abbildung 18. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung der Triplets von acht <i>Ab</i> -Isolaten von Tieren in M63- (oben) und LB-Medium (unten), Tripletvergleich.	81
Abbildung 19. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung der WT's von vier humanen und acht <i>Ab</i> -Isolaten von Tieren in M63- (oben) und LB-Medium (unten), Wirtsvergleich.....	82
Abbildung 20. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung der WT's von vier humanen und acht <i>Ab</i> -Isolaten von Tieren in M63- (oben) und LB-Medium (unten), Multilokus-Sequenztypen-Vergleich.....	83
Abbildung 21. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT7853. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	84
Abbildung 22. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT29027. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	85
Abbildung 23. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT29997. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	86
Abbildung 24. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT31605. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	87
Abbildung 25. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT31820. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	88
Abbildung 26. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT32292. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	89
Abbildung 27. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des <i>Ab</i> -Isolats IHIT32295. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.....	90

Abbildung 28. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Tripletts des *Ab*-Isolats IHIT32297. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium. 91

Abbildung 29. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Tripletts des *Ab*-Isolats IHIT34486. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium. 92

Abbildung 30. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung des tierischen (IHIT38008) und humanen (161/07) NDM-1-positiven *Ab*-Isolats in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium. 93

Abbildung 31. Vergleichende Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der *Galleria mellonella*-Larven für WT, WT-Cure und TF nach Infektion mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} 95

Abbildung 32. Vergleichende Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der *Galleria mellonella*-Larven des tierischen (IHIT38008) und humanen (161/07) NDM-1-positiven *Ab*-Isolats nach Infektion mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} 95

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Intrinsische Resistenzen des <i>Acb</i> -Komplexes nach EUCAST [121] und CLSI [74].	14
Tabelle 2. Nachweise über <i>Acinetobacter</i> spp. bei Kleintieren.	33
Tabelle 3. Carbapenemase-positive bzw. Carbapenem-resistente <i>Acinetobacter</i> spp. bei Kleintieren.	35
Tabelle 4. Übersicht von Carbapenemase-positiven <i>Acinetobacter</i> spp. tierischer Herkunft basierend auf 21 Studien.	42
Tabelle 5. Übersicht der <i>Acinetobacter</i> spp.-Isolate dieser Arbeit.	50
Tabelle 6. Übersicht über die Virulenz-assoziierten Gene von <i>Acinetobacter</i> spp., die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden.	51
Tabelle 7. Herkunft der <i>Acinetobacter</i> spp.-Isolate mit Carbapenemasen.	56
Tabelle 8. Herkunft und Charakteristika ergänzender Carbapenemase-tragender <i>Acinetobacter</i> spp.	58
Tabelle 9. Überblick über IS-Elemente und Gene innerhalb der CP-Region der <i>Acinetobacter</i> spp.-Isolate von Tieren.	66
Tabelle 10. Vorkommen von 32 Virulenz-assoziierten Genen bei OXA-positiven <i>Ab</i> -Isolaten des ST1 ^{Past}	69
Tabelle 11. Vorkommen von 32 Virulenz-assoziierten Genen bei OXA-positiven non-ST1 ^{Past} <i>Ab</i> -Isolaten.	71
Tabelle 12. Vorkommen von 32 Virulenz-assoziierten Genen bei OXA-positiven <i>Ap</i> -Isolaten.	73
Tabelle 13. Prozentuales Vorkommen der 32 untersuchten VAGs bei CR <i>Ab</i> nach Sequenztyp (Pasteur-Schema).	74
Tabelle 14. Übersicht zur Auswahl der <i>Ab</i> -Isolate und Stamm-Triplets für funktionelle Assays.	76
Tabelle 15. Vorkommen von Biofilm-assoziierten Genen und ihre Lokalisation bei CR <i>Ab</i> , die im Biofilm-Assay getestet wurden.	80

IV. Publikationsverzeichnis

ORIGINALARTIKEL

Im Rahmen der kumulativen Dissertation veröffentlicht:

- **Jacobmeyer, L., Semmler, T., Stamm, I., Ewers, C.** (2022) Genomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* Isolates carrying OXA-23 and OXA-58 genes from animals reveals ST1 and ST25 as major clonal lineages. *Antibiotics (Basel)* 11(8):1045.
- **Jacobmeyer, L., Stamm, I., Semmler, T., Ewers, C.** (2021) First report of NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain from a pet animal in Europe. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 26:128-129.
- **Klotz, P.*, Jacobmeyer, L.*, Leidner, U., Stamm, I., Semmler, T., Ewers, C.** (2018) *Acinetobacter pittii* from companion animals co-harboring *bla*_{OXA-58}, the *tet39* region and other resistance genes on a single plasmid. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(1): e01993-17.

* geteilte Erstautorenschaft

Außerhalb der kumulativen Dissertation veröffentlicht:

- **Klotz, P., Jacobmeyer, L., Stamm, I., Leidner, U., Pfeifer, Y., Semmler, T., Prenger-Berninghoff, E., Ewers, C.** (2018) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST294 harbouring the OXA-72 carbapenemase from a captive grey parrot. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(4): 1098-1100.
- **Rühl-Teichner, J., Jacobmeyer, L., Leidner, U., Semmler, T., Ewers, C.** (2023) Genomic diversity, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates from horses. *Microorganisms* 11(3):556.

POSTERPRÄSENTATIONEN:

- **Jacobmeyer, L., Prenger-Berninghoff, E., Leidner, U., Stamm, I., Semmler, T., Ewers, C.** Verbreitung von *Acinetobacter baumannii*-Isolaten der internationalen Klone IC1 und IC2 sowie von Carbapenem-resistenten Isolaten in einer Kleintierklinik. Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 14.06.-16.06.2021, Online Tagung.
- **Jacobmeyer, L., Klotz, P., Stamm, I., Prenger-Berninghoff, Unger, F., Eisenberg, T., E., Leidner, U., Semmler, T., Ewers, C.** *Acinetobacter radioresistens* von Tieren:

eine potenzielle Quelle für neue Varianten der OXA-23-Carbapenemase. Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 14.06.-16.06.2021, Online Tagung.

- **Rühl, J. Jacobmeyer, L., Leidner U. Semmler, T., Ewers, C.** Diversität, antimikrobielle Empfindlichkeit und Biofilmbildung bei *Acinetobacter baumannii*-Isolaten von Pferden, Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 14.06.-16.06.2021, Online Tagung.
- **Jacobmeyer, L., Dambon, F., Prenger-Berninghoff, E., Göttig, S., Pfeifer, Y., Leidner, U., Stamm, I., Semmler, T., Ewers, C.** Genomic features of NDM-1-, OXA-23- and OXA-58 type carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* from animals belonging to the globally distributed ST25 lineage. ECCMID - European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 13.04.-16.04.2019, Amsterdam.
- **Jacobmeyer, L., Klotz, P., Stamm, I., Fridriszik, F., Prenger-Berninghoff, E., Leidner, U., Semmler, T., Ewers, C.** 4-MRGN *Acinetobacter baumannii* in klinischem Untersuchungsgut von Tieren. Tagung der DVG-Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, 30.05.-01.06.2018, Hannover.

1. Einleitung

Acinetobacter (*A.*) spezies sind Gram–negative (GN), kokkoide Stäbchenbakterien [30]. Viele Arten der Gattung *Acinetobacter* wurden bereits als Teil der Mikrobiota, u.a. der Haut oder Schleimhäute von Mensch und Tier [410], aber auch aus der Umwelt oder von Nahrungsmitteln beschrieben [97]. *A. baumannii* (*Ab*) gilt als wichtigster klinischer Vertreter, welcher als opportunistischer Krankheitserreger häufig bei nosokomialen Infektionsgeschehen, aber auch sogenannten *community-acquired* Infektionen isoliert wird [7, 66, 301]. Neben *Ab* werden zunehmend auch non-*baumannii* *Acinetobacter*-Spezies wie z.B. *A. pittii* (*Ap*), *A. calcoaceticus* oder *A. lwoffii* (*Al*) als Ursache für Infektionen beim Menschen identifiziert [7, 92, 301]. *Ab* ist weltweit verbreitet, kommt aber im Gegensatz zu anderen Vertretern seiner Gattung nicht ubiquitär vor [92, 393], sondern wird vorwiegend in Krankenhäusern, insbesondere im Rahmen von Ausbruchsgeschehen, isoliert [301]. Krankenhausassoziierte bzw. nosokomiale Infektionen treten vor allem bei intensivmedizinisch betreuten Patienten auf, wohingegen der Erreger bei gesunden Menschen in der Regel keine Erkrankungen hervorruft [209]. Das klinische Bild ist größtenteils von beatmungsassoziierten Pneumonien, Blutstrom-Infektionen, Meningitiden, Wundinfektionen und Infektionen des Urogenitaltrakts geprägt [92]. Als prädisponierende Faktoren für eine *Ab*-Infektion gelten schwere Grunderkrankungen, schwere Traumata wie Verbrennungen, langwierige Krankenhausaufenthalte oder antimikrobielle Therapien nach operativen Eingriffen [30, 133]. In der Veterinärmedizin wurde erstmals im Jahr 2000 über *Ab*-Infektionen im Zusammenhang mit dem Aufenthalt von Kleintieren (Hunde/Katzen) und Pferden in Kliniken berichtet [36, 127, 402].

Meist weisen *Ab*-Isolate, die im Rahmen von Ausbruchsgeschehen bei Menschen, seltener bei Tieren isoliert wurden, Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika auf, darunter auch die von der WHO als *critically important antimicrobials* eingestufte Gruppe der Carbapeneme [92, 221, 291]. Die Eigenschaft der Multiresistenz in Verbindung mit der Etablierung erfolgreicher klonaler Linien wird als Grund für die weltweite Verbreitung von *Ab* als Erreger nosokomialer Infektionen angesehen [381]. Ebenfalls bedingt durch die Multiresistenz sind die Therapieoptionen bei *Ab*-Infektionen oft stark eingeschränkt. Patienten mit schwerwiegenden Infektionen können häufig nicht mehr adäquat therapiert werden [424]. Aufgrund dessen stufte die WHO auf ihrer „WHO Priority Pathogens List“ aus dem Jahr 2018 Carbapenem-resistenten (CR) *Ab* oberste Priorität für die Erforschung und Entwicklung neuer Antibiotika ein [381].

Trotz der zunehmenden Bedeutung von *Ab* ist hinsichtlich des natürlichen Reservoirs und des zooanthroponotischen sowie des anthroozoonotischen Potentials des Erregers erst wenig bekannt [301].

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis und die Charakterisierung von multiresistenten, insbesondere von CR *Ab*-Isolaten aus dem klinischen Untersuchungsgut von Kleintieren. Da Tiere, ähnlich wie Menschen, auch symptomlos mit dem Erreger besiedelt sein können [162, 162, 307, 369], ist es denkbar, dass Haustiere, insbesondere Hund und Katze, eine Quelle für *Ab* und andere klinisch relevante *Acinetobacter* spp. darstellen. Um die Relevanz von *Ab* von Hunden und Katzen einschätzen zu können, wurden die Isolate hinsichtlich ihrer Resistenzgene, ihrer Virulenz und bakteriellen Fitness sowie ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung analysiert und mit ausgewählten humanen Isolaten verglichen.

Die erhobenen Daten sollen zur Einschätzung von epidemiologischen Zusammenhängen, gemeinsamen Eigenschaften humaner und tierischer *Ab* und zur Bewertung wirtsübergreifender Pathogenität sowie potenzieller wechselseitiger Transmission zwischen Mensch und Tier beitragen.

2. Literaturübersicht

2.1. Taxonomie

In den vergangenen Jahrzehnten unterlag die taxonomische Einordnung der Gattung *Acinetobacter* (*A.*) stetigen Veränderungen. Insbesondere in den vergangenen 30 Jahren entwickelte sich die Taxonomie angesichts der zunehmenden Bedeutung von *Acinetobacter* spp. mithilfe der Weiterentwicklung diagnostischer Methoden, insbesondere von DNS-Sequenz-basierten Technologien weiter [422]. *Acinetobacter* sind aerobe, Oxidase-negative, Katalase-positive, kokkoide Stäbchenbakterien, die der Familie der *Moraxellaceae* und der Ordnung Pseudomonadales innerhalb der Klasse der γ -Proteobakterien zugeordnet werden [30]. Im Jahr 1911 wurde durch Beijerinck, einem niederländischen Mikrobiologen, das erste *Acinetobacter* spp.-Isolat als *Micrococcus calcoaceticus* aus einer Bodenprobe isoliert [27]. Der Name *Acinetobacter*, welcher erstmals fast 40 Jahre später von Brisou und Prévôt beschrieben wurde [48], wurde 1984 im „Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology“ etabliert. Zu diesem Zeitpunkt war die Gattung mit nur einer Spezies, *A. calcoaceticus*, die in die zwei Subspezies *A. calcoaceticus* var. *anitratius* und *A. calcoaceticus* var. *lwoffii* unterteilt wurde, vertreten [30]. 1986 gelang es Bouvet und Grimont (1986) erstmals mittels DNS-DNS-Hybridisierung zwölf verschiedene Hybridisierungsgruppen zu unterscheiden, darunter auch die als *A. baumannii* (*Ab*) bezeichnete Gruppe [43]. Durch die stetige Weiterentwicklung taxonomischer Verfahren, wie die *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (ADRA), die *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP)-Analyse, *rpoB*- oder 16S-rDNS-Sequenzierung sowie letztlich die Ganzgenomsequenzierung konnte die Gattung immer differenzierter beschrieben werden [440]. Unter den derzeit (Stand 01/2023) 76 valide beschriebenen *Acinetobacter* spp. (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html>) ist *Ab*, neben *Ap* und *A. nosocomialis*, der wichtigste klinische Vertreter [361]. 1991 fasste Gerner-Smidt die umweltassoziierte Spezies *A. calcoaceticus* sowie die human-pathogenen Spezies *Ab*, *Acinetobacter* Genom-Spezies 3 (*Ap* [282]) und *Acinetobacter* Genom-Spezies 13TU (*A. nosocomialis* [282]) aufgrund hoher DNS-Sequenzhomologien sowie großer phänotypischer Ähnlichkeiten zum *A. calcoaceticus*–*Ab*-Komplex (*Acb*-Komplex) zusammen [141]. Innerhalb der letzten Jahre wurde der *Acb*-Komplex um zwei weitere Spezies, *A. seifertii* [283] und *A. dijkshoorniae* (heute *A. lactucae*) [75] erweitert, welche bereits 1993 in Dänemark von Gerner-Smidt und Tjernberg (1993) als Genomspezies „between 1 and 3“ (*A. dijkshoorniae*) und Genomspezies „close to 13TU“ (*A. seifertii*) beschrieben wurden [142].

2.2. Differenzierung von *Acinetobacter* spp.

2.2.1. Phänotypische Eigenschaften von *Acinetobacter* spp.

Die meisten *Acinetobacter* spp. zeigen zwischen 20 °C und 37 °C ein Wachstum. Klinisch relevante Spezies zeigen meist ein Wachstumsoptimum zwischen 37 °C und 42 °C [97]. *Ab*, *Ap* und *A. nosocomialis* sind die einzigen Vertreter, die auch bei 44 °C wachsen können [30]. Auf Blutagar zeigen Isolate des *Acb*-Komplexes nach 18-24 h Inkubation bei 37 °C 1-2 mm große, nicht-pigmentierte, grauweiße oder leicht gelbliche, opake, glatte, erhabene, zum Teil schleimige Kolonien [30]. Die meisten anderen *Acinetobacter* spp. bilden kleinere (Durchmesser <1 mm), durchscheinende Kolonien aus [43, 389]. Einige Spezies, wie *A. haemolyticus* oder *A. beijerinckii* zeigen auf Schafblutagar eine vollständige Hämolyse [43, 282].

In der mikroskopischen Untersuchung zeigen sich *Acinetobacter* als gramnegative, teils gramlabile, kokkoide Stäbchen mit einer Länge von 1,5-2,5 µm und einer Breite von 1,0-1,5 µm in der exponentiellen Wachstumsphase [30]. Häufig liegen sie gruppiert oder in Ketten unterschiedlicher Länge vor [97].

Acinetobacter sind strikt aerobe Bakterien, die zu den Nonfermentern zählen, d.h. sie können Glucose nur oxidativ abbauen. Sie bilden das Enzym Katalase, welches Wasserstoffperoxid spaltet, während das Enzym Cytochromoxidase fehlt [30, 440].

Die Vertreter des *Acb*-Komplexes lassen sich aufgrund großer phänotypischer Ähnlichkeit nur anhand spezieller Methoden, wie z.B. der Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS, Kapitel 2.2.3), unterscheiden. Daher werden im Rahmen dieser Arbeit nur ausgewählte Methoden, die sich in den vergangenen Jahren hinsichtlich der Differenzierung von *Acinetobacter* spp. bewährt haben, beschrieben.

2.2.2. Genotypische Differenzierung von *Acinetobacter* spp.

Im Folgenden werden die wichtigsten Methoden zur genotypischen Differenzierung von *Acinetobacter* spp. erläutert. Auf die Beschreibung früher angewendeter Methoden, wie ARDRA, AFLP- und RAPD-Analyse, wird an dieser Stelle verzichtet, da sie mittlerweile kaum noch Anwendung in der Speziesdifferenzierung von *Acinetobacter* spp. finden.

2.2.2.1. S1-Nuklease-Hybridisierung

1986 gelang Bouvet und Grimont erstmals die Differenzierung von zwölf *Acinetobacter* spp., darunter *Ab*, *A. calcoaceticus* und *Aj*, mit Hilfe des S1-Nuklease Verdau und anschließender

DNS-DNS-Hybridisierung [43]. Die S1-Nuclease ist eine aus dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae* isolierte Endonuklease, welche einzelsträngige DNS und RNS zu Oligo- oder Mononukleotiden enzymatisch abbaut [77]. Unter anderem können so einzel- von doppelsträngiger DNS unterschieden sowie DNS-Homologien bestimmt werden [77, 440]. Dies legte die Grundlage für die derzeitige Taxonomie der Gattung *Acinetobacter*. Heute dient diese Methode nicht mehr der Speziesidentifizierung sondern wird vielmehr zur Analyse von Plasmiden bei *Acinetobacter* und anderen Bakteriengattungen genutzt [23].

2.2.2.2. Sequenzierung des 16S-rRNS-Gens

Das 16S-rRNS-Gen von Bakterien beinhaltet neun hypervariable Regionen, die sich zur Speziesdifferenzierung eignen, da sie sich zwischen einzelnen Bakterienspezies unterscheiden [67]. Mit 21 weiteren Proteinen bildet die 16S-rRNS die 30S-Untereinheit, welche mit der 50S-Untereinheit das bakterielle Ribosom darstellt [67, 396]. Die genetische Stabilität sowie die Präsenz in nahezu allen Bakterien begründen die Verwendung der 16S-rRNS Sequenzierung als meist genutzte Methode zur Speziesdifferenzierung [194]. Das 16S-rRNS-Gen wird mittels PCR partiell amplifiziert, sequenziert und anschließend mit der Sequenz publizierter Referenzstämme verglichen. Jedoch ist das 16S-rRNS-Gen zwischen verschiedenen *Acinetobacter*-Spezies nicht polymorph genug (zu sehr konserviert), sodass es keine verlässliche Unterscheidung sämtlicher *Acinetobacter* spp. zulässt [10, 194, 211].

2.2.2.3. Sequenzierung des RNS Polymerase Untereinheit B-Gens (*rpoB*)

Das *rpoB*-Gen kodiert die β -Untereinheit der bakteriellen RNS-Polymerase und eignet sich aufgrund seiner genetischen Stabilität (sogenanntes *housekeeping gene*) als molekularer Marker [4]. Wie bereits bei der 16S-rRNS-Gen-Sequenzierung werden auch hier partielle Regionen des *rpoB*-Gens amplifiziert, sequenziert und anschließend mit Referenzstämmen verglichen, um so die Spezies zu identifizieren [225]. Im Unterschied zur Analyse des 16S-rRNS-Gens erwies sich die *rpoB*-Gen Sequenzierung als verlässlicher zum Nachweis von *Acinetobacter* spp. [155]. Neben der Speziesidentifizierung kann auch eine Differenzierung des *Acb*-Komplexes erfolgen, sodass diese Methode auch heute noch Anwendung findet [228].

2.2.2.4. *GyrB* Multiplex-PCR

Das *gyrB*-Gen kodiert die Untereinheit B der DNS Gyrase, einem prokaryotischen Enzym, dass an der Raumorientierung doppelsträngiger DNS beteiligt ist [138]. Aufgrund der hohen Spezifität bzw. des Unterschiedes der *gyrB*-Gensequenz zwischen *Acinetobacter*-Spezies des

Acb-Komplexes eignet sich diese Methode zur sicheren Differenzierung von vier (*Ab*, *Ap*, *A. nosocomialis* und *A. calcoaceticus*) der sechs Vertreter [178, 182]. In einer Multiplex-PCR werden die Sequenzunterschiede des *gyrB*-Gens der vier Spezies des *Acb*-Komplexes amplifiziert und anschließend in einer Gelelektrophorese dargestellt, sodass eine Speziesdifferenzierung ohne eine Sequenzanalyse möglich ist [178]. Weitere *Acinetobacter*-Spezies, wie z.B. *A. dijkschoorniae* oder *A. seifertii* können nicht differenziert werden. Hierfür müssen andere Methoden, wie z.B. die Massenspektrometrie genutzt werden [75, 247].

2.2.2.5. Sequenzierung des *bla*_{OXA-51-like}-Gens

Die β -Laktamase OXA-51 wurde erstmals von Brown *et al.* (2005) bei mehreren, genetisch nicht verwandten *Ab* charakterisiert [50]. In der folgenden Zeit wurden immer mehr eng verwandte Varianten dieser Oxacillinase bei verschiedenen *Ab* beschrieben [49, 50, 170]. Eine phänotypische Carbapenem-Resistenz (CR) tritt auf, wenn aufwärts (*upstream*) des *bla*_{OXA-51-like}-Gens das IS-Element IS*Aba1* vorliegt, welches zu einer gesteigerten Expression der Oxacillinase führt [395]. Zur genotypischen Differenzierung wird das *bla*_{OXA-51-like}-Gen in einer PCR amplifiziert, sequenziert und mit Referenzsequenzen verglichen. In der *Beta-Lactamase Database* (<http://www.bldb.eu>) sind 373 (Stand 01/2023) OXA-51-Varianten beschrieben [277]. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Varianten der OXA-51-Laktamase mit klonalen Linien (Kapitel 2.3.1) von *Ab* korrelieren. So kann z.B. *bla*_{OXA-69} dem internationalen Klon (*international clone*) IC1 oder *bla*_{OXA-66} dem IC2 zugeordnet werden [161]. Folglich eignet sich die Sequenz des *bla*_{OXA-51-like}-Gens als Marker sowohl in diagnostischen als auch in epidemiologischen Untersuchungen [161, 433].

2.2.3. Massenspektrometrie

Bei der in den 1980er Jahren entwickelten *Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS)-Analyse wird das Massenspektrum, d.h. das Profil ribosomaler Proteine von Bakterien und Pilzen bestimmt [68]. Die Bakterien werden direkt oder infolge eines Extraktionsverfahrens mit einer Matrix auf einem Träger fixiert und anschließend durch einen Laser desorbiert, ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt [68]. Hier trennen sich die Moleküle entsprechend ihrer Ladung und Masse auf, wodurch individuelle Spektren erzeugt werden. Diese speziesspezifischen Spektren werden mit Referenzprofilen einer kontinuierlich aktualisierten Datenbank zur Identifikation relevanter Mikroorganismen abgeglichen [206, 372]. Neben anderen genotypischen Methoden der *Acinetobacter* spp.-Identifikation hat sich die MALDI-TOF MS-Analyse in den letzten Jahren in der

mikrobiologischen Routinediagnostik zunehmend etabliert und bewährt [284]. MALDI-TOF MS erwies sich als eine robuste, schnelle und verlässliche Methode zur Identifikation verschiedener Bakterien, wie auch von Vertretern des *Acb*-Komplexes [113, 425]. Auch können *A. seifertii* und *A. lactucae* (früher *A. dijkshoorniae*) aufgrund der Ergänzung neuer Spektren zuverlässig identifiziert werden [247]. Jedoch ist die Anwendung auf die ständige Weiterentwicklung der Datenbank angewiesen. Je nach verfügbaren Referenzspektren kann es daher notwendig sein, die Differenzierung einzelner *Acinetobacter* spp., insbesondere auch innerhalb des *Acb*-Komplexes, mit einer weiteren genotypischen Methode, wie z.B. der *gyrB*-PCR (Kapitel 2.2.2.4) oder der Ganzgenomsequenz-Analyse zu verifizieren [247].

2.3. Molekulare Epidemiologie von *Acinetobacter baumannii*

2.3.1. Phylogenetische Gruppen von *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii (*Ab*) kommt im Gegensatz zu anderen Vertretern der Spezies, wie z.B. *A. calcoaceticus*, nicht ubiquitär vor [92], führt jedoch weltweit zu nosokomialen Infektionen. Um die globale Epidemiologie von *Ab* besser verstehen zu können, wurden *Ab*-Isolate mittels unterschiedlicher Methoden in phylogenetische Gruppen eingeteilt. Untersuchungen zeigten, dass viele der weltweit vorkommenden Stämme auf wenige klonale Linien mit großer phäno- und genotypischer Ähnlichkeit zurückzuführen sind [356]. Diese klonalen Linien, welche auf gemeinsamen phylogenetischen Vorläufern beruhen und nicht als eigentliche Klone zu verstehen sind, zeichnen sich oftmals durch eine Multiresistenz, u.a. gegenüber Carbapenemen sowie durch eine hohe Tenazität, u.a. gegenüber Austrocknung und eine hohe genetische Stabilität aus. Bereits 1996 beschrieben Dijkshoorn *et al.* (1996) das Auftreten von phäno- und genotypisch ähnlichen *Ab* bei verschiedenen Ausbruchsgeschehen in Europa, was einen gemeinsamen klonalen Ursprung der Isolate vermuten ließ. So gelang erstmals anhand einer AFLP-Analyse die Beschreibung der sogenannten europäischen Klone (EU) I und II [90]. Der EUIII wurde acht Jahre später von van Dessel *et al.* (2004) beschrieben [400]. Higgins *et al.* (2010) konnten zeigen, dass die Verbreitung der EUs nicht auf Europa beschränkt ist: sie ersetzten daher die Bezeichnung der EUs durch den Begriff der weltweiten (*worldwide* - WW) Klone [174]. Die Autoren konnten anhand der rep-PCR (Kapitel 2.3.2.2) fünf neue klonale Linien (WWIV-WWVIII) benennen [174]. Im gleichen Jahr prägten Diancourt *et al.* (2010) den Begriff der Internationalen Klone (*international clones* – IC1-IC3), welcher sich zunehmend durchsetzte [88]. Bis heute sind weltweit sechs weitere Internationale Klone IC5-IC9 von *Ab* beschrieben [174, 276]. Zudem konnte gezeigt werden, dass die ICs auf

Grundlage der MLST (Kapitel 2.3.2.4) bestimmten Sequenztypen zugeordnet werden können. Die Autoren vermuteten, dass die antimikrobielle Resistenz einer der Hauptgründe für den Erfolg der klonalen Linien sein könnte [88]. Insbesondere *Ab* des IC1, IC2 und IC7 kommen eine besondere Bedeutung zu, da sie am häufigsten im Rahmen nosokomialer Infektionsgeschehen nachgewiesen werden. Oft sind solche Stämme mit einer CR assoziiert [174, 348, 399].

2.3.2. Molekularbiologische Methoden zur Typisierung von *Acinetobacter baumannii*

2.3.2.1. Pulsfeldgelelektrophorese

Bei der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) wird die bakterielle genomische DNS mit einem Restriktionsenzym (bei *Acinetobacter* spp. z.B. *ApaI*) restringiert [150]. Je nach Genomsequenz entstehen hierbei unterschiedlich große Fragmente (Längenpolymorphismus), welche anschließend in einem alternierenden elektrischen Feld aufgetrennt werden [9, 150]. Es entsteht ein stammspezifisches Bandenmuster, welches eine Zuordnung von zeitlich zusammenhängenden Isolaten zu Klonen ermöglicht [9]. Die PFGE galt lange als der Goldstandard in der epidemiologischen Untersuchung nosokomialer Ausbruchsgeschehen [24], jedoch wird sie zunehmend durch sequenzbasierte Methoden, wie der *core genome* MLST (cgMLST) (Kapitel 2.3.2.5) abgelöst. DNS-Sequenz-basierte Verfahren sind gegenüber der PFGE besser standardisierbar und liefern reproduzierbare Daten für einen internationalen Vergleich [24].

2.3.2.2. Repetitive Extragenetische Palindromische PCR und DiversiLab

Die Repetitive Extragenetische Palindromische (rep)-PCR beruht auf der REP-Sequenz, ein 35 bp langer Genomabschnitt, der erstmals bei *E. coli* und *Salmonella* Typhimurium nachgewiesen wurde [376]. Die REP-Sequenz ist hochkonserviert und kann aufgrund mehrerer Kopien bis zu 1 % des Gesamtgenoms ausmachen [376]. Auch wenn die Sequenz im Reich der Eubakterien weit verbreitet ist, ist die Verteilung im Genom stammspezifisch [404]. Mittels spezifischer Primer kommt es nach einer PCR so zu einer stammspezifischen Anzahl und Länge von Amplifikaten, was zur Typisierung von u.a. *Acinetobacter* spp. genutzt werden kann [404]. So können *Ab* den ICs zugeordnet werden [177]. Heute wird häufig das automatisierte Verfahren DiversiLab von bioMérieux (Nürtingen, Deutschland) genutzt, welches die DNS-Isolation und die rep-PCR sowie einen anschließenden Vergleich der Muster mit Referenzmustern einer rep-PCR Datenbank umfasst. Auch wenn weder das Ergebnis der rep-

PCR noch des DiversiLab-Verfahrens zwischen Laboren identisch ist, kann eine Gruppenbildung der jeweiligen Cluster reproduziert werden [176].

2.3.2.3. Multiplex-PCR zur Typisierung von *A. baumannii*

Turton *et al.* (2007) etablierten eine Multiplex-PCR zur Identifizierung klonaler Linien bei *Ab* im Rahmen von Ausbruchsgeschehen. In zwei unterschiedlichen PCRs werden die drei konservierten Gene *ompA*, *csuE* und *bla_{OXA51}-like* partiell amplifiziert und mittels einer Gelelektrophorese dargestellt [394]. Die Typisierung von *Ab* anhand der drei Gene wird auch als *3-locus-sequence typing* (3-LST) bezeichnet [320]. Das spezifische Bandenmuster der Stämme in den separaten PCRs erlaubt eine Einteilung von *Ab* in drei Gruppen (SGI-SGIII), die mit den IC1-IC3 korrelieren [394]. Ein Vorteil dieser Methode liegt darin, dass so Isolate auch ohne Sequenzierung, also sehr schnell, klonalen Linien zugeordnet werden können [252]. Jedoch können nicht alle Stämme einer klonalen Linie zugeordnet werden, was zum einen in der geringen Anzahl an definierten Gruppen (SGI-SGIII vs. IC1-IC9) und zum anderen in der Variabilität der Zielgene und der damit verbunden niedrigen Spezifität der Primer begründet ist [252]. Pournas *et al.* (2014) zeigten außerdem, dass aufgrund des *csuE*-Gens eine falsche Zuordnung möglich ist, da *csuE* auch von *Ab* anderer klonaler Linien erworben werden kann. So konnte bei zwei *Ab* des klonalen Komplex (*clonal complexes* - CC) CC1 das für Stämme des CC2 charakteristische *csuE* Gen nachgewiesen werden [320]. Demnach sollten die Ergebnisse mit weiteren Methoden, wie z.B. einer MLST (Kapitel 2.3.2.4) überprüft werden.

2.3.2.4. Multilokus-Sequenztypisierung (MLST)

Bei der Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) werden mehrere verschiedene Loci des bakteriellen Genoms amplifiziert und sequenziert [244]. Diese Loci sind hochkonservierte Gene (*housekeeping genes*), welche konstitutiv, unabhängig von äußeren Einflüssen exprimiert werden [220]. Hierbei wird den unterschiedlichen Sequenzen eines Gens ein bestimmtes Allel zugewiesen, sodass ein stammspezifisches Allel-Profil entsteht [244]. Dieses Profil kann mit einer internationalen Datenbank (<https://pubmlst.org/databases/>) abgeglichen und so einem Sequenztyp (ST) zugeordnet werden. Im Jahr 2005 wurde erstmals von Bartual *et al.* (2005) ein MLST-Schema, das „Oxford“-Schema (Ox), für *Ab* beschrieben [24, 202]. Dieses basiert auf der Sequenzierung der 305 bis 513 bp großen Regionen der Gene *cpn60*, *gdhB*, *gltA*, *gpi*, *gyrB*, *recA* und *rpoD*. Fünf Jahre später etablierten Diancourt *et al.* (2010) ein weiteres Schema zur Typisierung: das „Pasteur“-Schema (Past) [88]. Beide Schemata werden heute parallel angewendet und ermöglichen einen weltweiten, Laboratorien übergreifenden Vergleich von

Ab-Stämmen (<https://pubmlst.org/abbaumanni/>). Während das Ox-Schema *Ab* auf Grundlage der Sequenzunterschiede der bereits o.g. sieben Haushaltsgene typisiert, verwendet das Past-Schema folgende Gene: *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* und *rpoB* [88]. Das Ox-Schema hat eine differenziertere Auflösung und bildet mehr STs ab als das Past-Schema. So werden z.B. dem ST2^{Past} mehrere STs des Ox-Schemas zugeordnet. Das Past-Schema hingegen korreliert besser mit der Einteilung von *Ab* in die ICs. So können STs bestimmten ICs zugeordnet werden (z.B. ST1^{Past} dem IC1 oder ST25^{Past} dem IC7) [391]. Derzeit umfasst das MLST Ox-Schema 2.836 und das Past-Schema 2.249 verschiedene STs (Stand 01/2023). Beide Schemata eignen sich zur Durchführung weltweiter phylogenetischer Studien von *Ab*, jedoch sind sie aufgrund ihrer begrenzten Anzahl an verwendeten Genloci zur Analyse von Ausbruchsgeschehen nur bedingt anwendbar [391]. Hier eignet sich die cgMLST eher, da sie sich auf eine deutlich höhere Anzahl an Loci bezieht (Kapitel 2.3.2.5).

2.3.2.5. Core genome MLST

Die *core genome* MLST (cgMLST) ist eine Erweiterung der MLST, da sie nicht nur auf der Analyse der Allele von sieben Haushaltsgenen, sondern aller Allele der Gene des Kerngenoms beruht. Als Grundlage dient eine Ganzgenomsequenzierung (*whole genome sequencing* - WGS) der inkludierten Stämme. Das Kerngenom kann auf zwei unterschiedliche Arten definiert werden: (i) es werden möglichst viele Genome einer Spezies miteinander verglichen und Gene, welche unter Anwendung eines Grenzwertes (z.B. >95 % Ähnlichkeiten der Gene in Länge und Nukleotidsequenz), in möglichst vielen Genomen vorhanden sind, als Kerngenom definiert [203] oder (ii) es werden auf Grundlage einer repräsentativen Anzahl an Referenzgenomen einer Spezies Gene, die bei allen ausgewählten Stämmen vorkommen, als Grundlage für das Kerngenom genutzt [258]. Higgins *et al.* (2017) etablierten ein cgMLST-Schema für *Ab* auf Grundlage der Genome von 53 humanen *Ab*-Isolaten aus diversen nosokomialen Ausbruchsgeschehen innerhalb deutscher Kliniken [181]. Sie definierten ein Kerngenom, basierend auf 2.390 Genen, welches in weiteren Analysen bei 98,4 % von 1.339 öffentlich verfügbaren *Ab*-Genomen nachgewiesen werden konnte [181]. In den letzten Jahren nimmt die Zahl an standardisierten cgMLST-Schemata für verschiedene Bakterienpezies stetig zu (<https://www.cgmlst.org/ncs>). Die Größe des Kerngenoms variiert derzeit zwischen 425 Genen bei *Mycoplasma gallisepticum* bis zu 3.152 Genen bei *E. coli*. Durch die deutlich höhere Anzahl an Zielgenen, im Vergleich zur rep-PCR oder MLST, die benutzerfreundliche Analyse der WGS-Daten über verschiedene öffentlich zugängliche Softwareprogramme sowie

die Reproduzier- und Transferierbarkeit zwischen Laboren ist anhand der cgMLST-Analyse eine deutlich bessere Aufarbeitung von Ausbrüchen möglich als über herkömmliche Methoden.

2.3.2.6. *Maximum Common Genome (MCG)*

Die Analyse des *Maximum Common Genomes* (MCG) ähnelt der cgMLST. Beide Verfahren beruhen auf dem Vergleich von repräsentativen Genen auf Grundlage von WGS-Daten. Bei der MCG-Analyse werden orthologe Gene innerhalb der Vergleichsgruppe von Stämmen bestimmt. Als orthologe Gene gelten Gene, die sich bis zu einem bestimmten Grenzwert (z.B. >70 %) in ihrer Nukleinsäuresequenz ähneln und in jedem der inkludierten Genome präsent sind [260]. Die Auflösung der MCG-Analyse ist im Vergleich zur cgMLST deutlich erhöht, da die Genome nicht anhand der Allele, sondern anhand von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single-nucleotide polymorphism* – SNP) verglichen werden. Dies erlaubt eine detailliertere verwandtschaftliche Untersuchung der Genome. Die biomathematische Auswertung der MCG-Analyse ist jedoch deutlich komplexer als die der cgMLST.

2.4. **Antimikrobielle Empfindlichkeit von *Acinetobacter* spp.**

Die weltweit zunehmende Resistenz von Bakterien gegenüber einer Vielzahl von antimikrobiellen Wirkstoffen stellt sowohl die Human- als auch die Veterinärmedizin vor eine große Herausforderung [330]. Neben Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) und Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL)-bildenden *Enterobacteriaceae* gehören *Ab* zu den bedeutsamsten Erregern, die in der Lage sind, in hohem Maße Resistenzen zu erwerben [330, 381]. Insbesondere der zunehmende Wirkverlust von Carbapenemen gegenüber *Ab* schränkt adäquate Therapieoptionen stark ein [92, 221, 291]. Bakterielle Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen können intrinsisch, von anderen Bakterien erworben sein oder auf DNS-Mutationen zurückgehen [301]. Multiresistente, insbesondere CR *Ab* werden zunehmend im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen nachgewiesen [335].

Der Begriff der Multiresistenz ist nicht einheitlich definiert. Magiorakos *et al.* (2012) legten eine Definition von multiresistent (*multidrug resistant* - MDR) für das Resistenzprofil von *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. fest, die sich in drei Gruppen unterteilt [242]:

- I ***Pandrug resistant*** (PDR) als Unempfindlichkeit gegenüber allen antimikrobiellen Wirkstoffen aus allen Antibiotikaklassen

- II *Extensively drug resistant* (XDR) als Unempfindlichkeit gegenüber mindestens einem antimikrobiellen Wirkstoff aus allen bis auf zwei oder weniger Antibiotikaklassen
- III *Multidrug resistant* (MDR) als Unempfindlichkeit gegenüber mindestens einem antimikrobiellen Wirkstoff aus drei oder mehr Antibiotikaklassen

Zur Definition von multiresistenten *Ab* werden von diesen Autoren die Klassen bzw. Substanzen der Aminoglykoside, Carbapeneme, Fluorchinolone, Penicilline + β -Laktamase-Inhibitoren, Extended-Spektrum Cephalosporine, Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Polymyxine und Tetrazykline herangezogen [242].

Im Rahmen der „Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention“ (KRINKO) vom Robert Koch-Institut (RKI) wurde eine weitere Definition multiresistenter *Ab* etabliert [333, 334]:

- I 3MRGN als **Multiresistente gramnegative** Stäbchen mit einer Resistenz gegen **3** der 4 Antibiotikaklassen
- II 4MRGN **Multiresistente gramnegative** Stäbchen mit einer Resistenz gegen **4** der 4 Antibiotikaklassen, bzw. für *Ab* und Enterobakterien mit einer CR

Die Grundlage der Definition stellen die vier in der Humanmedizin therapeutisch relevanten Antibiotikaklassen der Acylureidopenicilline, 3./4. Generations-Cephalosporine, Carbapeneme und Fluorchinolone dar.

Des Weiteren veröffentlicht Schwarz *et al.* (2010) folgende Definition für Multiresistenz in der Veterinärmedizin: Multiresistenz ist die erworbene Resistenz gegenüber mindestens einem Antibiotikum aus drei oder mehr Antibiotikaklassen bzw. auf molekularer Ebene das Vorhandensein von mindestens drei Resistenzgenen, die mit phänotypischer Resistenz in drei oder mehr Antibiotikaklassen assoziiert sind, innerhalb eines Isolats [357]. Da der Ausdruck der Multiresistenz weder in der Human- noch in der Veterinärmedizin eindeutig definiert ist, sollte ein Vergleich von Daten aus unterschiedlichen Studien stets unter Berücksichtigung der angewendeten Definition erfolgen [242].

Weltweit gibt es zwei Kommissionen, die die mikrobielle Empfindlichkeitsprüfung zu Normen standardisieren. Zum einen das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), ein Netzwerk unter der Schirmherrschaft des *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), und zum anderen das US-amerikanische *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Neben der Festlegung von sogenannten *Breakpoints* (Grenzwerten), der Minimalen-Hemmstoffkonzentration (MHK) von antimikrobiellen

Wirkstoffen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Bakterium und der Wirkstoffkonzentration legen beide Komitees auch eine Reihe an intrinsischen Resistenzen fest [71, 115]. Bei der MHK handelt es sich um die geringste Wirkstoffkonzentration einer antimikrobiellen Substanz, die eine Erregervermehrung in der Kultur noch verhindert [14].

Von der CLSI gibt es seit mehr als zehn Jahren für den veterinärmedizinischen Bereich das Komitee *Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing* (VAST) [70]. Seit 2015 bildet EUCAST ebenfalls ein Komitee: The EUCAST *Veterinary Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (VetCAST) zur Veröffentlichung von Leitlinien für die Tiermedizin [392]. Dennoch ist die Interpretation der Ergebnisse der antimikrobiellen Resistenztestung in der Tiermedizin oft eingeschränkt, da für viele Wirkstoffe sowie Erreger und Indikationen bis heute keine oder keine einheitlichen MHK-Werte festgelegt sind.

2.4.1. Intrinsische Resistenzen

Intrinsische Resistenzen sind stabile genetische Eigenschaften, die in allen Genomen einer Bakterienspezies, so auch in Spezies aus dem *Acb*-Komplex zu finden sind (Tabelle 1).

Intrinsische Resistenzen sind in der Regel unabhängig von äußeren Einflüssen, wie Antibiotika-Selektionsdruck und werden nicht mittels horizontalem Gentransfer (HGT) verbreitet [76]. Ein Beispiel für *Ab* ist die chromosomal kodierte CP *bla_{OXA-51-like}*, die jedoch nur in Kombination mit *ISAba1*, welches die Expression der β -Laktamase erhöht, zu einer phänotypischen und somit klinisch relevanten CR führt (Kapitel 2.2.2.5).

Tabelle 1. Intrinsische Resistenzen des *Acb*-Komplexes nach EUCAST [121] und CLSI [74].

Antibiotika	EUCAST	CLSI	Antibiotika	EUCAST	CLSI
Penicilline			Lincosamide		
Ampicillin	R	R	Clindamycin	R	R
Amoxicillin	k.A.	R	Zyklische Lipopeptide		
Amoxicillin-Clavulansäure	R	R	Daptomycin	k.A.	R
Penicillin	R	R	Steroid-Antibiotika		
Cephalosporine			Fusidinsäure	R	R
Cefalotin, Cefazolin	R	R	Glykopeptide		
Cefotaxim	R	k.A.	Vancomycin	R	R
Cefotetan	k.A.	R	Teicoplanin	R	R
Cefoxitin	k.A.	R	Oxazolidinon-Antibiotika		
Ceftriaxon	R	k.A.	Linezolid	R	R
Cefuroxim	k.A.	R	Streptogramin-Antibiotika		
Carbapeneme			Quinupristin-Dalfopristin	R	R
Ertapenem	R	R	Ansamycine		
Monobactam-Antibiotika			Rifampicin	R	R
Aztreonam	R	R	Sonstige		
Tetrazykline			Chloramphenicol	k.A.	R
Tetrazyklin	R	k.A.	Erythromycin	R	R
Doxyzyklin	R	k.A.	Fosfomycin	R	R
Makrolid-Antibiotika			Trimethoprim	R	R
Azithromycin	R	R			
Clarithromycin	R	R			

R: Resistent; k.A.: keine Angabe

2.4.1.1. Intrinsische Resistenzmechanismen

2.4.1.1.1. Multidrug-Efflux-Pumpen

Die Überexpression von sogenannten Multidrug-Efflux-Pumpen gehört zu den unspezifischen bakteriellen Abwehrmechanismen, da undifferenziert Substanzen, wie antimikrobielle Wirkstoffe, aus der Bakterienzelle geschleust werden [243]. Entweder sind Gene für Efflux-Pumpen chromosomal kodiert, wie für z.B. AdeABC bei *Ab* [246], oder sie werden via HGT, wie z.B. *tet*-Gene, die auf Transposons (Kapitel 2.4.3.2) oder Plasmiden (Kapitel 2.4.3.3) lokalisiert sind, erworben. Die Klasse der Multidrug-Efflux-Pumpen kann in sechs Gruppen unterteilt werden: *ATP binding Cassette* (ABC) Familie, *Resistance-nodulation-division* (RND) Superfamilie, *Multidrug-and-toxic-compound-extrusion* (MATE) Familie, *Small-multidrug-resistance* (SMR) Familie, *Major-Facilitator* (MF) Superfamilie und die

Drug/Metabolite Transporter (DMT) Superfamilie [243, 406]. Bei *Ab* sind v.a. Efflux-Pumpen der RND- und MF-Superfamilie vertreten [406]. So vermitteln die zur RND-Superfamilie zugeordneten Pumpen AdeABC, AdeIJK und AdeFGH Unempfindlichkeiten gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika wie Aminoglykosiden, Chloramphenicol, Tetrazyklinen oder Fluorchinolonen [85, 243]. Das Produkt des *tetA*-Gens führt zu einer Resistenz gegenüber Tetrazyklinen während das *tetB*-Gen mit einer Resistenz gegenüber Tetrazyklinen und Minozyklinen assoziiert ist [249]. Beide Efflux-Pumpen werden der MF-Superfamilie zugeordnet [405]. Martí *et al.* (2006) konnten im Rahmen ihrer Studie zeigen, dass von 79 *Ab*-Isolaten 66 % *tetB* und 13,6 % *tetA* trugen, jedoch kein Isolat beide Gene gleichzeitig aufwies [249]. Die unspezifischen Transporter AbeS bzw. AbeM der SMR-Familie bzw. der MF-Superfamilie sind mit einer Vielzahl an Resistenzen assoziiert [374, 378]. Die Expression des *cmIA*-Gens führt zu einer Resistenz gegenüber Chloramphenicol, bedingt durch eine Efflux Pumpe der MF-Superfamilie [126].

2.4.1.1.2. Änderung der Permeabilität der äußeren Membran

Die Veränderung der Membranpermeabilität von Bakterien, z.B. durch eine geringe Anzahl von Porinen, kann die antimikrobielle Empfindlichkeit stark beeinflussen [227]. Da Porine aber nicht nur Einfluss auf die antimikrobielle Resistenz haben, sondern auch andere Moleküle durch die äußere Membran transportieren können, spielen sie auch in der Virulenz von *Ab* eine bedeutsame Rolle [406]. *Ab* weist im Vergleich z.B. mit *E. coli* deutlich weniger Porine auf, dies kann u.a. für das breite Spektrum intrinsischer Resistenzen verantwortlich sein [406]. Unter der Vielzahl an Porinen in der äußeren Membran von GN Bakterien ist das äußere Membranprotein OmpA am häufigsten vertreten [367]. OmpA, das bei *Ab* u.a. an der Apoptose von Wirtszellen beteiligt ist [63], spielt eine große Rolle in der Virulenz [227], ist jedoch aufgrund der Beeinflussung der Permeabilität auch bei der antimikrobiellen Resistenz von Bedeutung [367]. So zeigten Smani *et al.* (2014), dass die Deletion des *ompA*-Gens bei dem *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978 zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber u.a. Chloramphenicol oder Aztreonam, führte. Dies ließ vermuten, dass OmpA an der Ausschleußung verschiedener Wirkstoffe aus der bakteriellen Zelle beteiligt ist [367]. Des Weiteren führt eine verminderte Expression der äußeren Membranproteine CarO oder Omp37 zu einer Resistenz von *Ab* gegenüber Carbapenemen [227, 315].

2.4.1.1.3. Enzyme

Ab verfügt über die intrinsische β -Laktamase OXA-51-like mit ihren derzeit 373 Varianten [49]. Diese wird jedoch nur sehr gering exprimiert, sodass erst die Kombination mit IS*Aba1* (Kapitel 2.4.3.1) *upstream* des OXA-51 kodierenden Gens die Ausbildung einer phänotypischen Resistenz gegenüber Carbapenemen bewirkt [395]. Wie bereits in Kapitel 2.2.2.5 erläutert, eignet sich der Nachweis dieser Oxacillinase zur Speziesidentifizierung von *Ab*. Eine weitere intrinsische β -Laktamase von *Ab* ist die chromosomal kodierte Cephalosporinase AmpC [304]. Auch hier ist eine Insertionssequenz wie IS*Aba1*-like *upstream* in der Promotorregion des *bla*_{AmpC}-Gens mit nachfolgend vermehrter Expression notwendig, damit es zu einer klinisch und somit therapeutisch relevanten Resistenz kommt [73, 172].

2.4.2. Erworbene Resistenzen

Eine erworbene Resistenz liegt vor, wenn ein Bakterium gegenüber einem bestimmten antimikrobiellen Wirkstoff eine Resistenz aufweist, gegen den die Wildtyppopulation ursprünglich empfindlich war (Kapitel 2.4.3). Im Unterschied zu intrinsischen Resistenzen treten erworbene Resistenzmechanismen nicht bei allen Vertretern einer Spezies auf. Neben den in Kapitel 2.4.1 beschriebenen intrinsischen Resistenzen kann *Ab* eine Vielzahl an erworbenen Resistenzmechanismen, wie z.B. β -Laktamasen aufweisen [30].

2.4.2.1. Resistenz gegenüber β -Laktam-Antibiotika

Zur Klasse der β -Laktam-Antibiotika zählen eine Reihe von bakteriziden Wirkstoffen wie Penicilline, Cephalosporine oder Carbapeneme. Diese hemmen die Peptidoglykansynthese bei der Zellteilung und führen so zu einem Absterben der Bakterienzelle. Insbesondere die immer häufiger anzutreffende CR von *Ab* ist besorgniserregend, da Carbapeneme lange Zeit als wichtigstes Therapeutikum bei Infektionen mit multiresistenten *Ab* galten [92, 102]. Über 95 % der CR sind enzymatisch durch die zu den β -Laktamasen gehörenden CPs bedingt [1, 335]. Diese enzymatischen Resistenzmechanismen führen jedoch häufig erst in Kombination mit Efflux-Pumpen (Kapitel 2.4.1.1.1) oder Porinen (Kapitel 2.4.1.1.2) zu einer klinisch relevanten antimikrobiellen Resistenz [406]. Beta-Laktamasen sind eine große Gruppe von Enzymen, die den β -Laktam-Ring hydrolysieren und so die Wirksamkeit des Antibiotikums verhindern [1]. Anhand ihrer Aminosäuresequenz können β -Laktamasen in vier molekulare Klassen (Ambler Klasse A-D) eingeteilt werden [11].

2.4.2.1.1. Enzyme der Ambler Klasse A

Enzyme der Ambler Klasse A zählen zu den Serin- β -Laktamasen und hydrolysieren Cephalosporine und Penicilline effektiver als Carbapeneme. Sie können, mit Ausnahme von wenigen KPC-like-Enzymen, durch Clavulansäure gehemmt werden [196]. Zu der Ambler Klasse A zählen u.a. TEM (**Temoneira**; v.a. *E. coli*), GES (**Guiana Extended-Spektrum β -Laktamase**), KPC (**Klebsiella pneumoniae Carbapenemase**), IMI (**Imipenem-hydrolysierende β -Laktamase**) und SHV (**Sulphydryl-variabel**; v.a. *Klebsiella pneumoniae*) [227, 414]. Bei *Ab* werden vereinzelt β -Laktamasen der Ambler Klasse A nachgewiesen [3, 39, 251, 301, 308, 309].

2.4.2.1.2. Enzyme der Ambler Klasse B

Im Unterschied zu den Serin-abhängigen β -Laktamasen sind Enzyme der Ambler Klasse B von der Anwesenheit von Zink oder anderen Metallen abhängig [196]. Daher werden sie auch als Metallo- β -Laktamasen (MBLs) bezeichnet. MBLs weisen eine höhere hydrolytische Aktivität gegenüber β -Laktamen, exklusive Monobaktam-Antibiotika, als z.B. Vertreter der Ambler Klasse D (Oxacillinasen) auf [315]. Chelatkomplexbildner wie EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) können im Gegensatz zu Clavulansäure, Sulbactam oder Tazobactam MBLs inaktivieren [98]. Bei *Ab* konnten bisher die MBLs IMP (**Imipenem-resistente *Pseudomonas***), VIM (**Verona integron-encoded Metallo- β -Laktamase**), NDM (**Neu Delhi Metallo- β -Laktamase**) und SIM (**Seoul Imipenemase**) nachgewiesen werden [309].

2.4.2.1.3. Enzyme der Ambler Klasse C

Beta-Laktamasen der Ambler Klasse C können Resistenzen gegenüber verschiedenen β -Laktam-Antibiotika wie Penicillinen oder Cephalosporinen vermitteln [227]. Der wichtigste Vertreter ist die bei *Ab* intrinsische chromosomal kodierte Cephalosporinase AmpC (Kapitel 2.4.1.1.3). Bisher gibt es keine Berichte über erworbene β -Laktamasen der Ambler Klasse C bei *Ab*.

2.4.2.1.4. Enzyme der Ambler Klasse D (Oxacillinasen)

Enzyme der Ambler Klasse D, sogenannte Oxacillinasen (OXA) werden am häufigsten bei β -Laktam-resistenten *Ab* nachgewiesen [301]. Bereits vor 38 Jahren wurde die erste plasmidkodierte Oxacillinase OXA-23 (damals ARI-1) in Schottland bei *Ab* nachgewiesen [354]. Weltweit spielen bei CR *Ab* neben OXA-23 insbesondere OXA-24/40 und OXA-58 eine bedeutende Rolle [315]. OXA-24/40 wurde erstmals 1997 bei einem Patienten in Spanien in

einem *Ab*-Isolat chromosomal nachgewiesen [42]. Sechs Jahre später wurde OXA-58 bei einem humanen CR *Ab*-Isolat in Frankreich gefunden [313]. Diesen drei Oxacillinase-Familien werden aufgrund von Homologien der Aminosäuresequenzen weitere *bla*_{OXA}-Gene zugeordnet, welche entsprechend als *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like} und *bla*_{OXA-58-like} bezeichnet werden. Stämme, die diese *bla*_{OXA}-Gene tragen, exprimieren Enzyme, die Carbapeneme hydrolysieren und somit inaktivieren können [117]. Häufig kommt es zu einer verstärkten Expression dieser Gene aufgrund von IS-Elementen *upstream* der entsprechenden Promotersequenzen (z.B. *ISAbal* oder *ISAbas*) wie auch bei der intrinsischen *bla*_{OXA-51-like} Oxacillinase [301, 315]. Higgins *et al.* (2009 und 2013) konnten zwei neue Oxacillinasen bei *Ab* nachweisen: *bla*_{OXA-143} wurde 2004 in Brasilien bei einem CR *Ab*-Isolat aus dem Blut eines Patienten isoliert; *bla*_{OXA-235} konnte bei acht multiresistenten *Ab* humanen Ursprungs zwischen 2005 und 2009 in Mexiko und den USA nachgewiesen werden [179, 180].

2.4.2.2. Resistenz gegenüber Aminoglykosiden

Aminoglykoside binden an die 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und hemmen so eine korrekte Proteinbiosynthese, was letztlich zu einem Absterben der Bakterienzelle führt. Die Resistenz gegenüber Aminoglykosid-Wirkstoffen ist bei *Ab* häufig durch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme vermittelt, welche in die drei Klassen Acetyl-, Adenyl- und Phosphotransferasen eingeteilt werden [227, 301]. Diese werden von einer Vielzahl an Genen, u.a. *aph*, *aac* oder *aad* und ihren Varianten kodiert (z.B. *aac(3)-Ia*, *strA* [*aph(3'')-Ib*], *strB* [*aph(6)-I*]) [147]. Die chromosomal- oder plasmidkodierte Gene sind mit Resistenzen gegenüber unterschiedlichen Aminoglykosiden assoziiert. So vermitteln z.B. *aadB* und *aphA6* eine Unempfindlichkeit gegenüber Amikacin, Kanamycin und Neomycin, oder *aacC1* gegenüber Gentamicin [289, 319]. Des Weiteren können plasmidkodierte RNS-Methylasen wie ArmA durch eine Methylierung der 16S-rRNS zu einer Aminoglykosid-Resistenz führen [95, 309]. Neben Enzymen können, wie bei den meisten antimikrobiellen Wirkstoffen auch, Efflux-Pumpen (Kapitel 2.4.1.1.1) und Porine (Kapitel 2.4.1.1.2) zu einer Resistenz gegenüber Aminoglykosiden führen [243, 378].

2.4.2.3. Resistenz gegenüber Cephalosporinen

Cephalosporine, die die Zellwandsynthese von Bakterien hemmen, können von CPs sowie von β -Laktamasen der Ambler Klasse A inaktiviert werden (Kapitel 2.4.2.1.1). Zur Ambler Klasse A gehören ESBL, wie z.B. TEM, SHV oder CTX-M, die Oxyimino- β -Laktam- Antibiotika spalten [51]. Sie können durch sogenannte *site*-spezifische β -Laktamase-Inhibitoren

(Clavulansäure, Sulbactam, Tazobactam) gehemmt werden [196]. Insbesondere bei *Enterobacterales* wie *E. coli*, *Proteus* spp. und *Klebsiella* spp. sind plasmidkodierte ESBL weit verbreitet [309]. Aber auch bei *Ab* konnten bereits verschiedene ESBLs wie TEM-92 [109] oder PER-1 [311] nachgewiesen werden. Die bei *Ab* intrinsisch vorkommende AmpC-Cephalosporinase (Kapitel 2.4.1.1.3) vermittelt ebenfalls, in Kombination mit einem IS-Elements *upstream* des *bla*_{AmpC}-Gens, eine phänotypische Resistenz gegenüber Cephalosporinen [301].

2.4.2.4. Resistenz gegenüber Fluorchinolonen

Die Zielmoleküle von bakteriziden Fluorchinolonen, eine Gruppe der Chinolon-Antibiotika, sind die bakterielle DNS-Gyrase und die Topoisomerase IV [309]. Die Unempfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen ist bei den meisten Bakterien durch die Mutation der DNS-Gyrase bzw. Topoisomerase IV kodierenden Gene *gyrA* bzw. *parC* bedingt [407, 408]. Diese führen zu einer Veränderung der Zielstruktur, sodass das Antibiotikum nicht mehr an die DNS-Gyrase bzw. Topoisomerase IV binden kann. Diese Mutationen wurden bereits zahlreich in *Ab* beschrieben [301]. Neben Aminoglykosiden stellen auch Fluorchinolone geeignete Substrate für Multidrug-Efflux-Pumpen wie AdeABC oder AbeM dar [243, 378]. Alle genannten Resistenzmechanismen sind chromosomal kodiert. Bis heute wurde noch kein plasmidkodierter Fluorchinolon-Resistenzmechanismus bei *Ab* nachgewiesen [309].

2.4.2.5. Resistenz gegenüber Colistin

Colistin (auch Polymyxin E), ein Polymyxin Antibiotikum, welches aufgrund starker Nebenwirkungen seit Jahrzehnten in der Humanmedizin nicht mehr eingesetzt wurde, stellt inzwischen bei Infektionen mit CR Bakterien oft die letzte therapeutische Option dar. Es ist besorgniserregend, dass bereits Colistin-resistente *Ab* bei Patienten nachgewiesen werden konnten [149]. Bei *Ab* können Mutationen in den chromosomalen Genen *lpxA*, *lpxC* und *lpxD* [265] sowie in *pmrA* und *pmrB* [21, 195], die an der Synthese bzw. Modifikation von Lipid A, einer Komponente des Lipopolysaccharids (LPS) beteiligt sind, zu einer Colistin-Resistenz führen [195, 386]. Neben Mutationen chromosomaler Gene werden seit 2015 insbesondere bei *Enterobacteriaceae* plasmidkodierte und damit horizontal übertragbare Colistinresistenzgene (*mobilized colistin resistance; mcr-1–mcr-10*) beschrieben. Die durch diese Gene kodierten Phosphoethanolamintransferasen katalysieren den Transfer von Phosphoethanolamin auf Lipid A [54]. Bei *Ab* gibt es bisher nur vereinzelt Berichte über plasmidkodierte *mcr*-Gene: so wurden in 2019 ein *mcr-4.3*-positiver *Ab* aus porzinen Fäzes in China, ein *mcr-1* tragender humaner *Ab*

in Pakistan, sowie ein *Ab*-Isolat von einer Pute als Träger von *mcr-4* identifiziert [137, 156, 241].

2.4.2.6. Resistenz gegenüber Sulfonamiden und Trimethoprim

Sulfonamide sind bakteriostatische Wirkstoffe, die häufig in Kombination mit Trimethoprim zur Erweiterung des Wirkspektrums eingesetzt werden. Die Wirkstoffe hemmen die Enzyme Dihydropteroat-Synthase bzw. -Reduktase. Dies führt zu einer Behinderung der Folsäuresynthese und somit zu einer Störung der DNS-Synthese der Bakterienzelle. Bakterien können die Affinität für Sulfonamide/Trimethoprim senken, indem sie mittels der weitverbreiteten Gene *sul1*, *sul2* und *sul3* alternative Dihydropteroat-Enzyme synthetisieren. Alle drei Gene sind häufig plasmidkodiert und konnten in vielen Studien bei *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden [52].

2.4.2.7. Resistenz gegenüber Tetrazyklinen

Die Gruppe der Tetrazykline sind natürlich antibiotisch wirksame Substanzen, die erstmals 1948 von Benjamin Minge Duggar aus Bakterien der Gattung *Streptomyces* isoliert wurden [99]. Als wichtiger Vertreter ist das Tetracyclin-Antibiotikum der dritten Generation, Tigazyklin, ein bedeutsames (*last resort*) Therapeutikum bei Infektionen mit multiresistenten *Ab* zu nennen [59, 429]. Tetrazykline hemmen, wie z.B. auch Aminoglykoside, die Proteinbiosynthese an den bakteriellen Ribosomen. Zwei wichtige bakterielle Resistenzmechanismen gegenüber Tetrazyklinen sind spezifische Efflux-Pumpen sowie Schutzproteine, die die Bindung des Antibiotikums an die Ribosomen verhindern [406]. Beide Mechanismen sind bereits bei *Acinetobacter* spp. nachgewiesen worden. Die häufig auf Transposons (Kapitel 2.4.3.2) lokalisierten Gene *tetA* und *tetB*, welche bei *Acinetobacter* spp. weitverbreitet sind, kodieren Efflux-Pumpen, die Tetrazykline aus der bakteriellen Zelle schleusen [153, 328, 337]. *TetM* hingegen kodiert ein ribosomales Schutzprotein und ist ebenfalls ein weitverbreiteter Mechanismus bei Tetrazyklin-resistenten *Acinetobacter* spp. [329]. Als weiterer Mechanismus ist der sauerstoffabhängige Abbau der Gruppe der Tetrazykline durch das Enzym TetX zu nennen [429]. Insbesondere bei Tigazyklin-resistenten *Ab* wird *tetX* sowie seine Varianten oft auf Plasmiden lokalisiert nachgewiesen [59].

2.4.3. Übertragung von Resistenzen

Neben den intrinsischen Resistenzen, die bei allen Vertretern einer Spezies vorhanden sind, können erworbene Resistenzen über zwei Wege zwischen Bakterien verbreitet werden: den

vertikalen Gentransfer (VGT) und den HGT. Beim VGT werden Gene, u.a. Resistenzgene, abhängig von der Zellteilung an Tochterzellen weitergegeben. Beim HGT hingegen können Gene unabhängig von der Zellteilung zwischen Bakterien, die nicht zwingend der gleichen Spezies angehören, ausgetauscht werden [233]. Insbesondere der HGT spielt bei der Verbreitung von Resistenzgenen bei *Acinetobacter* spp. eine bedeutende Rolle [80]. So sind die am weitesten verbreiteten CPs OXA-23-like, OXA-24/40-like und OXA-58-like oft auf mobilen genetischen Elementen kodiert, die via HGT verbreitet werden können [92]. Bereits bei der erstmalig entdeckten β -Laktamase OXA-23 (Kapitel 2.4.2.1.4) wurde eine Plasmid-Lokalisation nachgewiesen [354]. Die Spezies *A. radioresistens*, die als ursprüngliche Quelle von OXA-23 gilt, trägt jedoch nur Teile der Transposon-Strukturen, in denen man *bla*_{OXA-23-like} oft bei *Ab* eingebettet findet [287, 312]. OXA-24/40 wurde ebenfalls bereits chromosomal [42] und auf einem Plasmid [2] beschrieben [42]. Auch *bla*_{OXA-58-like} konnte bei *Ab* bereits auf Plasmiden beschrieben werden [248, 313].

Wenn mehrere Resistenzgene auf dem gleichen mobilen genetischen Element liegen, können auch Resistenzen gegen verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe mittels HGT zwischen Bakterien ausgetauscht werden [159, 288]. Die Möglichkeit des Austausches mobiler Elemente zwischen Bakterien stellt eine besondere Gefahr hinsichtlich der Akkumulation von Resistenzgenen und der damit einhergehenden *pandrug-resistance* (Kapitel 2.4) von Bakterien gegenüber allen therapeutisch verfügbaren Antibiotika dar [92, 303].

2.4.3.1. Insertions-Elemente

Insertions-Elemente oder -Sequenzen (IS) sind kurze (<2.5 kb), mobile genetische Elemente, die zu einer unabhängigen Transposition im Genom von Bakterien fähig sind [285]. Damit sind sie an der Verbreitung von Virulenz- und Resistenzgenen zwischen Bakterien beteiligt [275]. Zudem können IS-Elemente zu einer verstärkten Expression nachgeschalteter Gene führen (Kapitel 2.2.2.5). IS-Elemente werden von sich gegenläufig wiederholenden Sequenzen (*direct* oder *inverted repeats*) flankiert, die als Erkennungssequenz für die Transposase dienen. Bei *Ab* sind *ISAb*₁, welches oft mit *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-51-like} sowie *bla*_{AmpC} assoziiert ist [73, 74, 172, 395], das mit *bla*_{OXA-58} assoziierte *ISAb*₃ oder *ISAb*₁₂₅ [118, 311] sowie *ISAb*₂ und *ISAb*₄ [315] die am häufigsten gefundenen IS-Sequenzen.

2.4.3.2. Transposons

Transposons können autonom ihre Position im Genom verändern [233]. Wie auch IS-Elemente sind sie von *direct* oder *inverted repeats* umgeben, die als Erkennungssequenzen für die

Transposase dienen. Bei *Ab* sind bestimmte Transposons mit Oxacillinasen assoziiert [292]. So konnten für *bla*_{OXA-23-like} bisher fünf verschiedene Transposons beschrieben werden: Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008B und Tn2009. Diese weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit der chromosomalen genetischen Region der CP OXA-23 in *A. radioresistens* auf. In vier der fünf Transposons, Tn2006, Tn2008, Tn2008B und Tn2009 wird die β -Laktamase *upstream* des Startcodons von IS*Aba1* flankiert, während bei Tn2007 hier ein IS*Aba4* zu finden ist [287]. Bei Tn2007 sind 23 bp, bei Tn2008 27 bp und bei Tn2006, Tn2008B sowie Tn2009 34 bp zwischen dem IS-Element und *bla*_{OXA-23}. *Downstream* der CP ist bei allen fünf Transposons eine ATPase, die auch bei *A. radioresistens* gefunden werden kann, vorhanden. Bei Tn2008 und Tn2008B wird *bla*_{OXA-23-like} von nur einem IS*Aba1* flankiert, während bei Tn2006 und Tn2009 die CP beidseits flankiert wird. Dabei sind je nach Transposon unterschiedliche Gene zwischengeschaltet. Tn2006, welches neben Tn2008 und Tn2008B weltweit verbreitet ist, wird in humanen OXA-23-positiven *Acinetobacter* spp. am häufigsten nachgewiesen [74, 287]. Bei *bla*_{OXA-23-like}-positiven *Acinetobacter* spp. von Tieren wurden neben Tn2006 [45, 56, 140, 317] auch Tn2008 [121, 215, 231, 307, 369] und Tn2008B nachgewiesen [239].

Die Metallo- β -Laktamase NDM-1 ist sowohl bei humanen als auch bei tierischen *Acinetobacter* spp. häufig mit Tn*I25* assoziiert. Tn*I25* wurde erstmals 2007 in dem klinischen *Ab*-Isolat 161/07, das bei einem Patienten, der aus einem serbischen in ein deutsches Krankenhaus verlegt wurde, beschrieben [306]. Seitdem wurde Tn*I25* als Teil des Chromosoms sowie von Plasmiden in verschiedenen *Acinetobacter* spp. weltweit nachgewiesen [40, 58, 310, 443]. Tn*I25* ist ein 10.099 bp großes mobiles Element, dass sich aus *bla*_{NDM-1} und vier weiteren, z.T. verkürzten Genen (*Δ trpF*, *Δ groS*, *groL* und *insE*), die von zwei IS*Aba125*-Elementen flankiert werden, zusammensetzt [306]. Bei *Acinetobacter* spp. sind für weitere bereits nachgewiesene CPs, wie z.B. *bla*_{OXA-58-like} oder *bla*_{OXA-24/40-like} keine Transposons beschrieben [292].

2.4.3.3. Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale, meist zirkuläre, autonom replizierende DNS-Moleküle, die u.a. bei Bakterien vorkommen und die in der Regel keine essentiellen Gene tragen [364]. Plasmide können eine Reihe an Genen aufweisen, die einen Vorteil zur Anpassung an ein neues Lebensumfeld darstellen, wie z.B. Antibiotikaresistenz-, Fitness- oder Virulenzgene [396]. Bei *Acinetobacter* spp. konnten bereits eine Vielzahl an Antibiotikaresistenzgenen, wie Aminoglykosid-Resistenzgene oder Oxacillinasen auf Plasmiden lokalisiert werden [288, 301, 315]. Neben Antibiotika-Resistenzgenen sind häufig auch weitere Mechanismen wie Resistenzen gegenüber Schwermetallen oder Desinfektionsmitteln genetisch auf Plasmiden

kodiert [253]. So tragen *Acinetobacter* spp. einen sehr diversen Pool an Plasmiden unterschiedlicher Gene und Größe (1.000 bp - >100 kb), die via HGT an andere Bakterien weitergegeben werden können [126, 144, 349]. Oftmals lassen sich bei *Acinetobacter* Plasmiden ähnliche Kerngenome, bestehend aus Genen, die funktionelle Prozesse, wie Mobilisierung oder Replikation kodieren, nachweisen, während sich das akzessorische Genom variabel zeigt. Verschiedene Resistenzgene, wie auch CP-kodierende Gene, oftmals eingebettet in Transposons, sind meist Teil des akzessorischen Genoms [253, 287, 349].

2.5. Pathogenese und Virulenz von *Acinetobacter* spp.

Unter dem Begriff der Pathogenese versteht man den Verlauf einer Infektion sowie sämtliche Vorgänge, die zur Entstehung einer Krankheit beitragen. Die Pathogenese ist sowohl von Faktoren des Erregers (z.B. Invasionsfähigkeit des Erregers) als auch des Wirtes (z.B. Eigenschaften des Immunsystems) abhängig [208]. Die Virulenz beschreibt den Ausprägungsgrad der pathogenen Fähigkeit von Isolaten einer Erregerspezies, also in welchem Ausmaß ein Bakterium fähig ist, den Wirt zu schädigen. Im Unterschied hierzu ist die Pathogenität zu nennen, die sich allgemein auf die Fähigkeit einer Spezies von Mikroorganismen bezieht, im Wirtsorganismus eine Erkrankung zu verursachen. Im Englischen werden die beiden Begriffe der Pathogenität und Virulenz meist synonym verwendet [379]. Über die genaue Pathogenese ist, im Vergleich zu anderen GN Bakterien wie *E. coli*-Pathovaren oder *P. aeruginosa*, bei *Ab* bisher nur wenig bekannt [97, 230]. Insbesondere die Fähigkeit von *Ab*, dem Komplementsystem und der Phagozytose des Wirtes zu entgehen, bedingt v.a. durch kapsuläre Polysaccharide, wird als wichtiger Schritt in der Pathogenese vermutet. Die Kapsel ermöglicht eine effektive Evasion des Immunsystems des Wirtes und trägt maßgeblich zur Virulenz des Erregers bei [230, 345, 423]. Es gibt zahlreiche Studien zum Thema Virulenzfaktoren (VFs) von *Ab*. Im Folgenden werden die wichtigsten VFs von *Ab* beschrieben.

2.5.1. Virulenzeigenschaften von *Acinetobacter* spp.

Genomanalysen humaner *Ab*-Isolate im Zusammenhang mit funktionellen Studien haben in den vergangenen Jahren Einblicke in die Mechanismen der Virulenz und Pathogenität des Infektionserregers geliefert. Zu den bis heute bedeutsamsten Virulenzdeterminanten von *Ab* zählen das äußere Membranprotein OmpA (früher Omp38), Phospholipasen, Polysaccharide, Metall-Akquisitionssysteme sowie die Fähigkeit zur Motilität [227, 256, 273]. Indirekt spielt

auch die antimikrobielle Resistenz von *Ab* eine Rolle, da sie den Therapieerfolg bestimmt und so einen direkten Einfluss auf die durch *Ab*-Infektionen bedingte Todesraten hat [423].

OmpA

OmpA ist ein Porin, welches die zelluläre Permeabilität modifiziert. So ist OmpA maßgeblich an der Adhäsion und Invasion von Epithelzellen des Wirtes [64], Induktion der Apoptose [62, 63], Serumresistenz [212] und Biofilmbildung [132, 256] beteiligt. OmpA ist zudem an der antimikrobiellen Resistenz von *Ab* beteiligt (Kapitel 2.4.1.1.2) [367]. Neben OmpA sind weitere äußere Membranproteine wie Omp33 oder Omp22 als VFs beschrieben [188, 366].

Phospholipasen

Phospholipasen sind lipolytische Enzyme, die u.a. Phospholipide in Fettsäuren spalten und als VF in verschiedenen Bakterien bekannt sind [227]. Je nach Substrat werden vier Klassen an Phospholipasen (Phospholipase A-D) unterschieden. Phospholipide können die Stabilität der Wirtszelle beeinflussen und so die Immunantwort des Wirtes modulieren [125, 373]. Bei *Ab* wurden bereits Phospholipasen der Klassen C und D, die u.a. von den Genen *plc1*, *plc2* bzw. *pld1*, *pld2* und *pld3* kodiert werden, beschrieben [53, 193, 375]. So konnten Studien zeigen, dass Phospholipasen einen Einfluss auf den zytotoxischen Effekt [53] und die Serumresistenz von *Ab* haben [193] und an der Invasion von Wirtszellen beteiligt sind [375].

Polysaccharide

Bei *Ab* zählen kapsuläre Exopolysaccharide und Lipopolysaccharide (LPS) zu bedeutsamen Pathogenitätsfaktoren [227]. Kapsuläre Exopolysaccharide, die v.a. bei Patienten mit *Ab*-Infektionen nachgewiesen werden können [136, 219], haben Einfluss auf u.a. die Serumresistenz [345] sowie die antimikrobielle Resistenz [136]. Die Gene *epsA* und *ptk* spielen bei der Polymerisation und Bildung der Kapsel eine bedeutsame Rolle [345]. LPS bildet bei GN Bakterien die äußere Schicht der äußeren Zellmembran [419] und ist an der Serumresistenz sowie dem Überleben von *Ab* beteiligt [238, 256]. Ebenfalls kann eine Modifikation des Moleküls zu einer verminderten Empfindlichkeit von *Ab* gegenüber verschiedenen Antibiotika, wie z.B. Colistin (Kapitel 2.4.2.5), führen [265].

Metall-Akquisitionssysteme

Die Bindung wichtiger essentieller Nährstoffe für den bakteriellen Stoffwechsel, wie z.B. Eisen oder Zink, spielt eine wichtige Rolle im Abwehrmechanismus des Wirtes [227, 273]. So verhindert der Wirtsorganismus durch Eisen-bindende Proteine wie Lactoferrin oder

Transferrin die Verfügbarkeit von Eisen für den Erreger [326, 347]. Um diesem Abwehrmechanismus des Wirtes zu entgehen produzieren viele Bakterien eisenbindende Chelatoren, sogenannte Siderophore [347]. Die bekannteste Siderophore von *Ab* ist das von *bauA* kodierte Acinetobactin [256]. Es konnte gezeigt werden, dass bei gestörter Synthese von Acinetobactin die Persistenz von *Ab* in Epithelzellen, die Zellschädigung von Wirtszellen sowie die Virulenz im *Galleria mellonella*-Modell stark reduziert ist [131, 302].

Motilität

Faktoren, die eine Motilität von *Ab* und somit möglicherweise die Ausbreitung des Bakteriums im Wirtsorganismus oder die Überwindung von Wirtsbarrieren ermöglichen, werden als Virulenzfaktoren diskutiert [405]. Lange galt *Ab* als unbeweglich, da es, wie auch die anderen Vertreter von *Acinetobacter* spp., keine Flagellen besitzt [25, 301]. Mittlerweile sind jedoch zwei Arten der Fortbewegung, die *twitching motility* [226] und die *surface associated motility* [169] beschrieben. Die *twitching motility* wird durch Extension und Retraktion von Typ IV Pili, kodiert von *pilA*, ermöglicht [166, 255] Über die *surface associated motility* ist bisher erst wenig bekannt: so identifizierten Blaschke *et al.* (2021) 30 Gene u.a. *als0806* (kodiert eine Aminotransferase) und *purH* (kodiert ein Purin-Biosyntheseprotein), deren *knock out* zu einer verminderten *surface associated motility* bei *Ab* führt [35].

2.5.2. Biofilmbildung von *Acinetobacter* spp.

Biofilme sind Gemeinschaften von Bakterien einer oder verschiedener Spezies. Angesiedelt an einer Grenzfläche werden sie von extrazellulärer polymerer Matrix (EPS) umgeben und abgeschirmt. So bestehen Biofilme aus bis zu 90 % Wasser, Mikroorganismen und EPS [124, 273]. Die Biofilmbildung ist eine der bedeutsamsten Eigenschaften von *Ab* und kann wesentlich zur Persistenz des Erregers im klinischen Umfeld beitragen [250, 415, 440]. So können *Ab* im Verbund eines Biofilms monatelang auf Oberflächen, auch in Krankenhäusern, überleben [436]. Neben der Persistenz in der Umwelt ist es *Ab* so nicht nur möglich, Angriffen des Wirts-Immunsystems sondern auch antimikrobieller Therapeutika zu entgehen [96, 124]. *Ab* ist fähig, sowohl auf abiotischen Oberflächen, wie Glas, als auch auf biotischen Oberflächen, wie Epithelzellen, Biofilme zu bilden [130]. Die Biofilmbildung wird von mehreren Faktoren beeinflusst: der Verfügbarkeit von Nährstoffen und freien Kationen, der Präsenz von Pili und äußeren Membranproteinen sowie dem *Quorum sensing*, einem bei GN Bakterien weitverbreiteten Mechanismus der chemischen Kommunikation [130, 148, 183]. Wichtige

Gene, die einen Einfluss auf die Biofilmbildung von *Ab* haben, sind u.a. *bap* [234], *csuA-csuE* [390] sowie *blp1* und *blp2* [151].

2.5.3. Methoden zur Untersuchung der Virulenz

2.5.3.1. *In vitro*-Untersuchungen

Zur *in vitro*-Untersuchung der Virulenz von *Ab* wurden in der Vergangenheit u.a. Zellkulturversuche genutzt. Diese eignen sich zur Abschätzung der Zytotoxizität des Erregers und zum besseren Verständnis zellulärer Prozesse im Laufe einer *Ab*-Infektion. Es werden u.a. humane Lungenepithel- (A549), Larynxepithel- (Hep-2) sowie Zervixkarzinomzellen (HeLa) genutzt [64, 368]. Zur Untersuchung der Zytotoxizität eignet sich der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Zytotoxizitätsassay. Durch den zytotoxischen Effekt von *Ab* wird LDH freigesetzt, welche gemessen und als Parameter für Zellschäden herangezogen werden kann [368, 383]. Zur Bestimmung der Fähigkeit des Erregers zur Adhäsion und/oder Invasion wird hingegen die Fluoreszenz- oder Elektronenmikroskopie genutzt [12, 64, 368]. So gibt es bereits mehrere Studien, die sich mit der *in vitro*-Virulenz von *Ab*, insbesondere von antibiotikaresistenten Stämmen, beschäftigen. Smani *et al.* (2012) konnten mittels eines humanen Lungenepithelzell-Modells zeigen, dass die Ausbildung eines Ciprofloxacin-resistenten Phänotyps bei *Ab* die Virulenz des Erregers herabsetzt [368].

2.5.3.2. *In vivo*-Untersuchungen

Neben den *in vitro*-Untersuchungen gibt es eine Reihe von *in vivo*-Modellen zur Untersuchung der Virulenz von *Ab*. Die wichtigsten Studien dazu werden im Folgenden erläutert.

Maus und Ratte

Die Maus sowie die Ratte stellen, wie in den meisten *in vivo*-Forschungen, auch bei der Untersuchung von *Ab*-Infektionen die wichtigsten Tiermodelle dar. So wurden bereits Studien zur Untersuchung von durch *Ab* verursachte Pneumonien, Weichteilinfektionen oder Sepsiskämien im Maus- oder Ratten-Modell durchgeführt [256]. Anhand eines Maus-Pneumoniemodells konnten Jacobs *et al.* (2010) zeigen, dass die Phospholipase D vermutlich einen Einfluss auf die Ausbreitung von *Ab* im Blut sowie auf die Persistenz des Erregers in verschiedenen Organen hat [193]. Dijkshoorn *et al.* (2004) beschreiben, dass das humane Laktoferrin bei einer Weichteilinfektion der Maus mit multiresistenten *Ab* eine dosis- und zeitabhängig bakterizide Wirkung gegenüber dem Bakterium aufzeigt [91]. Anhand des früher oft eingesetzten Sepsis-Mausmodells untersuchten López-Rojas *et al.* (2011) den Einfluss der

Colistin-Resistenz auf die Virulenz und Fitness von *Ab*. Die Autoren nahmen an, dass die Colistin-Resistenz mit einer Verminderung der bakteriellen Virulenz einherging [236]. Auf Grundlage des gleichen Modells vermuteten Gaddy *et al.* (2012), dass Acinetobactin hingegen keinen Einfluss auf die Virulenz von *Ab* hat [131].

Caenorhabditis elegans

Bei *Caenorhabditis (C.) elegans* handelt es sich um einen Fadenwurm, der bereits in den 1960er Jahren durch den Entwicklungsbiologen Sydney Brenner als Modellorganismus in die Forschung eingeführt wurde [46]. Die Erdnematode ernährt sich v.a. von Bakterien und wurde bereits zur Untersuchung der Virulenz von *Ab* eingesetzt [397]. So wird das Überleben von *C. elegans* oder die Anzahl der abgelegten Eier zur Einschätzung der Virulenz herangezogen. Die Ergebnisse einer Studie von Smith *et al.* (2007) gaben erste Rückschlüsse auf die Bedeutung beispielsweise des Typ IV-Sekretionssystems oder des Eisenakquirierungssystems in der Virulenz von *Ab* [371]. Espinal *et al.* (2019) konnten zeigen, dass bei den untersuchten *Ab* die durch Oxacillinasen oder NDM bedingte CR keinen Einfluss auf die Virulenz der Stämme im *C. elegans*-Modell hatte. Während der Verlust von LPS, der eine Colistin-Resistenz verursacht, sowie der äußeren Membranproteine Omp33-36 zu einer Abnahme der Virulenz der untersuchten *Ab*-Isolate führte [112].

Galleria mellonella

Das Infektionsmodell der großen Wachsmotte (*Galleria (G.) mellonella*) ist ein weiteres Modell zur Untersuchung der bakteriellen Virulenz. Gegenüber anderen nicht-Vertebraten-Modellen hat das Wachsmottenmodell große Vorteile. Zum einen überleben die Larven bei 37 °C, was der Körpertemperatur von Mensch, Hund und Katze entspricht. Zum anderen kann aufgrund der Anatomie der Raupen eine genau lokalisierte Infektion erfolgen [300]. Verschiedene Konzentrationen einer Bakteriensuspension werden in das Coelom der Raupen injiziert, sodass anhand der Überlebensdauer sowie der Melanin-Einlagerungen, einer Immunreaktion der Wachsmotte, Rückschlüsse auf die Virulenz des Erregers gezogen werden können. Im Jahr 2009 nutzten Peleg *et al.* (2009) erstmals das *G. mellonella*-Infektionsmodell und konnten zeigen, dass *Ab* eine signifikant höhere Virulenz als *Al* und *A. baylyi* aufwies, da *Ab* in einem kürzeren Zeitraum mehr Larven tötete als die anderen beiden Spezies [300]. Sechs Jahre später untersuchten Stahl *et al.* (2015) den Einfluss von drei Phospholipasen D auf die *Ab*-Virulenz. Die Ergebnisse ließen die Autoren darauf schließen, dass zur Ausbildung der

vollen Virulenz des *Ab*-Referenzstammes ATCC 19606 alle drei intakten *pld*-Gene notwendig sind [375].

2.6. Vorkommen von *Acinetobacter* spp.

Im Jahr 1986 gelang es Bouvet und Grimont erstmals *Ab* als Spezies zu identifizieren und zu benennen [43]. Jedoch ist auch danach die Speziesdifferenzierung nicht immer verlässlich (Kapitel 2.2), sodass Speziesbezeichnungen vor der Jahrtausendwende nur mit Vorsicht interpretiert werden dürfen [301].

2.6.1. *Acinetobacter* spp. in der Umwelt

Im Gegensatz zu den meisten Vertretern der Gattung *Acinetobacter*, die ubiquitär in der Umwelt zu finden sind, ist das natürliche Reservoir von *Ab* nur unzureichend bekannt [97]. Nachdem 1911 Beijerinck erstmals den *A. calcoaceticus*-Typstamm aus einer Bodenprobe isolieren konnte, wurden 1968 verschiedene *Acinetobacter* spp. in mehreren Boden- und Wasserproben nachgewiesen [25, 27]. Weitere Studien über den Nachweis unterschiedlicher *Acinetobacter* spp. aus Gewässern, Abwasser, Pflanzen und dem Boden, darunter auch *Ap* oder *Aj*, deren klinische Relevanz zunehmend steigt, folgten [7, 97, 301, 323]. Bisher wurden jedoch keine systematischen Studien durchgeführt, um das natürliche Vorkommen verschiedener *Acinetobacter* spp. zu untersuchen. *Ab* hingegen wird nur sporadisch aus Umweltproben isoliert, was darauf schließen lässt, dass es sich um keinen typischen Umwelterreger handelt [301]. Allerdings konnten bereits multiresistente *Ab*, speziell CR Isolate, aus der Umwelt isoliert werden. Girlich *et al.* (2009) gelang erstmals der Nachweis eines *bla*_{OXA-23}-positiven *Ab*-Isolats aus der Seine [145]. Zehn Jahre später wiesen Hrenovic *et al.* (2019) CR *Ab* und andere *Acinetobacter* spp. in Bodenproben, die mit einer illegalen Müllentsorgung assoziiert waren, nach [185]. Ähnliche Funde machten Higgins *et al.* (2018), die CR OXA-23- und OXA-72-positive *Ab* der ICs 1 und 2 aus einer Kläranlage isolieren konnten [175]. Diese Berichte lassen jedoch vermuten, dass der Nachweis von *Ab* aus der Umwelt häufig im Zusammenhang mit menschlichem Handeln steht, das möglicherweise die Verbreitung CR Bakterien begünstigt [185].

2.6.2. *Acinetobacter* spp. beim Menschen

Acinetobacter spp. gehören beim Menschen zur Mikrobiota der Haut und Schleimhäute [97, 301]. So konnten bei bis zu 42,5 % gesunder, nicht-hospitalisierter Menschen und bei 75 % hospitalisierter Patienten *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden. Am häufigsten wurden *Al*,

Aj und *A. radioresistens* u.a. von Stirn, Ohr, Nase, Rachen oder Achsel isoliert [359]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie von Berlau *et al.* (1999), in der bei bis zu 40 % der gesunden Testpersonen *Acinetobacter* spp., insbesondere *AI* und *A. radioresistens*, nachgewiesen werden konnten [31]. Die klinisch relevanten *Acinetobacter* spp. wie *Ab*, *A. nosocomialis* oder *Ap* wurden hingegen nur selten auf der Haut gesunder Menschen gefunden [30, 92, 359]. Als wichtigster klinischer Vertreter kann *Ab* insbesondere bei hospitalisierten Patienten und auf Oberflächen in Kliniken nachgewiesen werden [72, 92, 342]. Ob der Intestinaltrakt ein Reservoir für *Ab* darstellt, ist unklar. So konnten Corbella *et al.* (1996) bei 41 % der Patienten einer Intensivstation eine fäkale Kolonisation mit multiresistenten *Ab* nachweisen, während Dijkshoorn *et al.* (2005) nur <1 % gesunder Menschen mit *Ab* kolonisiert fanden [72, 93]. Dies stützt die Vermutung, dass Krankenhäuser ein mögliches Reservoir für *Ab* darstellen [435]. Sowohl die hohe Tenazität als auch die Fähigkeit Biofilme zu bilden begünstigen das vermehrte Auftreten von *Ab* im klinischen Umfeld und die Entstehung von nosokomialen *Ab*-Infektionen [256]. Davon abzugrenzen sind die sogenannten *community acquired*-Infektionen, welche in keinem zeitlichen Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt stehen [30, 92, 97, 301]. Insbesondere bei immungeschwächten Patienten führt *Ab* zu Erkrankungen [92, 209]. Selten werden ähnliche Infektionen auch von weiteren *Acinetobacter* spp., wie zum Beispiel von *Al* oder *Aj*, verursacht [393]. Als prädisponierende Faktoren sind u.a. schwere Grunderkrankungen, Traumata, wiederholte Krankenhausaufenthalte oder antimikrobielle Therapien nach Operationen zu nennen [30, 133]. Am häufigsten manifestiert sich eine nosokomiale *Ab*-Infektion im Respirationstrakt [301]. Bei intubierten Patienten können schwer therapierbare Pneumonien mit hoher Sterblichkeit auftreten [134]. Weitere klinische Erscheinungsformen sind Wund-, Urogenitaltrakt- und Blutstrom-Infektionen oder Meningitiden [18, 92]. Die Mortalitätsrate beträgt v.a. bei intensivmedizinisch betreuten Patienten bis zu 30 % [183, 303]. Solche Infektionen werden meist von multiresistenten *Ab*, die zunehmend auch Resistenzen gegenüber Reserveantibiotika wie Colistin oder Carbapenemen aufweisen, verursacht [101, 335]. So bewegt sich der Nachweis von CR *Acinetobacter* in Deutschland um die 5 % aller invasiven *Acinetobacter* spp. In südeuropäischen Ländern wie Italien, Griechenland und Spanien ist der Anteil von CR Isolaten mit >50 % deutlich höher [103]. Seltener treten auch *Acinetobacter* spp.-Infektionen, vorwiegend Pneumonien, bei nicht-hospitalisierten Patienten auf. Meist treten diese im Zusammenhang mit zusätzlichen Risikofaktoren wie Alkoholmissbrauch, Rauchen, Diabetes mellitus und/oder chronischen obstruktiven Lungenerkrankungen auf [92]. Die oft mit Mortalitätsraten von 40-64 % einhergehenden Infektionen spielen v.a. in sub-/tropischen Regionen wie Südostasien oder

Australien eine bedeutsame Rolle [16, 61, 87, 92]. Durch *Ab* verursachte Pneumonien können jedoch auch in gemäßigten Breiten auftreten. So berichten Serota *et al.* (2018) von *community acquired-Ab*-Pneumonien in Nordamerika [362].

2.6.3. *Acinetobacter* spp. beim Tier

2.6.3.1. Kleintiere

Im Jahr 1976 berichteten Saphier *et al.* (1976) erstmalig von *A. calcoaceticus* (var. *anitratius* und *hwoffii*) aus der Gingiva von gesunden Hunden (10 %) in Amerika [352]. Kurze Zeit später berichteten Krogh *et al.* (1981) über *Acinetobacter* spp. aus Hautproben gesunder sowie an Pyodermie erkrankter Hunde in Dänemark. Vermutlich kommt es aufgrund der Läsionen zu einem Versagen der lokalen Immunabwehr, sodass die Anzahl GN Erreger zunimmt. Die Autoren mutmaßten, dass es sich bei *Acinetobacter* spp. um opportunistische Krankheitserreger handelt [223]. Ein Jahr später berichteten Mathewson und Simpson (1982) über *A. calcoaceticus* aus veterinärmedizinischem Probenmaterial. Unter 3.474 Proben wurden bei 10 % Nonfermenter, davon 50 *A. calcoaceticus* (14,5 %), nachgewiesen [254]. In einer weiteren Studie konnten in 52 von 53 vaginalen sowie in zwei von 29 Uterustupferproben von gesunden Katzen aerobe Bakterien wie Koagulase-negative-Staphylokokken (56 %), *Streptococcus canis* (52 %), *E. coli* (44 %) und vereinzelt *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden [69]. Leider wird in keiner der o.g. Studien die antimikrobielle Empfindlichkeit der *Acinetobacter* spp.-Isolate beschrieben.

Im Jahre 2000 wurde erstmals über *Ab* als möglicher nosokomialer Infektionserreger in der Veterinärmedizin diskutiert. Francey *et al.* (2000) berichteten über CS *Ab* aus klinischem Untersuchungsgut von Hunden und Katzen, die während zwei saisonalen Ausbruchsgeschehen in einer Tierklinik isoliert wurden. Die Autoren konnten mittels Ribotypisierung die Persistenz einzelner *Ab* in der klinischen Umgebung und die Isolation identischer Stämme von verschiedenen Tieren während der zwei Ausbrüche zeigen, sodass sie den nosokomialen Charakter von *Ab* annahmen [127]. Hier ist jedoch zu beachten, dass die Ribotypisierung eine geringere Auflösung im Vergleich zur später etablierten PFGE aufweist und somit die Möglichkeit besteht, dass die Stämme entgegen der damaligen Annahme nicht identisch sind und es sich nicht um ein nosokomiales Geschehen handelt [360]. Boerlin *et al.* (2001) kamen zu ähnlichen Ergebnissen als sie über nosokomiale bakterielle Infektionen in einer Kleintierklinik berichteten. Beide beschriebenen Ausbrüche ereigneten sich in den warmen

Sommermonaten, was auf eine Saisonalität von *Ab* hindeutet [36]. In den folgenden Jahren wird immer wieder über *Ab*-Infektionen bei Kleintieren berichtet (Tabelle 2). Im Jahr 2011 veröffentlichten Endimiani *et al.* (2011) erstmals eine Studie, in der tierische *Ab* mit den molekularen Charakteristika humaner Stämme verglichen wurden. Es konnte gezeigt werden, dass *Ab* von Hunden, Katzen und Pferden ebenfalls den in der Humanmedizin weltweit verbreiteten klonalen Linien IC1 und IC2 zugeordnet werden konnten. Drei der 19 *Ab* zeigten eine CR, die durch eine gesteigerte Expression der intrinsischen Oxacillinase *bla*_{OXA-51-like} aufgrund eines vorgeschalteten IS-Element bedingt war (Tabelle 2) [108]. Zordan *et al.* (2011) konnten neben dem nosokomialen Charakter auch das vermehrte Auftreten von IC1- und IC2-*Ab* bei Hunden und Katzen bestätigen. Eins der *Ab*-Isolate zeigte eine Resistenz gegenüber Imipenem [441]. Es folgten weitere Studien, über phylogenetische Verwandtschaften veterinärmedizinischer *Ab*, sowie der Zuordnung tierischer *Ab*-Isolate zu in der Humanmedizin weltweit erfolgreichen ICs/STs, u.a. IC1/ST1^{Past} und IC2/ST2^{Past} (Tabelle 2 und Tabelle 3).

Im Jahr 2014 wurde erstmals über eine Oxacillinase-vermittelte CR bei *Ab* tierischer Herkunft berichtet. Pomba *et al.* (2014) wiesen einen OXA-23-positiven *Ab* des IC2/ST2^{Past} bei einer an einem Harnwegsinfekt erkrankten Katze nach [317]. Ewers *et al.* (2016) wiesen ebenfalls einen felinen OXA-23-positiven *Ab* aus einem Harnwegsinfekt nach, der jedoch dem IC1/ST1^{Past} zugeordnet wurde. Bei der Analyse des MCG konnte eine große Ähnlichkeit des tierischen mit dem humanen *Ab* AYE, der von einem Patienten mit Pneumonie und Harnwegsinfekt in 2001 in Frankreich isoliert wurde, nachgewiesen werden [120, 314]. Im folgenden Jahr berichteten die Autoren über die nosokomiale Verbreitung von CS IC2-*Ab*-Isolaten in der Tiermedizin. Allerdings konnten bei drei caninen *Ab* des ST1^{Past} sowie des ST10^{Past} *bla*_{OXA-23} nachgewiesen werden. 58 weitere *Ab* trugen zudem *ISAbal* vor der intrinsischen β -Laktamase *bla*_{OXA-51-like}. Jedoch zeigten lediglich zwei OXA-23-positive ST10^{Past} *Ab*, die von zwei Hunden in Mischkultur isoliert wurden, auch eine phänotypische CR [121]. In einer weiteren Studie wurde erstmals die klonale Verbreitung von *bla*_{OXA-23}-*Ab* des ST25^{Past} bei Tieren in Frankreich beschrieben. Die Isolate wiesen zueinander Ähnlichkeiten von $\geq 98,8$ % auf und wurden aus Harnwegsinfektionen von Hunden und Katzen in fünf verschiedenen Kliniken aus zwei Regionen Frankreichs isoliert [239]. In Serbien konnten Misić *et al.* (2018) einen *bla*_{OXA-72}-positiven *Ab* aus dem Urin eines Hundes isolieren und dem ST1^{Past} zuordnen. Das Isolat wies neben einer CR auch eine Resistenz gegenüber Colistin, bedingt durch Mutationen des *pmrCAB*-Operons, auf [263]. Ebenfalls aus dem Urin eines hospitalisierten Hundes gelang Chanchaithong *et al.* (2018) der Nachweis eines *bla*_{OXA-23}-positiven *Ab*, des ST2^{Past}. Das

lediglich gegenüber Colistin sensible Isolat zeigte u.a. phänotypische Resistenzen gegenüber Carbapenemen, Gentamicin und Ciprofloxacin [56]. Zwei Jahre später konnten Taj *et al.* (2020) ebenfalls einen CR OXA-23-positiven *Ab* des IC2/ST2^{Past} bei einem Harnwegsinfekt nachweisen, jedoch von einer Katze. Der XDR *Ab* zeigte einzig gegenüber Colistin und Tigazyklin einen sensiblen Phänotyp [382]. Dass das Auftreten von CR *Ab* bei Tieren nicht immer in einem nosokomialen Zusammenhang steht, zeigten Hérivaeux *et al.* (2016) in einer Untersuchung von nicht-hospitalisierten Hunden und Katzen in Frankreich. Bei 2,7 % der Hunde konnte *Ab*, darunter CR OXA-23-positiv ST25^{Past} sowie CS *Ab* des ST250^{Past} und ST753^{Past}, nachgewiesen werden. In der PFGE-Analyse ergab sich eine 100 % Homologie der beiden CR Isolate, was auf einen klonalen Ursprung schließen lässt [173]. Die niedrigere Prävalenz von *Ab* in nicht-hospitalisierten Tieren im Vergleich zu der Studie von Belmonte *et al.* (2014) und Pailhoriès *et al.* (2015) führten die Autoren auf das gemäßigte Klima zurück, da *Ab*-Infektionen v.a. in tropischen Klimazonen beschrieben wurden [28, 92, 173, 295]. Entgegen der Annahme der Verbreitung von *Ab* in nicht-hospitalisierten Tieren konnten Gentilini *et al.* (2018) bei der Untersuchung von hospitalisierten und nicht-hospitalisierten Hunden und Katzen nur bei Tieren, die stationär aufgenommen waren, CR *Acinetobacter* spp. nachweisen. *Ab* des ST2^{Past} waren Träger der Oxacillinase *bla*_{OXA-23} während bei *A. radioresistens* die Metallo- β -Laktamase NDM-1 nachgewiesen wurde. Die multiresistenten *Ab*-Isolate zeigten in der PGFE-Analyse das gleiche Bandenmuster und wiesen nur gegenüber Colistin einen empfindlichen Phänotyp auf [140].

Der Nachweis von β -Laktamasen in der Veterinärmedizin ist nicht nur auf *Ab* beschränkt. So konnten Klotz *et al.* (2017) bei 2,5 % klinischer *Ap* von Hunden und Katzen *bla*_{OXA-58} nachweisen (Publikation 3). Die Isolate stammten aus zwei unterschiedlichen deutschen Kliniken, was sich in der PFGE in zwei Klonen widerspiegelte. Anhand einer MCG-Analyse wurden Ähnlichkeiten zu humanen Stämmen, die von Patienten in Deutschland und den USA isoliert wurden, aufgezeigt. Trotz der erworbenen CP wies keines der fünf *Ap*-Isolate einen resistenten Phänotyp gegenüber Carbapenemen auf [217].

Kimura *et al.* (2017) konnten zeigen, dass der CR Phänotyp tierischer *Acinetobacter* spp. auch durch andere β -Laktamasen bedingt sein kann. Bei einem Hund mit Zystitis und einer Katze mit Konjunktivitis konnte ein IMP-1-positiver *A. radioresistens* isoliert werden. Beide Tiere waren nicht-hospitalisiert und beide Stämme wiesen unterschiedliche Resistenzprofile sowie 3.569 *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) auf, was gegen einen klonalen Ursprung spricht [213].

Tabelle 2. Nachweise über *Acinetobacter* spp. bei Kleintieren.

Spezies	Land	Jahr	NI	P	Tierart	Lokalisation	Beteiligte Bakterien	IC/ST ^{Past}	Antimikrobielle Resistenz	Referenz
<i>Ab</i>	CH	08-1995 - 12/1997	Ja	k.A.	Hd (17), Ktz (2)	UGT, RT, ZVK, Wunde, Blut	u.a. <i>Ec</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Proteus</i> spp.	k.A.	z.T. SXT, AMI, Fluorchinolone	[127]
<i>Ab</i>	CH	08/1998 - 12/2000	Ja	k.A.	Hd (10), Ktz (5),	UGT, Chirurgische Wunde, Blut	k.A.	k.A.	z.T. SXT, AMI, Sulfonamide	[36]
<i>Ab</i>	CH	05/2004- 08/2009	Ja	k.A.	u.a. Hd (12), Ktz (3)	u.a. UGT, Wunde	k.A.	ST10, ST12, ST15, ST20	z.T. GEN, CIP, SXT	[108]
<i>Ab, Ap</i>	DE	2000-2008	Ja	k.A.	u.a. Hd (26), Ktz (23)	u.a. UGT, Wunde, RT	k.A.	IC1, IC2, IC3	z.T. GEN, CIP, IMP	[441]
<i>Ab</i>	DE	2000-2013	Nein	k.A.	u.a. Hd (168), Ktz (42)	u.a. Wunde, UGT, ZVK, RT	k.A.	ST1, ST2, ST10	z.T. IMP, GEN, SAM, SXT, LEV	[121]
<i>Ab, Ec, Si</i>	US	01-06/2006	Ja	7 %	Hd (74)	u.a. RT, UGT, Peritoneale Flk.	<i>Ab</i> (7 %), <i>Ec</i> (23 %), <i>Si</i> (10 %)	k.A.	Multiresistent (Kapitel 2.6.3.1)	[32]
<i>Ab</i>	CH	2007	Ja	k.A.	Ktz (1), Hd (2)	UGT, Wunde, Organe, Haut	Haut: GN Mischflora, Organe: <i>Ab</i> Reinkultur	k.A.	u.a. PIP, AMI, Fluorchinolone	[44]
<i>Ab</i> <i>Ab, Ac</i> , <i>Aj, Al</i> , <i>Anov, Ap</i>	JP GB	2008 2008	k.A. Nein	- 8,13 %	Hd (1) Hd (40)	Perikard Haut	<i>Candida albicans</i> k.A.	- k.A.	k.A. k.A.	[266] [264]
<i>Acb</i>	IL	07/2010- 11/2012	Ja	k.A.	Hd (19), Ktz (4)	u.a. UGT, RT, Blut	k.A.	k.A.	z.T. GEN, FLO, SXT	[224]
<i>Acb</i>	IN	03/2010- 02/2012	k.A.	6,9 %	Hd (66)	Haut	u.a. GP, <i>Ec</i> , <i>Kp</i> , <i>Pa</i>	-	u.a. GEN, SXT	[165]
<i>Ab</i>	FR	10/2012	k.A.	6,5 %	Hd (7), Ktz (2)	Oral, Rektal, ggf. Wunde	k.A.	ST25, ST239	CIP, SXT, LEV	[28]

Tabelle 2. Fortsetzung nächste Seite.

Literaturübersicht

Tabelle 2. Fortsetzung: Nachweise über *Acinetobacter* spp. bei Kleintieren.

Spezies	Land	Jahr	NI	P	Tierart	Lokalisation	Beteiligte Bakterien	IC/ST ^{past}	Antimikrobielle Resistenz	Referenz
<i>Ab</i> , <i>Ap</i> , <i>Abe</i> , <i>Aj</i> , <i>Anov</i> , <i>Al</i> , <i>Ar</i> , <i>Asc</i> , <i>Av</i>	LB	02/2012- 10/2013	Nein	7,7 %	u.a. Hd, Ktz,	Oral, Rektal, Kot	k.A.	u.a. ST1, ST10, ST13, ST46	z.T. CIP, DOX, DOR,	[323]
<i>Ab</i>	FR	2015	Nein	8,5 %	Hd (102), Ktz (39)	ZVK, UGT, Rektal, Wunde, Tonsille	k.A.	u.a. ST2, ST33, ST107	Multiresistent [242]	[295]
<i>Ab</i>	FR	04-06/2015	Nein	2,7 %	Hd (104), Ktz (46)	Oral, Rektal	k.A.	ST25, ST250, ST753	z.T. IMP, SXT, CIP, DOX	[173]

NI: nosokomiale Infektion; P: Prävalenz; IC: internationaler Klon; ST^{past}: Sequenztyp nach dem Pasteur-Schema; Ref.: Referenz; *Ab*: *A. baumannii*; *Abe*: *A. bereziniae*; *Acb*: *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*-Komplex; *Ac*: *A. calcoaceticus*; *Aj*: *A. junii*; *Al*: *A. lwoffii*; *Ap*: *A. pittii*; *Ar*: *A. radioresistens*; *Asc*: *A. schindleri*; *Av*: *A. variabilis*; *Anov*: *Acinetobacter* sp. nova; *Ec*: *Escherichia coli*; *Si*: *Staphylococcus intermedius*; *E*: *Enterococcus*; *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; *Pa*: *Pseudomonas aeruginosa*; CH: Schweiz; DE: Deutschland; FR: Frankreich; GB: England; IN: Indien; IL: Israel; JP: Japan; LB: Libanon; US: Vereinigte Staaten von Amerika; Hd: Hund; Ktz: Katze; in Klammern: Anzahl; Flk.: Flüssigkeit; UGT: Urogenitaltrakt; RT: Respirationsstrakt; ZVK: zentraler Venenkatheter; GN: Gram negativ; GP: Gram-positiv; AMI: Aminoglykoside; CIP: Ciprofloxacin; DOR: Doripenem; DOX: Doxycyclin; FLO: Florfenicol; GEN: Gentamicin; IMP: Imipenem; LEV: Levofloxacin; PIP: Piperacillin; SAM: Ampicillin/Sulbactam; SXT: Trimethoprim/Sulfamethoxazol; -: nicht vorhanden; k.A.: keine Angabe.

Literaturübersicht

Tabelle 3. Carbapenemase-positive bzw. Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp. bei Kleintieren.

Spezies	Land	Jahr	Nosokomiale Infektion	Kleintier	Lokalisation	Carbapenemase	Lokalisation Carbapenemase	Carbapenem Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Ab</i>	DE	2000	Ja	Ktz	Urin	k.A.	k.A.	IMP	k.A.	k.A.	[441]
<i>Ab</i>	DE	2000	Ja	Ktz	Urin	OXA-23	P, Tn2008	IMP	1	1 ^{Past} , 231 ^{Ox}	[120]
<i>Ab</i>	CH	2005, 2009	Ja	Hd, Ktz	u.a. Wunde, Urin, Blut	ISAbaI/- OXA-51	C	IMP, MER	1, 2	12 ^{Ox} , 15 ^{Ox}	[108]
<i>Ab</i>	PT	2009	Ja	Ktz	Urin	OXA-23	C, Tn2006	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[317]
<i>Ab</i>	DE	2011	k.A.	Hd	Urin, Haut	OXA-23	P, Tn2008	IMP, MER	1, 8	10 ^{Past} , 585 ^{Ox}	[121]
<i>Ab</i>	FR	2011-2015	k.A.	Hd, Ktz	Urin	OXA-23	C	IMP, MER	7	25 ^{Past}	[239]
<i>Ar</i>	JP	2014	Nein	Hd, Ktz	Urin, Auge	IMP-1	k.A.	IMP, MER	-	-	[213]
<i>Ap</i>	DE	2014-2016	Nein	Hd	Haut, RT	OXA-58	P	keine	-	93 ^{Past}	[217]
<i>Ab</i>	FR	2015	Nein	Hd	Oral/Rektal	OXA-23	k.A.	IMP, MER, DOR	7	25 ^{Past}	[173]
<i>Ab</i>	RS	2016	k.A.	Hd	Urin	OXA-72	P	IMP, MER	1	1 ^{Past}	[263]
<i>Ab</i>	IT	2014/2015	Ja	Hd, Ktz	Kot	OXA-23	P, Tn2006	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[140]
<i>Ar</i>	IT	2014	Ja	Hd	Kot	NDM-1	C, Tn125	IMP, MER	-	-	[140]
<i>Ab</i>	TH	2017	Ja	Hd	Urin	OXA-23	Tn2006	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[56]
<i>Ab</i>	PK	2020	k.A.	Ktz	Urin	OXA-23	k.A.	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[382]
<i>Ab</i>	IT	2021	Nein	Ktz	Urin	NDM-1	C, Tn125	keine	7	25 ^{Pas}	[192]

IC: internationaler Klon; ST: Sequenztyp; *Ab*: *A. baumannii*; *Ar*: *A. radioresistens*; *Ap*: *A. pittii*; CH: Schweiz; DE: Deutschland; FR: Frankreich; IT: Italien; JP: Japan; PK: Pakistan; PT: Portugal; RS: Serbien; TH: Thailand; Hd: Hund; Ktz: Katze; RT: Respirationstrakt; P: Plasmid; C: Chromosom; Tn: Transposon; DOR: Doripenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; Past: Pasteur-Schema; Ox: Oxford-Schema; -: nicht vorhanden; k.A.: keine Angabe.

2.6.3.2. Pferde

Immer wieder wurden, neben GP Erregern, *Acinetobacter* spp. als häufigster GN Vertreter der Mikrobiota von Pferdeaugen beschrieben [139, 199, 269–271]. *A. calcoaceticus*, wurde in mehreren Veröffentlichungen wiederholt mit klinischen Infektionen, u.a. Aborten oder Infektionen des Respirationstraktes, in Verbindung gebracht [89, 325]. Leider liefern die ersten Berichte keine Hinweise über eine verlässliche Speziesidentifizierung sowie die Resistenzlage der Isolate. Im Jahr 2000 berichten Vaneechoutte *et al.* (2000) erstmals über nosokomiale *Ab*-Infektionen bei Pferden. In der Universitätsklinik in Gent wurden *Ab*, deren Resistenzlage gegenüber Carbapenemen nicht erläutert wurde, aus zentralen Venenkathetern bei hospitalisierten Pferden isoliert. Drei Pferde zeigten lokale Infektionen [402]. Entgegen dieser milden Verlaufsform berichteten Bentz *et al.* (2002) von einer Thrombozytopenie bei zwei Vollblutfohlen mit Sepsis und neonataler Enzephalopathie [29]. Im gleichen Jahr berichteten Blanchard *et al.* (2002) über den hochgradigen Nachweis von *A. calcoaceticus* im Ejakulat eines Quarter Horse. Das Isolat wies Resistenzen gegenüber Gentamicin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol auf, während die Empfindlichkeit gegen Carbapeneme nicht erläutert wurde [34]. Auch in 2002 beschrieben Boguta *et al.* (2002) das Vorkommen von *Acinetobacter* spp. bei Fohlen mit Infektionen des oberen Respirationstraktes. Von 80 erkrankten Fohlen konnten bei 45 % *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden, während die Kontrollgruppe mit 20 gesunden Fohlen negativ war [37]. Im Gegensatz dazu stellten Newton *et al.* (2003) eine negative Korrelation zwischen einer apparenten Infektion des Respirationstrakts und dem Nachweis von *Acinetobacter* spp. fest [286]. Im Jahr 2010 wurde erstmals von einer Bronchopneumonie, verursacht durch einen multiresistenten *Ab*, berichtet. Das Isolat war nur noch gegenüber Fluorchinolonen und Trimethoprim/Sulfamethoxazol sensibel [201]. Smet *et al.* (2012) berichteten erstmalig über CR *Acinetobacter* spp. (heute *A. gandensis*), die Träger der β -Laktamase OXA-23 waren, aus Kotproben hospitalisierter Pferde (Tabelle 4). Die Isolate wiesen identische PFGE-Pulsotypen auf, was ein nosokomiales Geschehen vermuten lässt [369]. In der Studie von Rafei *et al.* (2015) konnten bei Pferden *Ab*, *Ap*, *A. bereziniae* sowie eine potenziell neue *Acinetobacter* Spezies nachgewiesen werden. Ein *Ab* konnte dem ST294^{Past} zugeordnet werden und war Träger von OXA-143, zeigte aber keine phänotypische CR [323]. Im Jahr 2016 beschrieben Poppel *et al.* (2016) die neue *Acinetobacter*-Spezies *A. equi*, die aus equinem Kot isoliert wurde und eine hohe Ähnlichkeit zu *Al* (98,3 %) aufweist. Die Autoren geben keine Informationen bezüglich des Resistenzprofils der Stämme [318]. Eine retrospektive Studie der Universität Zürich beschäftigte sich mit der

antimikrobiellen Resistenz bakterieller Erreger bei hospitalisierten Pferden. Als multiresistent wurden Isolate mit Resistenzen gegen drei oder mehr Antibiotikaklassen definiert [242, 401]. 96 % der getesteten *Ab* wiesen einen multiresistenten, aber CS Phänotyp auf, während ein *Ab* auch eine Resistenz gegenüber Imipenem zeigte [401]. Zwei Jahre später wurde über Imipenem-sensible *Ab* (0,9 %) aus Nasentupfern und Kotproben von Pferden berichtet [413]. Leider wurden in keiner der o.g. Studien die STs der Isolate untersucht. Das Wissen über die Verteilung von *Ab*-Sequenztypen bei Pferden ist insgesamt unzureichend.

In zwei Studien wurde ein speziesübergreifendes Infektionsgeschehen mit *Ab* beschrieben. Boerlin *et al.* (2001) berichteten über *Ab*, die nach einem Ausbruch in einer Kleintierklinik ein Jahr später ein erneutes Ausbruchsgeschehen verursachten, dass sich auf die benachbarte Pferdeklunik erstreckte [36]. In der zweiten Studie wurden tierische mit humanen *Ab* verglichen und *Ab* des ST12^{Past} (IC2) und ST15^{Past} (IC1) bei Pferden nachgewiesen [108].

2.6.3.3. Rinder

Der erste Bericht über *Acinetobacter* spp., genauer *A. calcoaceticus*, bei Rindern stammt aus dem Jahr 1982 [254]. In den nächsten Jahren wurde *A. calcoaceticus* aus Proben einer Mastitis und einer Metritis isoliert [324]. Hamouda *et al.* (2008 und 2011) untersuchten diverse Proben von Rindern auf *Ab* und *P. aeruginosa*. CS *Ab* wurden aus Kotproben sowie Nasentupfern isoliert, wohingegen kein Nachweis aus Ohr- oder Hauttupfern sowie Milch- und Fleischprodukten möglich war [162, 163]. Im Gegensatz dazu konnten Ercolini *et al.* (2009) in gefrorenem Fleisch *Ab* nachweisen [110]. Nam *et al.* (2009) untersuchten Proben klinischer Mastitiden und konnten in 6 % der Proben *Al* und *A. junii* nachweisen. Leider wurde keine Aussage über die Resistenzlage gegenüber Carbapenemen getroffen [278]. Im Jahr 2012 berichteten Poirel *et al.* (2012) erstmals über CP-produzierende *Acinetobacter* Genomspezies 15TU (heute *A. variabilis*) bei Rindern in Frankreich (Tabelle 4). Unter 50 beprobten Rindern konnten neun genetisch unterschiedliche OXA-23-positive CR *A. variabilis*-Stämme isoliert werden. In nur einem Isolat war *bla*_{OXA-23} Teil des Tn2008 mit einem unterbrochenen IS*Abal* [307]. Lupo *et al.* (2014) berichteten über *Ab*-Prävalenzen von 18 % bzw. 6 % in Schweizer Kalbs- bzw. Rindfleisch. In der MLST-Analyse wurde eine große Diversität der CS *Ab*-Isolate mit zum Teil neuen STs festgestellt [240]. *Acinetobacter gandensis*, der bereits bei Pferden isoliert wurde [369], konnte auch bei einem Rektaltupfer eines Rindes im Libanon nachgewiesen werden [370]. Ebenfalls bei einem Rind aus dem Libanon wurde erstmals ein CR ST2^{Past}-*Ab*-Isolat, das Träger des Gens *bla*_{OXA-23} war nachgewiesen [8]. In einer weiteren Studie aus dem Libanon konnten Rafei *et al.* (2015) bei Rindern in Milch- sowie

Rindfleischproben *Ab*, *Ap*, *A. calcoaceticus*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. variabilis* sowie mehrere potenziell neue *Acinetobacter* spp. nachweisen. *Ab* zeichneten sich erneut durch eine hohe Variabilität der STs aus [323]. Bei einer Untersuchung von tierassozierten Umweltproben, wie Oberflächenwasser und Gülle von Rinderbetrieben in Kanada, konnten sowohl CS *Ab* als auch CS *Ai* nachgewiesen werden [123]. Im Jahr 2016 wurde von einem *bla*_{OXA-24/40}-positiven CR *Ab*-Isolat des neuen ST587^{Past} aus dem Maul eines Rindes berichtet. Bei fünf von sechs beprobten Tieren wurden *Ab* des ST278^{Past} sowie vier neuen STs (ST479^{Past}, ST480^{Past}, ST482^{Past} und ST587^{Past}) isoliert [294]. Im gleichen Jahr berichteten Webb *et al.* (2016) von dem Nachweis eines *Ab* aus Kotproben von Milchrindern. Die Autoren wiesen die neue intrinsische OXA-51-like β -Laktamase OXA-497 nach und konnten das Isolat dem neuen ST742^{Past} bzw. ST1133^{OX} zuordnen [418]. Neben *Ab* spielt auch *Ai* als CR Erreger bei Rindern eine Rolle. So konnten CR *Ai*-Stämme aus Nasentupfern von Kälbern isoliert werden (Tabelle 4). Die Stämme wiesen phänotypische Resistenzen gegenüber Carbapenemen, bedingt durch OXA-23 als Teil eines unvollständigen Tn2008, Gentamicin und Fluorchinolonen auf [215]. In einer weiteren Studie der Autoren wurde die Saisonalität boviner *Ab* in Deutschland untersucht. Bei 15,6 % der Rinder wurden CS *Ab* mit erhöhten Prävalenzen zwischen Mai und August nachgewiesen. Die Isolate wurden 83 verschiedenen STs zugeordnet, darunter 67 neue STs. Neun dieser STs wurden bereits bei Infektionen von Menschen beschrieben [216]. NDM-1 und OXA-58 konnten 2020 bei *Ai*-Isolaten von Milchkühen in China nachgewiesen werden [167].

2.6.3.4. Schweine

Im Jahr 2008 wurde erstmalig über *Acinetobacter* spp. bei der Untersuchung von Nasen-, Ohr- und Hauttupfern sowie Kotproben von Schweinen in Schottland berichtet. Aus Kotproben wurden CS *Ab*, mit Ähnlichkeiten von >85 % untereinander, aber phylogenetischer Diversität im Vergleich zu humanen Stämmen, isoliert [163]. In einer Studie über Sulfonamid-resistente bakterielle Erreger wurden in 35,7 % der Bodenproben, von mit Schweinegülle behandelten Feldern, Sulfonamid-resistente *Acinetobacter* spp. nachgewiesen [52]. 2013 wurde erstmals über ein porcines CR *Ab*-Isolat berichtet (Tabelle 4). Zhang *et al.* (2013) konnten aus der Lunge eines an Pneumonie und Sepsis erkrankten Schweines postmortal einen NDM-1-positiven *Ab* isolieren [437]. In 6 % von Schweinefleischproben aus der Schweiz wurden CS *Ab* nachgewiesen. Eines der Isolate wurde weiter charakterisiert und dem ST273^{Past} zugeordnet [240]. 2015 wurde ein *bla*_{OXA-23}-positiver *Ab*, des neuen ST491^{Past}, aus einer porcinen Kotprobe im Libanon nachgewiesen [8]. McLellan *et al.* (2018) beprobten ebenfalls Schweinefleischproben in Australien und wiesen CS Isolate des *Acb*-Komplexes und

A. ursingii-Isolate nach. *Ab* wies am häufigsten Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation auf [257]. In 2019 berichten Hrenovic *et al.* (2019) über CR OXA-23-positive *Ab* des IC2 bzw. ST195^{Ox} aus Schweinegülle [186].

2.6.3.5. Geflügel

Im Jahr 1988 wurde erstmals über Fälle von Hühnern mit Septikämien, bedingt durch *A. calcoaceticus*, berichtet [111]. Ein Jahr später beschrieben Kaya *et al.* (1989) den Nachweis von *Al* aus der Lunge von zwei Hennen, ebenfalls mit Septikämien [207]. Erst Jahre später wurde über ein CR NDM-1-positives *Al*-Isolat aus der Kloake eines Huhnes in China berichtet (Tabelle 4) [416]. Lupo *et al.* (2014) konnten mit einer Prävalenz von 45,7 % bzw. 100 % *Ab* in Hühner- bzw. Putenfleischproben aus der Schweiz nachweisen. Die CS Isolate zeigten in der MLST-Analyse ein sehr diverses Bild, wobei ST348^{Past} und ST353^{Past} dominierten [240]. Al Bayssari *et al.* (2015) konnten ebenfalls in Geflügelproben CR *Ab* nachweisen. Zwei *Ab* des neuen STs ST492^{Past} bzw. ST493^{Past} waren Träger von OXA-23, während ein ST20^{Past} Isolat neben *bla*_{OXA-23} auch *bla*_{OXA-58} trug [8]. In China wurde 2016 von einem hochvirulenten CR *Ab* berichtet, der zu seuchenhaften Erkrankungen bei 100.000 sechs Tage alten Küken führte, wovon 3.000 an der Infektion starben. Leider gibt es keine Informationen über den Mechanismus der CR [232]. Ein Jahr später untersuchten Wilharm *et al.* (2017) Tracheal- und Rektaltupfer von Hühnern, Gänsen und Störchen in Deutschland. Bei 3 % bzw. 8 % der Proben von Hühnern bzw. Gänsen wurde *Ab* isoliert. Keines der CS Isolate konnte dem IC1-IC8 (IC9 war zu dem Zeitpunkt noch nicht definiert) zugeordnet werden [421]. In Australien wiesen McLellan *et al.* (2018) in Hühnerfleischproben CS *Ab* nach. *Ab* war erneut die häufigste Spezies, die Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation aufwies [257]. Bei der Untersuchung von Wasserproben eines Geflügelschlachthofes in Deutschland konnten *Acinetobacter* ssp. des *Acb*-Komplexes (32,4 %) nach *E. coli* (39,4 %) als zweithäufigste ESKAPE-Erreger nachgewiesen werden. Eine phänotypische Colistin- bzw. Meropenem-Resistenz wiesen 5,5 % bzw. 1,3 % der *Acb*-Stämme auf. Leider wird weder die weitere Speziesdifferenzierung noch der Mechanismus der CR weiter erläutert [353]. 2021 gelang Tang *et al.* der Nachweis eines CR *Ai*-Isolats bei Beprobung einer Entenfarm. Neben der chromosomal lokalisierten β -Laktamase NDM-3, welche von einem IS*Aba*125 flankiert wurde, war das Isolat ebenfalls Träger eines Plasmid-lokalisierten *bla*_{OXA-58}-Gens [384].

2.6.3.6. Weitere Tierarten

Die ersten Berichte über *Acinetobacter* spp. bei Zoo- und Wildtieren stammen aus dem Jahr 1981. Iverson und Connelly (1981) berichteten über einen Orang-Utan, der an einer chronischen Infektion der Atemwege verstarb. In beiden Lungenflügeln wurde postmortal hochgradig *A. calcoaceticus* var. *Iwoffii* nachgewiesen [190]. Fünf Jahre später wurde der Nachweis von *A. calcoaceticus* aus Abortmaterial von Wasserbüffeln beschrieben [86]. Ahmed *et al.* (2007) konnten ein aviäres CS *Ab*-Isolat in einem Zoo in Japan nachweisen [5]. Dahiru und Enabulele (2015) untersuchten die auf Feldern von zwei Betrieben gesammelten aviären Kotproben auf *Ab*. Hier lagen die *Ab*-Prävalenzen bei 20,8 % bzw. 41,7 %. Die CR wurde nicht untersucht [83]. In der bereits mehrfach erwähnten Studie von Rafei *et al.* (2015) wurden *Acinetobacter* spp. bei einer Reihe weiterer Tierarten gefunden. So wurden bei (i) Kaninchen *Ab*, ein CR OXA-24/40-positiver *Ap* und *Aj*, bei (ii) Ziegen *Ab*, *Ap* und *A. calcoaceticus*, bei (iii) einem Affen ein *Ab*, bei (iv) einem Maultier ein *Ab*, bei (v) Schafen *Ap* und zwei potentiell neue *Acinetobacter* Spezies sowie bei einer (vi) Taube ein *A. bereziniae* nachgewiesen [323]. 2016 wurden CR *bla*_{OXA-23}-positive *Ab* (0,7 %) bei Achselfleckbrassen aus dem Mittelmeer nahe Algerien beschrieben (Tabelle 4). Die Stämme zeigten phylogenetische Ähnlichkeiten (>95 %) zu humanen Isolaten aus Frankreich und Algerien [45]. Narciso *et al.* (2017) wiesen ein CR *A. seifertii*-Isolat aus einem Kloakentupfer bei einem Schwarzhalsschwan in São Paulo nach. Das OXA-58-positiv Isolat zeigte in der PFGE einen identischen Pulsotypen zu OXA-58-positiven *A. seifertii*, die bereits in den frühen 90er Jahren bei hospitalisierten Menschen in São Paulo isoliert wurden [280]. Neben Geflügelproben untersuchten Wilharm *et al.* (2017) auch Tracheal- und Rektaltupfer von Störchen in Polen. Die Prävalenz von *Ab* (non-IC1-IC8) lag bei 25 %, wobei sie regional zwischen 3 % und 48 % schwankte. [421]. Klotz *et al.* (2017) berichteten über einen CR OXA-72-ST294^{Past}-*Ab* von einem Graupapagei mit respiratorischer Symptomatik aus Luxemburg [218]. Kurze Zeit später veröffentlichten Linz *et al.* (2018) eine Studie über eine seuchenhafte respiratorische Erkrankung bei Schafen in Pakistan, die durch *Ab* verursacht wurde. Das Isolat des ST452^{Past} war Träger von *bla*_{PER-1} und drei *bla*_{OXA-23}-Genen [231]. Bei der Beprobung von Wasservögeln sowie deren Umgebung konnten Cui *et al.* (2020) *Acinetobacter* spp. Isolate, die neben *bla*_{NDM-1} auch *tetX*, welches eine Resistenz gegenüber Tigezyklin vermittelt, trugen nachweisen. Bei 33,3 % der Stämme konnten beide Resistenzgene auf dem gleichen Plasmid nachgewiesen werden. Obwohl die Plasmide von unterschiedlichen *Acinetobacter* spp. (*Ai*, *A. schindleri*, *Al*) isoliert wurden, wiesen sie eine hohe Sequenzähnlichkeit auf [78]. Im gleichen Jahr wurden CR *Ab*, die Träger des CP-Gens *bla*_{OXA-}

⁷² waren, bei Gänsen und Schwänen eines brasilianischen Zoos beschrieben. Die Stämme zeigten Ähnlichkeiten zu humanen CR *Ab* und konnten dem in Brasilien weitverbreiteten Hoch-Risiko-Klon CC79 zugeordnet werden. Dies deutet auf eine Beteiligung von Vögeln an der Verbreitung von multiresistenten *Ab*, die Hoch-Risiko-Klonen zugeordnet werden können, hin [279].

Tabelle 4. Fortsetzung: Übersicht von Carbapenemase-positiven *Acinetobacter* spp. tierischer Herkunft basierend auf 21 Studien.

Spezies	Land	Jahr	Nosokomiale Infektion	Wirt	Lokalisation	Carbapenemase	Lokalisation Carbapenemase	Carbapenem Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Ab</i>	LU	2016	k.A.	Gr	Choane	OXA-72	P	IMP, MER	k.A.	294 ^{Past}	[218]
<i>Ab</i>	PK	2011-2012	Nein	Sf	Nase, BAL	OXA-23, PER-1	Tn2008 (C, P), Tn1213 (RI)	k.A.	2	2 ^{Past}	[231]
<i>Ai</i> , <i>Asc</i> , <i>Al</i>	CN	07/2016- 11/2018	Nein	WV	Kot, Boden, Abwasser	NDM-1	C oder P, Tn125	MER	-	-	[78]
<i>Ab</i>	BR	2012	Nein	WV, ZV	Choane, Kloake	OXA-72	P	IMP, MER	k.A.	79 ^{Past} , 957 ^{Past}	[279]
<i>Ai</i>	CN	2020	Nein	Gef	k.A.	NDM-3, OXA-58	C, Tn125 P, ISAba3	MER	-	-	[384]
<i>Acb</i>	DE	2020	Nein	Gef	Wasser	k.A.	k.A.	MER	k.A.	k.A.	[353]

Ab: *A. baumannii*; *Acb*: *A. calcoaceticus-baumannii*-Komplex; *Ag*: *A. gandensis*; *Ai*: *A. indicus-like*; *Al*: *A. lwoffii*; *Ap*: *A. pittii*; *Ar*: *A. radioresistens*; *As*: *A. seifertii*; *Asc*: *A. schindleri*; *Av*: *A. variabilis*; *BR*: Brasilien; *CH*: Schweiz; *CN*: China; *DE*: Deutschland; *DZ*: Algerien; *FR*: Frankreich; *HR*: Kroatien; *IT*: Italien; *JP*: Japan; *LB*: Libanon; *LU*: Luxemburg; *PK*: Pakistan; *PT*: Portugal; *RS*: Serbien; *TH*: Thailand; *Fi*: Fisch; *Gef*: Geflügel; *Gr*: Graupapagei; *Hd*: Hund; *Ka*: Kaninchen; *Ktz*: Katze; *Pf*: Pferd; *Ri*: Rind; *Schw*: Schwein; *Sw*: Schwan; *Sf*: Schaf; *WV*: Wasservogel; *ZV*: Zugvogel; *BAL*: Bronchoalveoläre Lavage; *P*: Plasmid; *C*: Chromosom; *RI*: Resistenzinsel; *Tn*: Transposon; *IC*: internationaler Klon; *ST*: Sequenztyp; *DOR*: Doripenem; *IMP*: Imipenem; *MER*: Meropenem; *Past*: Pasteur-Schema; *Ox*: Oxford-Schema; -: nicht vorhanden; k.A.: keine Angabe.

3. Ziele der Dissertation

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis und die Charakterisierung von multiresistenten *Acinetobacter baumannii*-Isolaten aus klinischem Probenmaterial von Kleintieren. Folgende Fragestellungen sollten bearbeitet werden:

- Welche epidemiologischen Zusammenhänge bestehen zwischen humanen und tierischen *Acinetobacter* spp.-Isolaten?
- Welche antimikrobiellen Resistenzen weisen *Acinetobacter* spp. aus klinischem Untersuchungsgut von Kleintieren auf und wie ist deren genetische Grundlage?
- Wie ist das Vorkommen von Carbapenem-resistenten (CR) *Acinetobacter* spp. aus klinischem Untersuchungsgut von Kleintieren und inwieweit gleichen sich CR Isolate von Kleintieren und Menschen hinsichtlich Resistenzmechanismen, genetischer Struktur und Resistenzgen-Lokalisation?
- Hat die CR einen Einfluss auf die *in vitro*-Fitness, Biofilmbildung und Virulenz im *Galleria mellonella*-Modell von *A. baumannii* und wie unterscheiden sich humane und tierische CR Isolate in dieser Hinsicht?

4. Publikationen

4.1. 1. Publikation

“Genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* isolates carrying OXA-23 and OXA-58 genes from animals reveals ST1 and ST25 as major clonal lineages”

Genomische Analysen von OXA-23- und OXA-58-positiven tierischen *Acinetobacter baumannii*-Isolaten weisen ST1 und ST25 als dominierende klonale Linien nach.

Publiziert in *Antibiotics* (Basel), August 2022, Volume 3.

DOI: 10.3390/antibiotics11081045.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung multiresistenter, insbesondere CR *Ab* aus dem klinischen Untersuchungsgut von Kleintieren. Ein Großteil der Ergebnisse dieser Untersuchungen, mit Ausnahme der Daten aus den funktionellen Assays (Kapitel 5.1.4, 5.1.5 und 5.1.7), wurde in der 1. Publikation veröffentlicht. Die Originalpublikation befindet sich im Anhang [191].

4.1.1. Zusammenfassung (Übersetzt aus Originalpublikation)

Acinetobacter baumannii (*Ab*) wird zunehmend als relevanter Krankheitserreger in der Veterinärmedizin, mit vermeintlich zoonotischem Potential, beschrieben. Insbesondere das Auftreten von Carbapenem-resistenten (CR) *Ab* ist besorgniserregend, da Carbapeneme zu den wichtigsten Therapeutika bei *Ab*-Infektionen zählen. Im Rahmen dieser Studie wurden Carbapenemase-produzierende *Ab* tierischen Ursprungs identifiziert und charakterisiert. Von 502 *Ab*, die zwischen 2013 und 2018 vor allem von Hunden und Katzen (75,7 %) isoliert wurden, konnten bei 42 Isolaten aus 22 verschiedenen Tierkliniken (TKs) die Carbapenemase-Gene *bla*_{OXA-58} (n=29) oder *bla*_{OXA-23} (n=13) nachgewiesen werden. Das *bla*_{OXA-58}-Gen konnte auf Plasmiden (n=4; 11,4-21,1 kb), in unterschiedlichen genetischen Umgebungen eingebettet, lokalisiert werden. *Bla*_{OXA-23} hingegen war entweder als Teil des Transposons Tn2006 auf dem Chromosom (n=4) oder innerhalb des Transposons Tn2008 auf Plasmiden (n=9; 41,2-71,3 kb) lokalisiert. Der dominierende Klon IC1-ST1^{Past}-OXA-58 (66,7 %; darunter 96,4 % vom cgMLST-Typ-1808) wurde in elf verschiedenen TKs in Deutschland nachgewiesen. Innerhalb aller ST1^{Past}-*Ab*-Isolate konnten seit 2016 die Resistenzinseln *AbaR3*-like (n=15) und *AbaR10* (n=1) identifiziert werden. *Ab*-Isolate des Typs IC7-ST25^{Past}-OXA-23 (21,4 %) wurden in sieben TKs in Deutschland, Frankreich und Italien nachgewiesen und zeigten andere Resistenzgenmuster als OXA-58-Isolate. Weitere nachgewiesene STs waren ST10^{Past}, ST578^{Past} und ST602^{Past}. Folglich konnten OXA-23- und OXA-58-positive *Ab* tierischen Ursprungs, den auch in der Humanmedizin weltweit erfolgreichen klonalen Linien ST1^{Past} und ST25^{Past} zugeordnet werden. Die genetische Umgebung des in die Transposonstrukturen Tn2006 bzw. Tn2008 eingebetteten *bla*_{OXA-23}-Gens sowie des *bla*_{OXA-58}-Gene in einen zuvor bereits beschriebenen genetischen Kontext deuten auf einen Transfer erworbener Carbapenemasen zwischen humanen und tierischen multiresistenten *Ab* hin. Ebenso weisen die Ergebnisse auf eine erfolgreiche Verbreitung von multiresistenten Stämmen in der klinischen Umgebung in der Tiermedizin hin.

4.2. 2. Publikation

„First report of NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain from a pet animal in Europe“
Erster Bericht eines NDM-1-positiven *Acinetobacter baumannii* tierischen Ursprungs in Europa.

Publiziert in Journal of Global Antimicrobial Resistance, September 2021, Volume 26.

DOI: 10.1016/j.jgar.2021.05.003.

In dieser Arbeit konnte ein *Ab*-Isolat, das Träger der bei Tieren noch sehr selten vorkommenden Neu-Delhi Metallo- β -Laktamase (NDM-1) war, von einem Hund aus Italien isoliert werden. Eine detaillierte Analyse des NDM-1-positiven Isolats ist Teil der 2. Veröffentlichung. Die Originalpublikation befindet sich im Anhang [192].

4.2.1. Zusammenfassung (Übersetzt aus Originalpublikation)

Multiresistente *Acinetobacter baumannii* (*Ab*), einschließlich Neu-Delhi-Metallo- β -Lactamase 1 (NDM-1)-positive, Carbapenem-resistente (CR) Isolate zählen weltweit zu den wichtigsten Ursachen nosokomialer Infektionen. 2018 konnte der NDM-1-positive *Ab* IHIT38008 aus dem Urin eines Hundes aus Italien mit Harnwegsinfektion isoliert werden. Das *bla*_{NDM-1}-positive Isolat zeigte gegenüber allen getesteten β -Laktam-Antibiotika sowie Enro-/Marbofloxacin und Nitrofurantoin einen resistenten Phänotyp und war Träger der intrinsischen β -Laktamase-Gene *bla*_{OXA-64} and *bla*_{ADC-25-like}. NDM-1 war, als Teil des Transposons Tn_{I25}, chromosomal lokalisiert. Die ca. 10,1 kb große Transposonstruktur von IHIT38008 wies >99.9 % Identität mit dem Transposon des humanen *Ab*-Isolats 161/07, sowie Ähnlichkeiten mit den NDM-1-Regionen des humanen *Ab*-Isolat JH, des felines *Al* Iz4b und des *bla*_{NDM-1}-positiven *A. radioresistens* eines Hundes aus Italien auf, während weitere *Al*-Isolate tierischen Ursprungs nur Teile des Tn_{I25} trugen. IHIT38008 konnte dem IC7/ST25^{Past} zugeordnet werden und zeigte in vergleichenden genomischen Analysen Ähnlichkeiten zu humanen Isolaten, u.a. aus den USA, während humane Isolate aus Europa weniger verwandt waren. Erstmals konnte ein NDM-1-positiver *Ab* tierischer Herkunft, der dem weltweit verbreiteten ST25^{Past} zugeordnet werden konnte, in Europa isoliert werden. Insbesondere die Lokalisation von *bla*_{NDM-1} innerhalb des Tn_{I25} liefert Hinweise auf einen möglichen sporadischen Transfer humaner *Ab*-Isolate auf Tiere.

4.3. 3. Publikation

“*Acinetobacter pittii* from companion animals co-harboring *bla*_{OXA-58}, the *tet39* region and other resistance genes on a single plasmid”.

Acinetobacter pittii von Haustieren, die gleichzeitig *bla*_{OXA-58}, die *tet39*-Region und weitere Resistenzgene auf einem Plasmid tragen.

Publiziert in Antimicrobial Agents Chemotherapy, January 2018, Volume 62 Issue 1.

DOI: 10.1128/AAC.01993-17.

Neben *Ab* konnten im Laufe der Untersuchungen auch CR *Acinetobacter* spp., wie *Ap* aus dem klinischen Untersuchungsgut von Tieren isoliert werden. Die Charakterisierung der *bla*_{OXA-58}-positiven *Ap* sind Teil der 3. Publikation. Die Originalpublikation befindet sich im Anhang [217].

4.3.1. Zusammenfassung (Übersetzt aus Originalpublikation)

Neben *Ab* stellt *Ap* einen bedeutsamen Erreger nosokomialer Infektionen dar. Carbapeneme gelten als Antibiotikum der Wahl bei Infektionen mit multiresistenten *Acinetobacter* spp. Besorgniserregend ist in diesem Zusammenhang der zunehmende Nachweis von CR *Acinetobacter* spp., deren Resistenzmechanismus meist auf erworbenen Oxacillinasen oder Metallo- β -Laktamasen basiert. Im Rahmen dieser Studie wurden CR *Ap*-Isolate tierischer Herkunft untersucht. Hierzu wurden 200 *Ap*-Isolate von Hunden (n=110), Katzen (n=48), Kaninchen (n=13), Pferden (n=10) und weiteren Tieren (n=19) mittels PCR auf erworbene β -Laktamasen untersucht. Bei fünf Isolaten (2,5 %), die von zwei Hunden, zwei Katzen und einem Kaninchen aus zwei Veterinärkliniken isoliert wurden, konnte *bla*_{OXA-58} nachgewiesen werden. Die Isolate konnten dem ST93^{Past} zugeordnet werden und zeigten in der PFGE-Analyse zwei unterschiedliche Pulsotypen, die sich den zwei Veterinärkliniken zuordnen ließen. In einer phylogenetischen Analyse konnte eine große Ähnlichkeit zwischen einem der felinen OXA-58-positiven und einem humanen GIM-1-positiven, 2011 in Deutschland detektierten *Ap*-Isolat dargestellt werden. Dies weist darauf hin, dass Mensch und Tier mit den gleichen *Ap*-Genotypen infiziert werden können. Neben OXA-58 wurden weitere Resistenzgene (*aacC2*, *aph(3')-Ic*, *strA*, *strB*, *sul2* und *tet39*) auf dem 53.802 bp großen Plasmid, das in allen tierischen *Ap*-Isolaten nachgewiesen wurde, gefunden. Die Stämme zeigten phänotypisch Resistenzen gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika, einschließlich Gentamicin und Fluorchinolonen, jedoch nicht gegenüber Imipenem. Auch bei Anwesenheit eines IS-Elements führt OXA-58 bei *Ap* nicht immer zu einer phänotypischen CR. In allen tierischen Isolaten befand sich *bla*_{OXA-58}, flankiert von *ISAb3*, *araC* und *lysE*, d.h. im gleichen genetischen Kontext, der auch bei einem humanen CS *Ap*-Isolat aus China gefunden wurde. Auf diese Weise kann die Co-Lokalisation von *bla*_{OXA-58} mit weiteren Resistenzgenen auf einem Plasmid zur Verbreitung von CP-Genen beitragen, auch wenn Carbapeneme in der Veterinärmedizin kaum eingesetzt werden. Des Weiteren verdeutlicht die phylogenetische Verwandtschaft mit humanen klinischen Isolaten die Gefahr eines zoonotischen Potentials tierischer *Ap*-Isolate.

5. Ergänzungen und unveröffentlichte Daten

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden Publikationen war der Fokus jeweils auf einen bestimmten Aspekt gerichtet (Charakterisierung CR *Ab*- und *Ap*-Isolaten bei Kleintieren), sodass nicht alle erfassten Daten und Ergebnisse der Arbeit veröffentlicht und diskutiert wurden. Diese werden im Folgenden als zusätzliche Informationen präsentiert.

5.1. Unveröffentlichte Methoden

Die im Folgenden erläuterten Methoden wurden zusätzlich zu den Methoden der Publikationen durchgeführt um weitere Erkenntnisse des Einflusses der CR auf die bakterielle Fitness, die Biofilmbildung und die Virulenz von *Ab*-Isolaten zu erhalten. Hierzu wurden Stamm-Triplets, bestehend aus Wildtyp, Transformante und plasmidfreier Variante vergleichend in funktionellen Assays untersucht.

Methoden, die den Publikationen entnommen werden können:

- Identifizierung von *Acinetobacter* spp. und DNS-Isolation
- PCR-Screening auf erworbene CP-Gene
- Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit (VITEK, E-Test, MICRONAUT)
- Ganzgenomsequenzierung
- Identifizierung antimikrobieller Resistenzgene und -inseln
- Untersuchung der Umgebung der Resistenzgene
- *in silico*-Analyse der Resistenzplasmide
- Phylogenetische Untersuchungen (MLST, MCG-Analyse, cgMLST)
- Southern Blot und Hybridisierung zur Bestimmung der Lokalisation der Resistenzgene
- Transkonjugation und Transformation der Resistenzplasmide

5.1.1. *Acinetobacter* spp.-Sammlung aus veterinärmedizinischem Probenmaterial und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung

Neben den in der 1. und 2. Publikation beschriebenen 503 *Ab*-Isolaten sowie den 5 *Ap*-Isolaten der 3. Publikation von Kleintieren aus Deutschland, Frankreich, Italien, Holland und Polen, wurden für vergleichende Untersuchungen weitere *Acinetobacter* spp. von Großtieren (Rind, Schwein, Schaf, Ziege), Heimtieren (Kaninchen, Maus, Ratte) sowie von Wild- und Zootieren mit in die Untersuchungen aufgenommen (Tabelle 5). Ebenfalls sind die bereits früher

publizierten Isolate IHIT7853 [120], IHIT17886 und IHIT17966 [121] Teil der Studie. Zusätzlich wurden 49 Isolate von einem externen veterinärdiagnostischen Labor (Dr. Ivonne Stamm, IDEXX GmbH, Ludwigsburg) auf CR vorselektierte, sowie 57 humane Isolate (Dr. Yvonne Pfeifer, Robert-Koch-Institut, Wernigerode; Dr. Stephan Göttig, Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt; Dr. Alexandr Nemeč, Centre for Epidemiology and Microbiology, National Institute of Public Health, Prag) zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurden in den Untersuchungen 1.540 *Acinetobacter* spp.-Isolate berücksichtigt.

Da nicht alle *Acinetobacter* spp. ein Wachstum bei 37 °C zeigen und für die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung mittel VITEK2 geeignet sind, wurden für *Aj* und *Al*, welche ihr Temperaturoptimum bei 28 °C haben, die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) zusätzlich mit dem Micronaut (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel) bestimmt. Die Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung wurden anhand der humanen Grenzwerte für *Acinetobacter* spp. von CLSI und EUCAST interpretiert [71, 116]. Falls kein Grenzwert für den Wirkstoff definiert wurde, wurden Grenzwerte von Antibiotika der gleichen Klasse (z.B. Ciprofloxacin für Enro- und Marbofloxacin) oder von *Enterobacteriaceae* (z.B. Tigezyklin) zur Interpretation herangezogen.

Tabelle 5. Übersicht der *Acinetobacter* spp.-Isolate dieser Arbeit.

<i>Acinetobacter</i> Spezies	Klein- tiere	Groß- tiere	Heim- tiere	Wild-/ Zoo- tiere	Vögel	weitere Tier- arten/ Umwelt	Mensch	Gesamt
<i>A. baumannii</i>	594*	129	22	15	10	1	50	821
<i>A. pittii</i>	239**	37	38	25	9	0	3	351
<i>A. nosocomialis</i>	2	3	0	1	0	0	0	6
<i>A. calcoaceticus</i>	16	34	2	6	0	0	0	58
<i>A. johnsonii</i>	31	47	9	7	0	0	0	94
<i>A. Iwoffii</i>	12	26	5	2	0	0	0	45
<i>A. indicus</i>	0	8	0	0	0	2	2	12
<i>A. radioresistens</i>	12	4	12	1	0	0	1	30
weitere Spezies***	21	79	9	7	6	0	1	123

*inklusive der *Ab*-Isolate (n=503) aus der 1. [191] und 2. Publikation [192] sowie IHIT7853, IHIT17886 und IHIT17966 aus früheren Publikationen [120, 121]

** inklusive der *Ap*-Isolate aus der 3. Publikation [217].

*** weitere Spezies: *A. baylyi*, *A. bereziniae*, *A. bohemicus-like*, *A. equi-like*, *A. gernerii*, *A. guillouiae*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. oleivorans-like*, *A. parvus*, *A. rhizosphaerae*, *A. schindleri*, *A. schindleri-like*, *A. species* (nicht differenzierbar), *A. tjernbergiae*, *A. townneri* und *A. ursingii*.

5.1.2. Untersuchungen zum Vorkommen von Virulenz-assoziierten Genen bei *Acinetobacter baumannii*-Isolaten von Tieren

Die CR *Acinetobacter* spp.-Isolate von Tieren wurden mittels des Online-Service des *Center for genomic Epidemiology* (CGE) (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>) und einer hausinternen Datenbank auf die wichtigsten Virulenz-assoziierten Gene (VAGs) von *Acinetobacter* spp. untersucht (Tabelle 6) [214]. Dazu zählen, wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde, Gene, die im Zusammenhang mit der Biofilmbildung (*blp1*, *blp2*, *csuABCDE*), Kapselbiosynthese (*epsA*), Zink-Akquisition (*znuABCDE*), Motilität (*pilA*) sowie Interaktion mit dem Immunsystem (*lipA1*, *epsA*) zur Virulenz von *Acinetobacter* beitragen. Als Grenzwerte wurde, wie in der CGE-Datenbank hinterlegt, eine Nukleinsäuren-Sequenzähnlichkeit von ≥ 90 % sowie eine Längenübereinstimmung von ≥ 60 % zur Referenzsequenz gewählt [214].

Tabelle 6. Übersicht über die Virulenz-assoziierten Gene von *Acinetobacter* spp., die in dieser Arbeit berücksichtigt wurden.

Gen	Produkt	Funktion	Referenz
<i>adeAB</i>	Protein Effluxpumpe	Antibiotikaresistenz	[331]
<i>adeRS</i>	Regulatorprotein Effluxpumpe	Genregulation	[331]
<i>arpA</i>	Protein Effluxpumpe	Phasenvariation	[388]
<i>arpB</i>	Protein Effluxpumpe	Phasenvariation	[388]
<i>ata</i>	Autotransporter Adhäsion	Adhäsion	[420]
<i>bap</i>	Biofilm-assoziiertes Protein	Biofilmbildung	[234]
<i>bauA</i>	Acinetobactin, Membranprotein	Eisenaufnahme	[131]
<i>blp1</i>	Bap-ähnliches Protein	Biofilmbildung	[151]
<i>blp2</i>	Bap-ähnliches Protein	Biofilmbildung	[151]
<i>cpaA</i>	Metalloprotease	Immunevasion	[387]
<i>csuA</i>	Csu Pilus Untereinheit A	Biofilmbildung	[390]
<i>csuB</i>	Csu Pilus Untereinheit B	Biofilmbildung	[390]
<i>csuC</i>	Csu Pilus Untereinheit C	Biofilmbildung	[390]
<i>csuD</i>	Csu Pilus Untereinheit D	Biofilmbildung	[390]
<i>csuE</i>	Csu Pilus Untereinheit E	Biofilmbildung	[390]
<i>epsA</i>	Kapselprotein	Immunevasion	[345]
<i>lipA1</i>	Lipase	Lipidhydrolyse	[200]
<i>omp33</i>	Äußeres Membranprotein 33	Adhäsion, Zytotoxizität	[366]
<i>ompA</i>	Äußeres Membranprotein A	Adhäsion, Zytotoxizität	[358]
<i>pilA</i>	Typ 4 Pilus Untereinheit A	Motilität, Adhäsion	[106]
<i>plc1</i>	Phospholipase C1	Zytotoxizität	[193, 375]
<i>plc2</i>	Phospholipase C2	Zytotoxizität	[193, 375]
<i>pld1</i>	Phospholipase D1	Zytotoxizität	[193, 375]
<i>pld2</i>	Phospholipase D2	Zytotoxizität	[193, 375]
<i>pld3</i>	Phospholipase D3	Zytotoxizität	[193, 375]
<i>ptk</i>	Kapselprotein	Immunevasion	[345]
<i>sod2343</i>	Superoxid-Dismutase B	Abwehr oxidativer Stress	[168]
<i>surA1</i>	Oberflächenantigen 1	unbekannt	[237]
<i>tssM</i>	Typ 6 Sekretionsprotein	Interspezies Kompetenz	[327]
<i>znuA</i>	Zink Akquisitions-System A	Zinkaufnahme	[135]
<i>znuB</i>	Zink Akquisitions-System B	Zinkaufnahme	[135]
<i>znuC</i>	Zink Akquisitions-System C	Zinkaufnahme	[135]

5.1.3. Generierung Resistenzplasmid-freier Varianten und Transformanten, sowie Auswahl von Triplets für funktionelle Assays

Für weitere Untersuchungen wurden 30 der 43 CR *Ab* auf Grundlage ihres STs, tierartlichen und klinischen Herkunft sowie Lokalisation der Carbapenemase-Gene ausgewählt. Durch verschiedene *in vitro*-Kultivierungsverfahren und Stressfaktoren (Farbstoff Acridinorange, Inkubation bei 43 °C) wurde die Abgabe (Curen) der Resistenzplasmide, die Carbapenemase-Gene trugen, provoziert. Ebenso wurden die Resistenzplasmide von CR Isolaten auf den CS *Ab*-Laborstamm ATCC 17978 (Mensch, Frankreich, 1951 [371]) transformiert. Hier wurde nach Isolierung der Plasmid-DNS die Zellmembran des Empfängerstamms mittels Elektroporation permeabel gemacht, um die Resistenzplasmide einzuschleusen [65]. Auf diese Weise wurde von ausgewählten *Ab*-Isolaten ein Triplet von Wildtyp (WT), plasmidfreier Variante des WTs und Transformante (ATCC 17978 + WT-Plasmid) generiert [84, 355].

Für den Vorgang des Curens wurden die WT-Isolate aus Übernachtskulturen (NBI-Medium) in Brain Heart Infusion (BHI)-Flüssigmedium zur Inkubation bei 43 °C und in Lysogeny Broth (LB)-Flüssigmedium mit Acridinorange zur Inkubation bei 37 °C überimpft. Mit maximal 100 Passagen wurden die Isolate täglich überimpft und alle fünf Tage auf Blutagar und Mueller-Hinton + 8 µl/ml Meropenem (Oxoid GmbH, Wesel) als Selektivmedium ausgestrichen. Im Falle eines Wachstums der Kolonien auf dem Antibiotika-haltigen Medium wurden die Isolate weiter überimpft. Bei ausbleibendem Wachstum auf dem Selektivmedium wurden die Isolate mittels OXA-Multiplex-PCR und S1-Nuclease-Verdau mit anschließendem Southern Blot auf den Verlust des Oxacillinase-Gens und per VITEK2 auf die phänotypische Carbapenem-Empfindlichkeit untersucht. Wenn das negative Ergebnis der PCR, des S1-Nuclease-Verdau sowie ein Carbapenem-sensibler Phänotyp einen Verlust des Plasmids bestätigten, wurden die klonale Identität des Wildtyps mit der plasmidfreien Variante im *ApaI*-Verdau überprüft. Wenn nach 100 Passagen keine plasmidfreie Variante generiert werden konnte, wurde der Versuch des Curens eingestellt.

Im Rahmen der Transformationsversuche wurden die WT-Isolate aus üN-Kulturen mit LB-Flüssigmedium in das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) überführt und die Plasmid-DNS gemäß Herstellerangaben isoliert. Parallel wurde der *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978 in üN-Kulturen mit LB-Flüssigmedium bei 37 °C angezüchtet. Anschließend wurde die Zellmembran des Empfängerstamm ATCC 17978 mittels elektrischem Strom in einem Elektroporator (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vorübergehend permeabel gemacht und schließlich die Plasmid-DNS transformiert [65]. Um die erfolgreiche Transformation zu überprüfen, wurde die Zellsuspension auf LB-Agar + 8 µl/ml Meropenem ausplattiert und bei 37 °C 24 h inkubiert. Im Falle eines Wachstums wurden die Stämme mittels OXA-Multiplex-PCR auf die Transformation des Oxacillinase-Gens und per VITEK2 auf die phänotypische Carbapenem-Empfindlichkeit untersucht. Deutete alles auf eine erfolgreiche Transformation des Resistenzplasmids hin, wurde die klonale Identität der Transformante mit dem Referenzstamm ATCC 17978 im *Apal*-Verdau überprüft. Konnte nach drei Versuchen keine erfolgreiche Transformation durchgeführt werden, wurden die Versuche eingestellt.

5.1.4. *In vitro*-Fitness Assay

Die Untersuchungen zur kompetitiven Fitness erfolgten angelehnt an die Methode von Kaiser *et al.* (2017) [205]. *Ab*-WT-Isolate und genetisch modifizierte Stämme wurden in LB-Flüssigmedium für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend im flüssigen Mangelmedium M63 [107] auf einen McFarland von 0,5 ($1-1.5 \times 10^8$ CFU) eingestellt. Im nächsten Schritt wurden folgende Stammkombinationen zu gleichen Teilen gemischt und für 24 h bei 37 °C inkubiert:

- *Ab*-Wildtyp + plasmidfreie Variante Wildtyp
- *Ab*-Wildtyp + *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978
- Plasmidfreie Variante Wildtyp + Transformante
- *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978 + Transformante

Gleiche Verdünnungsstufen wurden am nächsten Tag im Doppelansatz auf Blutagar sowie Mueller-Hinton + 8 µl/ml Meropenem ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden die koloniebildenden Einheiten (KbE) ausgezählt. Die *in vitro*-Fitness wurde als Quotient aus den Kolonien auf Mueller-Hinton + 8 µl/ml Meropenem und den Kolonien auf Blutagar definiert:

$$\textit{in vitro}\text{-Fitness Index} = \frac{\text{KbE Mueller-Hinton} + 8 \mu\text{l/ml Meropenem}}{\text{KbE Blutagar}}$$

Die Versuche wurden in dreifacher Wiederholung durchgeführt und der Berechnung der *in vitro*-Fitness liegt der Median-Wert der drei Auszählungen zugrunde.

Bei einem *in vitro*-Fitness-Index von 0,5 wurde die *in vitro*-Fitness der Stammkombination als gleichwertig beurteilt. Bei einem Index <0,5 wurde der auf Blutagar wachsenden Stammvariante (plasmidfreie Variante des Wildtyps oder Referenzstamm) eine höhere *in vitro*-Fitness zugesprochen, während ein Index von >0,5 eine höhere Fitness der auf antibiotikahaltigem Agar wachsenden Stammvariante (Wildtyp oder Transformante) indizierte.

5.1.5. Biofilm-Assay

Die Biofilmbildung wurde mithilfe des Kristallviolett-Mikrotiter-Assays untersucht [33]. Hierzu wurden Übernackulturen in LB- und M63-Medium photometrisch auf eine $OD_{600\text{nm}}$ von 0,05 eingestellt und im Dreifachansatz je 200 μl in vier 96-well-Mikrotiterplatten aufgebracht. Diese wurden im Anschluss statisch bei 28 °C und 37 °C je für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Danach wurde das Wachstum der Bakterien photometrisch bei $OD_{595\text{nm}}$ bestimmt. Der Überstand wurde abgenommen, die adhärennten Bakterien mittels Methanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Nach drei Waschschrinen wurde der Biofilm mit Ethanol-Aceton (80:20) in Lösung gebracht und anschließend photometrisch bei $OD_{540\text{nm}}$ gemessen. Als Positivkontrollen wurden die Stämme *Ab* ATCC 19606 sowie *E. coli* W3110 (IHIT24619) [377] mitgeführt. Als Negativkontrolle diente der *E. coli*-Stamm AAEC189 (IHIT24620) [17], der sowohl in LB- als auch in M63-Medium keine Biofilmbildung zeigt. Ebenfalls wurde die potenzielle Lokalisation der Biofilm-Gene (Tabelle 15) auf den Resistenzplasmiden des jeweiligen *Acinetobacter*-Isolats untersucht.

5.1.6. Statistische Auswertung der Ergebnisse des Biofilm-Assays

Zur statistischen Auswertung wurde der *Specific Biofilm Formation* (SBF)-Wert herangezogen [290], der sich als Quotient aus der $OD_{540\text{nm}}$ des Biofilms abzüglich des Leerwertes und der $OD_{595\text{nm}}$ des bakteriellen Wachstums nach der Inkubation errechnet:

$$\text{SBF} = \frac{\text{Biofilm} - \text{Leerwert}}{\text{Wachstum}}$$

Bei dem Leerwert handelt es sich um die Menge an Kristallviolett, die aufgrund abiotischer Faktoren an den Wänden des Mikrotiterplatten-Wellen haftet. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte mit der Software IBM SPSS Statistics 26 (IBM, Armonk, USA). Die Daten wurden anhand einer einfaktoriellem Varianzanalyse (ANOVA) unter Verwendung des Bonferroni-Posthoc- und Kruskal-Wallis-Tests analysiert. Es wurde eine Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ festgelegt.

5.1.7. *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Die Virulenz ausgewählter *Ab*-Isolate (unterschiedliche STs, Tier vs. Mensch) wurde anhand eines Infektionsmodells von Larven der großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*) bestimmt (Kapitel 2.5.3.2) [300]. Übernachtskulturen der *Ab*-Triplets wurden auf eine OD_{600nm} von 1 eingestellt. Nach mehreren Waschschriffen wurden Verdünnungsreihen von 10^{-1} bis 10^{-7} der Stämme hergestellt. Die Verdünnungsstufen 10^{-6} und 10^{-7} wurden im Doppelansatz ausplattiert und die Keimzahl nach 24 h Inkubation bestimmt. Die Verdünnungsstufen 10^{-1} bis 10^{-4} wurden für die Infektion der Larven genutzt. Hierzu wurden die Larven in 10er Gruppen anhand des Zufalls einem Isolat zugeordnet. Jede Larve wurde mit 10 μ l der entsprechenden Verdünnung per Injektion ins Coelom infiziert. Als Kontrolle diente eine Gruppe ohne Injektion sowie eine Gruppe, der PBS injiziert wurde. Die infizierten Raupen wurden bei 37 °C inkubiert. Über 6 Tage wurde alle 24 h die Anzahl der überlebenden Individuen bestimmt. Anhand der Überlebensdauer kann ein Rückschluss auf die relative Virulenz der Stammvarianten gezogen werden.

5.1.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse des *Galleria mellonella*-Infektionsmodells

Die statistische Auswertung der Daten aus den *Galleria mellonella*-Infektionsversuchen wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung unter Leitung von Dr. rer. nat. Dipl.-Math. Klaus Failing des Fachbereichs 10 der Justus-Liebig-Universität durchgeführt. Zur statistischen Analyse der Daten wurde das Programmpaket BMDP, Release 8.1 (BMDP Statistical Software, Inc., Statistical Solutions, USA) verwendet [94]. Die Überlebenszeitanalyse und paarweise Vergleiche wurden mit Hilfe einer Cox-Regression und dem Programm 2L sowie eine Regressionsanalyse mit dem Programm 6D durchgeführt. Es wurde eine Signifikanzgrenze von $p \leq 0,05$ festgelegt.

5.2. Unveröffentlichte Ergebnisse

5.2.1. Weitere Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp. aus veterinärmedizinischem Probenmaterial und deren Resistenz gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

Neben den in Publikationen 1 bis 3 erwähnten CP-bildenden *Acinetobacter* spp. konnten in dieser Arbeit CP-Bildner bei zwei weiteren *Ab* des ST1^{Past} (IHIT33917) und ST37^{Past} (IHIT36139) sowie bei anderen *Acinetobacter* spp. (n=21) von verschiedenen Tierarten gefunden werden (Tabelle 7 und 8). Des Weiteren wurden CP-Gene bei den zu Vergleichszwecken inkludierten humanen *Ab*-Isolaten (n=48) nachgewiesen.

Tabelle 7. Herkunft der *Acinetobacter* spp.-Isolate mit Carbapenemasen.

CPs	Herkunft [#]	<i>Acinetobacter</i>					
		<i>baumannii</i>	<i>pitii</i>	<i>lwoffii</i>	<i>johnsonii</i>	<i>indicus</i>	<i>species</i>
OXA-23 (n=52)	Kleintiere	17*	0	2	0	0	0
	Heimtiere	0	0	1	0	0	0
	Großtiere	1	0	1	0	2	0
	Mensch	27	1	0	0	0	0
OXA-58 (n=58)	Kleintiere	28*	5**	1	1	0	0
	Heimtiere	0	1	0	2	0	0
	Großtiere	0	0	3	2	1	2
	Mensch	9	0	0	0	1	0
	Klimaanlage	1	0	0	0	0	0
OXA-72 (n=12)	Kleintier	0	1	0	0	0	0
	Vogel	0	0	0	0	0	0
	Mensch	10	0	0	0	0	0
OXA-143 (n=1)	Kleintier	0	1	0	0	0	0
NDM-1 (n=1)	Kleintier	1**	0	0	0	0	0
Gesamt		94	9	8	5	4	2

* inklusive der Carbapenemase-bildenden *Ab*-Isolate (n=42) aus der 1. Publikation [191] sowie IHIT7853/IHIT17886/IHIT17966 aus früheren Publikationen [120, 121]

** inklusive des NDM-1 positiven *Ab*-Isolat IHIT38008 aus der 2. Publikation [192].

*** inklusive der OXA-58-positiven *Ap*-Isolate aus der 3. Publikation [217].

CP: Carbapenemasen; [#] Kleintiere: Hund und Katze; Heimtiere: Kaninchen, Maus, Meerschweinchen, Ratte; Großtiere: Pferd, Rind, Schaf, Schwein, Ziege; Vogel: Graupapagei.

Ergänzend zu der 1. und 2. Publikation zeigte eines der *bla*_{OXA-23}-positiven *Ab*-Isolate (IHIT36139) einen intermediären Phänotyp gegenüber Imipenem (MHK 6 mg/L), sowie Dori- und Meropenem (MHK 4 mg/L), während das zweite Isolat (IHIT33917) einen sensiblen Phänotyp (MHK ≤1 mg/L) gegenüber Carbapenemen im E-Test zeigte. Beide Isolate waren

gegenüber Colistin, Amikacin, Enrofloxacin, Gentamicin, Tetrazyklin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol sensibel.

Sieben (33,3 %) der CP-Gene tragenden non-*Ab* (n=21) wiesen eine phänotypische Resistenz gegenüber Imipenem auf (MHK 8 mg/L bis ≥ 16 mg/L). Ein (4,8 %) Isolat war intermediär und die verbleibenden 13 (61,9 %) Isolate waren trotz vorhandener CP-Gene phänotypisch sensibel (Tabelle 8). Zwei der phänotypischen Resistenzen mit der Analyse des VITEK2 konnten im E-Test nicht bestätigt werden (IHIT35582 und IHIT38006). Gegenüber dem Carbapenem Meropenem zeigten fünf (23,8 %) Isolate einen intermediären (MHK 3 mg/L-6 mg/L) und 16 (76,2 %) einen sensiblen Phänotyp, während gegen Doripenem je drei (14,3 %) einen resistenten (MHK 8 mg/L) bzw. intermediären (MHK 3 mg/L-6 mg/L) und 15 (71,4 %) einen sensiblen Phänotyp im E-Test zeigten (Tabelle 8). Alle 21 Isolate waren gegenüber Colistin und Amikacin sensibel. Drei (14,3 %) Isolate waren gegen Gentamicin (MHK ≥ 16 mg/L) und ein Isolat (4,8 %) gegen Enrofloxacin (MHK ≥ 4 mg/L) resistent, während eines der Isolate (4,8 %) gegen Gentamicin (MHK 8 mg/L) und eines (4,8 %) gegen Enrofloxacin (MHK 1 mg/L) einen intermediären Phänotyp zeigte. Die restlichen Isolate waren gegenüber Gentamicin (n=17; 81 %) und Enrofloxacin (n=19; 90,4 %) sensibel. Das gegen Enrofloxacin resistente *Ap*-Isolat zeigte Mutationen in der *quinolon resistanc-determining region* (QRDR) der DNS-Gyrase (*gyrA*, S81L) und Topoisomerase IV (*parC*, S84L). Des Weiteren zeigten je sechs Isolate (28,6 %) gegen Tetrazyklin (MHK ≥ 16 mg/L) sowie sechs Isolate (28,6 %) gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol (MHK 40 mg/L bis ≥ 320 mg/L) einen resistenten Phänotyp. Ein OXA-58-positives *Aj*-Isolat war Tetrazyklin-resistent (MHK ≥ 16 mg/L) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol-sensibel (MHK ≤ 20 mg/L). Ein weiteres OXA-58-positives *Aj*-Isolat war Trimethoprim/Sulfamethoxazol-resistent (MHK ≥ 80 mg/L) und Tetrazyklin-sensibel (MHK ≤ 4 mg/L). Die restlichen Isolate (n=15; 71,4 %) waren gegenüber beiden Wirkstoffen sensibel. Jedoch ist zu beachten, dass für *Acinetobacter* spp. keine Grenzwerte in der Veterinärmedizin vorliegen und die oben genannte Einteilung, die auf Grenzwerten von Antibiotika der gleichen Klasse oder von *Enterobacteriaceae* basiert, somit keine Aussage über die therapeutische Wirksamkeit der genannten antimikrobiellen Wirkstoffe zulässt.

Bei den humanen Isolaten waren 45 CP-Bildner Imipenem-resistent (MHK 8 mg/L bis > 32 mg/L) während drei Isolate einen intermediären Phänotyp (MHK 6 mg/L), zeigten. Dies lässt sich in der selektiven Auswahl auf CR Isolate erklären.

Tabelle 8. Herkunft und Charakteristika ergänzender Carbenamase-tragender *Acinetobacter* spp.

IHIT-Nr.	Jahr	Isolierung	Spezies	Klinische Herkunft	Tierart	Land	Erworbene Oxacillinase (Lokalisation)	Intrinsische Oxacillinase	Gene für antimikrobielle Resistenz	MHK-Werte für Carbename			
										¹ IMP	² IMP	² DOR	² MER
27359	2014	Ap	Ohr		Hund	DE	OXA-143 (n.t.)	OXA-270	<i>bla_{ADC-25}</i>	>=1	0,25	0,75	0,5
28445	2014	Al	Organe		Meerschweinchen	DE	OXA-23 (P)	OXA-283	<i>strA, strB</i>	>=16	32	8	6
29999	2015	Al	Uterus		Pferd	DE	OXA-23 (P)	-	<i>strA, strB, sul2</i>	>=16	8	8	3
30696	2015	Aj	Wunde		Hund	LU	OXA-58 (P)	OXA-212	-	4	3	1,5	3
32294	2016	Al	Urin		Hund	DE	OXA-23 (P)	OXA-335	<i>strA, strB</i>	>=16	8	6	4
32300	2015	Aj	Urin		Kaninchen	DE	OXA-58 (P)	OXA-373	<i>tet39</i>	2	0,75	0,38	0,38
33472	2017	Aj	Milz		Schaf	DE	OXA-58 (P)	OXA-211	<i>aac(3)-IId, aph(3')-Ia, strA, strB, sul2, tet39</i>	<=0,25	0,75	0,25	0,38
33541	2016	Al	Auge		Katze	FR	OXA-23 (P)	OXA-285	<i>strA, strB, msrE, mphE</i>	>=16	8	8	4
33552	2017	Aj	Lunge		Rind	DE	OXA-58 (P)	OXA-211	<i>aac(3)-IId, aph(3')-Ia, strA, strB, sul2, tet39</i>	<=0,25	0,75	0,38	0,25
33561	2017	Al	Organe		Rind	DE	OXA-58 (P)	OXA-360	<i>aac(3)-IIA, aph(3')-Ic, strA, strB, sul2, tet39, msrE, mphE, floR</i>	<=0,25	0,75	0,38	0,25
33917	2017	Ab	Wunde		Hund	DE	OXA-23 (P)	OXA-69	<i>aac(3)-Ia, aacdA1, bla_{ADC-25}, blaTEM-ID, catA1, sul1, tetA</i>	<=1	0,38	0,125	0,094
34477	2017	Ai	Nase		Rind	DE	OXA-58 (C)	-	<i>strB, strA</i>	<=1	0,125	0,19	0,125
35280	2017	Ap	Wunde		Hund	DE	OXA-58 (P)	OXA-500	<i>aac(3)-IId, aph(3')-Ia, strA, strB, sul2, tet39</i>	<=1	1	0,5	0,38
35582	2017	Ai	Milz		Schaf	DE	OXA-23 (C)	-	<i>aph(3')-Ia, strB, strA, sul2, tetX, tetY</i>	8	2	4	2
36139	2018	Ab	Urin		Rind	DE	OXA-23 (P)	OXA-78	<i>strB, aac(3)-IId, bla_{ADC-25}, strA, sul2, tet39, msrE, mphE, floR</i>	<=1	6	4	4

Tabelle 8. Fortsetzung nächste Seite.

Tabelle 8. Fortsetzung: Herkunft und Charakteristika ergänzender Carbapenemase-tragender *Acinetobacter* spp.

IHIT-Nr.	Jahr Isolierung	Spezies	Klinische Herkunft	Tierart	Land	Erworben Oxacillinase (Lokalisation)	Intrinsische Oxacillinase	Gene für antimikrobielle Resistenz	MHK-Werte für Carbapeneme			
									¹ IMP	² IMP	² DOR ² MER	
36143	2018	<i>As</i>	Urin	Rind	DE	OXA-58 (P)	-	<i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>tet39</i>	≤=1	1	1	0,5
36316	2018	<i>Al</i>	Luftsack	Pferd	DE	OXA-58 (C)	-	<i>aac(6)-Ib3</i> , <i>aac(6)-Ib-cr</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i>	≤=1	0,002	0,19	0,125
36460	2018	<i>As</i>	Organe	Schaf	DE	OXA-58 (P)	-	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet39</i> , <i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>floR</i>	≤=1	0,094	0,5	0,38
37103	2018	<i>Ai</i>	Nase	Kalb	DE	OXA-23 (C)	-	<i>aac(3)-IIa</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aacAI</i> , <i>sul2</i> , <i>tetX</i> , <i>tetY</i> , <i>dfrAI</i> , <i>floR</i>	8	4	0,75	1,5
37305	2018	<i>Al</i>	Lunge	Schwein	DE	OXA-58 (P)	OXA-363	<i>aac(3)-IIc</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tet39</i>	≤=1	0,19	0,125	0,094
37764	2018	<i>Al</i>	Lunge	Hund	DE	OXA-58 (P)	OXA-282	<i>aac(3)-IV</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(4)- Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tetY</i> , <i>msrE</i> , <i>mphE</i> , <i>floR</i>	≤=1	0,25	0,064	0,094
37774	2018	<i>Aj</i>	Niere	Kaninchen	DE	OXA-58 (C)	OXA-281	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i> , <i>tetH</i> , <i>tetY</i> , <i>tet39</i>	n.t.	0,38	0,25	0,38
38006	2018	<i>Ap</i>	Gingiva	Hund	DE	OXA-72 (n.t.)	OXA-564	<i>bla_{4DC-25}</i>	8	1	3	2

Ab: A. baumannii; *Ap: A. pittii*; *Al: A. lwoffii*; *Aj: A. johnsonii*; *Ai: A. indicus*; *As: A. species*; DE: Deutschland; LU: Luxemburg; FR: Frankreich; P: Plasmid; C: Chromosomal; weißer Kasten (MHK-Werte): sensibel; hellgrau: intermediär; dunkelgrau: resistent; n.t.: nicht getestet; -: Untersuchung negativ; abgebildet sind die MHKs [mg/L] der Carbapeneme; ¹Imipenem (IMP); untersucht mit der Karte AST-GN38; ²Imipenem (IMP)/²Doripenem (DOR)/²Meropenem (MER); untersucht mit E-Test. Weitere MHK-Werte sind im Fließtext (Kapitel 5.2.1) erwähnt.

5.2.2. Ganzgenomsequenzierung und phylogenetischer Hintergrund Carbapenem-resistenter *Acinetobacter* spp.

Neben den 48 CP-Gen tragenden tierischen *Ab* und *Ap* aus den drei Publikationen wurden weitere zwei Oxacillinase-positive *Ab* und 21 *Acinetobacter* spp. (Tabelle 8) von Tieren Ganzgenom sequenziert.

Zusätzlich zu den CP-Genen konnten bei den tierischen CR *Ab* (n=2) und non-*Ab*-Isolaten (n=21) Gene, die Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden (u.a. *aac(3)-Ia*, *aadA1*, *strA* [*aph(3'')-Ib*], *strB* [*aph(6)-I*]), Sulfonamiden (*sul1*, *sul2*) oder Tetracyklinen (*tet39*, *tetH*, *tetY*) vermitteln, nachgewiesen werden (Tabelle 8). Die Nachweise der Resistenzgene *tet*, *sul2*, *floR*, sowie *mrsE* und *mphE* korrelierten mit den phänotypischen Resistenzen gegenüber Tetracyclin (MHK >8 mg/L) Trimethoprim/Sulfamethoxazol (MHK ≥38 mg/L), Chloramphenicol (MHK >16 mg/L) bzw. Erythromycin (MHK >4 mg/L). Im Gegensatz dazu vermitteln die Aminoglykosid-Resistenzgene *aac*, *aad* und *aph* sowie deren Varianten allein nicht immer eine Resistenz gegen bestimmte Aminoglykosid-Antibiotika [147, 363]. So zeigten die meisten CP-positiven *A. lwoffii* (*Al*), *A. johnsonii* (*Aj*), *A. indicus* (*Ai*) und *A. species* (*As*)-Isolate trotz der bei ihnen nachgewiesenen und nachfolgend in Klammern genannten Aminoglykosid-Resistenzgene einen sensiblen Phänotyp gegenüber Gentamicin und Tobramycin (*aac(3)-IIa*, *aac(3)-IId*, *aac(3)-IV*) bzw. Amikacin (*aac(6)-Ib3*). Die Gene *aac(3)-IIa* und *aac(3)-IId* begründeten jedoch bei einem *Ap*- (IHIT35280) und einem *Ai*-Isolat (IHIT37103) eine Resistenz gegenüber Gentamicin, während zwei *Aj*-Isolate (IHIT30696 und IHIT37774), die kein Träger der getesteten Aminoglykosid-Resistenzgene waren, ebenfalls eine Resistenz gegenüber Gentamicin aufwiesen (Tabelle 8). Keines der nachgewiesenen und im Folgenden in Klammern genannten Aminoglykosid-Resistenzgene vermittelte eine phänotypische Resistenz gegenüber Tobramycin (*aac(3)-II*, *aac(3)-IV*, *aac(6')-I*) und Amikacin (*aac(6')-I*) (Tabelle 8) [363]. Die Korrelation zwischen dem Genotyp *aph*, *strA/strB* und phänotypischer Resistenz gegenüber den Aminoglykosiden Streptomycin, Kanamycin und Neomycin wurde nicht untersucht.

Die β -Laktamase OXA-23 war bei beiden *Ab*-Isolaten (IHIT33917 und IHIT36139), zwei *Ai*-Isolaten (IHIT35582 und IHIT37103) sowie einem *As*-Isolat (IHIT36139) chromosomal lokalisiert, während *bla*_{OXA-23} bei den restlichen *As*- sowie bei den *Al*-Isolaten plasmidkodiert vorlag (Abbildung 1-4). Mit Ausnahme des *Ab* IHIT33917 befanden sich alle OXA-23-Gene

innerhalb eines Tn2008-Kontextes. Bei den *Ai*-Isolaten waren jeweils das *ISAbal* und somit auch das Transposon Tn2008 von einem *ISAcsp2* und einem hypothetischen Protein unterbrochen. Die genetische Umgebung der plasmidlokalisierten *bla*_{OXA-23}-Gene war identisch (Abbildung 4). Der genetische Kontext der chromosomalen *bla*_{OXA-23}-Gene unterschied sich zwischen den *Ai*- und den *Ab*-Isolaten (Abbildung 1-3). *Ab* IHIT33917 war trotz des Vorhandenseins von OXA-23 Imipenem (IMP)-sensibel. Dies ließ sich mit dem Fehlen des *ISAbal* und der damit fehlenden gesteigerten Expression der CP begründen. Jedoch zeigt das zweite *Ab*-Isolat IHIT36139 trotz eines vollständigen *ISAbal* nur einen intermediären Phänotyp gegenüber IMP. Bei den Isolaten IHIT35582 und IHIT37103, die trotz chromosomal kodiertem CP-Gen keine IMP-Resistenz zeigten, waren *ISAbal* und Tn2008 unterbrochen (Abbildung 3). Bei IMP-resistenten Isolaten dagegen lagen Tn2008 inklusive *ISAbal* auf dem jeweiligen Plasmid vollständig vor (Abbildung 4).

Bei drei Isolaten (*Ai* IHIT34477, *Aj* IHIT37774 und *Al* IHIT36316) wurde OXA-58 auf dem Chromosom, bei den restlichen zehn *Acinetobacter* spp.-Isolaten auf dem Plasmid lokalisiert nachgewiesen (Abbildung 5-14). Innerhalb der 13 *bla*_{OXA-58}-positiven Isolate lagen zehn unterschiedliche genetische Kontexte vor. Bei sieben Isolaten (Abbildung 8-11) waren *upstream* des CP-Gens *ISAbal* das Gen *araC*, welches ein Regulationsprotein der Transkription kodiert sowie das für einen Lysin-Transporter kodierende Gen *lysE* lokalisiert, welches bei einem Isolat verkürzt war (Abbildung 7). Das *Aj*-Isolat IHIT37774 wies ein verkürztes *araC*-Gen auf, während es bei dem *Ap*-Isolat IHIT35280 von einer IS5-Familie-Transpoase und einem hypothetischen Protein unterbrochen war (Abbildung 5 und 12). Bei drei *Acinetobacter* spp.-Isolaten (Abbildung 6, 13 und 14) konnte *upstream* von *ISAbal* kein *araC1*-Gen nachgewiesen werden. Zwei der drei *araC1*-negativen Isolate wiesen ein unvollständiges IS-Element *ISAbal* *upstream* der β -Laktamase auf (Abbildung 6 und 13). IHIT32300 zeigte als einziges OXA-58-positives Isolate einen resistenten und IHIT30696 einen intermediären Phänotyp gegenüber IMP auf, während die restlichen Stämme, unabhängig des genetischen Kontextes des *bla*_{OXA-58}-Gens, IMP-sensibel waren. Bei dem *Aj*-Isolat IHIT30696 konnte ein 11.388 bp großes Plasmid nachgewiesen werden, welches ebenfalls bei zehn *Ab*-Isolaten aus der 1. Publikation gefunden wurde. Des Weiteren trug das *Ap*-Isolat IHIT35280 das gleiche Plasmid, das die fünf *Ap*-Isolate aus der 3. Publikation trugen. Bei IHIT33472 und IHIT33552 konnte ein 60.058 bp sowie bei IHIT33561 und IHIT36460 ein 17.318 bp großes Plasmid nachgewiesen werden. Die restlichen Isolate (n=6) trugen unterschiedliche Plasmide, welche zwischen 45.935 bp und 63.410 bp groß waren.

Weder die β -Laktamase OXA-72 noch OXA-143 wiesen ein Insertionselement in ihrer direkten genetischen Umgebung auf. Beide Isolate zeigten einen sensiblen Phänotyp gegenüber IMP im E-Test.

Im Folgenden sind die Abbildungen zu den genetischen Kontexten der im vorherigen Text beschriebenen CP-Gen tragenden ($n=21$) *Acinetobacter* spp. dargestellt. In jeder Abbildung (Abbildung 1-16) stellen weiße Pfeile hypothetische Proteine dar, ein Delta (Δ) vor einem Gen bedeutet, dass die entsprechende Gensequenz unterbrochen ist. Im Anschluss an die Abbildungen findet sich eine Übersicht über alle in der CP-Gen Region gefunden IS-Elemente sowie Gene samt ihrer Funktion (Tabelle 9).

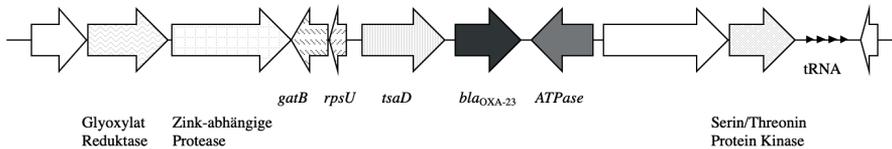


Abbildung 1. Genetische Umgebung (10.497 bp) des chromosomal kodierten bla_{OXA-23} -Gens des *Ab*-Isolats IHIT33917 (Hund, Wunde, 2017).

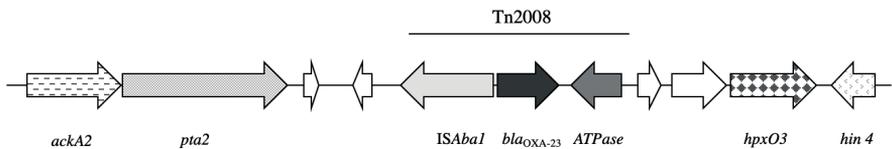


Abbildung 2. Genetische Umgebung (10.803 bp) des chromosomal kodierten bla_{OXA-23} -Gens des *Ab*-Isolats IHIT36139 (Rind, Harn, 2018).

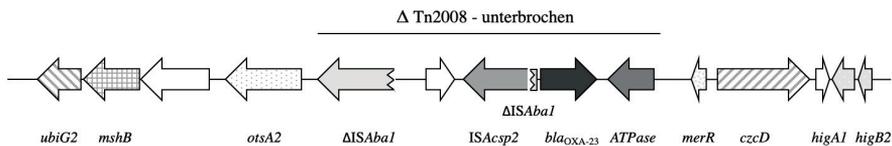


Abbildung 3. Genetische Umgebung (11.332 bp) des chromosomal kodierten bla_{OXA-23} -Gens der *Ai*-Isolate IHIT35582 (Schaf, Milz, 2017) und IHIT37103 (Kalb, Nase, 2018).

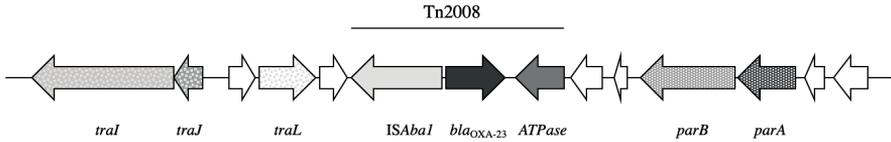


Abbildung 4. Genetische Umgebung (10.897 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla_{OXA-23}*-Gens der *Al*-Isolate IHIT28445 (Meerschweinchen, Organe, 2014), IHIT29999 (Pferd, Uterus, 2015), IHIT32294 (Hund, Urin, 2016) und IHIT33541 (Katze, Auge, 2016).

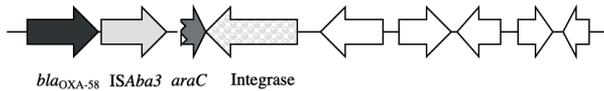


Abbildung 5. Genetische Umgebung (6.578 bp) des chromosomal kodierten *bla_{OXA-58}*-Gens des *Aj*-Isolats IHIT37774 (Kaninchen, Niere, 2018).

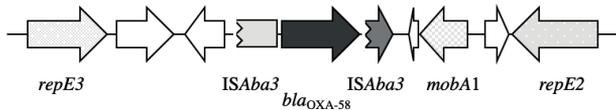


Abbildung 6. Genetische Umgebung (6.525 bp) des chromosomal kodierten *bla_{OXA-58}*-Gens des *Al*-Isolats IHIT36316 (Luftsack, Pferd, 2018).

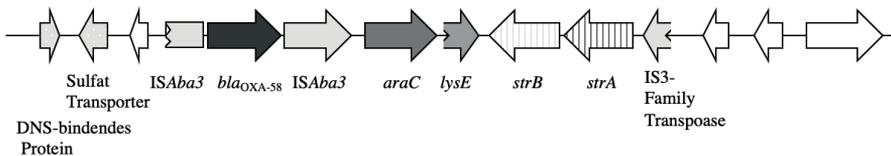


Abbildung 7. Genetische Umgebung (10.281 bp) des chromosomal kodierten *bla_{OXA-58}*-Gens des *Ai*-Isolats IHIT34477 (Rind, Nase, 2017).

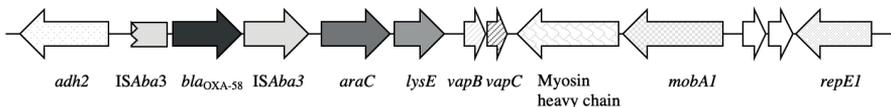


Abbildung 8. Genetische Umgebung (10.348 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla_{OXA-58}*-Gens des *Aj*-Isolats IHIT30696 (Hund, Wunde, 2015).

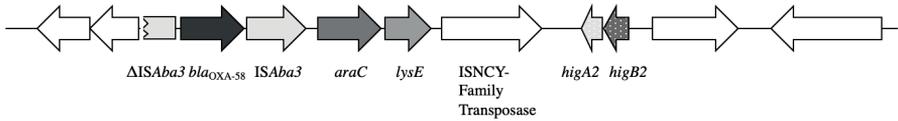


Abbildung 9. Genetische Umgebung (11.034 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-58}-Gens des *Aj*-Isolats IHIT32300 (Kaninchen, Urin, 2015).

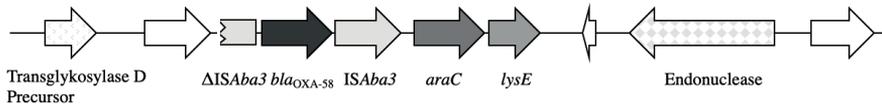


Abbildung 10. Genetische Umgebung (10.186 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-58}-Gens des *Al*-Isolats IHIT33561 (Rind, Organe, 2017) und des *As*-Isolats IHIT36460 (Schaf, Organe, 2018).

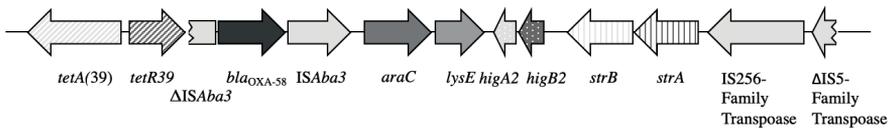


Abbildung 11. Genetische Umgebung (8.837 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-58}-Gens der *Aj*-Isolate IHIT33472 (Schaf, Milz, 2017) und IHIT33552 (Rind, Lunge, 2017) sowie des *Al*-Isolats IHIT37305 (Schwein, Lunge, 2018).

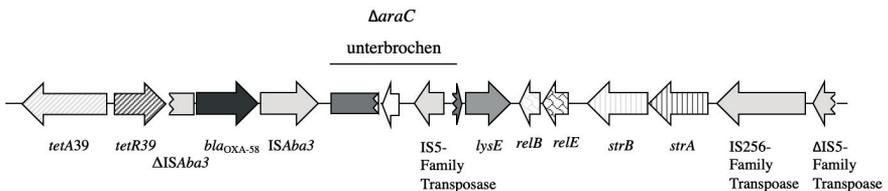


Abbildung 12. Genetische Umgebung (10.768 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-58}-Gens des *Ap*-Isolats IHIT35280.

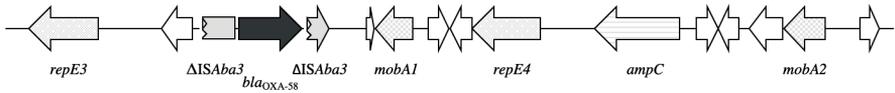


Abbildung 13. Genetische Umgebung (10.769 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-58}-Gens des *As*-Isolats IHIT36143 (Rind, Harn, 2018).

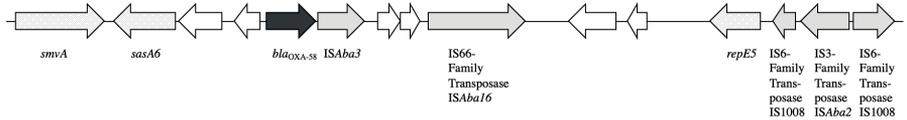


Abbildung 14. Genetische Umgebung (14.785 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-58}-Gens des *Al*-Isolats IHIT37764 (Hund, Lunge, 2018).

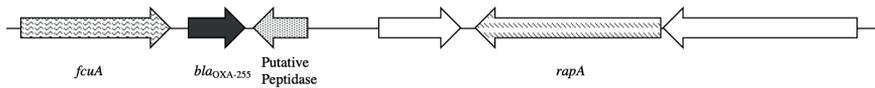


Abbildung 15. Genetische Umgebung (11.859 bp) des chromosomal kodierten *bla*_{OXA-143}-Gens des *Ap*-Isolats IHIT27359 (Hund, Ohr 2014).

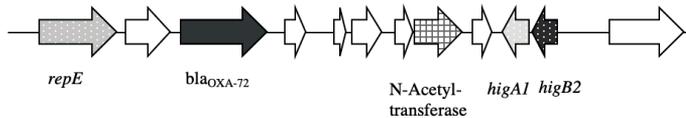


Abbildung 16. Genetische Umgebung (7.897 bp) des Plasmid-lokaliserten *bla*_{OXA-72}-Gens des *Ap*-Isolats IHIT38006 (Hund, Gingiva, 2018).

Tabelle 9. Überblick über IS-Elemente und Gene innerhalb der CP-Region der *Acinetobacter* spp.-Isolate von Tieren.

Gen-Name/ IS-Element	Funktion
<i>ackA2</i>	Gen für eine Acetat-Kinase
<i>adh2</i>	Gen für eine Alkoholdehydrogenase
<i>ampC</i>	Gen für β -Laktamase für Cephalosporin-Resistenz
<i>araC</i>	Gen für ein Transkriptionsregulationsprotein
<i>czeD</i>	Gen für ein Metallkationen-Efflux-Systemprotein
<i>esiB3</i>	Sekretorisches Immunglobulin A-bindendes Protein
<i>fcuA</i>	Gen für ein Ferrichromrezeptor
<i>folP2</i>	Gen für eine Dihydropteroatsynthase
<i>gatB</i>	Gen für eine Transamidase
<i>glmM2</i>	Gen für eine Phosphoglucoaminmutase
HAGH ²	Gen für eine Hydroxyacylglythathionhydrolase
<i>higA1</i>	Gen für ein Antitoxin
<i>higA2</i>	Gen für ein putatives Antitoxin
<i>higB2</i>	Gen für ein putatives Toxin
<i>hin4</i>	Gen für eine DNS-Invertase
<i>hpxO3</i>	Gen für eine FAD-abhängige Urathydroxylase
IS256	Insertionselement 256
IS3	Insertionselement 3
IS5	Insertionselement 5
IS6	Insertionselement 6
IS66	Insertionselement 66
IS <i>Aba</i> 1	Insertionselemente <i>Acinetobacter baumannii</i> 1
IS <i>Aba</i> 34	Insertionselement <i>Acinetobacter baumannii</i> 34
IS <i>Acsp</i> 2	Insertionselemente <i>Acinetobacter species</i> 2
<i>lysE</i>	Gen für ein Lysin Transporter
<i>merR</i>	Gen für ein Regulatorisches Protein des Quecksilberresistenzoperons
<i>mobA1-2</i>	Gen für ein Mobilisierungsprotein
<i>mshB</i>	Gen für eine Deacetylase
<i>otsA2</i>	Gen für eine Trehalose-Phosphat-Synthase
<i>parA</i> und <i>parB</i>	Gene für Proteine der Plasmidpartitionierung
<i>pta2</i>	Gen für eine Phosphotransacetylase
<i>purD</i>	Gen für eine Phosphoribosylaminyclinligase
<i>rapA</i>	Gen für ein RNS-Polymerase-assoziiertes Protein
<i>relB</i>	Gen für einen Transkriptionsfaktor

Tabelle 9. Fortsetzung nächste Seite.

Tabelle 9. Fortsetzung: Überblick über IS-Elemente und Gene innerhalb der CP-Region der *Acinetobacter* spp.-Isolate von Tieren.

Gen-Name/ IS-Element	Funktion
<i>relE</i>	Gen für ein mRNS Interferasetoxin
<i>repE1-5</i>	Gene für Replikationsinitiationsproteine
<i>rpsU</i>	Gen für ein ribosomales Protein;
<i>sasA6</i>	Gen für eine Kinase
<i>smvA</i>	Gen für eine Effluxpumpe
<i>strA</i> und <i>strB</i>	Gene für Aminoglykosid Resistenzproteine
<i>tetA39</i> und <i>tetR39</i>	Gene für Tetracyclin Resistenzproteine
<i>traI</i>	Gen für ein multifunktionales Konjugationsprotein
<i>traJ</i>	Gen für ein Protein zur Assemblierung des konjugalen Transferpilus
<i>trbB</i> und <i>trbC</i>	Gene für Konjugationsproteine
<i>tsaD</i>	Gen für eine tRNS N6-adenosine Threonylcarbamoyltransferase
<i>ubiG2</i>	Gen für eine O-Methyltransferase
<i>vapB</i> und <i>vapC</i>	Gene für Vesikel-assoziierte Membranprotein-assoziierte Proteine
<i>virD4</i>	Gen für ein Typ-IV Sekretionssystemprotein

5.2.3. Analyse Virulenz-assoziiierter Gene Carbapenem-resistenter *Acinetobacter* spp.

Die Genome der 48 *Ab*-Isolate aus den in dieser Arbeit gezeigten drei Publikationen sowie die 23 zusätzlich nachgewiesenen OXA-positiven *Acinetobacter* spp.-Isolate wurden auf VAGs untersucht (Tabelle 10-12). Zusätzlich wurden die VAGs der *Ab*-Isolate IHIT7853, IHIT17886, IHIT17966 [120, 121] und IHIT32296 [218] sowie der humanen Isolate aus früheren Publikationen zu Vergleichszwecken analysiert.

Alle 48 untersuchten OXA-positiven *Ab*-Isolate waren Träger der VAGs *bauA*, *pld123*, *plc12*, *sod2343*, *arpAB*, *lipA1* sowie *znuABC* die, wie in früheren Publikationen beschrieben, im Zusammenhang mit der Biofilmbildung, Zytotoxizität und der Zinkaufnahme die Virulenz von *Ab* maßgeblich beeinflussen (Tabelle 10-12). Mit wenigen Ausnahmen waren alle Stämme des gleichen STs auch Träger der gleichen VAGs. So wiesen alle ST25^{Past}-*Ab*-Isolate von Tieren das gleiche VAG-Profil wie der humane ST25^{Past}-NDM-1-positive Stamm 161/07 auf (Tabelle 11). Ausschließlich *Ab*-Isolate des ST1^{Past} waren Träger eines Kapselproteins (*epsA*), das an der Immunevasion beteiligt ist. *Blp1*, ein Gen der Biofilmbildung, konnte bei 50 % der *Ab*-Isolate des ST1^{Past} nachgewiesen werden, während keine *Ab*-Isolate anderer STs Träger dieses

Gens waren (Tabelle 13). Das äußere Membranprotein 33 (*omp33*) konnte außer bei ST1^{Past}-*Ab* bei allen *Ab*-Isolaten weiterer STs^{Past} nachgewiesen werden. Das weitere getestete äußere Membranprotein OmpA konnte bei allen STs, außer bei *Ab*-Isolaten des ST25^{Past} und ST294^{Past} nachgewiesen werden. Das Gen *cpaA*, welches eine Metalloprotease kodiert, konnte hingegen nur bei *Ab*-Isolaten des ST10^{Past}, ST25^{Past} und ST294^{Past} gefunden werden. Das Operon *csuABCDE*, dessen Produkte ebenfalls an der Biofilmbildung beteiligt sind, konnte bei nahezu allen *Ab*-Isolaten, mit Ausnahme von Isolaten des ST10^{Past}, nachgewiesen werden. Die ebenfalls an der Biofilmbildung beteiligten Gene *blp1* und *blp2* konnten bei 15 ST1^{Past}-*Ab* bzw. 44 *Ab*-Isolaten nachgewiesen werden. Kein tierisches *Ab*-Isolat des ST10^{Past} und ST37^{Past} war Träger des *blp2* Gens. Das Gen *bap*, welches ebenfalls an der Biofilmbildung bei *Ab* beteiligt ist, konnte bei keinem der tierischen CR Isolate nachgewiesen werden. Die für Protein-Efflux-Pumpen kodierenden Gene *adeRS* und *adeAB* konnten bei 45 bzw. 46 der Isolate nachgewiesen werden. Während das getestete ST37^{Past}-Isolat keines der Gene trug, konnte *abeAB* nur bei einem *Ab*-Isolat des ST10^{Past} nachgewiesen werden (Tabelle 13). Die VAGs *ataA*, *ptk* und *pilA*, welche an der Immunevasion sowie der Motilität von *Acinetobacter* spp. beteiligt sind, konnten bei keinem tierischen CR Isolat nachgewiesen werden. Bei keinem der Stämme konnten auf dem Plasmid, welches das Gen der β -Laktamase trug, eines der getesteten VAGs nachgewiesen werden.

Die fünf *Ap*-Stämme der 3. Publikation sowie drei weitere *Ap*-Isolate wiesen die VAGs *plc2*, *sod2343*, *omp33*, *cpaA* und *lipA1* auf, welche u.a. in Zusammenhang mit der Zytotoxizität, Immunevasion bzw. der Abwehr von oxidativem Stress eine bedeutende Rolle spielen. Die Gene *surA1* und *ompA* konnten bei sieben der acht *Ap*-Isolate (87,5 %) nachgewiesen werden, während sechs Isolate *csuC* (75 %), fünf *csuD* (62,5 %) und zwei *bauA* (25 %) trugen (Tabelle 12). Keines der getesteten VAGs konnte auf dem Plasmid, welches *bla_{OXA-58}* trug, nachgewiesen werden.

Keines der *Al*-, *Aj*- oder *Ai*-Isolate wies eines der getesteten VAGs auf.

Ergänzungen und unveröffentlichte Daten

Tabelle 11. Vorkommen von 32 Virulenz-assoziierten Genen bei OXA-positiven non-ST1^{Past} *Ab*-Isolaten.

VAG	Funktion	Referenzstamm	ST ^{Past}	161/07	ST25 [*]													
		Herkunft	H			ST25	ST10	ST10	ST10	ST602	ST602	ST602	ST294	ST37	ST578	ST437	ST52	ST2
<i>adeAB</i>	Efflux-System	ATCC 17978																
<i>adeRS</i>	Zwei-Komponentensystem	ATCC 17978																
<i>arpA</i>	Phasenvariation	ATCC 17978																
<i>arpB</i>	Phasenvariation	ATCC 17978																
<i>ata</i>	Adhäsion	ATCC 17978																
<i>bauA</i>	Eisenaufnahme	ATCC 17978																
<i>blp1</i>	Biofilmbildung	AYE																
<i>blp2</i>	Biofilmbildung	AYE																
<i>comEC</i>	DNS-Aufnahme	ATCC 17978																
<i>cpaA</i>	Immunevasion	AB031																
<i>csuA</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978																
<i>csuB</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978																
<i>csuC</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978																
<i>csuD</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978																
<i>csuE</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978																
<i>epsA</i>	Immunevasion	AB307-0294																
<i>lipA1</i>	Lipidhydrolyse	AB5075-UW																
<i>ompA</i>	Adhäsion, Zytotoxizität	ATCC 17978																

Tabelle 11. Fortsetzung nächste Seite.

Tabelle 12. Vorkommen von 32 Virulenz-assoziierten Genen bei OXA-positiven *Ap*-Isolaten.

VAG	Funktion	Referenzstamm	Kleintiere							H
			*IHIT24944	IHIT27359	*IHIT29469	*IHIT29592	*IHIT32473	IHIT35280	IHIT38006	*IHIT32685
<i>adeAB</i>	Efflux-System	ATCC 17978								
<i>adeRS</i>	Zwei-Komponentensystem	ATCC 17978								
<i>arpA</i>	Phasenvariation	ATCC 17978								
<i>arpB</i>	Phasenvariation	ATCC 17978								
<i>ata</i>	Adhäsion	ATCC 17978								
<i>bauA</i>	Eisenaufnahme	ATCC 17978		■					■	
<i>blp1</i>	Biofilmbildung	AYE								
<i>blp2</i>	Biofilmbildung	AYE								
<i>comEC</i>	DNS-Aufnahme	ATCC 17978								
<i>cpaA</i>	Immunevasion	AB031	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>csuA</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978								
<i>csuB</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978								
<i>csuC</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978	■		■	■	■	■	■	■
<i>csuD</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978	■		■	■	■	■	■	■
<i>csuE</i>	Biofilmbildung	ATCC 17978				■	■	■	■	■
<i>epsA</i>	Immunevasion	AB307-0294								
<i>lipA1</i>	Lipidhydrolyse	AB5075-UW	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>ompA</i>	Adhäsion, Zytotoxizität	ATCC 17978	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>omp33</i>	Adhäsion, Zytotoxizität	ATCC 17978	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>pilA</i>	Adhäsion, Motilität	ATCC 19606								
<i>plc1</i>	Zytotoxizität	ATCC 17978								
<i>plc2</i>	Zytotoxizität	ATCC 17978	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>pld1</i>	Zytotoxizität	ATCC 19606								
<i>pld2</i>	Zytotoxizität	ATCC 17978								
<i>pld3</i>	Zytotoxizität	ATCC 17978								
<i>ptk</i>	Immunevasion	AB5075-UW								
<i>sod2343</i>	Schutz oxidativer Stress	ATCC 17978	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>surA1</i>	unbekannt	ATCC 17978	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>issM</i>	Interspezies-Kompetenz	ATCC 17978								
<i>znuA</i>	Zinkaufnahme	AB5075-UW								
<i>znuB</i>	Zinkaufnahme	AB5075-UW								
<i>znuC</i>	Zinkaufnahme	AB5075-UW								

* *Ap*-Isolate aus 3. Publikation [217]; *Ap*: *A. pittii*; H: Human; Accession-Nummern: ATCC 17978: CP012004.1; ATCC 19606: ACQB01000015.1 und GG704576.1; AB307-0294: CP001172.2 und EU117203.1; AB031: CP009256.1 und KJ461713.1; AYE: CU459141.1; AB5075-UW: NZ_CP008706.1; grau: Gen vorhanden (Nukleinsäure-Sequenzähnlichkeit zur Referenz ≥ 90 %; Längenübereinstimmung ≥ 60 %); weiß: Gen nicht vorhanden.

Tabelle 13. Prozentuales Vorkommen der 32 untersuchten VAGs bei CR *Ab* nach Sequenztyp (Pasteur-Schema).

VAG	ST1 (n=30)	ST25 (n=9)	ST10 (n=3)	ST602 (n=3)
<i>adeAB</i>	100	100	33,3	100
<i>adeRS</i>	100	100	0	100
<i>arpA</i>	100	100	100	100
<i>arpB</i>	100	100	100	100
<i>ata</i>	0	0	0	0
<i>bauA</i>	100	100	100	100
<i>blp1</i>	50	0	0	0
<i>blp2</i>	100	100	0	100
<i>comEC</i>	96,7	100	100	100
<i>cpaA</i>	0	100	100	0
<i>csuA</i>	96,7	100	0	100
<i>csuB</i>	96,7	100	0	100
<i>csuC</i>	100	100	0	100
<i>csuD</i>	100	100	0	66,7
<i>csuE</i>	100	100	0	100
<i>epsA</i>	100	0	0	0
<i>lipA1</i>	100	100	100	100
<i>ompA</i>	100	0	100	100
<i>omp33</i>	0	100	100	100
<i>pilA</i>	0	0	0	0
<i>plc1</i>	100	100	100	100
<i>plc2</i>	100	100	100	100
<i>pld1</i>	100	100	100	100
<i>pld2</i>	100	100	100	100
<i>pld3</i>	100	100	100	100
<i>ptk</i>	0	0	0	0
<i>sod2343</i>	100	100	100	100
<i>surA1</i>	100	100	100	100
<i>tssM</i>	100	100	100	100
<i>znuA</i>	100	100	100	100
<i>znuB</i>	100	100	100	100
<i>znuC</i>	100	100	100	100

5.2.4. Generierung Resistenzplasmid-freier Varianten und Transformanten, sowie Auswahl von Triplets für funktionelle Assays

Für die Generierung plasmidfreier Varianten wurden 30 CR *Ab*-Isolate von Tieren sowie drei humane CR *Ab*-Isolate ausgewählt. Dabei wurden das CP-Gen, eine gleichmäßige Verteilung von STs, Tierart sowie die geographische und klinische Herkunft berücksichtigt. Tatsächlich konnten von 29 Isolaten von Tieren und von zwei humanen Isolaten die Resistenzplasmide gecurt werden. Bei zwei Isolaten gelang dies auch nach 100 Passagen nicht.

Des Weiteren wurden im Rahmen von Transformationsversuchen 20 CR *Ab*-Isolate von Hunden sowie elf CR *Ab*-Isolate von Katzen weitergehend untersucht. Hier galten dieselben Auswahlkriterien wie bereits oben genannt. Insgesamt konnten von 22 *Ab*-Isolaten das jeweilige Resistenzplasmid auf den Referenzstamm ATCC 17978 transformiert werden. Bei neun Isolaten konnte auch nach drei Versuchen keine Transformante generiert werden.

Für die funktionellen Assays (Kapitel 5.1.4, 5.1.5 und 5.1.7) sollten nach den oben genannten Kriterien acht Triplets zur Verfügung stehen (Tabelle 14). Neben den so generierten Triplets wurde im Biofilm-Assay und im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell ein humanes OXA-72-*Ab*-Isolat (IHIT34203) sowie ein humanes NDM-1-*Ab*-Isolat, die humanen *Ab*-Referenzstämme ATCC 17978 und ATCC 19606 sowie das tierische NDM-1 tragende *Ab*-Isolat IHIT38008 (2. Publikation [192]) zu Vergleichszwecken in die Untersuchungen mit aufgenommen.

Tabelle 14. Übersicht zur Auswahl der *Ab*-Isolate und Stamm-Triplets für funktionelle Assays.

Stamm-Nr.	Trip- lett	ST ^{Past}	IC	Klinische Herkunft	Tierart	Land	Erworbene Oxacillinase (Lokalisation)	IMP-MHK, Resistenz	Funktioneller Assay
IHIT7853*	ja	ST1	IC1	Urin spontan	Katze	DE	OXA-23 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT29027**	ja	ST10	IC8	Urin Zystozent.	Hund	IT	OXA-23 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT29997**	ja	ST578	n.t.	BAL	Hund	FR	OXA-58 (P)	8 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT31820**	ja	ST1	IC1	ZVK	Hund	DE	OXA-58 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT32292**	ja	ST25	IC7	Absstrich Pfote	Hund	DE	OXA-23 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT32295**	ja	ST1	IC1	Urin spontan	Hund	DE	OXA-58 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT32297**	ja	ST25	IC7	Trachea	Hund	DE	OXA-23 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT34486**	ja	ST25	IC7	Absstrich Wunde	Katze	IT	OXA-23 (P)	>=16 R	Fitness, Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT34203	nein	ST2	IC2	unbekannt	Mensch	DE	OXA-72 (n.t.)	8 R	Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
IHIT38008***	nein	ST25	IC7	Urin	Hund	IT	NDM-1 (C)	8 R	Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
161/07	nein	ST25	IC7	Infektion	Mensch	DE	NDM-1 (C)	>=16 R	Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
ATCC 17978	nein	ST437	n.t.	Meningitis	Mensch	FR	keine	<=1 S	Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion
ATCC 19606	nein	ST52	n.t.	Urin	Mensch	NL	keine	<=1 S	Biofilm, <i>Gall. mell.</i> -Infektion

* *Ab* aus früherer Publikation [120]; ** *Ab* aus 1. Publikation [191]; *** *Ab* aus 2. Publikation [192]; *Ab*: *A. baumannii*; ST: Sequenztyp; Past: Pasteur; IC: Internationaler Klon; IMP: Imipenem; MHK: minimale Hemmstoffkonzentration; n.t.: nicht getestet; BAL: Bronchoalveoläre Lavage; ZVK: zentraler Venenkatheter; Zystozent.: Zystozentese; DE: Deutschland; IT: Italien; FR; Frankreich; P: Plasmid; C: Chromosomal; -: Untersuchung negativ; R: Resistent; S: Sensibel.; *Gall. mell.*: *Galleria mellonella*.

5.2.5. *In vitro*-Fitness Assay

Zur Untersuchung der *in vitro*-Fitness von CR und CS *Ab* wurden Stamm-Triplets (Wildtyp, WT; Transformante, TF, Plasmid-freier Wildtyp, WT-Cure) der in Tabelle 14 aufgeführten *Ab*-Isolate tierischen Ursprungs vergleichend untersucht. Als Referenz diente der *Ab*-Stamm ATCC 17978. Bei sechs der acht getesteten Stamm-Triplets wiesen der WT-Cure sowie der Referenzstamm ATCC 17978 einen höheren *in vitro*-Fitness Index (Werte zwischen 0 und 0,46) im kompetitiven Wachstum, als der WT der jeweiligen Stammkombination auf. Während bei zwei Stämmen, IHIT29027 und IHIT34486, der WT eine höhere *in vitro*-Fitness (0,66 bzw. 0,63) im Vergleich zu dem Referenzstamm ATCC 17978 aufwies. Bei drei der Stammkombinationen (IHIT29997, IHIT31820 und IHIT32295) konnte kein Wachstum der Stämme, die Träger von CP-Genen auf Plasmiden waren (WT bzw. TF) auf dem antibiotikahaltigen Nährmedium (Mueller-Hinton + 8 µl/ml Meropenem) nachgewiesen werden. Diese wurden nahezu vollständig durch die sensiblen Varianten (WT-Cure bzw. Referenzstamm) verdrängt. Bei den restlichen drei Triplets (IHIT7853, IHIT32292 und IHIT32297) zeigten die CR Varianten (WT bzw. TF) zwar ein Wachstum auf dem Meropenemhaltigen Agar, jedoch wiesen sie im Verhältnis zu den sensiblen Varianten einen geringeren *in vitro*-Fitness Index auf.

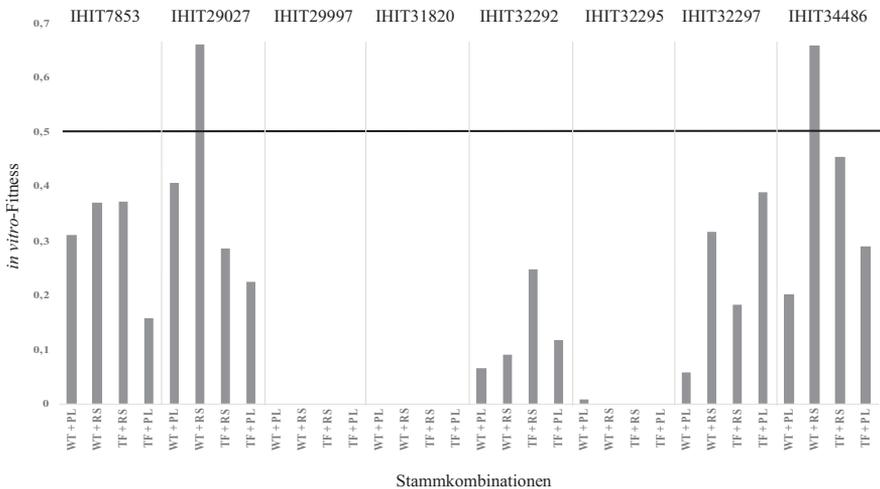


Abbildung 17. *In vitro*-Fitness Assay ausgewählter *Ab*-Triplets.

WT: Wildtyp; PL: Resistenzplasmid-freie Variante des Wildtyps; TF: Transformante (Referenzstamm ATCC 17978 + Resistenz-Plasmid des entsprechenden Isolats); RS: Referenzstamm ATCC 17978.

5.2.6. Biofilm-Assay

Zur Bestimmung der Biofilmbildung wurden acht *Ab* Stamm-Triplets (Träger von OXA-23 und OXA-58, 1. Publikation), ein NDM-1-positives *Ab*-Isolat (2. Publikation), zwei humane *Ab*-Isolate (OXA-72 und NDM-1) sowie die CP-negativen *Ab*-Referenzstämme ATCC 17978 und ATCC 19606 untersucht (Tabelle 14). Die Biofilmbildung der einzelnen Stamm-Triplett-Varianten im Vergleich erwies sich als Isolat-abhängig. Allen Varianten gemein war eine stärkere Biofilmbildung im Mangelmedium M63, während weder die Inkubationstemperatur (28 °C vs. 37 °C) noch die Inkubationsdauer (24 h vs. 48 h) einen Einfluss auf die Biofilmbildung hatten (Abbildung 18). Bei der Mehrzahl der Isolate zeigte der WT-Cure eine stärkere Biofilmbildung als der WT und die TF. Es wurde keines der Biofilm-assoziierten Gene auf den Resistenzplasmiden nachgewiesen (Tabelle 15).

Bei der vergleichenden Betrachtung aller *Ab*-Varianten zeigten die WT-Cure-Varianten bei fast allen Bedingungen der Inkubation eine signifikant höhere Biofilmbildung als die TFs ($p \leq 0,000$ bis $\leq 0,001$). Ebenfalls zeigten die WTs bei 28 °C im M63-Medium eine signifikant höhere Biofilmbildung ($p \leq 0,000$) als die TFs (Abbildung 18).

Der statistische Vergleich der Biofilmbildung der eingesetzten WTs miteinander zeigte, dass einzelne Stämme abhängig von Inkubationstemperatur, -dauer sowie dem Medium eine signifikant höhere Biofilmbildung zeigten als andere WTs (Abbildung 21-29). Hier ließen sich jedoch keine Regelmäßigkeiten hinsichtlich der Auswahlkriterien, wie Tierart, ST oder CP-Typ ziehen, was für einen stammspezifischen Effekt spricht. Es zeigte sich zudem, dass nach 24 h Inkubation im M63-Medium sowohl bei 28 °C ($p \leq 0,000$) als auch bei 37 °C ($p \leq 0,001$) die *Ab*-Isolate von Tieren signifikant mehr Biofilm bildeten als humane Isolate. Das gleiche Phänomen zeigte sich nach 24 h bei 28 °C ($p \leq 0,019$) im LB-Medium (Abbildung 19). Die Analyse der spezifischen Biofilmbildung der WTs, gruppiert nach Sequenztyp, ergab eine zum Teil hoch signifikant stärkere Biofilmbildung der Isolate des ST1^{Past}, ST25^{Past} und ST52^{Past} ($p \leq 0,000$ bis $\leq 0,046$) im Vergleich zu Isolaten des ST2^{Past}, ST10^{Past}, ST437^{Past} und ST578^{Past}. Dies ließ sich sowohl im M63- als auch im LB-Medium bei 28 °C bzw. 37 °C sowie 24 h bzw. 48 h Inkubationsdauer beobachten (Abbildung 20).

Bei der vergleichenden Biofilmuntersuchung des NDM-1-positiven Isolats IHIT38008 mit dem humanen NDM-1-Isolat 161/07 zeigte sich ein ähnliches Ergebnis wie bei den OXA-positiven

Ab-Isolaten von Tieren. Die Biofilmbildung war im Mangelmedium M63 stärker, während weder Inkubationsdauer noch -temperatur einen Einfluss auf die Biofilmbildung hatten. Insgesamt zeigte das NDM-1-Isolat von dem Hund eine signifikant höhere Biofilmbildung als das vergleichende humane NDM-1-Isolat ($p \leq 0,01$ bis $\leq 0,046$) (Abbildung 30).

Tabelle 15. Vorkommen von Biofilm-assoziierten Genen und ihre Lokalisation bei CR *Ab*, die im Biofilm-Assay getestet wurden.

VAG	<i>csuA</i>	<i>csuB</i>	<i>csuC</i>	<i>csuD</i>	<i>csuE</i>	<i>blp1</i>	<i>blp2</i>	Lokalisation
Produkt	Csu Pilus A- Untereinheit	Csu Pilus B- Untereinheit	Csu Pilus C- Untereinheit	Csu Pilus D- Untereinheit	Csu Pilus E- Untereinheit	Bap- ähnliches Protein	Bap- ähnliches Protein	Lokalisation
Referenzstamm	ATCC 17978	AYE	AYE					
7853*	C	C	C	C	C	C		C
29027**								
29997**								
31820**								C
32292**								C
32295**								C
32297**								C
34486**								C
34203								C
38008***								C
161/07								C
ATCC 17978								C
ATCC 19606								C

* *Ab* aus früherer Publikation [120]; ** *Ab* aus 1. Publikation [191]; *** *Ab* aus 2. Publikation [192]; *Ab: A. baumannii*; VAG: Virulenz-assoziiertes Gen; Accession-Nummern: ATCC 17978: CP012004.1; ATCC 19606: ACQB01000015.1 und GG704576.1; C: Chromosomal; grau: Gen vorhanden (Nukleinsäure-Sequenzähnlichkeit zur Referenz $\geq 90\%$; Längenübereinstimmung $\geq 60\%$); weiß: Gen nicht vorhanden.

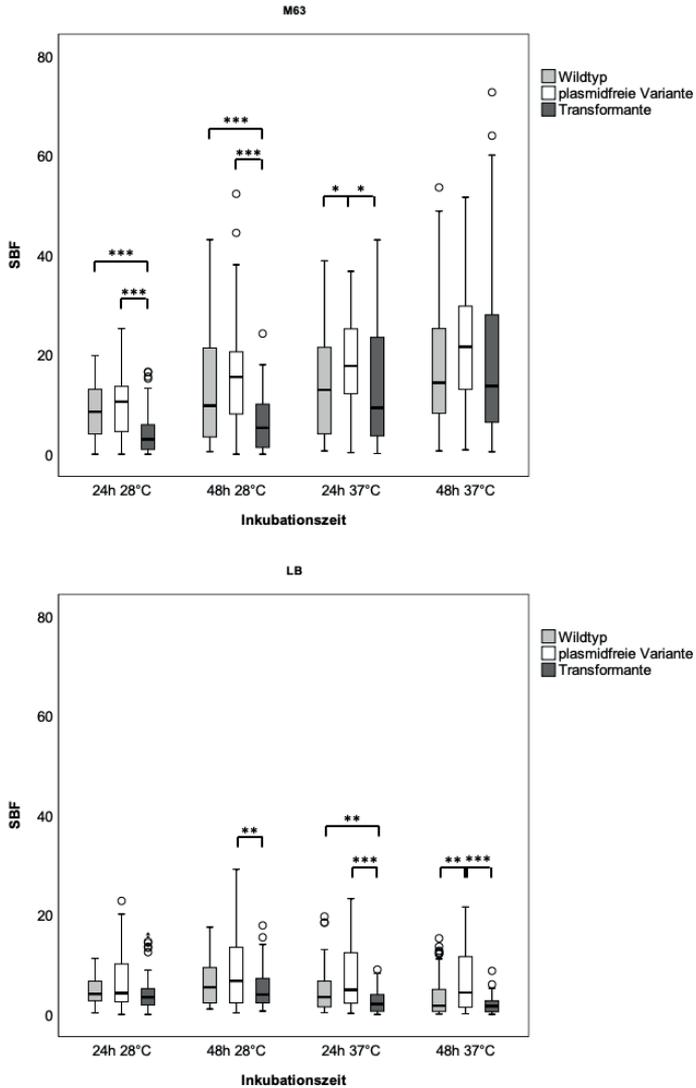


Abbildung 18. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung der Tripletts von acht *Ab*-Isolaten von Tieren in M63- (oben) und LB-Medium (unten), Triplettsvergleich.

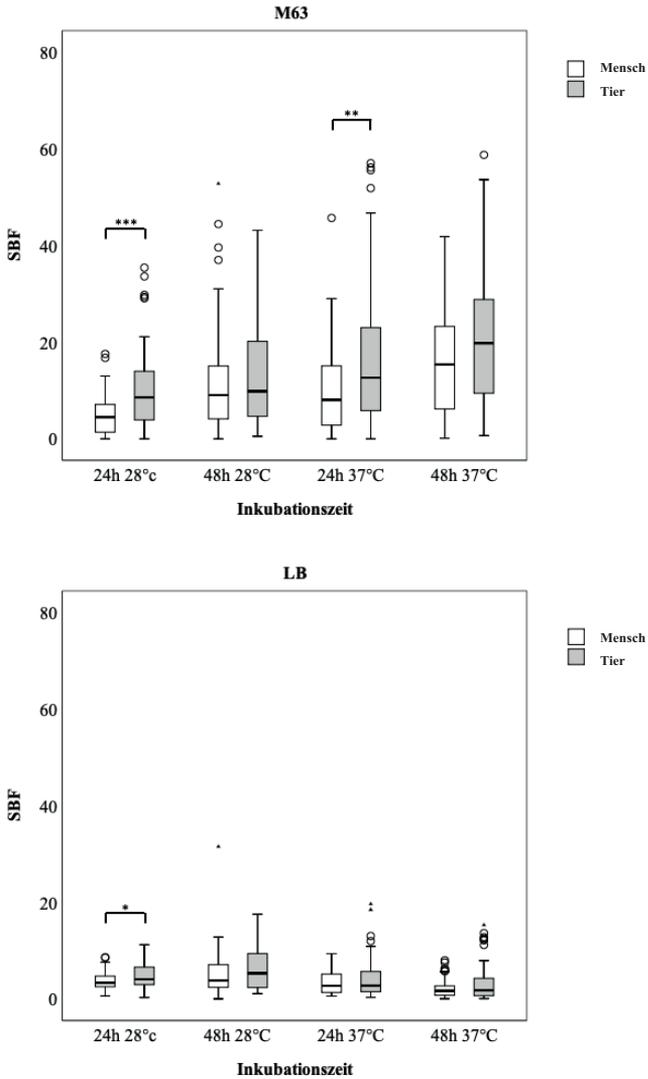


Abbildung 19. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung der WT's von vier humanen und acht *Ab*-Isolaten von Tieren in M63- (oben) und LB-Medium (unten), Wirtsvergleich.

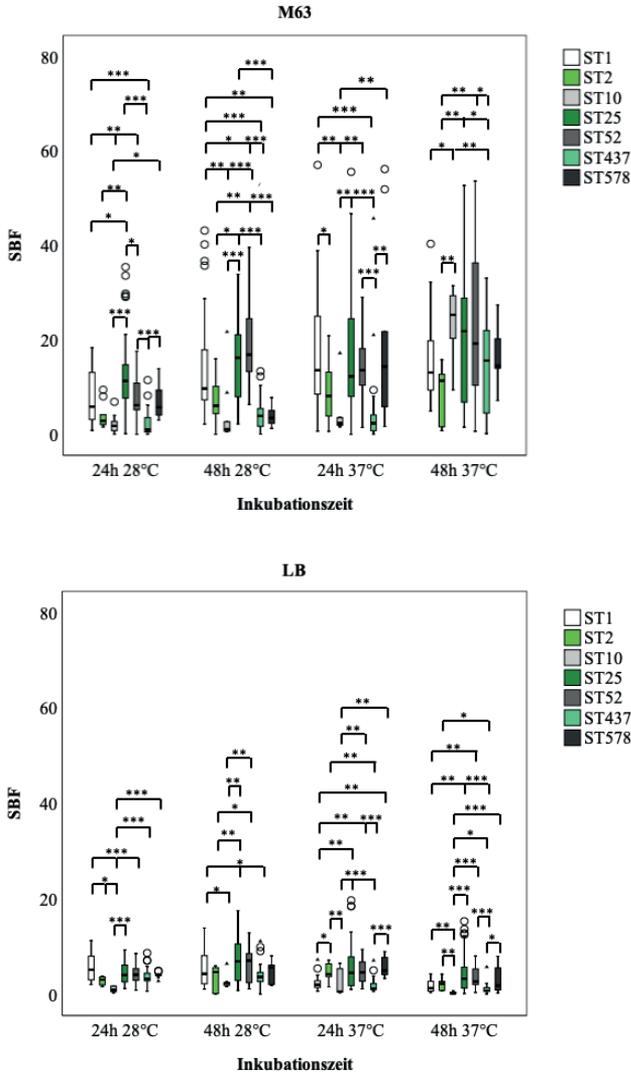


Abbildung 20. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung der WT's von vier humanen und acht *Ab*-Isolaten von Tieren in M63- (oben) und LB-Medium (unten), Multilokus-Sequenztypen-Vergleich.

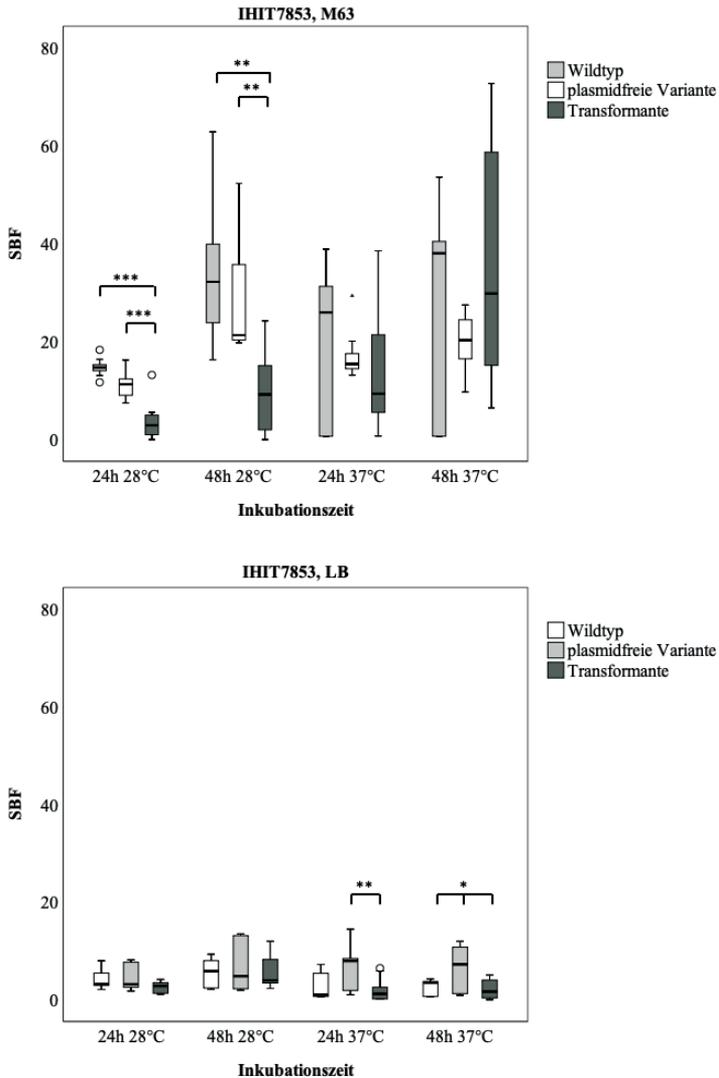


Abbildung 21. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des *Ab*-Isolats IHIT7853. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

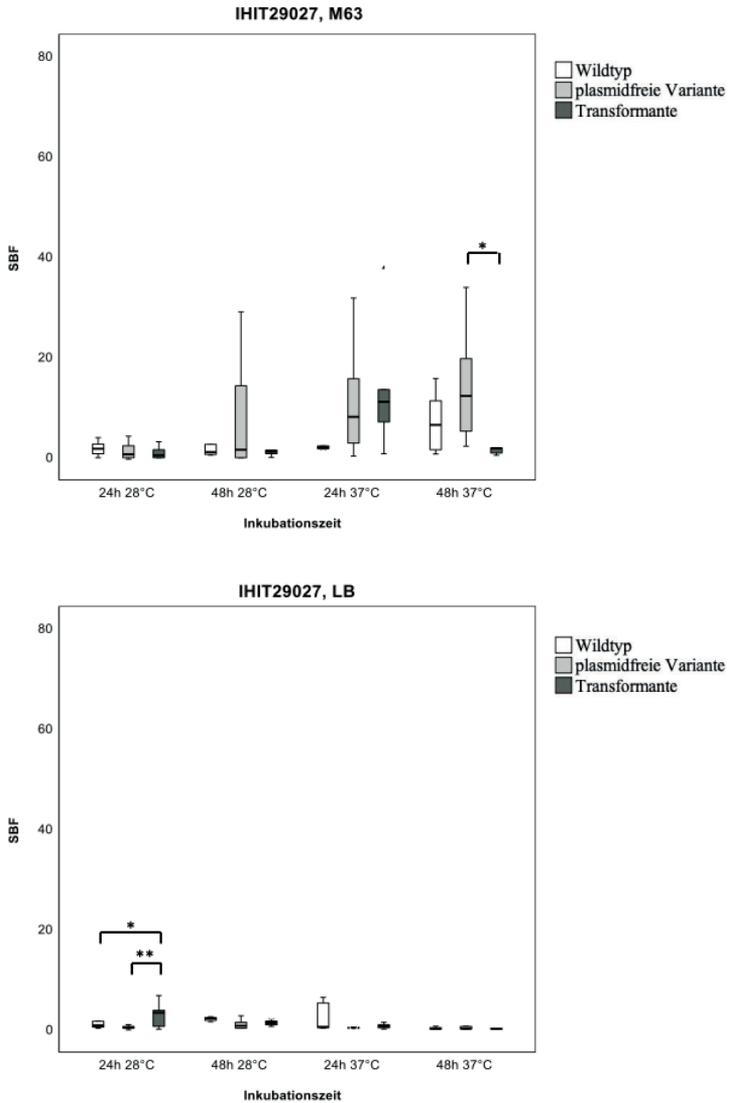


Abbildung 22. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Tripletts des *Ab*-Isolats IHIT29027. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

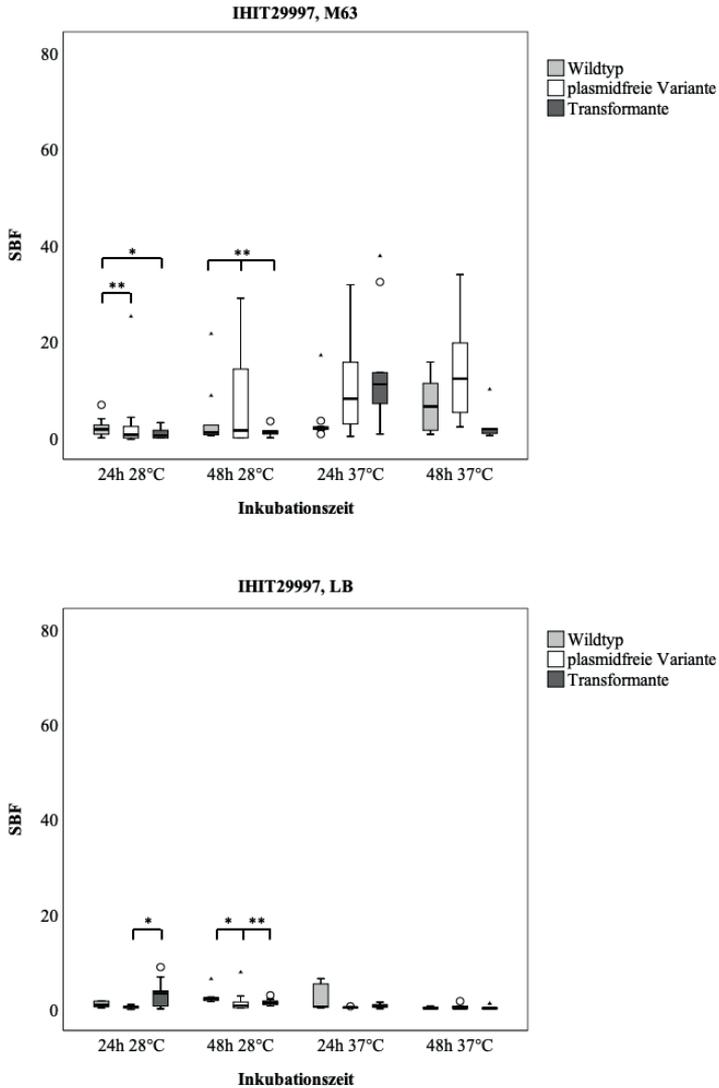


Abbildung 23. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des *Ab*-Isolats IHIT29997. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

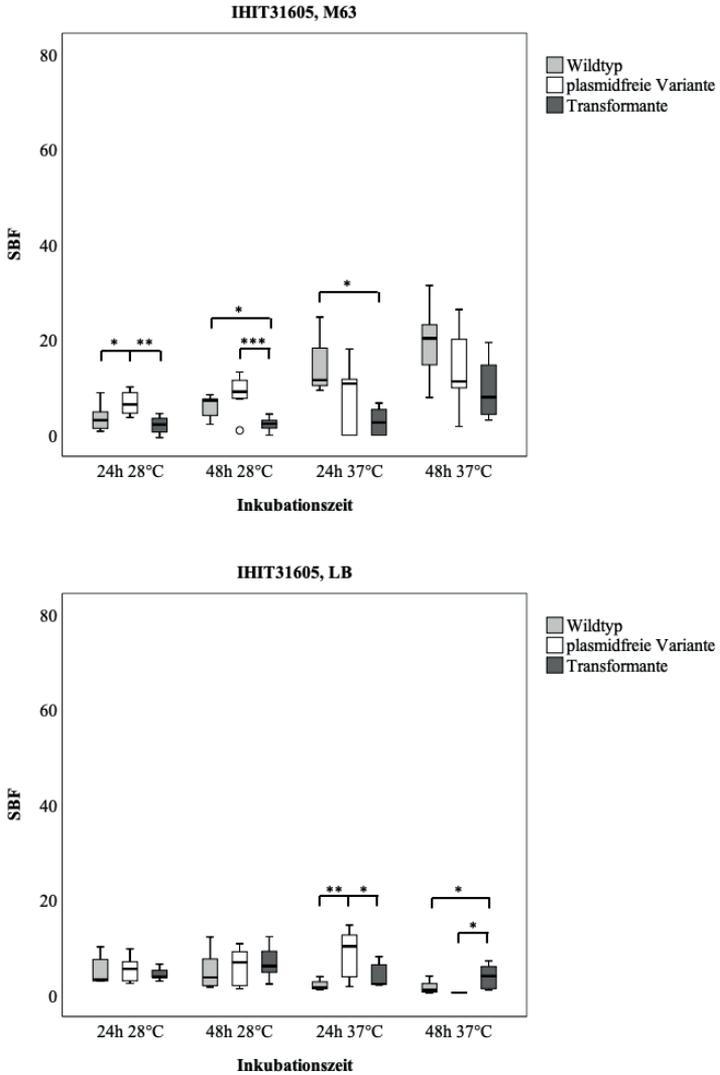


Abbildung 24. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des *Ab*-Isolats IHIT31605. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

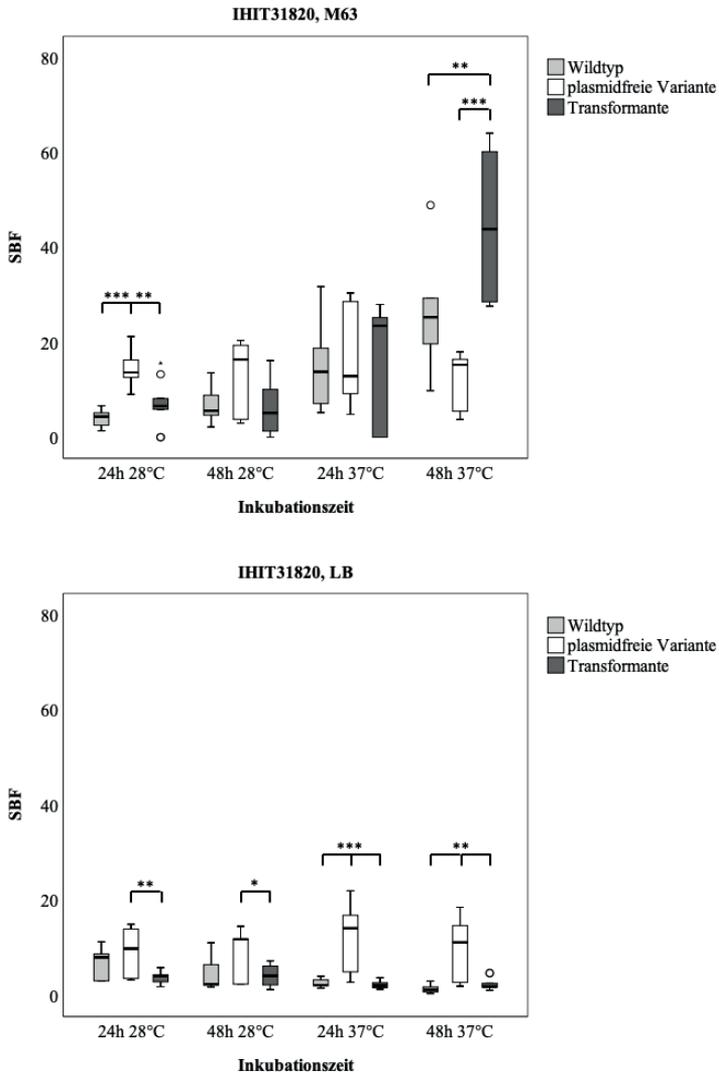


Abbildung 25. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des *Ab*-Isolats IHIT31820. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

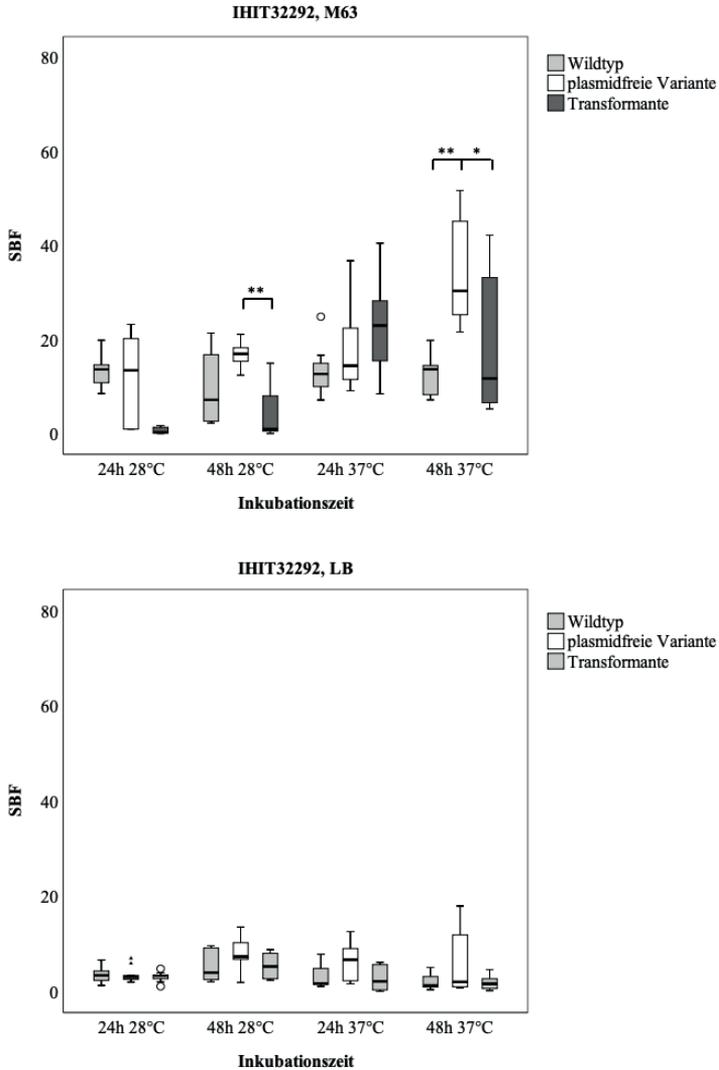


Abbildung 26. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Triplets des *Ab*-Isolats IHIT32292. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

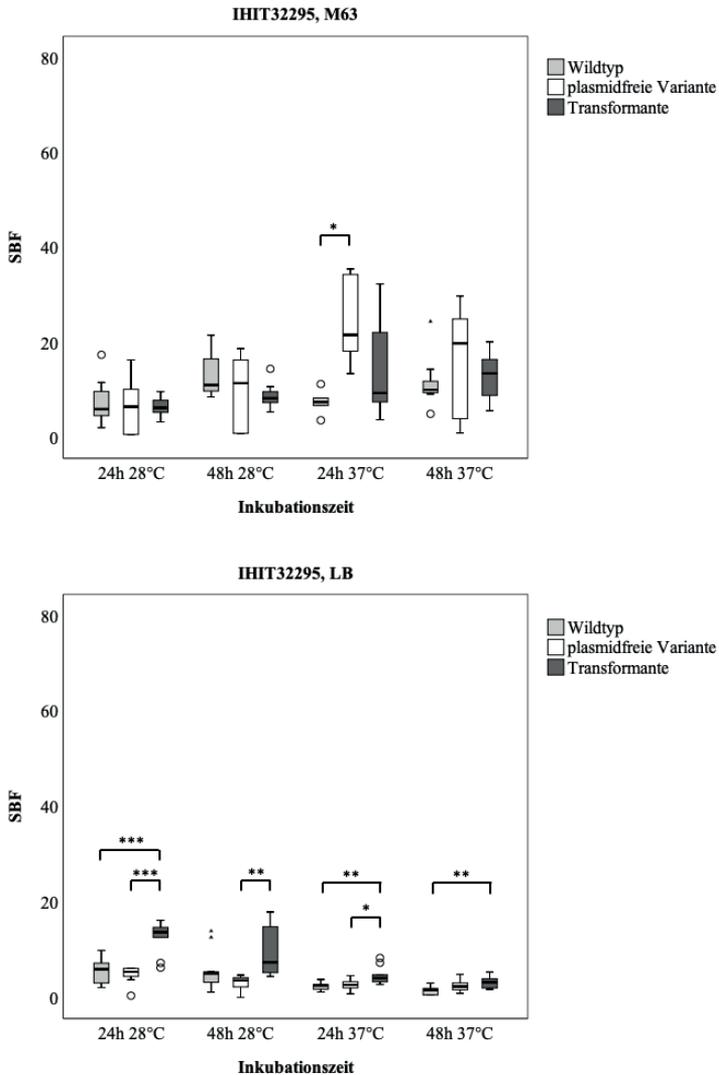


Abbildung 27. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Tripletts des *Ab*-Isolats IHIT32295. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

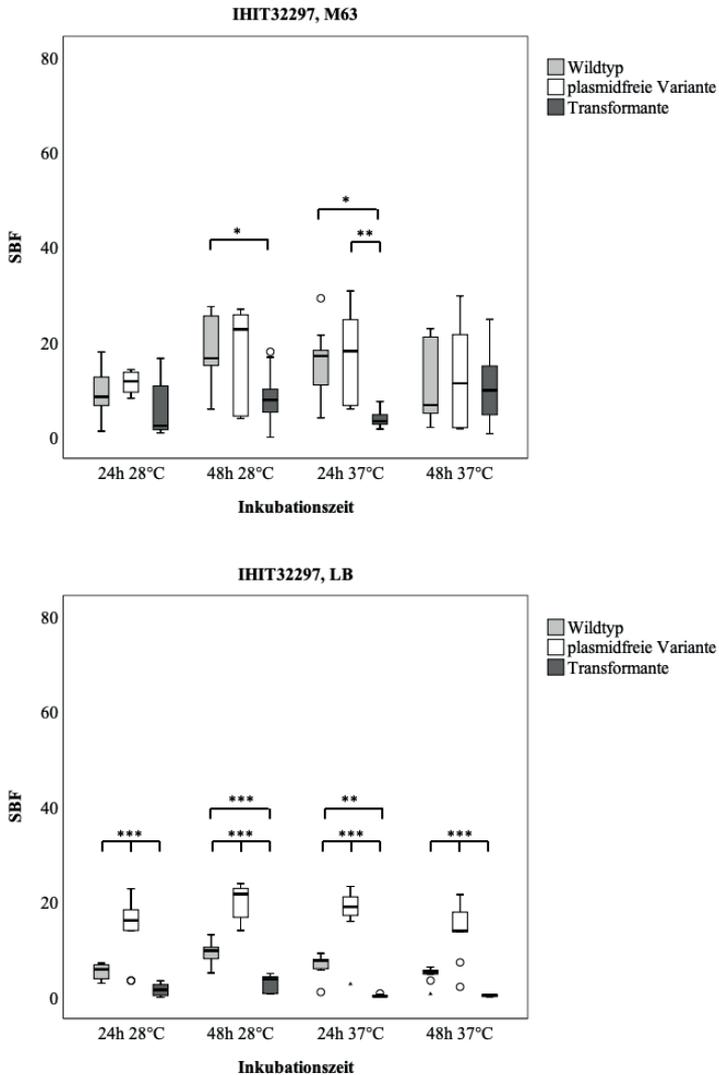


Abbildung 28. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Tripletts des *Ab*-Isolats IHIT32297. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

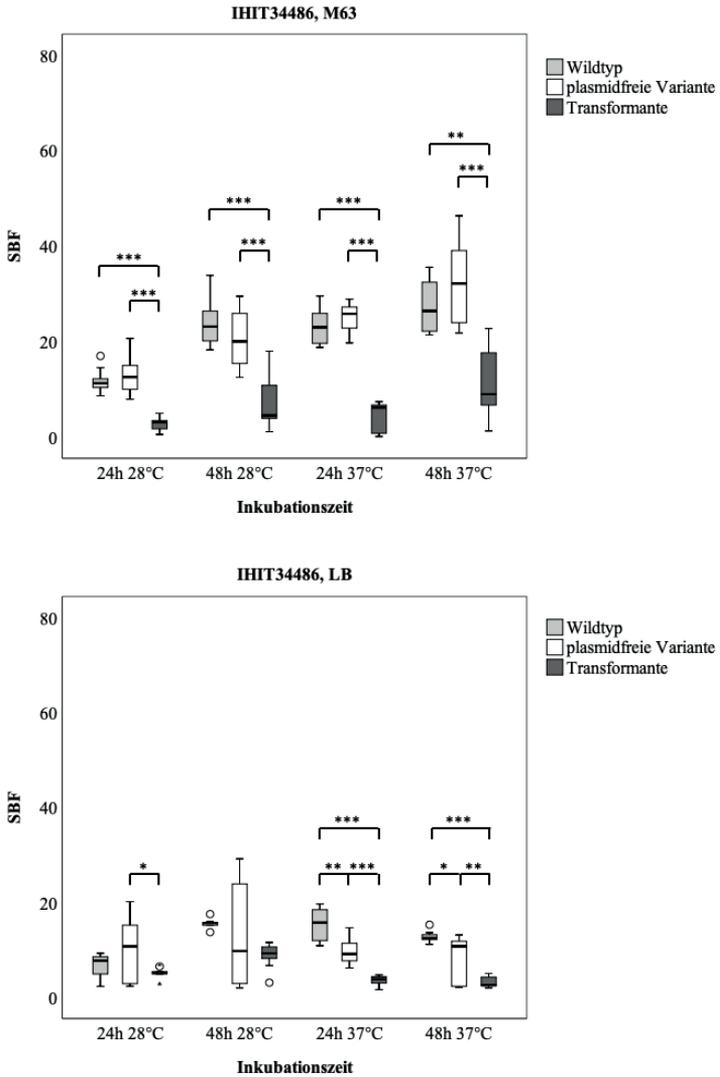


Abbildung 29. Spezifische Biofilmbildung des Stamm-Tripletts des *Ab*-Isolats IHIT34486. Vergleichende Betrachtung von WT, WT-Cure und TF in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

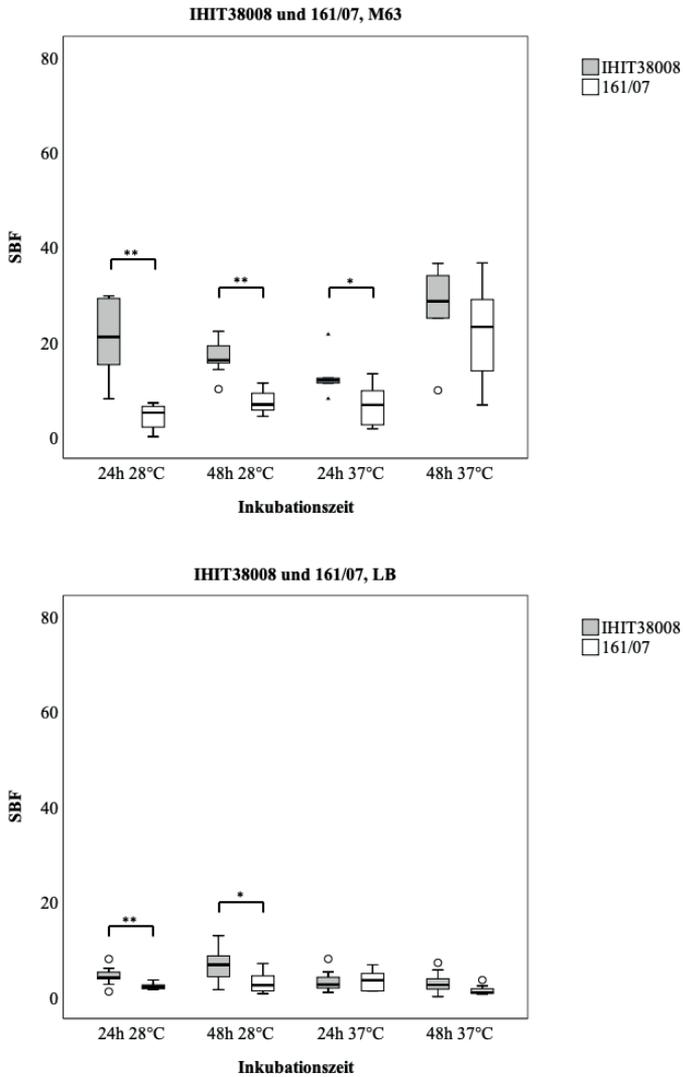


Abbildung 30. Vergleichende Betrachtung der spezifischen Biofilmbildung des tierischen (IHIT38008) und humanen (161/07) NDM-1-positiven *Ab*-Isolats in Abhängigkeit vom Inkubationsmedium.

5.2.7. *Galleria mellonella*-Infektion

Um den Einfluss der CR auf die Virulenz von *Ab* zu untersuchen, wurden acht *Ab* Stamm-Triplets von Tieren (Träger von OXA-23 und OXA-58, 1. Publikation), ein tierisches NDM-1-positives *Ab*-Isolat (2. Publikation), zwei humane *Ab*-Stämme (OXA-72- und NDM-1-positiv) sowie der *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978 ausgewählt (Tabelle 14). Von allen Stämmen waren Ganzgenom-Sequenzen generiert worden. Die Infektion der *Galleria mellonella*-Larven erfolgte in vier Verdünnungsstufen mit Keimzahlen von $5,5 \times 10^1$ bis 4×10^5 koloniebildende Einheiten (KbE). Bei allen Isolaten zeigte die Keimzahl einen signifikanten Einfluss auf die Larvensterblichkeit ($p \leq 0,0000$). Ebenfalls zeigten beim statistischen Vergleich der Triplets sowohl WT ($p \leq 0,0000$) als auch TF ($p \leq 0,0000$) eine signifikant höhere Sterblichkeit als die plasmidfreie Variante des entsprechenden Isolats, während es zwischen WT und TF keine signifikanten Unterschiede der Sterblichkeit gab (Abbildung 31).

Die Infektion mit dem humanen NDM-1-positiven-*Ab* 161/07 zeigte eine signifikant höhere Sterblichkeit als die Infektion mit dem tierischen NDM-1-Isolat IHIT38008 ($p=0,0114$) (Abbildung 32). Das humane *bla*_{OXA-72} tragende Isolat IHIT34203, der tierische NDM-1-positiv-*Ab* IHIT38008 sowie drei weitere *bla*_{OXA-23}-positive Isolate von Tieren zeigten eine signifikant höhere Sterblichkeit ($p \leq 0,0000$) der Larven als der *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978, während die restlichen Stämme eine geringere Sterblichkeit aufwiesen.

Beim Vergleich der Sterblichkeit abhängig vom Sequenztyp der Stämme zeigte sich eine signifikant niedrigere Sterblichkeit des ST2^{Past}-*Ab*-Isolats gegenüber den anderen STs. Die ST10^{Past}- und ST578^{Past}-*Ab*-Isolate zeigten signifikant die höchste Sterblichkeit der Larven im Vergleich zu Isolaten der Sequenztypen ST2^{Past}, ST1^{Past}, ST25^{Past} und ST437^{Past} ($p \leq 0,0000$).

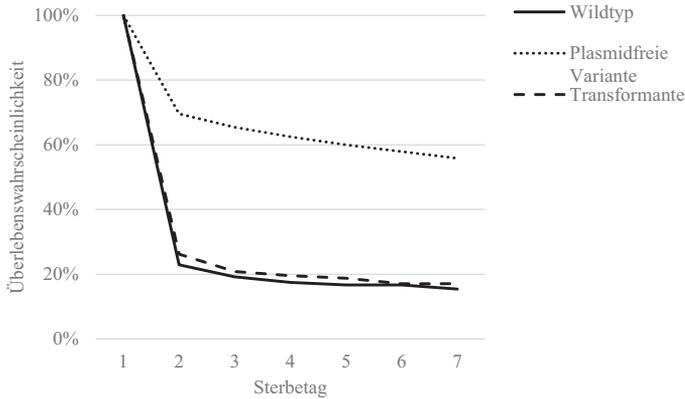


Abbildung 31. Vergleichende Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der *Galleria mellonella*-Larven für WT, WT-Cure und TF nach Infektion mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} .

Es wurde die Überlebenszeit aller untersuchten Isolate (Tabelle 14) im Mittel bestimmt und rechnerisch für eine Infektion mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} angegeben.

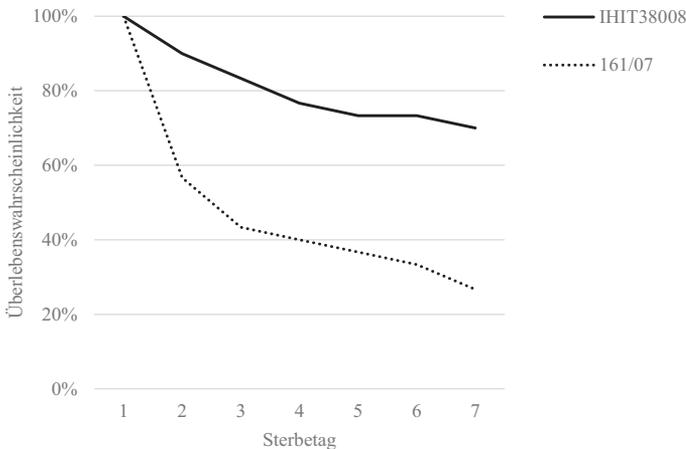


Abbildung 32. Vergleichende Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeit der *Galleria mellonella*-Larven des tierischen (IHIT38008) und humanen (161/07) NDM-1-positiven Ab-Isolats nach Infektion mit der Verdünnungsstufe 10^{-1} .

6. Diskussion

Das weltweite Auftreten von CR *Acinetobacter* spp., insbesondere von *Ab*, als Erreger nosokomialer Infektionen wird in der Humanmedizin seit vielen Jahren als eine große Bedrohung für das öffentliche Gesundheitssystem wahrgenommen [92, 174]. In jüngster Zeit mehren sich auch Berichte über Nachweise von CR *Acinetobacter* spp. aus klinischem Untersuchungsgut von Tieren, die u.a. Fragen nach der Relevanz dieser Erreger in der Tiermedizin sowie nach ihrer potentiellen Übertragbarkeit auf den Menschen aufwerfen [322, 399]. Das Ziel dieser Dissertation war es, einen Einblick in das Vorkommen von CP-produzierenden *Ab* bei Tieren, speziell bei Hund und Katze, zu erhalten. Um einen umfassenderen Überblick über die Verbreitung von CR innerhalb der gesamten Gattung *Acinetobacter* bei Tieren zu erhalten, wurden auch weitere *Acinetobacter* spp. von Hunden und Katzen sowie von anderen Tierarten, wie Rind, Pferd und Schwein in die Untersuchungen aufgenommen. Hierzu wurden alle seit dem Jahr 2000 im Rahmen der mikrobiologischen Diagnostik am IHIT isolierten und asservierten *Acinetobacter* spp. auf eine phänotypische CR untersucht. Vor Beginn der Dissertation wurden die am Institut vorliegenden *Acinetobacter* spp.-Isolate standardmäßig auf einem Carbapenem-Agar (Müller-Hinton mit 2 bzw. 4 mg/L Meropenem) vorselektiert. Um auch phänotypisch CS Isolate erfassen zu können, die möglicherweise dennoch Träger von CP-Genen sind, wurden mit Beginn der Dissertation alle auf Standardmedien isolierten *Acinetobacter* spp. mittels PCR auf CP-Gene untersucht. Auf diese Weise konnten unter insgesamt 1.483 tierischen *Acinetobacter* spp.-Isolaten sowie bei einem *Ab*-Isolat einer Klimaanlage einer Kleintierklinik 74 CP-bildende Isolate nachgewiesen werden. Hierzu zählten neben *Ab* auch *Ap*, *Al*, *Aj*, *Ai* sowie bisher nicht beschriebene und in dieser Arbeit nicht weiter differenzierte *Acinetobacter* species (*As*). Zusätzlich konnten 27 OXA-23-like tragende *A. radioresistens*-Isolate tierischer Herkunft gefunden werden. Auch in retrospektiven MALDI-TOF MS und Ganzgenom-Untersuchungen konnten keine CR *As*-Isolate der neuen Spezies *A. equi* [318] sowie den erst 2015 und 2016 benannten Vertretern des *Acb*-Komplexes *A. seifertii* und *A. dijkshoorniae* (heute als *A. lactucae* bezeichnet) zugeordnet werden [247]. Alle Stämme, die Träger von CP-Genen waren, wurden hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber veterinär- und humanmedizinisch relevanten antimikrobiellen Wirkstoffen sowie des Vorkommens von erworbenen Resistenzgenen und chromosomalen Mutationen, die zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika führen analysiert. Außerdem wurde die Zugehörigkeit der Isolate zu klonalen Linien überprüft, um mögliche Parallelen zur Humanmedizin zu identifizieren. Schließlich wurde bei ausgewählten

Stämmen der Einfluss der CR auf die bakterielle Fitness, Virulenz und Biofilmbildung untersucht.

6.1. Carbapenem-resistente *Acinetobacter baumannii* tierischer Herkunft

In der Humanmedizin isolierte *Ab*-Isolate zeichnen sich meist durch einen multiresistenten Phänotyp, darunter meist auch eine Resistenz gegenüber Antibiotika aus der Gruppe der Carbapeneme aus [92, 417]. Im Vergleich dazu sind die Funde von CR *Ab* bei Tieren selten [399]. Zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Dissertationsschrift gab es lediglich zwölf Publikationen, die über das Auftreten von CR *Ab*-Isolaten bei Kleintieren, insbesondere Hund und Katze berichteten [56, 108, 120, 121, 140, 173, 192, 239, 263, 317, 382, 399, 440]. Es gibt weitere Studien, die non-*Ab* bei Kleintieren, seltener bei lebensmittelliefernden Tieren beschreiben [399]. In **Publikation 1**, die dieser kumulativen Arbeit zugrunde liegt, wurden 502 *Ab*-Isolate, die zwischen 2013 und 2018 in Deutschland, Frankreich und Italien bei Tieren, v.a. Hund und Katze, isoliert wurden, auf CP-Gene untersucht. Im Rahmen dieser Studie konnten 42 CR *Ab*-Isolate aus klinischem Probenmaterial und veterinärmedizinischem Equipment, wie z.B. aus zentralen Venenkathetern nachgewiesen werden. Diese konnten den ebenfalls in der Humanmedizin weltweit verbreiteten klonalen Linien ST1^{Past} und ST25^{Past} sowie dem ST10^{Past}, ST578^{Past} und ST602^{Past} zugeordnet werden (Kapitel 4.1). Diese sowie zwei weitere OXA-23-positive *Ab*-Isolate (ST1^{Past} und ST37^{Past}), die während fortlaufender Untersuchungen nachgewiesen werden konnten, wurden im Rahmen der Studie näher charakterisiert. In **Publikation 2** wird über den erstmaligen Nachweis des *bla*_{NDM-1}-Gens bei einem *Ab*-Isolat tierischer Herkunft in Europa berichtet (Kapitel 4.2). Neben der Verbreitung, der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen sowie Untersuchungen der Resistenzdeterminanten wurde auch der Einfluss der CR auf die bakterielle Fitness, die Fähigkeit zur Biofilmbildung und der Virulenz charakterisiert.

Die drei CPs OXA-23, OXA-58 und NDM-1 (Kapitel 2.4.2.1), welche bereits weltweit in der Humanmedizin beschrieben wurden [103, 117, 417], konnten ebenfalls bei *Ab*-Isolaten von Tieren nachgewiesen werden. Die Prävalenzen betragen für OXA-23 2,3 % (18/771 Isolaten) und 3,8 % (29/771 Isolaten) für OXA-58. Das geringe Vorkommen dieser CPs sowie der nur einmalige Nachweis der Metallo- β -Laktamase NDM-1 (0,1 %), sprechen eher für ein sporadisches Auftreten von CR *Ab*-Isolaten in der Veterinärmedizin. Weiterhin konnten im Rahmen der **Publikation 1** nahezu alle OXA-58-Isolate (96,6 %) bei Kleintieren in Deutschland isoliert werden, während die Mehrheit der OXA-23-Isolate (76,9 %) von Kleintieren in

Frankreich und Italien stammte, was auf eine länderspezifische Verteilung hindeutet. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass die untersuchten Stämme aus unterschiedlichen Quellen stammten, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse einschränkt.

Während in der Humanmedizin weltweit OXA-23 als die am häufigsten nachgewiesene CP bei *Ab* gilt [239, 335], überwog bei den Tier-Isolaten OXA-58. Auch in Deutschland gilt OXA-23, gefolgt von OXA-72 als dominierende CP bei multiresistenten *Ab* in der Humanmedizin. Dagegen konnte OXA-58 in 2021 bei multiresistenten *Ab* in Deutschland nicht nachgewiesen werden [336]. Dies deutet zunächst auf ein separates epidemiologisches Geschehen bei Mensch und Tier hin. Da aber wenig über die Verbreitung von CR *Ab* bei gesunden Tieren, die möglicherweise asymptomatische Träger sind, bekannt ist, müssen zu diesem Aspekt weitere Untersuchungen folgen. Die Tatsache, dass humane und tierische Patienten zum Teil die gleichen, weltweit verbreiteten klonalen Linien tragen, ist ein weiterer Aspekt, der zukünftig weiter beleuchtet werden sollte [322, 399]. Hier war interessant, dass 61,7 % der CR Isolate dem ST1^{Past} und 21,3 % dem ST25^{Past}, jedoch kein CR *Ab* dem in der Humanmedizin am häufigsten mit nosokomialen Infektionen in Verbindung gebrachten ST2^{Past} angehörten [174, 391]. Im Laufe der Jahre häufen sich auch in der Humanmedizin Berichte über nosokomiale Infektionen durch ST25^{Past}-*Ab*. Diese Infektionen werden häufig mit einer hohen Mortalität, insbesondere von intensivmedizinisch betreuten Patienten, beschrieben [82]. Bisher wurden *bla*_{OXA-23} tragende *Ab* tierischer Herkunft meist dem ST1^{Past} oder dem ST2^{Past} zugeordnet [8, 56, 120, 317, 382], während in der vorgelegten Studie Stämme, die OXA-23-Träger waren, v. a. dem ST25^{Past} angehörten. Die *bla*_{OXA-23} tragenden ST25^{Past}-*Ab* von Tieren stammten aus Frankreich, Deutschland und Italien. Dies stärkt die Annahme von Lupo *et al.* (2017), dass es möglicherweise eine endemische Verbreitung von OXA-23-ST25^{Past}-*Ab* bei Tieren in Europa gibt [173, 239]. Püntener-Simmen *et al.* (2019) zeigten ebenfalls, dass die meisten *Ab*-Isolate, die bei hospitalisierten Tieren in der Schweiz gefunden wurden, den global verbreiteten ST1^{Past} und ST25^{Past} zugeordnet werden konnten [322]. Dies lässt vermuten, dass *Ab*-Isolate und/oder Resistenzdeterminanten zwischen Menschen und Kleintieren übertragen werden. Schleicher *et al.* (2013) konnten in einer Studie aus Deutschland zeigen, dass die Populationsstruktur von CS *Ab* aus der Humanmedizin sehr divers ist, während CR *Ab* sich deutlich klonaler darstellen und überwiegend mit dem IC1/ST1^{Past} und dem IC2/ST2^{Past} assoziiert sind [356].

Die Mehrzahl der *bla*_{OXA-23}-Gene aus dieser Studie waren Teil der Transposons Tn2006 oder Tn2008. Beide Strukturen, die die Mobilisation der Gene ermöglichen, wurden bereits bei humanen CR Isolaten beschrieben [149, 287, 343]. Der genetische Kontext der β -Laktamase

OXA-58, eingebettet zwischen dem Insertionselement *ISAb3*, dem Transkriptionsregulations-Gen *araC* und dem Lysin-Transportergen *lysE* ist in der Humanmedizin ähnlich weit verbreitet wie das *bla_{NDM-1}*-Gen als Teil des mobilen Elements *Tn125* [118, 198, 306, 315]. Die weitere Umgebung der Resistenzgene variierte, was auf unterschiedliche Ursprünge und Entwicklungen der Plasmide bzw. genetischer Fragmente hinweist. Die in **Publikation 1** beschriebenen OXA-58-Plasmide wiesen große Ähnlichkeiten mit Plasmiden humaner Patienten wie z.B. *pAba3207a*, welches in Mexiko isoliert wurde, auf [55]. Auch wiesen die Transposonstrukturen der OXA-23-Isolate aus **Publikation 1** große Ähnlichkeiten mit der genetischen Umgebung von *bla_{OXA-23}* aus humanen *Ab*-Isolaten, wie z.B. mit *Ab* Du202 eines Patienten aus Korea, auf [229]. Neben den Isolaten aus den **Publikationen 1 und 2** konnten diese genetischen Strukturen auch bei anderen in dieser Arbeit nachgewiesenen *Acinetobacter* spp. von u.a. Katze, Hunden oder Schafen gefunden werden (Kapitel 5.2.2). Dies stützt die Annahme des HGT von CR-Genen/-Plasmiden zwischen *Acinetobacter*-Isolaten. Alle *Ab*-Isolate dieser Arbeit wiesen einen resistenten Phänotyp gegenüber den getesteten Carbapenemen Imipenem, Meropenem und Doripenem auf, was auf das Vorliegen von intakten IS-Elementen zurückgeht: *ISAb1* bei den OXA-23- sowie *ISAb3* bei den OXA-58-positiven Isolaten. Die IS-Elemente führen durch ihre Promotor-ähnliche Funktion zu einer Verstärkung der Expression des nachfolgenden Gens, in diesem Falle der Oxacillinase-Gene, und somit zu einer Carbapenem-Resistenz [19, 74].

Neben den erworbenen CPs konnten weitere erworbene Resistenzgene, wie *aac(3)-Ia*, *strA* und *strB*, *sul1* und *sul2*, *tetA* und *tetB*, teilweise als Teil von Resistenzinseln, bei den *Ab*-Isolaten aus dieser Studie nachgewiesen werden. Diese Co-Resistenzen bei CR *Ab* wurden bereits mehrfach, auch in der Humanmedizin, beschrieben [399]. Während zwischen 2016 und 2018 isolierte Stämme Träger der *Ab*-Resistenzinsel (*AbaR*) *AbaR3*-like (n=10) oder *AbaR10* (n=1) waren, trugen zwischen 2014 und 2015 isolierte ST1^{Past}-*Ab* (n=10) neben *bla_{OXA-58}* lediglich das Cephalosporinase-Gen *bla_{ADC-11}*. Insbesondere in den Tierkliniken 1 und 4 könnte es zu einem Eintrag der *AbaR3* gekommen sein, da sowohl non-*AbaR3*-like *Ab*-Isolate, als auch *Ab*, die Träger dieser Resistenzinsel waren, nachgewiesen wurden. Die Isolate erwarben mit Aufnahme der Resistenzinsel zusätzlich die Resistenzgene *tetA*, *tetR*, *sul1* und *catA1* sowie die Gene *aacC1* und *aadA1*, die Teil der Genkassette der *AbaR3*-like sind. Während das *Ab*-Isolat IHIT36988, das Träger von *AbaR10* war, das Resistenzgen *sul1* trug. Auch humane *Ab*-Isolate sind oftmals Träger von Resistenzinseln, insbesondere von *AbaR0*, *AbaR3* sowie von deren Varianten [158, 222]. Sowohl bei menschlichen als auch bei tierischen Isolaten können diese

Resistenzinseln zu einer verminderten Effektivität einer Therapie mit verschiedenen Antibiotika führen [146]. Der Nachweis der gleichen Resistenzprofile innerhalb der *AbaR3*-like-Inseln bei ST1^{Past}-*Ab*-Isolaten aus den Jahren 2016 bis 2018 weist auf eine klonale Verbreitung dieser Isolate hin. Ähnliches konnten auch Püntener-Simmen *et al.* (2019) bei *Ab*-Isolaten des ST1^{Past} von Tieren aus der Schweiz aus den Jahren 2007, 2012, 2014 und 2015 zeigen, die alle die Gene *aac(3)-Ia*, *aadA1* und *sul1* trugen. Ob die erworbenen Resistenzgene auch hier Teil von Resistenzinseln waren, ist nicht bekannt [325].

Bei der Analyse der Virulenz-assoziierten Gene (VAGs) zeigten sich überwiegend Überschneidungen des VAG-Profiles bei *Ab*-Isolaten des gleichen STs. Diese deutet auf eine klonale Verbreitung der STs mit jeweiligem chromosomalen VAG-Profil hin. Ähnliches wurde bei der Analyse erworbener Resistenzgene beobachtet. Neben den Tier-Isolaten wiesen auch die humanen *Ab*-Isolate des ST1^{Past}, AYE [398], und des ST25^{Past}, 161/07 [306], die gleichen VAGs auf. So wiesen 14 tierische ST1^{Past}-*Ab* das gleiche VAG-Profil (n=23 VAGs) wie das humane *Ab*-Isolat AYE auf. Die restlichen untersuchten ST1-*Ab* von Kleintieren unterschieden sich zwischen einem (n=14) bis maximal drei (n=1) VAGs vom Referenzstamm AYE (Tabelle 10). Noch deutlicher zeichnete sich ein gemeinsames VAG-Profil für die ST25^{Past}-Isolate tierischer Herkunft ab. So wiesen alle CP-Isolate das gleiche VAG-Profil (n=26 VAGs) wie das humane NDM-1-*Ab*-Isolat 161/07 auf (Tabelle 11). Gemeinsam mit identischen STs und Resistenzgenprofilen deuten die Überschneidungen bei den VAG-Profilen einmal mehr darauf hin, dass sich *Ab*-Isolate von Mensch und Tier auf Basis dieser Kriterien nicht unterscheiden.

Mittels einer *in silico core-genome* MLST (cgMLST)-Analyse der tierischen CR Isolate konnte gezeigt werden, dass ST1^{Past}-*Ab*-Isolate des Clusters CT-1808 zum einen in unterschiedlichen Veterinärkliniken isoliert werden konnten, andererseits über mehrere Jahre innerhalb einer Klinik kursierten. Zwischen 2014 und 2018 wurden CT-1808-*Ab* in elf unterschiedlichen deutschen Tierkliniken isoliert. Insbesondere der wiederholte Nachweis dieser klonalen Linie in Klinik 1 (n=6, 2014-2017) und Klinik 4 (n=9, 2015-2018) über einen längeren Zeitraum deutet auf eine Persistenz des Erregers sowie ein nosokomiales Geschehen in diesen Tierkliniken hin. Zudem verdeutlicht der Nachweis von ST1^{Past}-*Ab*-Isolaten des gleichen Clusters in verschiedenen deutschen Veterinärkliniken, die erfolgreiche Verbreitung einer klonalen Linie auch zwischen Kliniken. Jedoch wurden in sieben dieser Kliniken nur einmalig ST1^{Past}-*Ab*-Isolate des Clusters CT-1808 isoliert. Dies könnte u.a. in einer mangelnden systematischen Beprobung der Kliniken oder einem erfolgreichen Hygienemanagement

begründet sein. Weiterhin unterstreicht der Nachweis eines ST1^{Past}-OXA-58-*Ab* des CT-1808 aus der Klimaanlage einer Kleintierklinik die Relevanz des klinischen Umfelds als Quelle für multiresistente *Ab*. Brillhante *et al.* (2021) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie zeigten, dass in einer Schweizer Tierklinik die klinischen CR *Klebsiella pneumoniae*-Isolate stark mit der die Umgebung kontaminierenden Stämmen verwandt waren [47]. Des Weiteren wurden innerhalb der gleichen Klinik unterschiedliche Klone nachgewiesen, was für eine Etablierung verschiedener OXA-58-positiver *Ab* des ST1^{Past} spricht. Ähnliches beschreiben Lupo *et al.* (2017), die ein endemisches Geschehen für *bla*_{OXA-23}-*Ab* des ST25^{Past} innerhalb der Haustierpopulation Frankreichs vermuteten [239]. Ebenfalls konnten *Ab*-Isolate des ST25^{Past}, die Träger der β -Laktamase OXA-23 waren, auch in Deutschland, Italien und der Schweiz nachgewiesen werden, was eine möglicherweise europäische Verbreitung dieses CR Klons in Haustieren unterstreicht [239, 322, 399].

In phylogenetischen Untersuchungen im Rahmen einer *maximum common genome* (MCG)-Analyse wurden *in silico* tierische und humane *Ab*-Isolate der gleichen STs miteinander verglichen. Bei ST1^{Past}-, ST10^{Past}- und ST25^{Past}-Isolaten zeigte sich, dass die Tier-Isolate aus dieser Arbeit eine eigene Gruppe darstellen, die jedoch mit Genomen von Isolaten von Patienten in Australien, Südkorea, Thailand, Tschechien und den USA clustern. Humane *Ab*-Isolate aus Europa zeigten dagegen nur geringe Ähnlichkeiten zu den Tier-Isolaten. Dies deutet auf eine Etablierung erfolgreicher Klone in der Veterinärmedizin, ähnlich, jedoch unabhängig wie in der Humanmedizin, hin. Bekräftigt wird dies damit, dass bisher noch über keinen eindeutigen Fall der Übertragung von *Ab* zwischen Mensch und Tier berichtet wurde, sodass die Frage nach dem Zoonosepotential von *Ab* allein auf der Grundlage der Extrapolation von epidemiologischen Daten nicht als gesichert gelten kann [105]. Auch wenn die Übertragung von CR *Ab* bzw. von Resistenzgenen von vielen Autoren als Gefahr für die öffentliche Gesundheit angesehen wird, wird die Richtung der Übertragung derzeit eher als ein *spill-over* aus der Humanmedizin angesehen [154, 240, 307, 369, 399]. Gemäß des Europäischen Durchführungsbeschlusses 2020/7894/EU ist für alle Mitgliedsstaaten eine Untersuchung von *Salmonella* spp. und *E. coli* auf ESBL-, AmpC- und CP-Bildner verpflichtend [100, 104]. Demzufolge gibt es bis heute weder bei Klein- noch bei lebensmittelliefernden Tieren eine verpflichtende Untersuchung von *Ab* auf CP-Bildner. Jedoch gibt es in Deutschland die Möglichkeit bei dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für GN-Krankenhauserreger der Ruhr-Universität Bochum eine kostenlose Untersuchung zur Abklärung bei Verdacht auf CR *Ab*, *Enterobacterales* und *P. aeruginosa* durchführen zu lassen (Stand 01/2023).

6.2. Carbapenem-resistente *Acinetobacter pittii* tierischer Herkunft

In **Publikation 3** wird der Nachweis der β -Laktamase OXA-58 bei CR *Ap*-Isolaten tierischer Herkunft beschrieben. Neben *Ab* werden zunehmend weitere *Acinetobacter* spp., wie *Ap* im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen bei Menschen beschrieben [7, 299, 339, 409, 432]. Auch konnten CPs bei *Ap*, insbesondere NDM-1 oder OXA-58, die im Rahmen nosokomialer Infektionsgeschehen isoliert wurden, nachgewiesen werden. So berichteten Yang *et al.* (2012) über *Ap*-Isolate, die Träger der Metallo- β -Laktamase NDM-1 waren, bei intensivmedizinisch betreuten Patienten in China [428]. Es folgten weltweit weitere Publikationen über CR *Ap*, u.a. aus Europa, Asien, Südamerika oder dem Libanon [6, 15, 160, 189, 204, 293, 296, 297, 305, 332, 338, 380, 432, 438]. Neben NDM-1 wurden auch OXA-23, OXA-58, OXA72, OXA-143 sowie die β -Laktamase GIM-1 bei *Ap* gefunden [6, 15, 431, 438]. In der Humanmedizin werden OXA-58-*Ap* v.a. im asiatischen Raum identifiziert und häufig wird von einer Co-Existenz mit NDM-1 bei *Ap*-Isolaten berichtet [15, 60, 128, 129, 432, 438]. Hingegen sind Berichte über CR *Ap*-Isolate tierischen Ursprungs selten [272, 323].

Um das Vorkommen von CPs bei *Ap* zu untersuchen, wurden 200 *Ap*-Isolate, die zwischen 2008 und 2017 aus tierischem Untersuchungsgut im Rahmen der institutseigenen mikrobiologischen Diagnostik isoliert wurden, mittels PCR auf CP-Gene untersucht. Bei fünf (2,5 %) Isolaten wurde die β -Laktamase OXA-58, lokalisiert auf einem Plasmid, nachgewiesen. Im Rahmen der Dissertation konnte ein weiteres OXA-58-positives *Ap*-Isolat aus der Wunde eines Hundes aus Deutschland isoliert werden. Neben den Berichten über ein OXA-58-positives *Ap*-Isolat aus dem Kot einer Taube in Frankreich [272] gibt es keine weiteren Berichte über *bla*_{OXA-58} bei *Ap* tierischer Herkunft. Weitere Publikationen über CR *Ap* bei Tieren beschränken sich auf einen Bericht von Rafei *et al.* (2015), die OXA-40 bei einem *Ap*-Isolat von einem Kaninchen nachwies. Das Isolat war Imipenem-, Meropenem- und Doripenem-resistent. Die Lokalisation des Resistenzgens wurde nicht untersucht [323].

Der Nachweis des erworbenen, Plasmid-lokalisierten *bla*_{OXA-58}-Gens in der vorliegenden Studie könnte ein erster Hinweis sein, dass OXA-58 sich nicht nur, wie in den **Publikationen 1 und 2** beschrieben, bei tierischen *Ab*-Isolaten verbreitet, sondern auch auf Tier-Isolate der Spezies *Ap* übertragen wurde und sich dort möglicherweise ausbreitet.

Die sechs OXA-58-positiven *Ap* konnten dem ST93 zugeordnet werden. Dieser Sequenztyp ist bereits in der Humanmedizin beschrieben. Nemeč *et al.* (2011) berichteten erstmals über ein *Ap*-Isolat des ST93 aus der Achsel eines Menschen in Deutschland [282]. Ebenfalls bei einem Menschen aus Deutschland konnten Kaase *et al.* (2014) ein ST93-*Ap*-Isolat, das Träger der Metallo- β -Laktamase GIM-1 war, isolieren [204]. In Portugal gelang Silva *et al.* (2018) der Nachweis eines gleichfalls *bla*_{OXA-58} tragenden ST93-*Ap*-Isolats bei einem Menschen [365].

OXA-58 zeigt in der Regel eine niedrige hydrolytische Aktivität, sodass es meist nur in Kombination mit IS-Elementen, die zu einer gesteigerten Expression der CP führen, zur Ausbildung einer phänotypischen CP-Resistenz kommt [117]. Bei *Ap* kann es aber trotz vorhandener IS-Elemente bei einer Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen bleiben [432]. Die *Ap*-Isolate dieser Arbeit zeigten, nach mehreren Passagen in Meropenem-haltigem Medium, eine achtfache Steigerung der MHKs gegenüber Imipenem. Ähnliches beobachteten auch Silva *et al.* (2018): ein OXA-58-positives *Ap*-Isolat zeigte ebenfalls, wie die Tier-Isolate aus **Publikation 3**, keine phänotypische CR. Nach einer Transformation des OXA-58 Plasmids des *Ap*-Isolats in ein *Ab*-Isolat kam es jedoch bei Letzterem zu einer MHK-Steigerung gegenüber Imipenem [365]. Demzufolge könnten OXA-58-positive *Ap* als „Vehikel“ für Plasmide, die Träger von CP-Genen sind, für andere *Acinetobacter* spp., wie *Ab*, dienen.

Der genetische Kontext des *bla*_{OXA-58}-Gens ist bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Häufig sind *downstream* von *bla*_{OXA-58} das IS-Element *ISAba3*, der Transkriptionsfaktor *araC* sowie das Efflux-Protein *lysE* lokalisiert, während *upstream* meist ein unvollständiges *ISAba3* kodiert ist [118, 316, 365]. Diese direkte genetische Umgebung von *bla*_{OXA-58} konnte ebenfalls in den Tier-Isolaten nachgewiesen werden, allerdings war das *araC*-Gen unterbrochen. Auch das OXA-58-positive *Ab*-Isolat WH8144 von einem Menschen in China zeigt ein unvollständiges *araC*-Gen, ist jedoch im Gegensatz zu den Tier-Isolaten Carbapenem-resistent [129]. Während in einer Studie von Silva *et al.* (2018) keine weiteren Resistenzgene auf dem OXA-58 Plasmid gefunden wurden, trugen die Plasmide der tierischen OXA-58-*Ap* weitere Gene, die Resistenzen gegenüber Tetrazyklinen (*tetA39/tetR39*), Aminoglykosiden (*aac*, *strA* [*aph(3'')-Ib*], *strB* [*aph(6)-I*]) und Sulfonamiden (*sul2*) vermittelten [365]. Diese Co-Existenz von Resistenzgenen auf einem Plasmid könnte, trotz des in der Regel fehlenden Einsatzes von Carbapenemen in der Tiermedizin, zu einer Verbreitung von Oxacillinasen aufgrund des Einsatzes anderer antimikrobieller Wirkstoffe führen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit des verantwortungsvollen und restriktiven Einsatzes von Antibiotika in der Tiermedizin.

In einer MCG-Analyse wurden die *bla*_{OXA-58}-positiven *Ap*-Isolate dieser Studie und OXA-58-*Ap* von Menschen vergleichend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die drei bzw. zwei tierischen *Ap*-Isolate, die innerhalb der Klinik A bzw. B isoliert wurden, auch zusammen clusterten. Dies stützt die Annahme der Etablierung erfolgreicher Klone innerhalb veterinärmedizinischer Kliniken, wie es in der Humanmedizin bekannt ist. Die Analyse zeigt ebenfalls, dass eine Ähnlichkeit der tierischen Stämme der Klinik B zu humanen *Ap*-Isolaten aus Deutschland und den USA besteht. Dies unterstreicht die Möglichkeit einer spezieübergreifenden Infektion mit *Ap* des gleichen Genotyps bei Mensch und Tier. Gestützt wird diese Annahme weiterhin dadurch, dass zwischen einem OXA-58-positiven *Ap*-Isolat, das in der vorliegenden Studie von einer Katze isoliert wurde und dem humanen GIM-1-positiven *Ap*-Isolat UKK-0555 (GenBank Nummer: NZ_MGIT00000000.2) aus Deutschland nur 88 Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs – *Single Nucleotide Polymorphism*) gefunden wurden [217].

Neben OXA-58 wurden bei zwei weiteren *Ap*-Isolaten von zwei Hunden aus Deutschland die β -Laktamasen OXA-72 (OXA-40-like) bzw. OXA-255 (OXA-143-like) nachgewiesen. In der Humanmedizin wurde bereits über *Ap*-Isolate mit diesen Enzymen berichtet, während in der Tiermedizin bis dato nur ein OXA-40 tragendes *Ap*-Isolat von einem Kaninchen bekannt war [323]. Nach der ersten Beschreibung der OXA-40-like CP aus dem Blut eines Patienten in Kolumbien in 2012 [268] folgten Berichte von OXA-72-positiven *Ap* aus Frankreich [38], Südamerika [298, 346, 403], dem Libanon [6] und China [60, 344]. Die Stämme zeigten alle eine phänotypische CR sowie eine Plasmid-Lokalisation der erworbenen CP, jedoch variierte die Größe der Plasmide zwischen ~10 kb und ~20 kb. Ruan *et al.* (2017) ordneten das entsprechende *Ap*-Isolat dem ST950 und Pavoni Gomes Chagas *et al.* (2017) dem ST947 zu [298, 344]. Anders als bei OXA-58 sind OXA-72 tragende *Ap* unterschiedlichen STs zugehörig. So konnte das OXA-72-positive Isolat unserer Studie keinem bisher bekannten ST zugeordnet werden. Trotz der Verbreitung von OXA-72 in *Ap*-Isolaten unterschiedlicher STs könnte diese *Acinetobacter*-Spezies eine Quelle für OXA-72 darstellen. Das entsprechende Gen ist oftmals, wie auch bei dem tierischen Isolat aus dieser Studie, innerhalb des sogenannten XerC/XerD-like Kontextes, der für die Mobilisation des Oxacillinase- Gens ursächlich ist, lokalisiert [261, 268, 321]. Über OXA-143-like tragende *Ap* gibt es bis dato nur drei Publikationen, die alle aus der Humanmedizin stammen. Zander *et al.* (2014) beschrieben erstmals eine OXA-143-like CP bei einem *Ap*-Isolat aus den USA. Das Isolat trägt, wie auch unser tierisches Isolat, das *bla*_{OXA-255}-Gen auf dem Chromosom und ist Carbapenem-sensibel [431]. Ebenfalls in 2014 berichteten

Ji *et al.* (2014) über ein OXA-143-like-positives *Ap*-Isolat aus China während D'Souza *et al.* (2017) drei Jahre später OXA-499 bei einem humanen ST1385-*Ap*-Isolat aus Südkorea nachwiesen [79, 197]. Ob *Ap*-Isolate von Tieren eine Quelle für *bla*_{OXA-143-like} Gene darstellen, kann anhand der derzeitigen Datenlage nicht valide abgeschätzt werden.

6.3. Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp. tierischer Herkunft

Neben *Ab* und *Ap* (**Publikationen 1-3**) konnten im Rahmen dieser Arbeit CP-Gene bei weiteren *Acinetobacter* spp., wie *Aj*, *Al*, *Ai* und *As* nachgewiesen werden (Kapitel 5.2.1). Neben *Ab* stellen auch non-*baumannii* *Acinetobacter* spp., insbesondere CR Isolate, als opportunistische Infektionserreger sowohl die Human- als auch die Tiermedizin vor therapeutische Herausforderungen [92, 423]. Besonders besorgniserregend ist in diesem Zusammenhang, dass bei allen tierischen CR *Acinetobacter* spp. mit OXA-23 und OXA-58 die gleichen erworbenen CPs wie in der Humanmedizin, meist eingebettet in den gleichen genetischen Kontext und die gleichen Transposon-Strukturen, nachgewiesen werden konnten. Die β -Laktamasen sind meist auf Plasmiden lokalisiert, die zusätzlich Aminoglykosid- oder Tetrazyklin-Resistenzgene tragen. Dies birgt die Gefahr, dass es bei der Anwendung von z.B. Tetrazyklinen zu einem Selektionsdruck und somit zu einer Co-Transmission von Tetrazyklin- und Carbapenem-Resistenzgenen kommen kann. Im Folgenden werden die einzelnen Funde von Oxacillinasen bei den verschiedenen *Acinetobacter* spp. genauer betrachtet.

6.3.1. *Acinetobacter lwoffii*

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es erstmals, die bei der klinisch relevantesten Spezies *Ab* weit verbreiteten β -Laktamasen OXA-23 sowie OXA-58 bei *Al*-Isolaten tierischer Herkunft nachzuweisen. Bis dato gibt es vier human- und zwei veterinärmedizinische Publikationen, die v.a. *bla*_{NDM-like} bei *Al* beschreiben. In 2012 wiesen zwei Studien NDM-1-positive *Al* aus dem Urin [187] sowie dem Blut [128] bei Patienten in zwei unterschiedlichen Kliniken in China nach. Während Hu *et al.* (2012) die Lokalisation der CP innerhalb eines Tn125 [306] beschrieben, konnten Fu *et al.* (2012) kein IS_{Aba125}, und somit die Lokalisation des CP-Gens auf einem unvollständigen Transposon nachweisen [128, 187]. Es folgten weitere Berichte *bla*_{NDM-like}-positiver *Al* aus Indien und China. Zou *et al.* (2015) wiesen *bla*_{NDM-14} auf einem ~40 kb großen Plasmid eines Imipenem- und Meropenem-resistenten *Al*-Isolats nach [442]. Ebenfalls Plasmid-lokalisiert fanden fünf Jahre später Khalid *et al.* (2020) das Gen *bla*_{NDM-1} bei einem *Al*-Isolat eines Patienten auf einer neonatalen Intensivstation in Indien [210]. Auch zwei Studien über CR *Al* tierischer Herkunft berichteten von NDM-positiven Isolaten. Wang *et al.*

(2012) beschrieben ein Imipenem-resistentes *Al*-Isolat von einem Huhn [416]. Cui *et al.* (2020) veröffentlichten acht Jahre später einen Bericht über den Nachweis eines Meropenem-resistenten NDM-1-*Al*-Isolats von einer Gans [78]. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse dieser Arbeit, in der insbesondere OXA-23-like- und OXA-58-like-*Al* bei Klein-, Heim- und Großtieren isoliert werden konnten. Ähnlich wie bei Wang *et al.* (2012) und Cui *et al.* (2020) gezeigt, sind auch diese Oxacillinasen, mit Ausnahme der OXA-58-CP des Isolats IHIT36316 (Pferd, Luftsack, 2018) auf Plasmiden lokalisiert. Dies ermöglicht die Verbreitung der Gene im Rahmen von horizontalem und vertikalem Gentransfer, nicht nur innerhalb der Spezies, sondern auch über die Speziesgrenze hinweg [78, 416]. Wie bereits bei *Ab* berichtet, sind auch die *Al*-Isolate, die OXA-23 innerhalb eines Tn2008-Kontextes tragen, Imipenem-resistent [287].

Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei *bla*_{OXA-58}-tragenden *Al* ab. Bei zwei *Al*-Isolaten von lebensmittelliefernden Tieren konnte, der von Evans *et al.* (2012) bei humanen Isolaten beschriebene genetische Kontext des Oxacillinase-Gens gefunden werden. Diese könnte auf einen Austausch dieser genetischen Region zwischen humanen und tierischen Isolaten oder auf gemeinsame Infektionsquellen in der Umwelt hindeuten. Bei zwei weiteren *Al*-Isolaten konnten hingegen nur Teile dieses genetischen Kontextes nachgewiesen werden [119]. Wie von Héritier *et al.* (2005) beschrieben wiesen *bla*_{OXA-58}-tragende *Ab*-Isolate nur in Kombination mit einer Überexpression der Efflux-Pumpe AdeABC eine phänotypische Carbapenem-Resistenz auf [171]. Dies lässt sich bei den *Al*-Isolaten dieser Studie ebenfalls beobachten: keines der Isolate ist Träger der für Protein-Efflux-Pumpen kodierenden Gene *adeRS* und *adeAB* (Kapitel 2.4.1.1.1), was einen sensiblen Phänotyp gegenüber Carbapenemen erklären könnte [119, 171].

Wie von Cui *et al.* (2020) beschrieben, konnten auch in unseren Untersuchungen weitere Resistenzgene, wie *strA* und *strB*, *sul*, *floR*, *msrE* und *mphE* bei *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden [78]. Ob der Genotyp von *strA/strB* und *aph* die in der Literatur beschriebene Resistenz gegenüber Strepto-, Kana-, bzw. Neomycin vermittelt, kann nicht geklärt werden, da der entsprechende Phänotyp nicht getestet wurde [147, 157, 363]. Trotz des Nachweises der Resistenzgene *aac(3)-Ic*, *aac(3)-IIa*, *aac(3)-IId*, *aac(3)-IV* bei den tierischen *Al*-Isolaten, wurde keine phänotypische Resistenz gegenüber den getesteten Aminoglykosiden Gentamicin, Amikacin bzw. Tobramycin detektiert, was in weiteren Studien untersucht werden muss. Im Gegensatz dazu korrelierten die Nachweise der erworbenen Resistenzgene *sul2*, *floR*, sowie *mrsE* und *mphE* mit einer Trimethoprim/Sulfamethoxazol-, Chloramphenicol- bzw. Erythromycin-Resistenz. Mit Ausnahme eines Isolats, das trotz des Nachweises von *tet39* keine

Tetrazyklin-Resistenz zeigte (möglicherweise begründet in einem Aminosäureaustausch im Bereich der Tetrazyklin-Effluxpumpe), korrelierte der Nachweis der Gene *tet39* sowie *tetY* bei den restlichen *Al*-Isolaten mit dem Phänotyp. Die gemeinsame Lokalisation der Aminoglykosid-Resistenzgene *strA* und *strB* auf den jeweils gleichen Plasmiden wie die CP-Gene *bla_{OXA-23}* und *bla_{OXA-58}* konnte ebenfalls bereits bei tierischen CR *Ab*- und *Ap*-Isolaten gezeigt werden, was auf einen Austausch von Plasmiden zwischen verschiedenen *Acinetobacter*-Spezies hindeutet [45, 120, 140, 217].

6.3.2. *Acinetobacter johnsonii*

Die bereits 1986 von Bouvet *et al.* im Rahmen einer Taxonomiestudie beschriebene *Acinetobacter*-Spezies *Aj* wird selten im Rahmen von Infektionsgeschehen beim Menschen isoliert [43, 267]. Während mehrere Berichte über *Aj*-Isolate, die in der Regel einen sensiblen Phänotyp gegenüber den meisten Antibiotika aufweisen, aus Umwelt- und humanen Haut- sowie tierischen Proben existieren [57, 152, 359, 411], gibt es bisher wenige Nachweise von CR *Aj*-Stämmen aus der Humanmedizin und keine Berichte über solche Isolate aus der Veterinärmedizin. Die wenigen Berichte aus der Humanmedizin liefern v.a. Nachweise von OXA-58 sowie NDM-1-positiven *Aj*-Isolaten. Dies überschneidet sich mit den Ergebnissen unserer Untersuchungen, in denen einzig die β -Laktamase OXA-58 bei tierischen *Aj*-Isolaten gefunden wurde. In 2014 berichteten Rodríguez *et al.* (2014) erstmals über ein OXA-58- sowie PER-2-positives *Aj*-Isolat, das aus der Peritonealflüssigkeit eines Patienten in Argentinien isoliert wurde [340]. Zwei Jahre später beschrieben Montaña *et al.* (2016) die genetische Umgebung der Resistenzgene [267]. Ähnliche Berichte gibt es über humane *Aj*-Isolate aus China. Zong *et al.* (2013) wiesen NDM-1 bei zwei CS *Aj*-Isolaten aus dem Abwasser einer Klinik nach, während Feng *et al.* (2016) bei einem der beiden Stämme drei Jahre später neben *bla_{NDM-1}* auf einem weiteren Plasmid *bla_{OXA-58}* nachweisen konnten [122, 439]. Ebenfalls über ein NDM-1- und OXA-58-positives Isolat berichteten Tang *et al.* (2020), welches aus kommunalem Abwasser in China isoliert wurde. Im Gegensatz zu den vorherigen Funden aus China war dieses Isolat Carbapenem-resistent [385].

Alle vier tierischen *Aj*-Isolate, die *bla_{OXA-58}* auf einem Plasmid trugen, wiesen den gleichen genetischen Kontext um das Gen auf, der bereits mehrfach bei *Ab* und den humanen *Aj*-Isolaten aus Argentinien und China beschrieben wurde [119, 122, 267]. Im Gegensatz zu den humanen Isolaten waren die Tier-Isolate mit Plasmid-lokalisierter CP Imipenem-resistent. Einzig ein Isolat, das *bla_{OXA-58}* chromosomal trug, war nicht resistent gegenüber Imipenem. Zur

Ausbildung einer klinisch relevanten CR, die in der Hydrolyse des Antibiotikums durch OXA-58 begründet ist, kommt es nur, wenn es durch einen starken Promoter, wie IS*Aba3*, zu einer gesteigerten Expression der nachgeschalteten β -Laktamase kommt [315] oder weitere Resistenzmechanismen, wie Efflux-Pumpen (z.B. AdeABC), synergistisch wirken [246, 430]. Bei dem CS Isolat konnten weder die spezifische Promoterregion noch weitere Efflux-Pumpen gefunden werden, was den sensiblen Phänotyp gegenüber Imipenem trotz vorhandener Oxacillinase erklärt.

Das canine *Aj*-Isolat IHIT30696 aus Luxemburg zeigte eine phänotypische Resistenz gegenüber Tetrazyklin und Gentamicin, obwohl keine weiteren Resistenzdeterminanten nachgewiesen werden konnten. Auch *Aj* IHIT37774 von einem Kaninchen zeigte eine Gentamicin-Resistenz, obwohl kein korrespondierendes Resistenzgen nachgewiesen wurde. Die restlichen *Aj*-Isolate waren trotz des Vorhandenseins von *aac(3)-IIa* Gentamicin-sensibel. Die Nachweise weiterer erworbener Resistenzgene, u.a. *tet39*, *tetH*, *tetY* und *sul2* bei den anderen *Aj*-Isolaten korrelierten hingegen mit den phänotypischen Resistenzen. Die Nachweise der Resistenzgene überschneiden sich teilweise mit den Beobachtungen aus der Humanmedizin. So konnten bei allen CR *Aj*-Isolaten ebenfalls die Streptomycin-Resistenz vermittelnden Gene *strA* und *strB* sowie Sulfonamid-Resistenzgene *sul1* oder *sul2* nachgewiesen werden [122, 267, 385]. Das bei 80 % der tierischen Isolate vertretene Tetrazyklin-Resistenzgen *tet* sowie Varianten dieses Gens konnte jedoch nur bei dem humanen NDM-1 und OXA-58-positiven Isolat aus China nachgewiesen werden [122]. Sowohl bei dem humanen als auch bei den tierischen Isolaten ist das *tet*-Gen auf dem gleichen Plasmid wie das *bla_{OXA}*-Gen lokalisiert, was eine wirtsunabhängige Verbreitung von Resistenzplasmiden unterstreicht. Die humanen *Aj*-Isolate waren zudem Träger weiterer Resistenzgene wie *floR*, *msrE*, *mphE* oder *ereA* [122, 267, 385]. Die gemeinsame Lokalisation von Tetrazyklin- und CP-Resistenzgenen auf dem gleichen Plasmid wurde ebenfalls schon bei anderen *Acinetobacter* spp. tierischer Herkunft beschrieben [78, 217]. Ebenso wie bei *Al* kommt auch bei *Aj* eine Co-Transmission dieser Resistenzgene in Betracht.

Zwei weitere Publikationen berichten von CR *Aj*-Isolaten, die von Patienten auf den Philippinen sowie aus Japan isoliert wurden. Beide Isolate waren Träger der Metallo- β -Laktamase IMP-19 bzw. IMP-4 [259, 426]. Derzeit gibt es keine Berichte über *Acinetobacter* spp. von Tieren, die Träger von CP-Genen aus der IMP-Familie sind.

6.3.3. *Acinetobacter indicus*

Zwei Jahre nach der erstmaligen Beschreibung von *A. indicus* (*Ai*) als umweltassoziierte Spezies, isoliert in einer Hexachlorcyclohexan-Deponie in Indien im Jahr 2012, berichteten Bonnin *et al.* (2014) von einem CR *Ai*-Isolat, das Träger der β -Laktamase OXA-23 war [41, 245]. Das Oxacillinase-Gen war auf einem Plasmid lokalisiert und in das Transposon Tn2007 eingebettet [41]. Die ersten Berichte über CP-tragende *Ai* tierischer Herkunft stammen von Klotz *et al.* (2017). Im Rahmen einer Beprobung von 45 Kälbern konnten zwei *bla*_{OXA-23}-positive CR *Ai*-Stämme aus Nasentupfern isoliert werden [215]. Im Rahmen weiterer Studien der Arbeitsgruppe wurden sieben weitere OXA-23- sowie zwei OXA-58-positive *Ai*-Isolate aus Nasen- und Rektaltupfern sowie Sammelkotproben von Rindern nachgewiesen [214]. Ähnliche Beobachtungen konnten in der vorgelegten Arbeit gemacht werden: zwei der drei CP-positiven *Ai*-Isolate, die aus der Nase eines Rindes und der Milz eines Schafes isoliert wurden, waren Träger des Gens *bla*_{OXA-23} und ein weiteres Isolat aus dem Nasentupfer eines Kalbes trug *bla*_{OXA-58}. Während bei allen CR *Ai*-Isolaten die CP-Gene chromosomal als Teil eines vollständigen oder unvollständigen Tn2008 Kontexts vorlagen, zeigte das von Bonnin *et al.* (2014) beschriebene humane Isolat *bla*_{OXA-23} eingebettet in Tn2007 auf einem Plasmid [41, 214]. Diese Ergebnisse liefern erste Hinweise auf eine unabhängige Verbreitung der Oxacillinase-Gene innerhalb tierischer und humaner *Ai*-Stämme. Jedoch ist zu bedenken, dass die erst seit 2012 beschriebene Spezies aufgrund der schwierigen Differenzierung sowie der unbekanntenen klinischen Relevanz unentdeckt bzw. falsch zugeordnet werden kann, wenn keine MALDI-TOF MS-Analyse mit entsprechenden Spektren oder eine genetische Spezies-Differenzierung erfolgt [41, 113, 214, 215].

Des Weiteren berichteten Bonnin *et al.* (2014) von zwei *Ai*-Isolaten aus Rinderkot, die kein CP-Gen trugen und Carbapenem-sensibel waren. Dies weist, zusammen mit den Ergebnissen von Klotz *et al.* (2019) und unseren Untersuchungen auf eine weite Verbreitung der *Acinetobacter* Spezies *Ai* bei Rindern hin. So werden in hessischen Rinderpopulationen Prävalenzen von bis zu 12,6 % von *Ai* beschrieben, die nach *Ab* die am häufigsten isolierte *Acinetobacter* Spezies ist [214].

Darüber hinaus konnten bei allen tierischen *Ai*-Isolaten weitere erworbene Resistenzgene nachgewiesen werden. So sind alle OXA-23 und OXA-58 dieser Studie sowie sechs der neun *bla*_{OXA-23} und beide *bla*_{OXA-58}-positiven *Ai*-Isolate der Studien von Klotz *et al.* (2017 und 2019)

Träger der Streptomycin-Resistenzgene *strA* und *strB* [214, 215]. Ebenfalls wurden Resistenzgene sowie Varianten dieser, die Resistenzen gegenüber Aminoglykosiden, Tetrazyklinen, der Sulfonamid-Trimethoprim-Kombination sowie Phenicolen vermitteln, wie *aac*, *aad*, *aph*, *tetA*, *tetX*, *tetY*, *floR* und *dfrA1*, in den tierischen *Ai*-Isolaten gefunden. Wie bereits bei *Al* erwähnt, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob *strA/strB* und *aph* eine phänotypische Resistenz gegenüber Strepto-, Kana- bzw. Neomycin vermitteln, da diese Wirkstoffe nicht getestet wurden. Streptomycin wird in der Regel in der Tiermedizin bei lebensmittelliefernden Tieren wie Rindern, Schweinen und Schafen angewendet (<https://www.ema.europa.eu/en>). In Deutschland gibt es jedoch derzeit kein zugelassenes Präparat (<https://vetidata.de/>). Kana- und Neomycin hingegen werden neben der Rinder- auch in der Kleintiermedizin, insbesondere bei Infektionen des Magen-Darm-Traktes eingesetzt. Es wäre also denkbar, dass es aufgrund der Anwendung dieser Antibiotika zu einer durch *aph* bzw. *strA/B* bedingten Co-Selektion von CP-Genen kommen kann.

Wie bereits bei *Ai*-Isolaten von Tieren beschrieben, waren auch die *bla_{OXA-23}*-Gene dieser Studie in einen Tn2008-Kontext im Chromosom eingebettet. Keiner der Stämme, die ein durch das IS-Element *ISAcsp2* unterbrochene Tn2008-Struktur aufwiesen, waren Carbapenem-resistent. Einzig drei Isolate der Studien von Klotz *et al.* (2017 und 2019), die ein intaktes Tn2008 aufwiesen, waren Imipenem-resistent [214, 215]. Das Transposon Tn2008, welches weltweit maßgeblich an der Verbreitung von *bla_{OXA-23}* bei *Ab* beteiligt ist [287], wurde bereits bei weiteren *Acinetobacter* spp. von Tieren, wie *A. variabilis* [307], *A. gandensis* [370] und *Al* (diese Arbeit, Kapitel 6.3.1) beschrieben. Poirel *et al.* (2012) berichteten ebenfalls über die Unterbrechung von Tn2008 durch *ISAcsp2* [307]. Ein *Ai*-Isolat (IHIT34477; 2017) dieser Studie zeigte den gleichen genetischen Kontext des *bla_{OXA-58}*-Gens, wie ein im Jahr 2016 isoliertes OXA-58-positives *Ai*-Isolat aus den Studien von Klotz *et al.* (2019). Das OXA-58-Gen war bei beiden Isolaten von einer unvollständigen sowie vollständigen Kopie von *ISAb3*, dem Gen *araC* für ein Transkriptionsregulationsprotein sowie einer unvollständigen Kopie des Lysin-Transportergens *lysE* umgeben (Kapitel 5.2.2) [214]. Trotz der IS-Elemente und der Promoter-Sequenz innerhalb des *ISAb3* vermittelte der Genotyp, wie bereits bei humanen und tierischen *Ap*-Isolaten gezeigt, keine phänotypische CR (Kapitel 6.2) [118]. Hingegen waren bei OXA-58-positiven und Carbapenem-resistenten *Acinetobacter* spp.-weitere IS-Elemente in die Umgebung des CP-Gens integriert [129, 280].

6.3.4. *Acinetobacter species*

Im Zuge der Arbeit konnten zwei weitere OXA-58-positive *Acinetobacter species* (*As*) bei einem Rind und einem Schaf nachgewiesen werden, die keine Carbapenem-Resistenz aufwiesen. Die MALDI-TOF MS-Analyse identifizierte beide Isolate (IHIT36143 und IHIT36460) als *Al*, jedoch mit einem geringen Score von 1,706 bzw. 1,701 (gelber Score). Es wurde versucht, die Spezies mittels *Tetra Correlation Search* (TCS)-Analyse (<http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/>), bei der das jeweilige Genom mit einer Datenbank an Referenzgenomen verglichen wird, zu identifizieren. Als sichere Zuordnung gilt ein Score von >0,999 während Ergebnisse von <0,989 als unsicher gelten. Das Isolat IHIT36143 zeigte eine hohe Ähnlichkeit mit dem *Al*-Referenzstamm NCTC 5866 und dessen Derivat CIP 64.10 (Accession-Nr. NZ_CAADHN000000000; Score 0,99842), mit *As* NIPH 713 (Accession-Nr. N8TW14; Score 0,99814) sowie zu weiteren *Al*- und *As*-Isolaten. Nemeč *et al.* (2019) zeigten in einer Studie, dass mehrere von Bouvet und Grimont als *Al* identifizierte Stämme, darunter auch der *Al*-Typstamm NCTC 5866 sowie dessen Derivat CIP 64.10 in zwei unterschiedlichen Gruppen clustern, sodass die Autoren eine Aufteilung in *Al* und *A. pseudolwoffii* empfahlen [281]. Die Autoren ordneten den Stamm CIP 64.10 der Spezies *A. pseudolwoffii* zu, der möglicherweise auch unser bovines Isolat IHIT36143 angehört. Die TCS-Ergebnisse für das ovine Isolat IHIT36460 zeigten ein noch unklarerer Ergebnis. Dieses *As*-Isolat wies Ähnlichkeiten zu *A. idrijaensis* MII (Score 0,93901), verschiedenen *Al*-Isolaten (Score zwischen 0,93426 und 0,93087) und verschiedenen *As*-Isolaten (Score zwischen 0,93434 und 0,93179) auf. Eine eindeutige Spezieszuordnung war nicht möglich. Das Isolat IHIT36460 wies den gleichen genetischen *bla*_{OXA-58}-Kontext wie das tierische *Al*-Isolat IHIT33561 dieser Studie auf, der u.a. bereits bei der klinisch relevantesten Spezies *Ab* beschrieben wurde (Kapitel 6.3.1) [118]. Im Gegensatz dazu ist das OXA-58-Gen bei dem Isolat IHIT36143 in zwei unvollständige Elemente von *ISAb*₃ eingebettet (Kapitel 5.2.2). IHIT36143 trug die Resistenzgene *mphE*, *msrE* und *tet39*, und IHIT36460 *aac(3)-IIa*, *mphE*, *msrE*, *floR*, *sul2* und *tet39*, die mit Ausnahme von Gentamicin mit der phänotypischen Resistenz der Isolate korrelierten. IHIT36460 trug ebenfalls die Gene *strAB* und *aph(3')-Ia*. Keines dieser Resistenzgene wurde auf dem *bla*_{OXA-58}-Plasmid nachgewiesen. Die Isolate der unbekanntenen *As* zeigen somit die gleichen erworbenen Resistenzmechanismen wie die tierischen, CP-positiven *Al*-, *Aj*- und *Ai*-Isolate (Kapitel 5.2.1).

Um die klinische Relevanz sowie die Verbreitung dieser Isolate in der Tiermedizin und die mögliche Bedeutung für die Humanmedizin abschätzen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen zur Spezieszugehörigkeit und zur Transferierbarkeit der CP-Gene.

6.3.5. Zusammenfassung OXA-23- und OXA-58-positive *Acinetobacter* spp. tierischer Herkunft

Insbesondere bei *Ab*-Isolaten von Kleintieren gibt es große phylogenetische Ähnlichkeiten sowie Überschneidungen hinsichtlich der Resistenzgenausstattung zu humanen Isolaten. Die Nachweise erworbener CR-Gene, die in Typ, genetischer Organisation und Lokalisation auf dem Chromosom oder Plasmiden häufig den in der Humanmedizin klinisch relevanten Spezies, wie *Ab*, *Ap* oder *A. nosocomialis* gleichen, sind von großer epidemiologischer Bedeutung [118, 129, 287]. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verschiedenen Resistenzdeterminanten zwischen *Acinetobacter species* von Menschen und Tieren übertragen werden. Umso wichtiger ist es zu verstehen, wo die ursprüngliche Quelle dieser Resistenzdeterminanten liegt und welche äußeren Faktoren deren Übertragung möglicherweise begünstigen. Der gleichzeitige Nachweis von weiteren, z.T. auf Plasmiden mit den CP-Genen co-lokalisierten Resistenzgenen indiziert einmal mehr, dass nicht nur die Gabe von Carbapenem-Antibiotika, deren Einsatz mittlerweile in der Veterinärmedizin gemäß Durchführungsverordnung (EU) 2022/1255 verboten ist, co-selektierend auf die Verbreitung von CR-Resistenzdeterminanten wirken kann. Neben dem verantwortungsvollen Einsatz von Antibiotika ist auch auf eine Einhaltung einer guten Hygienepraxis sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin zu achten, um die Verbreitung von resistenten *Acinetobacter* spp. zu vermeiden. Auch wenn die Pathogenität dieser non-*baumannii* *Acinetobacter* nach heutigem Kenntnisstand gering ist, so können sie maßgeblich an der Verbreitung der CP-Gene *bla*_{OXA-23} und *bla*_{OXA-58} beteiligt sein und unter bestimmten Umständen auch als opportunistische Erreger Infektionen hervorrufen.

6.4. Einfluss der Resistenz auf bakterielle Fitness, Biofilmbildung und Virulenz

Zusätzlich zu den Untersuchungen zur Verbreitung von CP-Genen bei *Acinetobacter* spp., insbesondere *Ab*, aus klinischem Untersuchungsgut von Tieren, sollte die vorliegende Arbeit Hinweise darauf liefern, welchen Einfluss die CR auf die (i) bakterielle Fitness im Rahmen eines kompetitiven Wachstums, (ii) Biofilmbildung und (iii) Virulenz von *Ab*-Isolaten hat. Dazu wurden acht *Ab* Stamm-Triplets (Wildtyp, plasmidfreie Variante und Transformante) in den entsprechenden Assays (Kapitel 5.2.5, 5.2.6 und 5.2.7) untersucht.

6.4.1. Einfluss der CR auf die bakterielle Fitness von *Acinetobacter baumannii*

Zur Überprüfung des Einflusses der CR auf die bakterielle Fitness wurden kompetitiv die gleichen Konzentrationen eines CR und eines CS *Ab* angezüchtet, ausplattiert und die KfE bestimmt (Kapitel 5.1.4). Anschließend wurden anhand der Wachstumsraten Rückschlüsse auf die bakterielle Fitness der CR *Ab* und somit des Resistenz-Plasmids gezogen. Mit Ausnahme von zwei Ergebnissen zeigt das CS Isolat im Vergleich zum CR Isolat eine deutlich höhere *in vitro*-Fitness. Dies deckt sich mit Studien, dass antimikrobielle Resistenz mit einem Verlust der Fitness einhergehen kann, wie bereits für Colistin- und Ciprofloxacin-resistente *Ab* in mehreren Studien gezeigt wurde [13, 81, 274, 366, 412]. Neben chromosomalen Mutationen, die zu einer antimikrobiellen Resistenz führen, scheinen auch Plasmid-vermittelte Resistenzen einen Einfluss auf die bakterielle Fitness zu haben. Die Ursachen für den mit dem Erwerb von Resistenzplasmiden einhergehenden Fitness-Verlust oder -Vorteil ist multifaktoriell und von dem jeweiligen Plasmid abhängig. Deutlich häufiger wird durch die Aufnahme eines Plasmids, das Träger von Resistenzgenen sein kann, von einem Verlust der bakteriellen Fitness berichtet [350, 412]. Für den Fitness-Verlust werden verschiedene Ursachen, wie eine verstärkte Expression erworbener Plasmidgene und einer damit einhergehenden verminderten Expression oder Translationseffizienz chromosomaler Gene aufgeführt. Hingegen kann es durch kompensatorische Mutationen zu einer Steigerung der *in vitro*-Fitness kommen [81, 351]. Smani *et al.* (2012) konnten zeigen, dass Ciprofloxacin-resistente *Ab*-Isolate in einem kompetitiven Wachstum mit sensiblen Stämmen eine geringere Wachstumsrate zeigten. Diese Beobachtungen stützen sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, jedoch war die Ciprofloxacin-Resistenz in der gesteigerten Expression einer Efflux-Pumpe begründet und nicht in erworbenen Resistenzgenen [368]. In einer weiteren Studie von 2013 zeigten die Autoren, dass ein Verlust des äußeren Membranproteins Omp33, welches mit CR bei *Ab* assoziiert ist, auch mit einem Verlust der bakteriellen Fitness einhergeht [366]. San Millan *et al.* (2017) berichteten, dass die Aufnahme von Plasmiden grundsätzlich mit einem negativen Effekt auf die Fitness einhergeht, der jedoch durch kompensatorische Mutationen nach mehreren Generationen ausgeglichen werden kann [350]. Ob die Fitnessverluste der *Ab*-Isolate dieser Studie durch entsprechende Mutationen kompensiert werden könnten, bedarf weiterer Untersuchungen. Ebenfalls müssen, um die Gründe der verminderten Fitness der CR *Ab*-Isolate zu eruieren, weitere Untersuchungen zum Einfluss der Aufnahme von Resistenz-Plasmiden auf die Expression, insbesondere chromosomaler Stoffwechsel-Gene durchgeführt werden [81]. Jedoch gab es vereinzelt auch einen Fitness-Vorteil bei Aufnahme des Resistenz-Plasmids. So

zeigten bei der kompetitiven Anzucht der Wildtypen der *Ab*-Isolate IHIT29027 und IHIT34486 mit dem *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978 die CR Isolat eine höhere *in vitro*-Fitness als der sensible Referenzstamm. Dies stützt die Aussagen vorheriger Studien, dass der Einfluss der antimikrobiellen Resistenz auf die bakterielle Fitness von vielen Faktoren wie u.a. vom *Ab*-Isolat (Sequenztyp, klonale Linie) und/oder dem Resistenz-Plasmid abhängt [81, 351]. Bis dato gibt es lediglich Studien, die den Einfluss chromosomaler Mutationen, die antimikrobielle Resistenzen vermitteln, auf die Fitness von *Ab*-Isolaten untersuchen und die meist einen durch die Resistenz bedingten Verlust der Fitness beschreiben [26, 81, 184, 236, 274, 366]. Zur Klärung, ob die Aufnahme von Plasmiden, die Träger anderer CR-Gene (z.B.: Metallo- β -Laktamasen) sind, sich negativ auf die Fitness von *Ab* auswirkt, bedarf es weiterer Studien.

6.4.2. Einfluss der CR auf die Biofilmbildung von *Acinetobacter baumannii*

Die Bildung von Biofilmen auf sowohl abiotischen wie auch biotischen Oberflächen zählt bei *Ab* zu einer der effizientesten Virulenzstrategien und begründet wesentlich den Erfolg von *Ab* als Erreger nosokomialer Infektionen. Der Biofilm ermöglicht *Ab* z.B. ein Überleben innerhalb eines Endotrachealtubus oder bietet dem Bakterium Schutz vor der Abtötung durch Desinfektionsmaßnahmen [164, 235]. Um die Fähigkeit zur Biofilmbildung der tierischen Isolate einschätzen zu können und den Einfluss der CR auf die Biofilmbildung einzuordnen, wurden tierische und humane *Ab*-Isolate sowie die *Ab*-Referenzstämme ATCC 17978 und ATCC 19606 vergleichend untersucht (Kapitel 5.2.6). Alle getesteten Stämme zeigten eine höhere Biofilmbildung im Mangelmedium M63, was die in der Literatur beschriebene Fähigkeit der Persistenz von *Ab* auch bei schwierigen Bedingungen, so auch bei Trockenheit und Temperaturschwankungen, widerspiegelt [235]. Wie bereits in Kapitel 6.4.1 erläutert, wird in Zusammenhang mit dem Erwerb antimikrobieller Resistenzen oft von einem Verlust der bakteriellen Fitness berichtet [13]. Tatsächlich zeigten auch bei uns die plasmidfreien Varianten eine signifikant höhere Biofilmbildung als die isogenen Wildtypstämme. Dies kann bedeuten, dass die Antibiotika-Resistenz einen negativen Einfluss auf die Biofilmbildung der Isolate hat. Rodríguez-Baño *et al.* (2007) berichteten, dass *Ab*-Isolate mit stärkerer Biofilmbildung seltener Imipenem-resistent waren [341]. Möglicherweise sind Imipenem-resistente gegenüber sensiblen Stämmen weniger auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung angewiesen, um damit im Krankenhausumfeld überleben zu können. Im Gegensatz dazu beschrieben Studien immer wieder einen Zusammenhang zwischen antimikrobieller Resistenz und Ausmaß der Biofilmbildung. So zeigten *Ab*, die in hohem Maße Biofilm bildeten, meist auch einen multiresistenten Phänotyp [22, 130]. Yang *et al.* (2019) berichteten über eine

vermehrte Biofilmbildung bei Aminoglykosid-resistenten *Ab*. Im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen wurde in der zitierten Literatur die Biofilmbildung von multiresistenten und non-multiresistenten Isolaten verglichen, ohne deren Zugehörigkeit zu ICs oder Sequenztypen zu berücksichtigen. Auch bezog man sich häufig auf einen multiresistenten Phänotyp, der jedoch keine Carbapenem-Resistenz umfasste [427]. Der Zusammenhang zwischen Multiresistenz und Biofilmbildung kann demnach auch in unseren Isolaten existieren, jedoch zeigen die isogenen CS Isolate (plasmidfreie Variante) eine noch stärkere Biofilmbildung als die resistenten Isolate (Wildtyp und Transformante). Um diesen möglichen Zusammenhang zu verifizieren, bedarf es zukünftiger Untersuchungen an einer größeren Anzahl von *Ab*-Isolaten mit unterschiedlichen Resistenzprofilen, auch unter Einbeziehung von Gen-Expressionsstudien.

In der Literatur werden bei *Ab* verschiedene Gene, darunter *ompA*, *bap*, *blp1/2*, oder *csuABCDE* mit der Biofilmbildung in Verbindung gebracht [235]. Um die Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp der tierischen *Ab*-Isolate zu bestimmen, wurden die Genome auf diese Gene untersucht (Kapitel 5.2.3). *Bap*, ein Gen, das in vielen Bakterien mit der Biofilmbildung korreliert und auch bei *Ab* nachgewiesen wurde, konnte in keinem der tierischen Isolate nachgewiesen werden. Mit Ausnahme des Isolats IHIT29027 trugen alle Isolate *blp2* [151] sowie Gene des Pilusystems *csuABCDE* [235, 390]. Dies begründet die sehr geringe Biofilmbildung des Isolats IHIT29027, wirft jedoch die Frage nach weiteren möglichen Genen, die die Biofilmbildung beeinflussen, auf. Des Weiteren war keines der biofilmassoziierten Gene *blp1/2* und *csuABCDE* auf den gleichen Plasmiden wie die CR-Gene lokalisiert. Somit wird die Annahme, dass der Erwerb antimikrobieller Resistenzen mit einem Verlust der Biofilmbildung, u.a. durch eine verminderte Expression chromosomaler Gene einhergeht, gestützt [350, 412].

6.4.3. Einfluss der CR auf die *in vivo*-Virulenz von *Acinetobacter baumannii*

Ab ist ein opportunistischer Infektionserreger, der insbesondere bei Menschen mit Grunderkrankungen und immunsupprimierten Patienten zu Infektionen führt. Damit es jedoch zu einer Infektion dieser Patienten kommt, muss der Erreger eine gewisse (Rest-) Virulenz besitzen [262]. Als Alternative zu Säugetiermodellen hat sich in den letzten Jahren das Infektionsmodell der großen Wachsmotte *Galleria (G.) mellonella* etabliert, um Rückschlüsse auf die Virulenz verschiedener Bakterienspezies, so auch von *Ab*, für den Menschen zu ziehen [20, 300]. Um den Einfluss der CR auf die Virulenz tierischer *Ab*-Isolate bestimmen zu können, wurden tierische und humane CR *Ab*-Isolate sowie der CS *Ab*-Referenzstamm ATCC 17978 in

diesem Modell vergleichend untersucht (Kapitel 5.2.7 und Tabelle 14). Wir konnten zeigen, dass Isolate, die Träger eines Oxacillinase-Gens auf einem Plasmid waren (Wildtyp), eine höhere Virulenz zeigten als das entsprechende CS Isolat (plasmidfreie Variante), auch wenn auf den jeweiligen Plasmiden keine VAGs lokalisiert waren. Ebenfalls zeigten die Larven der Wachsmotte nach der Infektion mit ATCC 17978 + Resistenz-Plasmid (Transformante) eine höhere Sterblichkeit als mit dem isogenen Isolat ohne Plasmid. Dies weist auf eine Steigerung der Virulenz, bedingt durch den Erwerb eines Plasmids und/oder von antimikrobiellen Resistenzgenen, hin. Im Gegensatz dazu berichteten Esterly *et al.* (2014) über eine höhere Virulenz von CS *Ab*-Isolaten im Mottenmodell. Sie verglichen die Sterberaten von OXA-24/40-positiven und -negativen *Ab*-Isolaten, die zum Teil mit Ausbruchsgeschehen assoziiert waren. Die OXA-24/40-negativen nicht-Ausbruchsisolate zeigten eine höhere Sterblichkeit als die OXA-24/40-positiven Ausbruchsisolate [114]. Die Unterschiede lassen sich möglicherweise darin begründen, dass die Isolate in der Studie von Esterly *et al.* (2014) zufällig aus einer Stichprobe von *Ab*-Isolaten des *Northwestern Memorial* Krankenhauses in Chicago ausgewählt wurden und die Virulenz nicht für das isogene Isolat, das nicht Träger des Resistenz-Plasmids war, vergleichend untersucht wurde. In einer weiteren Studie von 2019 zeigten Espinal *et al.* (2019), dass die durch Oxacillinasen bedingte CR bei *Ab* keinen Einfluss auf die Virulenz hat. Sie untersuchten u.a. den Einfluss von OXA-23, OXA-24/40 und NDM-2, indem sie die CS *Ab*-Isolaten, die vor einer Impipenem-Therapie isoliert wurden mit den isogenen CR Isolate im *Caenorhabditis elegans*-Infektionsmodell [112]. Im gleichen Jahre zeigen Chusri *et al.* (2019) ebenfalls, dass die CR keinen Einfluss auf die Virulenz von *Ab* im *G. mellonella*-Modell hat. Jedoch wurden die der CR zugrunde liegenden Mechanismen nicht weiter bestimmt [66]. Als mögliche Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien kommen (i) die unterschiedlichen Infektionsmodelle (Fadenwurm vs. Wachsmotte), (ii) die Unterschiede in den eingesetzten Isolaten (prä-/posttherapeutisch Imipenem vs. *Curing*/Transformation) sowie (iii) neben den Resistenzgenen weitere Gene, die mit der Virulenz von *Ab* assoziiert sind, in Betracht. Die bakterielle Virulenz wird durch Gene, die Virulenzfaktoren kodieren, bestimmt. Dies kann einzelne Gene umfassen, die z.B. für ein Toxin kodieren und so maßgeblich die Virulenz eines Erregers bestimmen. Oder es ist ein Zusammenspiel mehrere Gene, wie es nach aktuellem Stand bei *Acinetobacter* der Fall ist. Die Virulenz von *Ab* liegt vermutlich in einer *persist and resist*-Strategie. Der Erreger zeichnet sich durch die exzellente Fähigkeit zur Anpassung an und Persistenz in unterschiedlichen Umweltsituationen aus, was aufgrund eines Zusammenspiels mehrerer Virulenzfaktoren möglich ist [164].

Um die Ergebnisse aus den *G. mellonella*-Infektionen mit den genetischen Determinanten zu vergleichen, wurden die VAGs der getesteten *Ab*-Isolate analysiert. Da alle tierischen *Ab*-Isolate ein ähnliches VAG-Profil aufwiesen und keines der Gene auf den jeweiligen Resistenz-Plasmiden lokalisiert war, konnten keine Rückschlüsse auf die unterschiedliche Virulenz getroffen werden. So konnten bei allen Isolaten die Gene *bauA*, *pld123* sowie *znuABC* nachgewiesen werden, die bereits in der Literatur mit der Sterblichkeit im *G. mellonella*-Infektionsmodell in Verbindung gebracht werden konnten [131, 135, 375]. Um andere Gene, die die Virulenz der *Ab*-Isolate beeinflussen, zu identifizieren, bedarf es weiterer Studien, die beispielsweise auf Basis definierter Gen-Mutationen Rückschlüsse erlauben. So konnten Gerson *et al.* (2019) in einer Studie in 2019 zeigen, dass Colistin-resistente *Ab*-Isolate, die eine Mutation im *pmrB* Gen aufwiesen, eine höhere Virulenz im Mottenmodell zeigten, als isogene Colistin-sensible Isolate [143]. PmrB ist Teil des PmrA/PmrB Zweikomponentensystems, das bei verschiedenen Gram-negativen Bakterien als Hauptregulator der LPS-Modifikation gilt.

6.5. Limitationen

Die Ergebnisse sowie deren Diskussion sind, wie bei jeder wissenschaftlichen Arbeit, unter der Berücksichtigung einiger Limitationen zu betrachten. Die Untersuchungen ermöglichen lediglich einen Hinweis auf die Prävalenz von CR *Acinetobacter* spp. aus dem klinischen Untersuchungsgut von Tieren. In die Untersuchung aufgenommen wurden alle *Acinetobacter*-Isolate, die seit 2000 in der Routinediagnostik des IHIT in Gießen isoliert wurden. Es wurde weder ein Probenstichplan hinsichtlich der Wirtsspezies, des Probenmaterials oder der geographischen Herkunft befolgt. Die Ergebnisse können also stark von den Einsendern und der Art des eingesandten Probenmaterials abhängen. Des Weiteren wurden CR *Acinetobacter*-Isolate aus einem kommerziellen veterinärmedizinischen Labor mit in die Untersuchungen aufgenommen, während von dort keine sensiblen Isolate inkludiert wurden. Ebenfalls wurden nicht alle Isolate phylogenetisch untersucht, sodass mögliche unentdeckte klonale Geschehen die Prävalenz verzerrt haben könnten.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der funktionellen Assays ist zu beachten, dass die Stichprobe zu klein ist, um in Hinblick z.B. des Sequenztyps eine abschließende Aussage treffen zu können und einen möglichen stammspezifischen Effekt auszuschließen. Bei ähnlichen zukünftigen Studien muss die Stichprobe vergrößert werden, um eine detailliertere Gruppierung nach identischen phäno- und genotypischen Eigenschaften vornehmen zu können. So unterscheiden sich in der vorliegenden Studie die *Ab*-Isolate des ST1^{Past} in der klinischen

Herkunft, dem Wirt und der erworbenen Oxacillinase, sodass man keine generalisierte Aussage über Eigenschaften von Isolaten dieses ST treffen kann.

Nicht außer Acht zu lassen ist, dass bei den Laborversuchen zur Abgabe der Resistenz-Plasmide (*Curing*) die Isolate lediglich mittels Makrorestriktionsanalyse und anschließender PFGE auf Klonalität untersucht wurden. Unter anderem aus Kostengründen konnte keine Ganzgenomsequenzierung der Stamm-Triplets erfolgen. Es ist somit nicht auszuschließen, dass neben der Abgabe des Resistenz-Plasmids weitere chromosomale Veränderungen z.B. in Form von Mutationen stattgefunden haben, die ebenfalls einen Einfluss auf die bakterielle Fitness, Biofilmbildung und/oder Virulenz haben könnten. Dies sollte in ähnlichen Studien durch Vergleiche der Ganzgenom-Daten, wenn möglich, ausgeschlossen werden.

Die zur Abschätzung der Virulenz von *Ab* genutzten *Galleria mellonella*-Larven stammten nicht aus standardisierten spezifisch-pathogen freien (SPF) Züchtungen, sondern von einem kommerziellen Futterhandel. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass die Larven, wie bereits bekannt ist, mit anderen GN Keimen, wie z.B. *Proteus* spp., infiziert waren. Um diesen Einflussfaktor möglichst zu minimieren wurde bei jeder Larvencharge eine Kontrollgruppe in den Versuchen mitgeführt. Wenn mehr als 80 % aus dieser Charge verstarben, wurde der Versuch wiederholt und die Daten nicht verwendet. Die Reproduzierbarkeit der Daten wurde außerdem durch das dreifache Wiederholen der Versuche geprüft.

Zur Beurteilung der VAGs für die hier getesteten Phänotypen ist nicht allein das Vorhandensein dieser Gene, sondern auch die Expression von Bedeutung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *Acinetobacter* spp.-Isolate auf Virulenz-Determinanten, die im Zusammenhang mit der Virulenz und Biofilmbildung bei *Acinetobacter* spp. beschrieben werden, untersucht. Derartige Assoziationsstudien werden gleichermaßen in der aktuellen Literatur beschrieben und liefern wertvolle Hinweise zur Virulenz von *Acinetobacter* spp. Bei Anwesenheit von Genen könnten zusätzlich vergleichende Expressionstudien einen gesicherten Rückschluss auf eine Genotyp-Phänotyp Korrelation liefern.

7. Zusammenfassung

Auch wenn *A. baumannii* (*Ab*) als einer der wichtigsten Erreger nosokomialer Infektionen in der Humanmedizin gilt, ist nur wenig über das potenzielle Reservoir sowie die Rolle von Tieren als Träger und Überträger dieser Spezies bekannt. Anhand dieser Arbeit sollten Informationen über das Vorkommen multiresistenter, insbesondere Carbapenem-resistenter (CR) *Acinetobacter* spp. aus dem klinischem Untersuchungsmaterial von Tieren gesammelt werden. Ziel war es, tierische *Acinetobacter* spp.-Isolate genotypisch und phänotypisch zu charakterisieren. Hierzu wurde neben dem phylogenetischen Hintergrund, dem antimikrobiellen Resistenzprofil und erworbenen Resistenz-Determinanten auch der Einfluss der Carbapenem-Resistenz auf die bakterielle Fitness, Biofilmbildung und Virulenz untersucht. Im Zeitraum von November 2000 bis September 2018 wurden insgesamt 1.540 *Acinetobacter* spp., darunter 821 *A. baumannii*, die am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere im Rahmen der Routinediagnostik aus klinischem Probenmaterial, v.a. von Kleintieren, isoliert wurden, sowie Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp. eines kommerziellen veterinärmedizinischen Labors und zu Vergleichszwecken inkludierte humane CR *Acinetobacter* spp. untersucht. Die Speziesidentifikation erfolgte mithilfe der MALDI-TOF MS-Analyse und PCR, die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde per VITEK2 und für Carbapenem-Antibiotika per E-Test bestimmt. Der Nachweis von Carbapenemase-Genen erfolgte mittels PCR. Unter 1.483 *Acinetobacter* spp. von Tieren konnten 74 (5 %) Isolate, darunter 48 (3,2 %) *Ab*, acht (0,5 %) *A. pittii*, acht (0,5 %) *A. lwoffii*, fünf (0,3 %) *A. johnsonii*, drei (0,2 %) *A. indicus* und zwei (0,1 %) *A. species*, als Träger von Carbapenemase-Genen identifiziert werden. OXA-58 trat als häufigste Carbapenemase auf (n=47 Isolate), gefolgt von OXA-23 (n=24) sowie OXA-72, OXA-143 und NDM-1 (je 1 Isolat). Die CR Isolate konnten von Hunden (n=39; 52,7 %) und Katzen (n=18; 24,3 %), lebensmittelliefernden Tieren (n=10; 13,5 %), Heimtieren (n=4; 5,4 %) und Pferden (n=2; 2,7 %) sowie von einer Klimaanlage einer Kleintierklinik (1,4 %) u.a. aus dem Urin (n=19; 25,7 %), dem Respirationstrakt (n=17; 23 %) und Wunden (n=10; 1,4 %) isoliert werden. Die meisten Carbapenemase-positiven *Acinetobacter* spp. waren Träger weiterer erworbener Resistenzgene, wie *str*, *aac* oder *aad*, *tet*, *sulI/2* und ihren Varianten. Bei CR *Ab*-Isolaten konnten diese erworbenen Resistenzgene teilweise innerhalb von Resistenzinseln nachgewiesen werden. So trugen zehn der zwischen 2016 und 2018 isolierten ST1^{Past}-OXA-58-positiven *Ab*-Isolate *AbaR3*-like bzw. ein Isolat eine *AbaR10*-like Insel. Vor 2016 isolierte *Ab* trugen dagegen keine Resistenzinseln. Der Erwerb der Resistengene spiegelte sich meist in einem multiresistenten Phänotyp wider. Jedoch zeigten

nicht alle Isolate, die Träger eines Carbapenemase-Gens waren auch eine phänotypische Resistenz gegenüber den getesteten Carbapenemen. Dies war (i) in dem Fehlen von expressionssteigernden Insertionselementen, (ii) partiellen Deletionen in relevanten genetischen Strukturen oder (iii) in dem Fehlen von synergistischen Resistenzmechanismen, wie Efflux-Pumpen, begründet.

Anhand einer MLST-Analyse (Pasteur-Schema) konnten die tierischen *Ab*-Isolate sechs unterschiedlichen Sequenztypen (STs), darunter den weltweit in der Humanmedizin verbreiteten Klonen ST1^{Past} und ST25^{Past}, zugeordnet werden. Des Weiteren korrelierte sowohl die Verteilung der erworbenen Resistenzgene als auch die der Virulenz-assoziierten Gene mit den jeweilig zugeordneten STs. Mittels einer *core genome* MLST (cgMLST) konnten die CR *Ab* zwölf unterschiedlichen Clustern (CTs) zugeordnet werden. Der Großteil der ST1^{Past}-OXA-58-positiven *Ab* (93,1%) wurde dem CT-1808 zugeordnet. In Isolaten aus Deutschland dominierte bei OXA-23-*Ab* der CT-2177, während Isolate auf Frankreich und Italien acht unterschiedlichen CTs angehörten. Dies deutet auf eine klonale Verbreitung des CT-1808 bzw. CT-2177 bei Haustieren in Deutschland hin, wohingegen die Verbreitung von OXA-positiven *Ab* in Frankreich und Italien unabhängig von diesem Geschehen zu sein scheint.

Der genetische Kontext der Carbapenemase-Gene, sowohl bei *Ab* als auch bei non-*baumannii Acinetobacter* zeigte Überschneidungen mit der Struktur von CR Isolaten, die bei nosokomialen Infektionen beim Menschen auftreten. Besonders die Einbettung innerhalb mobiler genetischer Elemente wie *bla*_{OXA-23} in die Transposonstruktur Tn2008 sowie *bla*_{NDM-1} in Tn125 liefern Hinweise auf einen möglichen Austausch entsprechender Resistenzgene zwischen *Acinetobacter* spp. tierischer sowie humaner Herkunft.

Im Rahmen der vergleichenden Untersuchung des Einflusses der CR auf die bakterielle Fitness zeigte das Tragen des Resistenz-Plasmids einen negativen Einfluss auf die Fitness von *Ab*. Gleiches lässt sich bei der Biofilmbildung beobachten: so zeigten CR *Ab* eine signifikant niedrigere Biofilmbildung als die jeweils isogenen plasmidfreien Varianten. Im Gegensatz dazu zeigten die CR *Ab*-Isolate im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell einen deutlich virulenteren Phänotyp als die entsprechenden Carbapenem-sensiblen Varianten. Der Erwerb von Carbapenemase-Genen hat nach den vorliegenden Daten einen negativen Einfluss auf die bakterielle Fitness und Biofilmbildung, nicht jedoch auf die Virulenz der Isolate.

Anhand phylogenetischer Analysen konnte gezeigt werden, dass die tierischen Isolate dieser Arbeit vermutlich eine eigene Gruppe repräsentieren, die jedoch mit humanen Isolaten aus Australien, Südkorea, Thailand, Tschechien und den USA, clustern. Die für die Analysen verfügbaren Genome humaner *Ab* aus Europa wiesen dagegen nur geringe Ähnlichkeiten zu

den veterinärmedizinischen Isolaten auf. Ähnlich wie in der Humanmedizin haben sich offenbar auch in der Tiermedizin erfolgreiche Klone etabliert, die sich nosokomial im veterinärklinischen Umfeld verbreiten. Es muss angenommen werden, dass *Ab*-Isolate und/oder deren Resistenzdeterminanten zwischen Tieren und Menschen übertragen werden. Während Tiere initial als Empfänger fungierten, ist inzwischen eine gegenseitige Übertragung nicht auszuschließen. Eine gezielte Überwachung und Charakterisierung multiresistenter *Ab*, insbesondere von CR Isolaten, in der Veterinärmedizin sollte daher in Betracht gezogen werden. Dies ist zudem unerlässlich, um in Veterinärkliniken effektive Interventionsmaßnahmen zur Reduzierung von Infektionen mit diesem nosokomialen Erreger zu implementieren. Schließlich ist eine gemeinsame Betrachtung von humanen und tierischen Isolaten mit zeitlichem und regionalem Zusammenhang zwingend erforderlich, um die Ausbreitung und Übertragung von CR *Ab*-Isolaten im One-Health-Kontext besser beurteilen zu können.

8. Summary

Although *A. baumannii* (*Ab*) is considered as one of the most important pathogens of nosocomial infections in human medicine, little is known about the potential reservoir and the role of animals as carriers and vectors of this species. Based on this work, information on the occurrence of multidrug-resistant, in particular carbapenem-resistant (CR) *Acinetobacter* spp., should be observed from clinical animal samples. The aim was the genotypically and phenotypically characterization of animal *Acinetobacter* spp. isolates. For this purpose, the influence of CR on bacterial fitness, biofilm formation and virulence was investigated in addition to the phylogenetic background, antimicrobial resistance profile and acquired resistance determinants. A total of 1,540 *Acinetobacter* spp., including 821 *Ab*, were collected between November 2000 and September 2018. The collection was based on isolates from the *Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals* as part of routine diagnostics as well as CR *Acinetobacter* spp. of a commercial veterinary laboratory and human CR *Acinetobacter*. Species identification was performed using MALDI-TOF MS analysis and PCR. Antimicrobial susceptibility was determined by VITEK2 and for carbapenem antibiotics by E-test. Acquired carbapenemase genes were detected using PCR. Among 1,483 *Acinetobacter* spp. from animals, 74 (5 %) isolates, including 48 (3.2 %) *Ab*, eight (0.5 %) *A. pittii*, eight (0.5 %) *A. lwoffii*, five (0.3 %) *A. johnsonii*, three (0.2 %) *A. indicus*, and two (0.1 %) *A. species*, were identified as carriers of carbapenemase genes. OXA-58 occurred as the most frequent carbapenemase (n=47), followed by OXA-23 (n=24), and OXA-72, OXA-143, and NDM-1 (1

isolate each). CR isolates were obtained from dogs (n=39; 52.7 %) and cats (n=18; 24.3 %), livestock (n=10; 13.5 %), pets (n=4; 5.4 %), horses (n=2; 2.7 %), and from an air conditioner of a veterinary clinic (1.4 %). The *Acinetobacter* strains were isolated from urine (n=19; 25.7 %), the respiratory tract (n=17; 23 %), wounds (n=10; 1.4 %) and other clinical sites (n=28; 37.8 %). Most carbapenemase-positive *Acinetobacter* spp. were carriers of other acquired resistance genes, such as *str*, *aac* or *aad*, *tet*, *sul1/2* and their variants.

In CR *Ab* isolates, these acquired resistance genes were partially detected within resistance islands. Thus, ten of the ST1^{Past}-OXA-58-positive *Ab* isolated between 2016 and 2018 carried *AbaR3*-like and one isolate carried an *AbaR10*-like island. In contrast, *Ab* isolated before 2016 did not carry resistance islands. Acquisition of resistance genes was mostly reflected in a multidrug-resistant phenotype. However, not all isolates, which carried a carbapenemase gene showed a phenotypic resistance to the tested carbapenem antibiotics. This was due to (i) the absence of expression-enhancing insertion elements, (ii) partial deletions in relevant genetic structures, or (iii) the absence of synergistic resistance mechanisms, such as efflux pumps.

Using MLST analysis (Pasteur scheme), the animal *Ab* isolates could be assigned to six different sequence types (STs), including ST1^{Past} and ST25^{Past}, which are distributed worldwide in human medicine. Furthermore, the distribution of acquired resistance genes and virulence-associated genes correlated with the respectively assigned STs. Using core genome MLST (cgMLST), the CR *Ab* could be assigned to twelve different clusters (CTs). The majority of ST1^{Past}-OXA-58-positive *Ab* (93.1%) were assigned to CT-1808. In Germany OXA-23-*Ab* isolates CT-2177 dominated, whereas isolates from France and Italy belonged to eight different CTs. This suggests a clonal spread of CT-1808 respectively CT-2177 in companion animals in Germany, whereas the spread of OXA-positive *Ab* in France and Italy seems to be independent. The genetic context of carbapenemase genes, both *Ab* and non-*baumannii* *Acinetobacter* overlapped with the structure of CR isolates occurring in human nosocomial infections. In particular, the embedding within mobile genetic elements such as *bla*_{OXA-23} in the transposon structure Tn2008 as well as *bla*_{NDM-1} in Tn125 provides evidence for a possible transmission of resistance genes between *Acinetobacter* spp. of animal and human origin.

The examination of the influence of CR on bacterial fitness, carrying the resistance plasmid showed a negative influence on the fitness of *Ab*. The same can be observed in biofilm formation: CR *Ab* showed significantly lower biofilm formation than the isogenic plasmid-free variants. In contrast, the CR *Ab* isolates showed a significantly more virulent phenotype than the corresponding carbapenem-sensitive variant in the *Galleria mellonella* infection model.

According to the available data, the acquisition of carbapenemase genes has a negative impact on bacterial fitness and biofilm formation, but not on the virulence of the isolates.

Based on phylogenetic analyses of this study, it could be shown that the animal isolates from this work potentially represent a separate group, which clusters with human isolates from Australia, South Korea, Thailand, the Czech Republic and the USA. While human *Ab* from Europe were less similar to the veterinary isolates. Related to human medicine, successful clones have become established in veterinary medicine. These clones spread nosocomially in the veterinary clinical setting. It must be assumed that *Ab* isolates and/or their resistance determinants are transferred between animals and humans. Whereas animals initially acted as recipients, mutual transmission cannot be ruled out. Accordingly, targeted monitoring of multidrug-resistant *Ab*, in particular CR isolates, in veterinary medicine should be considered. This is mandatory to implement effective intervention measures in veterinary hospitals to reduce infections with this pathogen. After all, a common consideration of human and animal isolates is required to assess the spread and transmission of CR *Ab* isolates within a One Health context.

9. Literaturverzeichnis

1. Abbott I.; Cerqueira G.M. *et al.* (2013) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Laboratory Challenges, Mechanistic Insights and Therapeutic Strategies. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11(4):395–409. doi:10.1586/eri.13.21.
2. Acosta J.; Merino M. *et al.* (2011) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring OXA-24 carbapenemase, Spain. *Emerg Infect Dis* 17(6):1064–1067. doi:10.3201/eid1706.091866.
3. Adams M.D.; Goglin K. *et al.* (2008) Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 190(24):8053–8064. doi:10.1128/JB.00834-08.
4. Adékambi T.; Drancourt M. *et al.* (2009) The *rpoB* gene as a tool for clinical microbiologists. *Trends Microbiol* 17(1):37–45. doi: 10.1016/j.tim.2008.09.008.
5. Ahmed A.M.; Motoi Y. *et al.* (2007) Zoo animals as reservoirs of gram-negative Bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Appl Environ Microbiol* 73(20):6686–6690. doi: 10.1128/AEM.01054-07.
6. Al Atrouni A.; Joly-Guillou M.L. *et al.* (2016) Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon. *New Microbes New Infect* 12:43–44. doi: 10.3389/fmicb.2016.00049.
7. Al Atrouni A.; Joly-Guillou M.-L. *et al.* (2016) Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Front Microbiol* 7:49. doi: 10.3389/fmicb.2016.00049.
8. Al Bayssari C.; Dabboussi F. *et al.* (2015) Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. *J Antimicrob Chemother* 70(3):950–951. doi: 10.1093/jac/dku469.
9. Allardert-Servent A.; Bouzuges N. *et al.* (1989) Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *J Clin Microbiol* 27(9):2057–2061. doi: 10.1128/jcm.27.9.2057-2061.1989.
10. Alvarez-Buylla A.; Culebras E. *et al.* (2012) Identification of *Acinetobacter* species: is Bruker biotyper MALDI-TOF mass spectrometry a good alternative to molecular techniques? *Infect Genet Evol* 12(2):345–349. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.002.
11. Ambler R.P. (1980) The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 289(1036):321–331. doi: 10.1098/rstb.1980.0049.
12. Ambrosi C.; Scribano D. *et al.* (2017) *Acinetobacter baumannii* virulence traits: a comparative study of a novel sequence type with other Italian endemic international clones. *Front Microbiol* 8:1977. doi: 10.3389/fmicb.2017.01977.
13. Andersson D.I.; Levin B.R. (1999) The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2:489–493. doi: 10.1016/s1369-5274(99)00005-3.
14. Andrews J.M. (2001) Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* 48 Suppl 1:5–16. doi: 10.1093/jac/48.suppl_1.5.
15. Ang G.Y.; Yu C.Y. *et al.* (2016) Emergence of ST119 *Acinetobacter pittii* co-harboring NDM-1 and OXA-58 in Malaysia. *Int J Antimicrob Agents* 47(2):168–169. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.11.008.
16. Anstey N.M.; Currie B.J. *et al.* (2002) Community-acquired bacteremic *Acinetobacter* pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. *J Clin Microbiol* 40(2):685–686. doi: 10.1128/jcm.40.2.685-686.2002.
17. Antão E.-M.; Ewers C. *et al.* (2009) Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin. *PLoS One* 4(11):e7796. doi: 10.1371/journal.pone.0007796.

18. Antunes L.C.S.; Imperi F. *et al.* (2011) Deciphering the multifactorial nature of *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *PLoS One* 6(8):e22674. doi: 10.1371/journal.pone.0022674.
19. Antunes N.T.; Lamoureaux T.L. *et al.* (2014) Class D beta-lactamases: are they all carbapenemases? *Antimicrob Agents Chemother* 58(4):2119–2125. doi: 10.1128/AAC.02522-13.
20. Aperis G.; Fuchs B.B. *et al.* (2007) *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes Infect* 9(6):729–734. doi: 10.1016/j.micinf.2007.02.016.
21. Arroyo L.A.; Herrera C.M. *et al.* (2011) The *pmrCAB* Operon mediates Polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of Lipid A. *Antimicrob Agents Chemother* 55(8):3743–3751. doi: 10.1128/AAC.00256-11.
22. Avila-Novoa M.-G.; Solís-Velázquez O.-A. *et al.* (2019) Biofilm formation and detection of Fluoroquinolone- and Carbapenem-resistant genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology* 3454907:1–5. doi: 10.1155/2019/3454907.
23. Barton B.M.; Harding G.P. *et al.* (1995) A general method for detecting and sizing plasmids. *Anal. Biochem.* 226(2):235–240. doi: 10.1006/abio.1995.1220.
24. Bartual S.G.; Seifert H. *et al.* (2005) Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43(9):4382–4390. doi: 10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005.
25. Baumann P.; Doudoroff M. *et al.* (1968) A study of the *Moraxella* group. *J Bacteriol* 95(5):1520–1541. doi: 10.1128/jb.95.5.1520-1541.1968.
26. Beceiro A.; Moreno A. *et al.* (2014) Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58(1):518–526. doi: 10.1128/AAC.01597-13.
27. Beijerinck M. (1911) Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Vers Konin Akad Wet Ams, Amsterdam* 19:1092–1103.
28. Belmonte O.; Pailhories H. *et al.* (2014) High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Vet Microbiol* 170(3-4):446–450. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.042.
29. Bentz A.I.; Wilkins P.A. *et al.* (2002) Severe thrombocytopenia in 2 thoroughbred foals with sepsis and neonatal encephalopathy. *J Vet Intern Med* 16(4):494–497. doi: 10.1111/j.1939-1676.2002.tb01271.x.
30. Bergogne-Bérézin E.; Towner K.J. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9(2):148–165. doi: 10.1128/CMR.9.2.148.
31. Berlau J.; Aucken H. *et al.* (1999) Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18(3):179–183. doi: 10.1007/s100960050254.
32. Black D.M.; Rankin S.C. *et al.* (2009) Antimicrobial therapy and aerobic bacteriologic culture patterns in canine intensive care unit patients: 74 dogs (January–June 2006). *J Vet Emerg Crit Care* 19(5):489–495. doi: 10.1111/j.1476-4431.2009.00463.x.
33. Blädel I. (2012) Charakterisierung des regulatorischen Pyp-Netzwerkes in *Yersinia enterocolitica*. Dissertationsschrift. Westfälische Wilhelms-Universität Münster. <https://miami.uni-muenster.de/Record/0e630c26-92e5-42c7-8a8e-f5eb8e238082>.
34. Blanchard T.L.; Woods J.A. *et al.* (2002) Theriogenology question of the month. Treatment options for erosive seminal vesiculitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Am Vet Med Assoc* 221(6):793–795. doi: 10.2460/javma.2002.221.793.

35. Blaschke U.; Skiebe E. *et al.* (2021) Novel genes required for surface-associated motility in *Acinetobacter baumannii*. *Curr Microbiol* 78(4):1509–1528. doi: 10.1007/s00284-021-02407-x.
36. Boerlin P.; Eugster S. *et al.* (2001) Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol* 82(4):347–359. doi: 10.1016/S0378-1135(01)00396-0.
37. Boguta L.; Gradzki Z. *et al.* (2002) Bacterial flora in foals with upper respiratory tract infections in Poland. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 49(6):294–297. doi: 10.1046/j.1439-0450.2002.00570.x.
38. Bonnin R.A.; Docobo-Pérez F. *et al.* (2014) Emergence of OXA-72-producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents* 43:195–196. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2013.10.005.
39. Bonnin R.A.; Nordmann P. *et al.* (2011) Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 55(1):349–354. doi: 10.1128/AAC.00773-10.
40. Bonnin R.A.; Poirel L. *et al.* (2012) Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18(9):E362-5. doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03928.x.
41. Bonnin R.A.; Poirel L. *et al.* (2014) Carbapenem resistance in a human clinical isolate identified to be closely related to *Acinetobacter indicus*. *Int J Antimicrob Agents* 44(4):345–350. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.05.022.
42. Bou G.; Oliver A. *et al.* (2000) OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6):1556–1561.
43. Bouvet P.J.M.; Grimont P. (1986) Taxonomy of the genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov. *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov. *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and *Acinetobacter junii* sp. nov. and emended descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *Int J Syst Bacteriol* 36:228–240.
44. Brachelente C.; Wiener D. *et al.* (2007) A case of necrotizing fasciitis with septic shock in a cat caused by *Acinetobacter baumannii*. *Vet Dermatol* 18(6):432–438. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00624.x.
45. Brahmi S.; Touati A. *et al.* (2016) First description of two sequence Type 2 *Acinetobacter baumannii* isolates carrying OXA-23 carbapenemase in pcellus acarne fished from the mediterranean sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 60(4):2513–2515. doi: 10.1128/AAC.02384-15.
46. Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77(1):71–94. doi: 10.1093/genetics/77.1.71.
47. Brillhante M.; Gobeli Brawand S. *et al.* (2021) Two high-risk clones of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* that cause infections in pets and are present in the environment of a veterinary referral hospital. *J Antimicrob Chemother* 76(5):1140–1149. doi: 10.1093/jac/dkab028.
48. Brisou J.; Prevot A.R. (1954) Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group, 86(6):722–728.
49. Brown S.; Amyes S.G.B. (2005) The sequences of seven class D β -lactamases isolated from carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from four continents. *Clin Microbiol Infect* 11(4):326–329. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01096.x.
50. Brown S.; Young H.K. *et al.* (2005) Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect* 11(1):15–23. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x.

51. Bush K.; Jacoby G.A. *et al.* (1995) A functional classification scheme for β -Lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39(6):1211–1233. doi: 10.1128/AAC.39.6.1211.
52. Byrne-Bailey K.G.; Gaze W.H. *et al.* (2009) Prevalence of Sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 53(2):696–702. doi: 10.1128/AAC.00652-07.
53. Camarena L.; Bruno V. *et al.* (2010) Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathog* 6(4):e1000834. doi: 10.1371/journal.ppat.1000834.
54. Carroll L.M.; Gaballa A. *et al.* (2019) Identification of novel mobilized Colistin resistance Gene *mcr-9* in a multidrug-resistant, Colistin-susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate. *MBio* 10(3):e00853-19.
55. Castro-Jaimes S.; Salgado-Camargo A.D. *et al.* (2016) Complete genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate obtained from a mexican hospital (Sequence Type 422). *Genome Announc* 4(3):e00583-16. doi: 10.1128/genomeA.00583-16.
56. Chanchaithong P.; Prapasarakul N. *et al.* (2018) Extensively drug-resistant community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 2 in a dog with urinary tract infection in Thailand. *J Glob Antimicrob Resist* 13:33–34. doi: 10.1016/j.jgar.2018.02.007.
57. Chang W.N.; Lu C.H. *et al.* (2000) Community-acquired *Acinetobacter* meningitis in adults. *Infection* 28(6):395–397.
58. Chatterjee S.; Datta S. *et al.* (2016) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. causing neonatal sepsis. Focus on NDM-1 and its linkage to IS*Aba125*. *Front Microbiol* 7:1126. doi: 10.3389/fmicb.2016.01126.
59. Chen C.; Huang P.-Y. *et al.* (2022) Classification and molecular characteristics of *tet(X)*-carrying plasmids in *Acinetobacter* species. *Front Microbiol* 13:974432. doi: 10.3389/fmicb.2022.974432.
60. Chen F.-J.; Huang W.-C. *et al.* (2019) Molecular epidemiology of emerging Carbapenem resistance in *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* in Taiwan, 2010 to 2014. *Antimicrob Agents Chemother* 63(4):e02007-18. doi: 10.1128/AAC.02007-18.
61. Chen M. Z.; Hsueh P. R. *et al.* (2001) Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *Open Forum Infect Dis*. Elsevier 120(4):1072–1077. doi: 10.1378/chest.120.4.1072.
62. Choi C.H.; Hyun S.H. *et al.* (2008) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell. Microbiol.* 10(2):309–319. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x.
63. Choi C.H.; Lee E.Y. *et al.* (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell. Microbiol.* 7(8):1127–1138. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00538.x.
64. Choi C.H.; Lee J.S. *et al.* (2008) *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiol* 8:216. doi: 10.1186/1471-2180-8-216.
65. Choi K.-H.; Kumar A. *et al.* (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* 64(3):391–397. doi: 10.1016/j.mimet.2005.06.001.
66. Chusri S.; Chongsuvivatwong V. *et al.* (2019) Clinical characteristics and outcomes of community and hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *J Microbiol, Immunol Infect* 52(5):796–806. doi: 10.1016/j.jmii.2019.03.004.

67. Clarridge J.E. (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17(4):840-62, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.840-862.2004.
68. Claydon M.A.; Davey S.N. *et al.* (1996) The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14(11):1584-1586. doi: 10.1038/nbt1196-1584.
69. Clemetson L.L.; Ward A.C. (1990) Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats. *J Am Vet Med Assoc* 196(6):902-906.
70. CLSI (2018) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET08, 4th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. 978-1-68440-011-9.
71. CLSI (2019) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplement M100S, 29th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. 978-1-68440-033-1.
72. Corbella X.; Pujol M. *et al.* (1996) Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 23(2):329-334. doi: 10.1093/clinids/23.2.329.
73. Corvec S.; Caroff N. *et al.* (2003) AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *J Antimicrob Chemother* 52(4):629-635. doi: 10.1093/jac/dkg407.
74. Corvec S.; Poirel L. *et al.* (2007) Genetics and expression of the Carbapenem-hydrolyzing Oxacillinase gene *bla_{OXA-23}* in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology Journals 51(4):1530-1533. doi: 10.1128/AAC.01132-06.
75. Cosgaya C.; Mari-Almirall M. *et al.* (2016) *Acinetobacter dijkschoorniae* sp. nov. a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(10):4105-4111. doi: 10.1099/ijsem.0.001318.
76. Cox G.; Wright G.D. (2013) Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 303(6-7):287-292. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.009.
77. Crosa J.H.; Brenner D.J. *et al.* (1973) Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes. *J Bacteriol* 115(3):904-911.
78. Cui C.-Y.; Chen C. *et al.* (2020) Co-occurrence of plasmid-mediated tigecycline and carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. from waterfowls and their neighboring environment. *Antimicrob Agents Chemother* 64(5):e02502-19. doi: 10.1128/AAC.02502-19.
79. D'Souza R.; Pinto N.A. *et al.* (2017) First report of the carbapenemase gene *bla_{OXA-499}* in *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother* 61(5):e02676-16. doi: 10.1128/AAC.02676-16.
80. Da Silva G.J.; Domingues S. (2016) Insights on the horizontal gene transfer of carbapenemase determinants in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Microorganisms* 4(3):29. doi: 10.3390/microorganisms4030029.
81. Da Silva G.J.; Domingues S. (2017) Interplay between Colistin resistance, virulence and fitness in *Acinetobacter baumannii*. *Antibiotics* 6(4):28. doi: 10.3390/antibiotics6040028.
82. Da Silva K.E.; Maciel W.G. *et al.* (2018) A high mortality rate associated with a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a brazilian intensive care unit. *PLoS One* 13(12):e0209367. doi: 10.1371/journal.pone.0209367.
83. Dahiru M.; Enabulele O.I. (2015) *Acinetobacter baumannii* in birds' feces: a public health threat to vegetables and irrigation farmers. *AiM* 05(10):693-698. doi: 10.4236/aim.2015.510072.

84. Dale J.; Park S. (2010) Molecular genetics of bacteria, 5th ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, Hoboken, NJ. 9780470741849.
85. Damier-Piolle L.; Magnet S. *et al.* (2008) AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(2):557–562. doi: 10.1128/AAC.00732-07.
86. Das A.M.; Paranjape V.L. (1986) *Acinetobacter calcoaceticus* in three cases of late abortion in water buffaloes. *Vet Rec* 118(8):214. doi: 10.1136/vr.118.8.214.
87. Dexter C.; Murray G.L. *et al.* (2015) Community-acquired *Acinetobacter baumannii*: clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 13(5):567–573. doi: 10.1586/14787210.2015.1025055.
88. Diancourt L.; Passet V. *et al.* (2010) The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5(4):e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034.
89. Dickie C.W.; Regnier J.O. (1978) Equine myositis and septicemia caused by *Acinetobacter calcoaceticus* infection. *J Am Vet Med Assoc* 172(3):357–359.
90. Dijkshoorn L.; Aucken H. *et al.* (1996) Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J Clin Microbiol* 34(6):1519–1525. doi: 10.1128/jcm.34.6.1519-1525.1996.
91. Dijkshoorn L.; Brouwer C.P.J.M. *et al.* (2004) The aynthetic N-terminal peptide of human lactoferrin, hLF(1-11), is highly effective against experimental infection caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 48(12):4919–4921. doi: 10.1128/AAC.48.12.4919-4921.2004.
92. Dijkshoorn L.; Nemec A. *et al.* (2007) An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5(12):939–951. doi: 10.1038/nrmicro1789.
93. Dijkshoorn L.; van Aken E. *et al.* (2005) Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* 11(4):329–332. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01093.x.
94. Dixon W.J. (1992) BMDP statistical software manual. To accompany BMDP release 7, Completely rev. ed. University of California Press, Berkeley. 0520081382.
95. Doi Y.; Arakawa Y. (2007) 16S Ribosomal RNA Methylation: emerging resistance mechanism against Aminoglycosides. *Clin Infect Dis* 45(1):88–94. doi: 10.1086/518605.
96. Donlan R.M.; Costerton J.W. (2002) Biofilms. Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2):167–193. doi: 10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
97. Doughari H.J.; Ndakidemi P.A. *et al.* (2011) The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp. An overview. *Microbes Environ* 26(2):101–112. doi: 10.1264/jsme2.me10179.
98. Drawz S.M.; Bonomo R.A. (2010) Three decades of β -lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev* 23(1):160–201. doi: 10.1128/CMR.00037-09.
99. Duggar B.M. (1948) Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51(Art.2):177–181. doi: 10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x.
100. ECDC (2013) Durchführungsbeschluss der Kommission vom 12. November 2013 zur Überwachung und Meldung von Antibiotikaresistenzen bei zoonotischen und kommensalen Bakterien. ECDC, Stockholm.
101. ECDC (2016) Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings. ECDC, Stockholm.
102. ECDC (2017) Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm.
103. ECDC (2018) Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Antimicrobial resistance surveillance in Europe. ECDC, Stockholm.

104. EFSA (2013) Scientific opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. *European Food Safety Authority Journal* 11(12):2239. doi: 10.2903/j.efsa.2013.3501.
105. EFSA (2015) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *European Food Safety Authority Journal* 13(12):148. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
106. Eijkelkamp B.A.; Stroher U.H. *et al.* (2011) Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 323(1):44–51. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x.
107. Elbing K.L.; Brent R. (2002) Media preparation and bacteriological tool. *Molecular Biology Techniques* Chapter 1:Unit 1.1. doi: 10.1002/0471142727.mb0101s59.
108. Endimiani A.; Hujer K.M. *et al.* (2011) *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J Antimicrob Chemother* 66(10):2248–2254. doi: 10.1093/jac/dkr289.
109. Endimiani A.; Luzzaro F. *et al.* (2007) Spread in an Italian hospital of a clonal *Acinetobacter baumannii* strain producing the TEM-92 extended-spectrum β -Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 51(6):2211–2214. doi: 10.1128/AAC.01139-06.
110. Ercolini D.; Russo F. *et al.* (2009) Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *in vitro* and in beef. *Appl Environ Microbiol* 75(7):1990–2001. doi: 10.1128/AEM.02762-08.
111. Erganis O.; Corlu M. *et al.* (1988) Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from septicaemic hens. *Vet Rec* 123(14):374. doi: 10.1136/vr.123.14.374.
112. Espinal P.; Pantel A. *et al.* (2019) Relationship between different resistance mechanisms and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Microb Drug Resist* 25(5):752–760. doi: 10.1089/mdr.2018.0182.
113. Espinal P.; Seifert H. *et al.* (2012) Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) group by MALDI-TOF MS. *Clin Microbiol Infect* 18(11):1097–1103. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03696.x.
114. Esterly J.S.; McLaughlin M.M. *et al.* (2014) Pathogenicity of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates in a *Galleria mellonella* host model according to *bla*_{OXA-40} gene and epidemiological outbreak status. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2):1240–1242. doi: 10.1128/AAC.02201-13.
115. EUCAST (2020) Expert Rules. Version 3.2. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Växjö, Schweden.
116. EUCAST (2023) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Växjö, Schweden.
117. Evans B.A.; Amyes S.G.B. (2014) OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27(2):241–263. doi: 10.1128/CMR.00117-13.
118. Evans B.A.; Hamouda A. *et al.* (2010) Novel genetic context of multiple *bla*_{OXA-58} genes in *Acinetobacter* genospecies 3. *J Antimicrob Chemother*. Narnia 65(8):1586–1588. doi: 10.1093/jac/dkq180.
119. Evans B.A.; Hamouda A. *et al.* (2012) The rise of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Current Pharmaceutical Design* 19(2):223–238.
120. Ewers C.; Klotz P. *et al.* (2016) Genome sequence of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* IHIT7853, a carbapenem-resistant strain from a cat belonging to international clone IC1. *Gut Pathog* 8:37. doi: 10.1186/s13099-016-0119-z.
121. Ewers C.; Klotz P. *et al.* (2017) OXA-23 and ISAbal-OXA-66 class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *Int J Antimicrob Agents* 49(1):37–44. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.033.

122. Feng Y.; Yang P. *et al.* (2016) Characterization of *Acinetobacter johnsonii* isolate XBB1 carrying nine plasmids and encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by genome sequencing. *J Antimicrob Chemother* 71(1):71–75. doi: 10.1093/jac/dkv324.
123. Fernando D.M.; Khan I.U.H. *et al.* (2016) Isolation and characterization of *Acinetobacter baumannii* recovered from *Campylobacter* selective medium. *Front Microbiol* 7:1871. doi: 10.3389/fmicb.2016.01871.
124. Flemming H.-C.; Wingender J. (2002) Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide ... *Chemie in unserer Zeit* 36(1):30–42. doi: 10.1002/1521-3781(200202)36:1<30:AID-CIUZ30>3.0.CO;2-O.
125. Flores-Díaz M.; Monturiol-Gross L. *et al.* (2016) Bacterial sphingomyelinases and phospholipases as virulence factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 80(3):597–628. doi: 10.1128/MMBR.00082-15.
126. Fournier P.-E.; Vallenet D. *et al.* (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2(1):e7. doi: 10.1371/journal.pgen.0020007.
127. Francey T.; Gaschen F. *et al.* (2000) The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J Vet Intern Med* 14(2):177–183. doi: 10.1892/0891-6640(2000)014<0177:trobac>2.3.co;2.
128. Fu Y.; Du X. *et al.* (2012) Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla_{NDM-1}* in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. *J Antimicrob Chemother* 67(9):2114–2122. doi: 10.1093/jac/dks192.
129. Fu Y.; Jiang J. *et al.* (2014) Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of *bla_{OXA-58}* in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PLoS One* 9(1):e84680. doi: 10.1371/journal.pone.0084680.
130. Gaddy J.A.; Actis L.A. (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 4(3):273–278. doi: 10.2217/fmb.09.5.
131. Gaddy J.A.; Arivett B.A. *et al.* (2012) Role of Acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606^T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infect Immun* 80(3):1015–1024. doi: 10.1128/IAI.06279-11.
132. Gaddy J.A.; Tomaras A.P. *et al.* (2009) The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in Biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun* 77(8):3150–3160. doi: 10.1128/IAI.00096-09.
133. García-Garmendia J.-L.; Ortiz-Leyba C. *et al.* (2001) Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study. *Clin Infect Dis* 33(7):939–946. doi: 10.1086/322584.
134. Garnacho J.; Sole-Violan J. *et al.* (2003) Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients. A matched cohort study. *Crit Care Med* 31(10):2478–2482. doi: 10.1097/01.CCM.0000089936.09573.F3.
135. Gebhardt; M. J. *et al.* (2015) Joint Transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 6(6):e01660-15. doi: 10.1128/mBio.01660-15.
136. Geisinger E.; Isberg R.R. (2015) Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog* 11(2):e1004691. doi: 10.1371/journal.ppat.1004691.
137. Gelbířová T.; Baráková A. *et al.* (2019) Detection of Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* with the *mcr-4* Gene. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lekarství* 25(1):4–6.
138. Gellert M.; Mizuuchi K. *et al.* (1976) DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(11):3872–3876. doi: 10.1073/pnas.73.11.3872.

139. Gemensky-Metzler A.J.; Wilkie D.A. *et al.* (2005) Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *American Journal of Veterinary Research* 66(5):800–811. doi: 10.2460/ajvr.2005.66.800.
140. Gentilini F.; Turba M.E. *et al.* (2018) Hospitalized pets as a source of carbapenem-resistance. *Front Microbiol* 9:2872. doi: 10.3389/fmicb.2018.02872.
141. Gerner-Smidt P. (1992) Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 30(10):2680–2685. doi: 10.1128/jcm.30.10.2680-2685.1992.
142. Gerner-Smidt P.; Tjernberg I. (1993) *Acinetobacter* in Denmark: II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex 101(11):826–832.
143. Gerson S.; Betts J.W. *et al.* (2019) Investigation of novel *pmrB* and *eptA* mutations in isogenic *Acinetobacter baumannii* isolates associated with Colistin resistance and increased virulence *In Vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 63(3):e01586-18. doi: 10.1128/AAC.01586-18.
144. Ghaly T.M.; Paulsen I.T. *et al.* (2020) A novel family of *Acinetobacter* mega-plasmids are disseminating multi-drug resistance across the globe while acquiring location-specific accessory genes. *Front Microbiol* 11:605952. doi: 10.3389/fmicb.2020.605952.
145. Girlich D.; Poirel L. *et al.* (2010) First isolation of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 54(1):578–579. doi: 10.1128/AAC.00861-09.
146. Godeux Anne-Sophie; Svedholm Elin *et al.* (2020) Scarless removal of large resistance island *AbaR* results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology 64(10):e00951-20. doi: 10.1128/AAC.00951-20.
147. Goldstein F.W.; Labigne-Roussel A. *et al.* (1983) Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid* 10(2):138–147. doi: 10.1016/0147-619X(83)90066-5.
148. González R.H.; Nusblat A. *et al.* (2001) Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiol Res. Urban & Fischer* 155(4):271–277. doi: 10.1016/S0944-5013(01)80004-5.
149. Göttig S.; Gruber T.M. *et al.* (2014) Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. *J Antimicrob Chemother* 69(9):2578–2579. doi: 10.1093/jac/dku170.
150. Gouby A.; Carles-Nurit M.-J. *et al.* (1992) Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 30(6):1588–1591. doi: 10.1128/jcm.30.6.1588-1591.1992.
151. Gregorio E. de; Del Franco M. *et al.* (2015) Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 16:933. doi: 10.1186/s12864-015-2136-6.
152. Guardabassi L.; Dalsgaard A. *et al.* (1999) Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sourced. *J Appl Microbiol* 87(5):659–667. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00905.x.
153. Guardabassi L.; Dijkshoorn L. *et al.* (2000) Distribution and *in-vitro* transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *J Med Microbiol* 49(10):929–936. doi: 10.1099/0022-1317-49-10-929.
154. Guerra B.; Fischer J. *et al.* (2014) An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Vet Microbiol* 171(3-4):290–297. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.02.001.

155. Gundi V.A.K.B.; Dijkshoorn L. *et al.* (2009) Validation of partial *rpoB* gene sequence analysis for the identification of clinically important and emerging *Acinetobacter* species. *Microbiology* 155(7):2333–2341. doi: 10.1099/mic.0.026054-0.
156. Hameed F.; Khan M.A. *et al.* (2019) Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Rev Soc Bras Med Trop* 52:e20190237. doi: 10.1590/0037-8682-0237-2019.
157. Hamidian M.; Ambrose S.J. *et al.* (2016) A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the *sul2* sulphonamide and *strAB* streptomycin resistance genes. *Plasmid* 87-88:43–50. doi: 10.1016/j.plasmid.2016.09.001.
158. Hamidian M.; Hawkey J. *et al.* (2019) Evolution of a clade of *Acinetobacter baumannii* global clone 1, lineage 1 via acquisition of carbapenem- and aminoglycoside-resistance genes and dispersion of IS*Aba1*. *Microb Genom* 5(1):e000242. doi: 10.1099/mgen.0.00024.
159. Hamidian M.; Holt K.E. *et al.* (2014) A GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate carrying *AbaR3* and the aminoglycoside resistance transposon *TnaphA6* in a conjugative plasmid. *J Antimicrob Chemother* 69(4):955–958. doi: 10.1093/jac/dkt454.
160. Hammerum A.M.; Hansen F. *et al.* (2015) Use of whole-genome sequencing for characterisation of a ST119 NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* from a patient in Denmark with no history of recent travel. *Int J Antimicrob Agents* 46(3):351–352. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.05.005.
161. Hamouda A.; Evans B.A. *et al.* (2010) Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*_{OXA-51}-like genes. *J Clin Microbiol* 48(7):2476–2483. doi: 10.1128/JCM.02431-09.
162. Hamouda A.; Findlay J. *et al.* (2011) Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *Int J Antimicrob Agents* 38(4):314–318. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.007.
163. Hamouda A.; Vali L. *et al.* (2008) Gram-negative non-fermenting bacteria from food-producing animals are low risk for hospital-acquired infections. *J Chemother* 20(6):702–708. doi: 10.1179/joc.2008.20.6.702.
164. Harding C.M.; Hennon S.W. *et al.* (2017) Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol* 16(2):91–102. doi: 10.1038/nrmicro.2017.148.
165. Hariharan H.; Gibson K. *et al.* (2014) *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* from canine pyoderma cases in Grenada, West Indies, and their susceptibility to beta-lactam drugs. *Vet Med Int* 2014:850126. doi: 10.1155/2014/850126.
166. Harshey R.M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249–273. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.091014.
167. He T.; Li R. *et al.* (2020) Characterization of *Acinetobacter indicus* co-harboring *tet(X3)* and *bla*_{NDM-1} of dairy cow origin. *J Antimicrob Chemother* 75(9):2693–2696. doi: 10.1093/jac/dkaa182.
168. Heindorf M.; Kadari M. *et al.* (2014) Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. *PLoS One* 9(7):e101033. doi: 10.1371/journal.pone.0101033.
169. Henriksen J.; Blom J. (1975) Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 83(2):103–115. doi: 10.1111/j.1699-0463.1975.tb00078.x.
170. H eritier C.; Poirel L. *et al.* (2005) Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(10):4174–4179. doi: 10.1128/AAC.49.10.4174-4179.2005.

171. Héritier C.; Poirel L. *et al.* (2005) Contribution of acquired Carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(8):3198–3202. doi: 10.1128/AAC.49.8.3198-3202.2005.
172. Héritier C.; Poirel L. *et al.* (2006) Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of *ISAbal* in *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 12(2):123–130. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01320.x.
173. Hérivaux A.; Pailhoriès H. *et al.* (2016) First report of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* carriage in pets from the community in France. *Int J Antimicrob Agents* 48(2):220–221. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.03.012.
174. Higgins P.G.; Dammhayn C. *et al.* (2010) Global spread of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65(2):233–238. doi: 10.1093/jac/dkp428.
175. Higgins P.G.; Hrenovic J. *et al.* (2018) Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water Res* 140:261–267. doi: 10.1016/j.watres.2018.04.057.
176. Higgins P.G.; Hujer A.M. *et al.* (2012) Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Med Microbiol* 61(1):137–141. doi: 10.1099/jmm.0.036046-0.
177. Higgins P.G.; Janssen K. *et al.* (2012) Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol* 50(11):3493–3500. doi: 10.1128/JCM.01759-12.
178. Higgins P.G.; Lehmann M. *et al.* (2010) *GyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *J Clin Microbiol* 48(12):4592–4594. doi: 10.1128/JCM.01765-10.
179. Higgins P.G.; Pérez-Llarena F.J. *et al.* (2013) OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(5):2121–2126. doi: 10.1128/AAC.02413-12.
180. Higgins P.G.; Poirel L. *et al.* (2009) OXA-143, a novel Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12):5035–5038. doi: 10.1128/AAC.00856-09.
181. Higgins P.G.; Prior K. *et al.* (2017) Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 12(6):e0179228. doi: 10.1371/journal.pone.0179228.
182. Higgins P.G.; Wisplinghoff H. *et al.* (2007) A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* Genomic Species 13TU. *Clin Microbiol Infect* 13(12):1199–1201. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01819.x.
183. Howard A.; O'Donoghue M. *et al.* (2012) *Acinetobacter baumannii*: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3(3):243–250. doi: 10.4161/viru.19700.
184. Hraiech S.; Roch A. *et al.* (2013) Impaired virulence and fitness of a Colistin-resistant isolate of *Acinetobacter baumannii* in a rat model of pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 57(10):5120–5121. doi: 10.1128/AAC.00700-13.
185. Hrenovic J.; Ivankovic T. *et al.* (2019) Presence of Carbapenem-resistant bacteria in soils affected by illegal waste dumps. *Int J Environ Health Res* 29(2):154–163. doi: 10.1080/09603123.2018.1522423.
186. Hrenovic J.; Music M.S. *et al.* (2019) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from swine manure. *Microb Drug Resist* 25(5):725–730. doi: 10.1089/mdr.2018.0087.

187. Hu H.; Hu Y. *et al.* (2012) Novel plasmid and its variant harboring both a *bla*_{NDM-1} gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(4):1698–1702. doi: 10.1128/AAC.06199-11.
188. Huang W.; Yao Y. *et al.* (2016) Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep* 6:20724. doi: 10.1038/srep20724.
189. Imura M.; Hayashi W. *et al.* (2019) Detection of *Acinetobacter pittii* ST220 co-producing NDM-1 and OXA-820 carbapenemases from a hospital sink in a non-endemic country of NDM. *J Glob Antimicrob Resist* 21:353–356. doi: 10.1016/j.jgar.2019.11.013.
190. Iverson W.O.; Connelly M.R. (1981) *Acinetobacter* infection associated with pneumonia in an orangutan. *Primates* 22(4):587–589. doi: 10.1007/BF02381252.
191. Jacobmeyer L.; Semmler T. *et al.* (2022) Genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* isolates carrying OXA-23 and OXA-58 genes from animals reveals ST1 and ST25 as major clonal lineages. *Antibiotics* 11(8):1045. doi: 10.3390/antibiotics11081045.
192. Jacobmeyer L.; Stamm I. *et al.* (2021) First report of NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain from a pet animal in Europe. *J Glob Antimicrob Resist* 26:128–129. doi: 10.1016/j.jgar.2021.05.003.
193. Jacobs A.C.; Hood I. *et al.* (2010) Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun* 78(5):1952–1962. doi: 10.1128/IAI.00889-09.
194. Janda J.M.; Abbott S.L. (2007) 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 45(9):2761–2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
195. Jeannot K.; Bolard A. *et al.* (2017) Resistance to Polymyxins in gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* 49(5):526–535. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029.
196. Jeon J.H.; Lee J.H. *et al.* (2015) Structural basis for Carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J Mol Sci* 16(5):9654–9692. doi: 10.3390/ijms16059654.
197. Ji S.; Chen Y. *et al.* (2014) Prevalence of Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase genes in *Acinetobacter* spp. isolates in China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33:989–997. doi: 10.1007/s10096-013-2037-z.
198. Jiang L.; Yu Y. *et al.* (2020) Whole-genome analysis of New Delhi Metallo-beta-lactamase-1-producing *Acinetobacter haemolyticus* from China. *J Glob Antimicrob Resist* 20:204–208. doi: 10.1016/j.jgar.2019.05.012.
199. Johns I.C.; Baxter K. *et al.* (2011) Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Vet Ophthalmol* 14(3):195–199. doi: 10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x.
200. Johnson T.L.; Waack U. *et al.* (2015) *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and *in vivo* fitness. *J Bacteriol* 198(4):711–719. doi: 10.1128/JB.00622-15.
201. Jokisalo J.; Bryan J. *et al.* (2010) Multiple-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bronchopneumonia in a colt following intensive care treatment. *Equine Veterinary Education* 22(6):281–286. doi: 10.1111/j.2042-3292.2010.00071.x.
202. Jolley K.A.; Bray J.E. *et al.* (2018) Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res* 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
203. Kaas R.S.; Friis C. *et al.* (2012) Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics* 13:577. doi: 10.1186/1471-2164-13-577.
204. Kaase M.; Szabados F. *et al.* (2014) Description of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *J Antimicrob Chemother* 69(1):81–84. doi: 10.1093/jac/dkt325.

205. Kaiser S.J.; Mutters N.T. *et al.* (2017) Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36(2):243–253. doi: 10.1007/s10096-016-2792-8.
206. Kassim A.; Pflüger V. *et al.* (2017) Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast. *BMC Microbiol* 17(1):128. doi: 10.1186/s12866-017-1037-z.
207. Kaya O.; Ates M. *et al.* (1989) Isolation of *Acinetobacter lwoffii* from hens with septicemia. *J Vet Med* 36(2):157–158. doi: 10.1111/j.1439-0450.1989.tb00584.x.
208. Kayser F.H.; Böttger E.C. *et al.* (2014) Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. Hygiene, Immunologie, Bakteriologie, Virologie, Mykologie, Parasitologie, Infektiologie, 13. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 9783131682536.
209. Kempf M.; Rolain J.-M. (2012) Emergence of resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 39(2):105–114. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.10.004.
210. Khalid S.; Ahmad N. *et al.* (2020) Outbreak of efficiently transferred Carbapenem-resistant *bla_{NDM}*-producing gram-negative Bacilli isolated from neonatal intensive care unit of an indian hospital. *Microb Drug Resist* 26(3):284–289. doi: 10.1089/mdr.2019.0092.
211. Kilic A.; Li H. *et al.* (2008) *Acinetobacter septicus* sp. nov. association with a nosocomial outbreak of bacteremia in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol* 46(3):902–908. doi: 10.1128/JCM.01876-07.
212. Kim S.W.; Choi C.H. *et al.* (2009) Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* 301(2):224–231. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01820.x.
213. Kimura Y.; Miyamoto T. *et al.* (2017) Analysis of IMP-1 type metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter radioresistens* isolated from companion animals. *J Infect Chemother* 23(9):655–657. doi: 10.1016/j.jiac.2017.03.011.
214. Klotz P. (2019) Verbreitung von *Acinetobacter*-Spezies bei Rindern in Hessen unter Berücksichtigung der antimikrobiellen Resistenz. Dissertation, Gießen.
215. Klotz P.; Göttig S. *et al.* (2017) Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates. *PLoS One* 12(2):e0171986. doi: 10.1371/journal.pone.0171986.
216. Klotz P.; Higgins P.G. *et al.* (2019) Seasonal occurrence and Carbapenem susceptibility of bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Front Microbiol.* Frontiers 10:272. doi: 10.3389/fmicb.2019.00272.
217. Klotz P.; Jacobmeyer L. *et al.* (2017) *Acinetobacter pittii* from companion animals coharboring *bla_{OXA-58}*, the *tet(39)* Region, and other resistance genes on a single plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 62(1):e01993-17. doi: 10.1128/AAC.01993-17.
218. Klotz P.; Jacobmeyer L. *et al.* (2017) Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST294 harbouring the OXA-72 carbapenemase from a captive grey parrot. *J Antimicrob Chemother* 73(4):1098–1100. doi: 10.1093/jac/dkx490.
219. Koeleman J.G.; van der Bijl M.W. *et al.* (2001) Antibiotic resistance is a major risk factor for epidemic behavior of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 22(5):284–288. doi: 10.1086/501901.
220. Koolman J.; Röhm K.-H. (2019) Taschenatlas Biochemie des Menschen. Thieme, Stuttgart. 9783132417403.
221. Kostyanev T.; Vilken T. *et al.* (2019) Detection and prevalence of Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria among European laboratories in the COMBACTE network: a COMBACTE LAB-Net survey. *Int J Antimicrob Agents* 53(3):268–274. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.10.013.

222. Krizova L.; Dijkshoorn L. *et al.* (2011) Diversity and evolution of *AbaR* genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrob Agents Chemother* 55(7):3201–3206. doi: 10.1128/AAC.00221-11.
223. Krogh H.V.; Kristensen S. (1981) A study of skin diseases in dogs and cats. VI. Microflora of the major canine pyodermas. *Nord Vet Med* 33(1):17–22.
224. Kuzi S.; Blum S.E. *et al.* (2016) Multi-drug-resistant *Acinetobacter-calcoaceticus-Acinetobacter-baumannii* complex infection outbreak in dogs and cats in a veterinary hospital. *J Small Anim Pract* 57(11):617–625. doi: 10.1111/jsap.12555.
225. La Scola B.; Gundi V.A.K.B. *et al.* (2006) Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter species*. *J Clin Microbiol* 44(3):827–832. doi: 10.1128/JCM.44.3.827-832.2006.
226. Lautrop H. (1962) Bacterium anitratum transferred to the genus *Cytophaga*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Suppl* 154:303–304.
227. Lee C.-R.; Lee J.H. *et al.* (2017) Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol* 7:55. doi: 10.3389/fcimb.2017.00055.
228. Lee M.J.; Jang S.J. *et al.* (2014) Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 78(1):29–34. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.013.
229. Lee S.-Y.; Yun S.H. *et al.* (2014) Proteogenomic characterization of antimicrobial resistance in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* DU202. *J Antimicrob Chemother* 69(6):1483–1491. doi: 10.1093/jac/dku008.
230. Li F.-J.; Starrs L. *et al.* (2019) Tug of war between *Acinetobacter baumannii* and host immune responses. *Pathog Dis* 76(9):ftz004. doi: 10.1093/femspd/ftz004.
231. Linz B.; Mukhtar N. *et al.* (2018) Virulent epidemic pneumonia in sheep caused by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 9:2616. doi: 10.3389/fmicb.2018.02616.
232. Liu D.; Liu Z.-S. *et al.* (2016) Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China. *Microbiol Immunol* 60(8):533–539. doi: 10.1111/1348-0421.12400.
233. Lodish H.; Lange C. *et al.* (2001) Molekulare Zellbiologie, 4. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. 3827410770.
234. Loehfelm T.W.; Luke N.R. *et al.* (2008) Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *J Bacteriol* 190(3):1036–1044. doi: 10.1128/JB.01416-07.
235. Longo F.; Voutto C. *et al.* (2014) Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol* 37(2):119–127.
236. López-Rojas R.; Domínguez-Herrera J. *et al.* (2011) Impaired virulence and *in vivo* fitness of Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 203(4):545–548. doi: 10.1093/infdis/jiq086.
237. Lui D.; Lui Z.-S. *et al.* (2016) Characterization of surface antigen protein 1 (*SurA1*) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. *Vet Microbiol* 186:126–138. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.02.018.
238. Luke N.R.; Sauberan S.L. *et al.* (2010) Identification and characterization of a glycosyltransferase involved in *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharide core biosynthesis. *Infect Immun* 78(5):2017–2023. doi: 10.1128/IAI.00016-10.
239. Lupo A.; Châtre P. *et al.* (2017) Clonal spread of *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 carrying *bla_{OXA-23}* in companion animals in France. *Antimicrob Agents Chemother* 61(1):e01881-16. doi: 10.1128/AAC.01881-16.

240. Lupo A.; Vogt D. *et al.* (2014) Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *J Food Prot* 77(11):1976–1981. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-073.
241. Ma F.; Shen C. *et al.* (2019) Identification of a novel plasmid carrying *mcr-4.3* in an *Acinetobacter baumannii* strain in China. *Antimicrob Agents Chemother* 63(6):e00133-19. doi: 10.1128/AAC.00133-19.
242. Magiorakos A.-P.; Srinivasan A. *et al.* (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18(3):268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
243. Magnet S.; Courvalin P. *et al.* (2001) Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in Aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrob Agents Chemother* 45(12):3375–3380. doi: 10.1128/AAC.45.12.3375-3380.2001.
244. Maiden M.C.J.; Bygraves J.A. *et al.* (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(6):3140–3145. doi: 10.1073/pnas.95.6.3140.
245. Malhotra J.; Anand S. *et al.* (2012) *Acinetobacter indicus* sp. nov. isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *Int J Syst Evol Microbiol* 62(12):2883–2890. doi: 10.1099/ijs.0.037721-0.
246. Marchand I.; Damier-Piolle L. *et al.* (2004) Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 48(9):3298–3304. doi: 10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004.
247. Mari-Almirall M.; Cosgaya C. *et al.* (2017) MALDI-TOF/MS identification of species from the *Acinetobacter baumannii* (*Ab*) group revisited: inclusion of the novel *A. seifertii* and *A. dijkshoorniae* species. *Clin Microbiol Infect* 23(3):210.e1-210.e9. doi: 10.1016/j.cmi.2016.11.020.
248. Marqué S.; Poirel L. *et al.* (2005) Regional occurrence of plasmid-mediated Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in *Acinetobacter* spp. in Europe. *J Clin Microbiol* 43(9):4885–4888. doi: 10.1128/JCM.43.9.4885-4888.2005.
249. Martí S.; Fernández-Cuenca F. *et al.* (2006) Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 24(2):77–80. doi: 10.1157/13085012.
250. Martí S.; Rodríguez-Baño J. *et al.* (2011) Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes*. BioMed Central 4(1):1–4. doi: 10.1186/1756-0500-4-5.
251. Martínez T.; Martínez I. *et al.* (2016) Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *J Med Microbiol* 65(8):784–792. doi: 10.1099/jmm.0.000289.
252. Martins N.; Picão R.C. *et al.* (2016) A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. *Infect Genet Evol* 42:41–45. doi: 10.1016/j.meegid.2016.04.031.
253. Maslova O.; Mindlin S. *et al.* (2022) Plasmids as key players in *Acinetobacter* adaptation. *Int J Mol Sci* 23(18):10893. doi: 10.3390/ijms231810893.
254. Mathewson J.J.; Simpson R.B. (1982) Glucose-nonfermenting gram-negative bacilli associated with clinical veterinary specimens. *J Clin Microbiol* 15(6):1016–1018. doi: 10.1128/jcm.15.6.1016-1018.1982.
255. Mattick J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:289–314. doi: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160938.

256. McConnell M.J.; Actis L. *et al.* (2013) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37(2):130–155. doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x.
257. McLellan J.E.; Pitcher J.I. *et al.* (2018) Superbugs in the supermarket? Assessing the rate of contamination with third-generation Cephalosporin-resistant gram-negative bacteria in fresh Australian pork and chicken. *Antimicrob Resist Infect Control* 7:30. doi: 10.1186/s13756-018-0322-4.
258. Mellmann A.; Harmsen D. *et al.* (2011) Prospective genomic characterization of the german enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PLoS One* 6(7):e22751. doi: 10.1371/journal.pone.0022751.
259. Mendes R.E.; Bell J.M. *et al.* (2009) Emergence and widespread dissemination of OXA-23, -24/40 and -58 carbapenemases among *Acinetobacter* spp. in Asia-Pacific nations: report from the SENTRY Surveillance Program. *J Antimicrob Chemother* 63(1):55–59. doi: 10.1093/jac/dkn434.
260. Mentzer A. von; Connor T.R. *et al.* (2014) Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* 46(12):1321–1326. doi: 10.1038/ng.3145.
261. Merino M.; Acosta J. *et al.* (2010) OXA-24 Carbapenemase gene flanked by XerC/XerD-like recombination sites in different plasmids from different *Acinetobacter* species isolated during a nosocomial outbreak. *Antimicrob Agents Chemother* 54(6):2724–2727. doi: 10.1128/AAC.01674-09.
262. Miksits K.; Hahn H. (1999) Basiswissen Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, Berlin. 978-3-642-18525-0.
263. Misisic D.; Anasin J. *et al.* (2018) OXA-72-mediated Carbapenem resistance in sequence type 1 multidrug (Colistin)-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with urinary tract infection in a dog from Serbia. *Antimicrob Agents Chemother* 62(7):e00219-18. doi: 10.1128/AAC.00219-18.
264. Mitchell K.E.; Turton J.F. *et al.* (2018) Isolation and identification of *Acinetobacter* spp. from healthy canine skin. *Vet Dermatol* 29(3):240-e87. doi: 10.1111/vde.12528.
265. Moffatt J.H.; Harper M. *et al.* (2010) Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 54(12):4971–4977. doi: 10.1128/AAC.00834-10.
266. Mohri T.; Takashima K. *et al.* (2009) Purulent pericarditis in a dog administered immune-suppressing drugs. *J Vet Med Sci* 71(5):669–672. doi: 10.1292/jvms.71.669.
267. Montaña S.; Schramm S.T.J. *et al.* (2016) The genetic analysis of an *Acinetobacter johnsonii* clinical strain evidenced the presence of horizontal genetic transfer. *PLoS One* 11(8):e0161528. doi: 10.1371/journal.pone.0161528.
268. Montealegre M.C.; Maya J.J. *et al.* (2012) First Identification of OXA-72 Carbapenemase from *Acinetobacter pittii* in Colombia. *Antimicrob Agents Chemother* 56(7):3996–3998. doi: 10.1128/AAC.05628-11.
269. Moore C.P.; Collins B.K. *et al.* (1995) Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses. 63 cases (1986-1994). *J Am Vet Med Assoc* 207(7):928–933.
270. Moore C.P.; Fales W.H. *et al.* (1983) Bacterial and fungal isolates from equidae with ulcerative keratitis. *J Am Vet Med Assoc* 182(6):600–603.
271. Moore C.P.; Heller N. *et al.* (1988) Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *American Journal of Veterinary Research* 49(6):773–777.
272. Morakchi H.; Loucif L. *et al.* (2017) Molecular characterisation of carbapenemases in urban pigeon droppings in France and Algeria. *J Glob Antimicrob Resist* 9:103–110. doi: 10.1016/j.jgar.2017.02.010.

273. Morris F.C.; Dexter C. *et al.* (2019) The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 10:1601. doi: 10.3389/fmicb.2019.01601.
274. Mu X.; Wang N. *et al.* (2016) The effect of Colistin resistance-associated mutations on the fitness of *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol* 7:1715. doi: 10.3389/fmicb.2016.01715.
275. Mugnier P.D.; Poirel L. *et al.* (2009) Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 191(7):2414–2418. doi: 10.1128/JB.01258-08.
276. Müller C, Stefanik D *et al.* (Hrsg.) (2019) Molecular epidemiology of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and identification of the novel international clone IC9: Results from a worldwide surveillance study (2012–2016). In Proceedings of the Abstract Book of the 29th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, P0947, Amsterdam.
277. Naas T.; Oueslati S. *et al.* (2017) Beta-lactamase database (BLDB) - Structure and Function. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32(1):917–919. doi: 10.1080/14756366.2017.1344235.
278. Nam H.M.; Lim S.K. *et al.* (2009) Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *J Dairy Sci* 92(5):2020–2026. doi: 10.3168/jds.2008-1739.
279. Narciso A.C.; Martins W.M. *et al.* (2020) Healthcare-associated Carbapenem-resistant OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* of the clonal complex CC79 colonizing migratory and captive aquatic birds in a Brazilian Zoo. *Sci Total Environ* 726:138232. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.138232.
280. Narciso A.C.; Martins W.M.B.S. *et al.* (2017) Detection of OXA-58-producing *Acinetobacter seifertii* recovered from a black-necked swan at a zoo lake. *Antimicrob Agents Chemother* 61(12):e01360-17. doi: 10.1128/AAC.01360-17.
281. Nemeč A. (2019) Revising the taxonomy of the *Acinetobacter lwoffii* group - the description of *Acinetobacter pseudolwoffii* sp. nov. and emended description of *Acinetobacter lwoffii*. *Syst Appl Microbiol* 42(2):159–167. doi: 10.1016/j.syapm.2018.10.004.
282. Nemeč A.; Krizova L. *et al.* (2011) Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res Microbiol* 162(4):393–404. doi: 10.1016/j.resmic.2011.02.006.
283. Nemeč A.; Krizova L. *et al.* (2015) *Acinetobacter seifertii* sp. nov. a member of the *Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *Int J Syst Evol Microbiol* 65(Pt 3):934–942. doi: 10.1099/ijs.0.000043.
284. Neumeister B.; Geiss H.K. *et al.* (2009) Mikrobiologische Diagnostik. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 9783137436027.
285. Nevers P.; Saedler H. (1977) Transposable genetic elements as agents of gene instability and chromosomal rearrangements. *Nature* 268(5616):109–115. doi: 10.1038/268109a0.
286. Newton J.R.; Wood J.L.N. *et al.* (2003) A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK Thoroughbred racehorses. *Prev Vet Med* 60(1):107–132. doi: 10.1016/s0167-5877(03)00085-0.
287. Nigro S.J.; Hall R.M. (2016) Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *bla_{OXA-23}* carbapenemase gene. *J Antimicrob Chemother* 71(5):1135–1147. doi: 10.1093/jac/dkv440.

288. Nigro S.J.; Holt K.E. *et al.* (2014) Carbapenem and Amikacin resistance on a large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid. *J Antimicrob Chemother* 70(4):1259–1261. doi: 10.1093/jac/dku486.
289. Nigro S.J.; Post V. *et al.* (2011) Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 66(7):1504–1509. doi: 10.1093/jac/dkr163.
290. Niu C.; Gilbert E.S. (2004) Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Appl Environ Microbiol* 70(12):6951–6956. doi: 10.1128/AEM.70.12.6951-6956.2004.
291. Nordmann P.; Poirel L. (2019) Epidemiology and diagnostics of Carbapenem resistance in gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 69(S7):521–528. doi: 10.1093/cid/ciz824.
292. Pagano M.; Martins A.F. *et al.* (2016) Mobile genetic elements related to Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz J Microbiol* 47(4):785–792. doi: 10.1016/j.bjm.2016.06.005.
293. Pagano M.; Poirel L. *et al.* (2015) Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 45(4):444–445. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.011.
294. Pailhories H.; Kempf M. *et al.* (2016) First case of OXA-24-producing *Acinetobacter baumannii* in cattle from Reunion Island, France. *Int J Antimicrob Agents* 48(6):763–764. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.005.
295. Pailhoriès H.; Belmonte O. *et al.* (2015) Diversity of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. *Int J Infect Dis* 37:64–69. doi: 10.1016/j.ijid.2015.05.012.
296. Pailhoriès H.; Hadjadj L. *et al.* (2016) Fortuitous diagnosis of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* carriage in a patient from France with no recent history of travel. *J Antimicrob Chemother* 72(3):942–944. doi: 10.1093/jac/dkw505.
297. Pasteran F.; Mora M.M. *et al.* (2014) Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* strains in Paraguay. *J Antimicrob Chemother* 69(9):2575–2578. doi: 10.1093/jac/dku139.
298. Pavoni Gomes Chagas T.; Tavares e Oliveira, T. R. *et al.* (2017) Carbapenem-resistant *Acinetobacter pittii* strain harboring bla_{OXA-72} from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 88(1):93–94. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.022.
299. Peleg A.Y.; Breijl A. de *et al.* (2012) The success of *Acinetobacter* Species: genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One* 7(10):e46984. doi: 10.1371/journal.pone.0046984.
300. Peleg A.Y.; Jara S. *et al.* (2009) *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrob Agents Chemother* 53(6):2605–2609. doi: 10.1128/AAC.01533-08.
301. Peleg A.Y.; Seifert H. *et al.* (2008) *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21(3):538–582. doi: 10.1128/CMR.00058-07.
302. Penwell W.F.; Arivett B.A. *et al.* (2012) The *Acinetobacter baumannii entA* gene located outside the acinetobactin cluster is critical for siderophore production, iron acquisition and virulence. *PLoS One* 7(5):e36493. doi: 10.1371/journal.pone.0036493.
303. Perez F.; Hujer A.M. *et al.* (2007) Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51(10):3471–3484. doi: 10.1128/AAC.01464-06.
304. Perilli M.; FELICI A. *et al.* (1996) Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter lwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 40(3):715–719. doi: 10.1128/AAC.40.3.715.

305. Pfeifer Y.; Trifonova A. *et al.* (2017) Clonal transmission of gram-negative bacteria with carbapenemases NDM-1, VIM-1, and OXA-23/72 in a bulgarian hospital. *Microb Drug Resist* 23(3):301–307. doi: 10.1089/mdr.2016.0059.
306. Pfeifer Y.; Wilharm G. *et al.* (2011) Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 66(9):1998–2001. doi: 10.1093/jac/dkr256.
307. Poirel L.; Berçot B. *et al.* (2012) Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in cattle, France. *Emerg Infect Dis* 18(3):523–525. doi: 10.3201/eid1803.111330.
308. Poirel L.; Bonnin R.A. *et al.* (2011) Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother* 55(9):4224–4229. doi: 10.1128/AAC.00165-11.
309. Poirel L.; Bonnin R.A. *et al.* (2011) Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* Species. *IUBMB Life* 63(12):1061–1067. doi: 10.1002/iub.532.
310. Poirel L.; Bonnin R.A. *et al.* (2012) Tn125-related acquisition of *bla*_{NDM-like} genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 56(2):1087–1089. doi: 10.1128/AAC.05620-11.
311. Poirel L.; Cabanne L. *et al.* (2005) Genetic environment and expression of the extended-spectrum β -lactamase *bla*_{PER-1} gene in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 49(5):1708–1713. doi: 10.1128/AAC.49.5.1708-1713.2005.
312. Poirel L.; Figueiredo S. *et al.* (2008) *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of Carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 52(4):1252–1256. doi: 10.1128/AAC.01304-07.
313. Poirel L.; Marqué S. *et al.* (2005) OXA-58, a novel Class D β -lactamase involved in resistance to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 49(1):202–208. doi: 10.1128/AAC.49.1.202-208.2005.
314. Poirel L.; Menuteau O. *et al.* (2003) Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a french hospital. *J Clin Microbiol* 41(8):3542–3547. doi: 10.1128/jcm.41.8.3542-3547.2003.
315. Poirel L.; Nordmann P. (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect* 12(9):826–836. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x.
316. Poirel L.; Nordmann P. (2006) Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 50(4):1442–1448. doi: 10.1128/AAC.50.4.1442-1448.2006.
317. Pomba C.; Endimiani A. *et al.* (2014) First report of OXA-23-mediated Carbapenem resistance in sequence type 2 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with urinary tract infection in a cat. *Antimicrob Agents Chemother* 58(2):1267–1268. doi: 10.1128/AAC.02527-13.
318. Poppel M.T.; Skiebe E. *et al.* (2016) *Acinetobacter equi* sp. nov. isolated from horse faeces. *Int J Syst Evol Microbiol* 66(2):881–888. doi: 10.1099/ijsem.0.000806.
319. Post V.; White P.A. *et al.* (2010) Evolution of *AbaR*-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65(6):1162–1170. doi: 10.1093/jac/dkq095.
320. Pournaras S.; Gogou V. *et al.* (2014) Single-locus-sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *J Clin Microbiol* 52(5):1653–1657. doi: 10.1128/JCM.03565-13.
321. Povilonis J.; Seputiene V. *et al.* (2013) Spread of Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 68(5):1000–1006. doi: 10.1093/jac/dks499.

322. Püntener-Simmen S.; Zurfluh K. *et al.* (2019) Phenotypic and genotypic characterization of clinical isolates belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (ACB) complex isolated from animals treated at a veterinary hospital in Switzerland. *Front Veterinary Science* 6:17. doi: 10.3389/fvets.2019.00017.
323. Rafei R.; Hamze M. *et al.* (2015) Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl Environ Microbiol* 81(7):2359–2367. doi: 10.1128/AEM.03824-14.
324. Rahman H.; Baxi K.K. (1985) Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from a cow with mastitis. *J Vet Med* 32(1):71–72. doi: 10.1111/j.1439-0450.1985.tb01939.x.
325. Rajasekhar M.; Muniyappa L. *et al.* (1978) Chronic haematuria caused by *Acinetobacter calcoaceticus* in a race horse. *Vet Rec* 102(25):557. doi: 10.1136/vr.102.25.557-a.
326. Rakin A.; Schneider L. *et al.* (2012) Hunger for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia*. *Front Cell Infect Microbiol* 2:151. doi: 10.3389/fcimb.2012.00151.
327. Repizo G.D.; Gagné S. *et al.* (2015) Differential role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* virulence. *PLoS One* 10(9):e0138265. doi: 10.1371/journal.pone.0138265.
328. Ribera A.; Roca I. *et al.* (2003) Partial characterization of a transposon containing the *tet(A)* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 52(3):477–480. doi: 10.1093/jac/dkg344.
329. Ribera A.; Ruiz J. *et al.* (2003) Presence of the *TetM* determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(7):2310–2312. doi: 10.1128/aac.47.7.2310-2312.2003.
330. Rice L.B. (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis* 197(8):1079–1081. doi: 10.1086/533452.
331. Richmond G.E.; Evans L.P. *et al.* (2016) The *Acinetobacter baumannii* two-component system AdeRS regulates genes required for multidrug efflux, biofilm formation, and virulence in a strain-specific manner. *MBio* 7(2):e00430-16. doi: 10.1128/mBio.00852-16.
332. Rieber H.; Frontzek A. *et al.* (2016) Molecular investigation of Carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from hospitals in North Rhine-Westphalia, Germany. *Microb Drug Resist* 23(1):25–31. doi: 10.1089/mdr.2016.0035.
333. Robert Koch-Institut (2012) Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung von multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Bundesgesundheitsblatt. Springer. *Epidemiologisches Bulletin* 55(21):1311–1354. doi:10.1007/s00103-012-1549-5.
334. Robert Koch-Institut (2014) Ergänzung zu den "Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen" (2012) im Rahmen der Anpassung an die epidemiologische Situation. *Epidemiologisches Bulletin*. Springer 21:183–188.
335. Robert Koch-Institut (2018) Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NZR) für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bulletin*. Springer 28:263–270. doi: 10.1016/j.khinf.2013.09.011.
336. Robert Koch-Institut (2022) Bericht des Nationalen Referenzzentrums (NZR) für gramnegative Krankenhauserreger. *Epidemiologisches Bulletin*. Springer 19:1–7.
337. Roberts M.C. (1996) Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *Federation of European Microbiological Societies: Microbiology Reviews* 19(1):1–24. doi: 10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x.
338. Roca I.; Mosqueda N. *et al.* (2014) Molecular characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* isolated from Turkey in 2006. *J Antimicrob Chemother* 69(12):3437–3438. doi: 10.1093/jac/dku306.

339. Rocha G.A.; Lima D.F. *et al.* (2017) Species distribution, sequence types and antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. from cystic fibrosis patients. *Epidemiol Infect* 146(4):524–530. doi: 10.1017/S0950268817002849.
340. Rodríguez C.H.; Nastro M. *et al.* (2014) First isolation of *Acinetobacter johnsonii* co-producing PER-2 and OXA-58 β -lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 80(4):341–342. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.013.
341. Rodríguez-Baño J.; Martí S. *et al.* (2008) Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect* 14(3):276–278. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x.
342. Rose M.; Landmann D. *et al.* (2014) Are community environmental surfaces near hospitals reservoirs for gram-negative nosocomial pathogens? *Am. J. Infect. Control*. Mosby 42(4):346–348. doi: 10.1016/j.ajic.2013.12.025.
343. Royer S.; Campos P.A. de *et al.* (2018) Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial *bla*_{OXA-23} producing XDR *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 13(6):e0198643. doi: 10.1371/journal.pone.0198643.
344. Ruan Z.; Chen Y. *et al.* (2017) Glimpse into the genome sequence of a multidrug-resistant *Acinetobacter pittii* ST950 clinical isolate carrying the *bla*_{OXA-72} and *bla*_{OXA-533} genes in China. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 112(10):723–727. doi: 10.1590/0074-02760170019.
345. Russo T.A.; Luke N.R. *et al.* (2010) The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun* 78(9):3993–4000. doi: 10.1128/IAI.00366-10.
346. Saavedra S.Y.; Cayô R. *et al.* (2014) Early dissemination of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* strain in Colombia: a case report. *Braz J Infect Dis* 18(6):678–680. doi: 10.1016/j.bjid.2014.05.017.
347. Saha R.; Saha N. *et al.* (2013) Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol* 53(4):303–317. doi: 10.1002/jobm.201100552.
348. Sahl J.W.; Del Franco M. *et al.* (2015) Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage. *Sci Rep* 5:15188. doi: 10.1038/srep15188.
349. Salto I.P.; Torres Tejerizo G. *et al.* (2018) Comparative genomic analysis of *Acinetobacter* spp. plasmids originating from clinical settings and environmental habitats. *Sci Rep* 8(1):7783. doi: 10.1038/s41598-018-26180-3.
350. San Millan A.; MacLean R.C. (2017) Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. *Microbiol Spectrum* 5(5):1–12. doi: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017.
351. San Millan A.; Toll-Riera M. *et al.* (2018) Integrative analysis of fitness and metabolic effects of plasmids in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The ISME Journal* 12:3014–3024. doi: 10.1038/s41396-018-0224-8.
352. Saphir D.A.; Carter G.R. (1976) Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. *J Clin Microbiol* 3(3):344–349. doi: 10.1128/jcm.3.3.344-349.1976.
353. Savin M.; Bierbaum G. *et al.* (2020) ESKAPE bacteria and extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from wastewater and process water from german poultry slaughterhouses. *Appl Environ Microbiol* 86(8):e02748-19. doi: 10.1128/AEM.02748-19.
354. Scaife W.; Young H.K. *et al.* (1995) Transferable Imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *J Antimicrob Chemother* 36(3):585–587. doi: 10.1093/jac/36.3.585.

355. Schauffler K.; Wieler L.H. *et al.* (2013) ESBL-plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be "cured" of wild-type *Escherichia coli* using a heat technique. *Gut Pathog* 5(1):34. doi: 10.1186/1757-4749-5-34.
356. Schleicher X.; Higgins P.G. *et al.* (2013) Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin Microbiol Infect* 19(8):737–742. doi: 10.1111/1469-0691.12026.
357. Schwarz S.; Silley P. *et al.* (2010) Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Vet Microbiol* 141(1-2):1–4. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.013.
358. Schweppe D.K.; Harding C. *et al.* (2015) Host-microbe protein interactions during bacterial infection. *Chemistry & Biology* 22(11):1521–1530. doi: 10.1016/j.chembiol.2015.09.015.
359. Seifert H.; Dijkshoorn L. *et al.* (1997) Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *J Clin Microbiol* 35(11):2819–2825. doi: 10.1128/jcm.35.11.2819-2825.1997.
360. Seifert H.; Gerner-Smidt P. (1995) Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J Clin Microbiol* 33(5):1402–1407. doi: 10.1128/jcm.33.5.1402-1407.1995.
361. Selbitz H.J.; Truyen U. *et al.* (2015) Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. Enke-Verlag, Stuttgart. 9783830412625.
362. Serota D.P.; Sexton M.E. *et al.* (2018) Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii* in North America: case report and review of the literature. *Open Forum Infect Dis* 5(3):ofy044. doi: 10.1093/ofid/ofy044.
363. Shaw K.J.; Rather P.N. *et al.* (1993) Molecular genetics of Aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the Aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57(1):138–163. doi: 10.1128/MMBR.57.1.138-163.1993.
364. Sherratt D.J. (1974) Bacterial plasmids. *Cell* 3(3):189–195. doi: 10.1016/0092-8674(74)90130-5.
365. Silva L.; Mourao J. *et al.* (2018) Uncommon carbapenemase-encoding plasmids in the clinically emergent *Acinetobacter pittii*. *J Antimicrob Chemother* 73(1):52–56. doi: 10.1093/jac/dkx364.
366. Smani Y.; Dominguez-Herrera J. *et al.* (2013) Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *J Infect Dis* 208(10):1561–1570. doi: 10.1093/infdis/jit386.
367. Smani Y.; Fàbrega A. *et al.* (2014) Role of OmpA in the multidrug resistance phenotype of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58(3):1806–1808. doi: 10.1128/AAC.02101-13.
368. Smani Y.; López-Rojas R. *et al.* (2012) *In vitro* and *in vivo* reduced fitness and virulence in Ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 18(1):E1-4. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03695.
369. Smet A.; Boyen F. *et al.* (2012) OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? *J Antimicrob Chemother* 67(12):3009–3010. doi: 10.1093/jac/dks311.
370. Smet A.; Cools P. *et al.* (2014) *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *Int J Syst Evol Microbiol* 64(12):4007–4015. doi: 10.1099/ijs.0.068791-0.
371. Smith M.G.; Gianoulis T.A. *et al.* (2007) New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* 21(5):601–614. doi: 10.1101/gad.1510307.
372. Sogawa K.; Watanabe M. *et al.* (2011) Use of the MALDI BioTyper system with MALDI-TOF mass spectrometry for rapid identification of microorganisms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400(7):1905–1911. doi: 10.1007/s00216-011-4877-7.

373. Songer J.G. (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* 5(4):156–161. doi: 10.1016/S0966-842X(97)01005-6.
374. Srinivasan V.B.; Rajamohan G. *et al.* (2009) Role of AbeS, a novel efflux pump of the SMR family of transporters, in resistance to antimicrobial agents in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53(12):5312–5316. doi: 10.1128/AAC.00748-09.
375. Stahl J.; Bergmann H. *et al.* (2015) *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three phospholipases D. *PLoS One* 10(9):e0138360. doi: 10.1371/journal.pone.0138360.
376. Stern M.J.; Ferro-Luzzi Ames G. *et al.* (1984) Repetitive extragenetic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell* 37(3):1015–1026. doi: 10.1016/0092-8674(84)90436-7.
377. Stolle I. (2017) Phänotypische und genotypische Charakterisierung von ESBL-/AmpC-β-Laktamase- und Carbapenemase-bildenden *Escherichia coli*- und *Klebsiella* spp.-Isolaten aus klinischem Untersuchungsgut von Haustieren. Dissertationsschrift. VVB Laufersweiler Verlag, Gießen 978-3-8359-6559-1.
378. Su X.-Z.; Chen J. *et al.* (2005) AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob Agents Chemother* 49(10):4362–4364. doi: 10.1128/AAC.49.10.4362-4364.2005.
379. Suerbaum S.; Burchard G.D. *et al.* (2016) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer, Berlin, Heidelberg. 9783662486788.
380. Sung J.Y.; Koo S.H. *et al.* (2015) Emergence of *Acinetobacter pittii* Harboring New Delhi Metallo-β-Lactamase Genes in Daejeon, Korea. *Ann Lab Med* 35(5):531–534. doi: 10.3343/alm.2015.35.5.531.
381. Tacconelli E.; Magrini N. (2018) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *WHO* 18(3):318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
382. Taj Z.; Rasool M.H. *et al.* (2020) Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to International Clone II from a pet cat with urinary tract infection; The first report from Pakistan. *Pol J Microbiol* 69(2):1–4. doi: 10.33073/pjm-2020-017.
383. Talreja D.; Muraleedharan C. *et al.* (2014) Virulence properties of multidrug resistant ocular isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Curr Eye Res* 39(7):695–704. doi: 10.3109/02713683.2013.873055.
384. Tang B.; Yang H. *et al.* (2021) Coexistence and characterization of *tet(X5)* and NDM-3 in the MDR-*Acinetobacter indicus* of duck origin. *Microb Pathog* 150:104697. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104697.
385. Tang L.; Shen W. *et al.* (2020) Whole-genome analysis of two copies of *bla_{NDM-1}* gene carrying *Acinetobacter johnsonii* strain Acsw19 isolated from Sichuan, China. *Infect Drug Resist* 13:855–865. doi: 10.2147/IDR.S236200.
386. Thi Khanh Nhu N.; Riordan D.W. *et al.* (2016) The induction and identification of novel Colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Sci Rep* 6:28291. doi: 10.1038/srep28291.
387. Tilley D.; Law R. *et al.* (2014) CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiol Lett* 356(1):56–61. doi: 10.1111/1574-6968.12496.
388. Tipton K.A.; Farokhyfar M. *et al.* (2017) Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *MicrobiologyOpen* 6(2):e00418. doi: 10.1002/mbo3.418.

389. Tjernberg I.; Ursing J. (1989) Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 97(7):595–605. doi: 10.1111/j.1699-0463.1989.tb00449.x.
390. Tomaras A.P.; Dorsey C.W. *et al.* (2003) Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149(12):3473–3484. doi: 10.1099/mic.0.26541-0.
391. Tomaszek F.; Higgins P.G. *et al.* (2016) Head-to-head comparison of two multi-locus sequence typing (MLST) schemes for characterization of *Acinetobacter baumannii* outbreak and sporadic isolates. *PLoS One* 11(4):e0153014. doi: 10.1371/journal.pone.0153014.
392. Toutain P.-L.; Bousquet-Mélou A. *et al.* (2017) En route towards european clinical breakpoints for veterinary antimicrobial susceptibility testing: a position paper explaining the VetCAST approach. *Front Microbiol* 8:2344. doi: 10.3389/fmicb.2017.02344.
393. Towner K.J. (2009) *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect* 73(4):355–363. doi: 10.1016/j.jhin.2009.03.032.
394. Turton J.F.; Gabriel S.N. *et al.* (2007) Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect* 13(8):807–815. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x.
395. Turton J.F.; Ward M.E. *et al.* (2006) The role of IS*Abal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett* 258(1):72–77. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x.
396. Urry L.A.; Cain M.L. *et al.* (2019) Campbell Biologie. Pearson Studium, Hallbergmoos. 978-3-86894-366-5.
397. Vallejo J.A.; Beceiro A. *et al.* (2015) Optimisation of the *Caenorhabditis elegans* model for studying the pathogenesis of opportunistic *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* S0924-8579(15):00241-1. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2015.05.021.
398. Vallenet D.; Nordmann P. *et al.* (2008) Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS One* 3(3):e1805. doi: 10.1371/journal.pone.0001805.
399. van der Kolk J.H.; Endimiani A. *et al.* (2018) *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist*. Elsevier 16:59–71. doi: 10.1016/j.jgar.2018.08.011.
400. van Dessel H.; Dijkshoorn L. *et al.* (2004) Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res Microbiol* 155(2):105–112. doi: 10.1016/j.resmic.2003.10.003.
401. van Spijk J.N.; Schmitt S. *et al.* (2016) A retrospective analysis of antimicrobial resistance in bacterial pathogens in an equine hospital (2012–2015). *Schweiz Arch Tierheilkd* 158(6):433–442. doi: 10.17236/sat00068.
402. Vanechoutte M.; Deveriese L.A. *et al.* (2000) *Acinetobacter baumannii*-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. *J Clin Microbiol* 38(11):4280–4281. doi: 10.1128/JCM.38.11.4280-4281.2000.
403. Vasconcelos A.T.R.; Barth A.L. *et al.* (2015) The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 83(4):382–385. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.08.006.
404. Versalovic J.; Koeuth T. *et al.* (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* 19(24):6823–6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823.
405. Vijayakumar S.; Rajenderan S. *et al.* (2016) Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Front Public Health* 4:105. doi: 10.3389/fpubh.2016.00105.

406. Vila J.; Marti S. *et al.* (2007) Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 59(6):1210–1215. doi: 10.1093/jac/dkl509.
407. Vila J.; Ruiz J. *et al.* (1995) Mutation in the *gyrA* gene of Quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 39(5):1201–1203. doi: 10.1128/AAC.39.5.1201.
408. Vila J.; Ruiz J. *et al.* (1997) Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 39(6):757–762. doi: 10.1093/jac/39.6.757.
409. Villalón P.; Ortega M. *et al.* (2019) Dynamics of a sporadic nosocomial *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii* complex population. *Front Microbiol* 10:593. doi: 10.3389/fmicb.2019.00593.
410. Villegas M.V.; Hartstein A.I. (2003) *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infect Control Hosp Epidemiol* 24(4):284–295. doi: 10.1086/502205.
411. Visca P.; Seifert H. *et al.* (2011) *Acinetobacter* infection – an emerging threat to human health. *IUBMB Life* 63(12):1048–1054. doi: 10.1002/iub.534.
412. Vogwill T.; MacLean R.C. (2014) The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol. Appl.* 8(3):284–295. doi: 10.1111/eva.12202.
413. Walther B.; Klein K.-S. *et al.* (2018) Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* among horses entering a veterinary teaching hospital: the contemporary "Trojan Horse". *PLoS One* 13(1):e0191873. doi: 10.1371/journal.pone.0191873.
414. Walther-Rasmussen J.; Høiby N. (2007) Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 60(3):470–482. doi: 10.1093/jac/dkm226.
415. Wand M.E.; Bock L.J. *et al.* (2012) *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *J Med Microbiol* 61(4):470–477. doi: 10.1099/jmm.0.037523-0.
416. Wang Y.; Wu C. *et al.* (2012) Identification of New Delhi Metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS One* 7(5):e37152. doi: 10.1371/journal.pone.0037152.
417. Wareth G.; Brandt C. *et al.* (2020) Spatio-temporal distribution of *Acinetobacter baumannii* in Germany - a comprehensive systematic review of studies on resistance development in humans (2000–2018). *Microorganisms* 8(3):375. doi: 10.3390/microorganisms8030375.
418. Webb H.E.; Bugarel M. *et al.* (2016) Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the High Plains Region of the USA. *PLoS One* 11(1):e0147363. doi: 10.1371/journal.pone.0147363.
419. Weber B.S.; Harding C.M. *et al.* (2015) Pathogenic *Acinetobacter*. From the cell surface to infinity and beyond. *J Bacteriol* 198(6):880–887. doi: 10.1128/JB.00906-15.
420. Weidendorfer M.; Chae J.I. *et al.* (2015) Analysis of endothelial adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* using a dynamic human *ex vivo* infection model. *Infect Immun* 84(3):711–722. doi: 10.1128/IAI.01502-15.
421. Wilharm G.; Skiebe E. *et al.* (2017) Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environ Microbiol* 19(10):4349–4364. doi: 10.1111/1462-2920.13931.
422. Wisplinghoff H.; Seifert H. (2014) Infektionen mit *Acinetobacter baumannii* beim Menschen – Epidemiologie und klinische Bedeutung. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 127(11/12):447–457. doi: 10.2376/0005-9366-127-447.

423. Wong D.; Nielsen T.B. *et al.* (2017) Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev* 30(1):409–447. doi: 10.1128/CMR.00058-16.
424. World Health Organization (2018) Critically important antimicrobials for human medicine. WHO. 9789241515528.
425. Wu M.-S.; Collier S. *et al.* (2017) Sensitivity and specificity of Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization - Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) in discrimination at species level for *Acinetobacter* bacteremia. *J Microbiol Methods* 140:58–60. doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.019.
426. Yamamoto M.; Nagao M. *et al.* (2011) Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying *bla*_{IMP-19} among *Acinetobacter* species in Japan. *J Antimicrob Chemother* 66(11):2480–2483. doi: 10.1093/jac/dkr336.
427. Yang C.-H.; Su P.-W. *et al.* (2019) Biofilm formation in *Acinetobacter Baumannii*: genotype-phenotype correlation. *Molecules* 24(10):1849. doi: 10.3390/molecules24101849.
428. Yang J.; Chen Y. *et al.* (2012) Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect* 18(12):E506–E513. doi: 10.1111/1469-0691.12035.
429. Yang W.; Moore I.F. *et al.* (2004) TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to Tetracycline antibiotics. *J Biol Chem* 279(50):52346–52352. doi: 10.1074/jbc.M409573200.
430. Yoon E.-J.; Chabane Y.N. *et al.* (2016) Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 6(2):e00309-15. doi: 10.1128/mBio.00309-15.
431. Zander E.; Bonnin R.A. *et al.* (2014) Characterization of *bla*_{OXA-143} Variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58(5):2704–2708. doi: 10.1128/AAC.02618-13.
432. Zander E.; Fernández-González A. *et al.* (2014) Worldwide dissemination of acquired Carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 43(4):375–377. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.01.012.
433. Zander E.; Nemeč A. *et al.* (2012) Association between β -lactamase-encoding *bla*_{OXA-51} variants and DiversiLab Rep-PCR-based typing of *Acinetobacter baumannii* isolates. *J Clin Microbiol* 50(6):1900–1904. doi: 10.1128/JCM.06462-11.
434. Zarrilli R.; Pournaras S. *et al.* (2013) Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 41(1):11–19. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008.
435. Zeana C.; Larson E. *et al.* (2003) The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 24(4):275–279. doi: 10.1086/502209.
436. Zhang D.; Xia J. *et al.* (2016) Biological features of biofilm-forming ability of *Acinetobacter baumannii* strains derived from 121 elderly patients with hospital-acquired pneumonia. *Clin Exp Med* 16(1):73–80. doi: 10.1007/s10238-014-0333-2.
437. Zhang W.-J.; Lu Z. *et al.* (2013) Complete sequence of the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J Antimicrob Chemother* 68(7):1681–1682. doi: 10.1093/jac/dkt066.
438. Zhou S.; Chen X. *et al.* (2015) “Roar” of *bla*_{NDM-1} and “silence” of *bla*_{OXA-58} co-exist in *Acinetobacter pittii*. *Sci Rep* 5:8976. doi: 10.1038/srep08976.
439. Zong Z.; Zhang X. (2013) *Bla*_{NDM-1}-carrying *Acinetobacter johnsonii* detected in hospital sewage. *J Antimicrob Chemother* 68(5):1007–1010. doi: 10.1093/jac/dks050.

440. Zordan S. (2011) Diversität und Klonalität multiresistenter *Acinetobacter*-Stämme von Patienten deutscher Tierkliniken und Tierarztpraxen. Dissertationsschrift, Gießen 978-3-8359-5752-7.
441. Zordan S.; Prenger-Berninghoff E. *et al.* (2011) Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg Infect Dis* 17(9):1751–1754. doi: 10.3201/eid1709.101931.
442. Zou D.; Huang Y. *et al.* (2015) A novel New Delhi Metallo-beta-lactamase variant, NDM-14, isolated in a chinese hospital possesses increased enzymatic activity against Carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 59(4):2450–2453. doi: 10.1128/AAC.05168-14.
443. Zou D.; Huang Y. *et al.* (2017) Complete sequences of two novel bla NDM-1-harbouring plasmids from two *Acinetobacter towneri* isolates in China associated with the acquisition of Tn125. *Sci Rep* 7(1):9405. doi: 10.1038/s41598-017-09624-0.

10. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich besonders bei Frau Prof. Dr. Christa Ewers für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung sowie fachliche Unterstützung bedanken. Großen Dank an Peter Klotz für die Einführung in die Welt der *Acinetobacter* und die hilfreichen Diskussionen. Des Weiteren möchte ich mich herzlichst bei dem Team des S2-Labors, insbesondere bei Uschi, Anja und Jörg bedanken für die Einarbeitung in die verschiedenen Methoden, die angenehme Stimmung sowie den Austausch von Erfahrungen. Ebenfalls möchte ich mich für die tolle Unterstützung bei dem Team der Nährboden- und der Spülküche sowie des Sekretariats bedanken. Für die Gewinnung der Isolate bedanke ich mich besonders bei Frau Dr. Ellen Prenger-Berninghoff, Frau Dr. Nadine Schmidt, Herrn Dr. Carsten Heydel sowie dem gesamten Team der Diagnostik. Vielen lieben Dank an Frau Dr. Katharina Kerner – Danke für deine Unterstützung in jeglicher Situation, deine Hilfe bei Problemen und für die freundschaftlichen und lustigen Mittagspausen.

Für die finanzielle Unterstützung möchte ich mich insbesondere bei der Akademie für Tiergesundheit e.V. bedanken – ohne diese wäre die Dissertation nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank für die Übersendung von Isolaten für diese Arbeit gilt Frau Dr. Ivonne Stamm (Kornwestheim), Herrn Dr. Stephan Göttig (Frankfurt am Main) und Frau Dr. Yvonne Pfeifer (Wernigerode). Vielen Dank an Herrn Dr. Torsten Semmler (Berlin) für die Durchführung der Gesamtgenom-Sequenzierungen und -Analysen. Für die lehrreichen Gespräche und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung dieses Projekts möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Klaus Failing, Herrn Schaubmar und Frau Sparenberg bedanken.

Ein großer Dank gebührt all meinen lieben Mitdoktorand*innen – Franzi, Steffen, Sophie, Maria, Peter, Dordia, Franzi, Sandra und Jessica – Danke, für den tollen Zusammenhalt, das wundervolle Miteinander, das Teilen von Frustration und lustigen Momenten sowie das ein oder andere gemütliche Feierabendgetränk. Liebe Franzi, vielen lieben Dank, dass du mich immer unterstützt hast, dein offenes Ohr, die großartige gemeinsame Büroatmosphäre und die einzigartige Freundschaft. Zum Abschluss möchte ich meinen Freunden, meinen Eltern, ohne die ich heute nicht das wäre, was ich bin, meinen Schwestern und meinem Freund Lennart von ganzem Herzen Danken. Danke vielmals für die umfassende Unterstützung, sei es motivierend, finanziell oder einfach durch Zuhören. Danke für das Ertragen meiner Launen, bestärken meiner Entscheidungen sowie des Durchhaltens und die aufbauenden Worte. Danke für eure Liebe, euren Rückhalt und euer Verständnis, damit ich diese Arbeit abschließen konnte. Tausend Dank!

11. Selbstständigkeitserklärung

„Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.“

Lisa Jacobmeyer

12. Eigenanteil in den Publikationen

Der Eigenanteil ist den Publikationen direkt zu entnehmen.

13. Anhang

13.1. Volltexte der Publikation 1, 2 und 3



Article

Genomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 and OXA-58 Genes from Animals Reveals ST1 and ST25 as Major Clonal Lineages

Lisa Jacobmeyer¹, Torsten Semmler², Ivonne Stamm³ and Christa Ewers^{1,*} ¹ Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Department of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University Giessen, 35392 Giessen, Germany; Lisa.Jacobmeyer@vetmed.uni-giessen.de² NG1 Microbial Genomics, Robert Koch Institute, 13353 Berlin, Germany; SemmlerT@rki.de³ Vet Med Labor GmbH, 70806 Kornwestheim, Germany; Ivonne.Stamm@idexx.com

* Correspondence: Christa.Ewers@vetmed.uni-giessen.de; Tel.: +49-641-9938300

Abstract: *Acinetobacter baumannii* is increasingly being recognized as a relevant pathogen for animals with a putative zoonotic impact. This study aimed at identifying and characterizing carbapenemase-producing *A. baumannii* from animals. Among 503 *A. baumannii*, mainly isolated from dogs/cats (75.7%) between 2013 and 2018, 42 isolates from 22 veterinary clinics (VCs) harboured *bla*_{OXA-58} ($n = 29$) or *bla*_{OXA-23} ($n = 13$). The *bla*_{OXA-58} gene was located on plasmids (11.4–21.1 kb) within different genetic surroundings (patterns A–D). *Bla*_{OXA-23} was embedded in Tn2006 on the chromosome ($n = 4$; pattern a) or Tn2008 on plasmids ($n = 9$; 41.2–71.3 kb; patterns b–e). The predominant IC1-ST1^P-OXA-58 (66.7%; 96.4% cgMLST complex type (CT)-1808) was disseminated among 11 VCs in Germany. Resistance islands *AbaR3*-like ($n = 15$) and *AbaR10* ($n = 1$) have emerged among ST1-isolates since 2016. IC7-ST25^P-OXA-23 isolates (21.4%) occurred in seven VCs in Germany, France and Italy and differed in their resistance gene patterns from those of OXA-58 isolates. They were separated into six CTs, basically according to their regional origin. Other STs observed were ST10, ST578 and ST602. In conclusion, OXA-23 and OXA-58 were linked with ST1 and ST25, two globally distributed lineages in humans. The suggested transmission of certain lineages within and among VCs together with the acquisition of *AbaR* islands hints at a successful dissemination of multidrug-resistant strains in the VC environment.

Keywords: companion animal; carbapenemase; OXA; international clone; resistance island; veterinary



Citation: Jacobmeyer, L.; Semmler, T.; Stamm, I.; Ewers, C. Genomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* Isolates Carrying OXA-23 and OXA-58 Genes from Animals Reveals ST1 and ST25 as Major Clonal Lineages. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1045. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081045>

Academic Editors: Jana Avberšek and Tetsuo Asai

Received: 31 May 2022

Accepted: 26 July 2022

Published: 3 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is an opportunistic Gram-negative bacterium that is responsible for a wide range of healthcare-associated infections such as ventilator-associated pneumonia, wound infections or catheter-associated bloodstream infections, especially in intensive care units (ICU) [1]. The majority of hospital-acquired infections are caused by *A. baumannii* strains belonging to international clones IC1, IC2 and, more recently, to IC7, corresponding to clonal complexes CC1, CC2, and CC25 and to sequence types ST1, ST2 and ST25 (Pasteur scheme) [1–4]. In the case of infections with multidrug-resistant *A. baumannii*, therapeutic options are generally limited. Of particular concern is the emergence of *A. baumannii* with resistance to carbapenems, as these are the cornerstone of treatment for *A. baumannii* infections [5]. Carbapenem-resistant (CR) *A. baumannii* are among the critical-priority pathogens on the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria for effective drug development [6]. In addition to the presence of chromosomally located *bla*_{OXA-51}-like genes that confer carbapenem-resistance when overexpressed due to insertion sequences upstream of the genes, the acquisition of plasmid-located carbapenemases, predominantly oxacillinases OXA-23, OXA-58 and NDM-like β -lactamases, represent the most common mechanisms of CR in *A. baumannii* [1,7]. Carbapenemase (CP)-producing *A. baumannii*

are on a global rise in humans, and in the last decade, a growing number of studies also confirmed their dissemination in companion [8–13] and livestock animals including horses [14–18]. Previous reports gave evidence that *A. baumannii* from companion animals revealed the same clonal lineages and resistance determinants as human strains, indicating a spill-over of such strains from humans to animals [8,11,19].

The aim of this study was to determine the presence of CP-producing *A. baumannii* isolates among clinical isolates from animals. CP producers were assessed for their antimicrobial susceptibility and their genomes were sequenced to identify resistance genes and their genetic surroundings and to determine the phylogenetic background of the isolates by multilocus sequence typing (MLST) and core genome MLST analysis.

2. Results

2.1. Presence and Type of Carbapenemase Genes

We identified 42 isolates that carried a carbapenemase gene. Among the first collection of 473 randomly collected *A. baumannii* isolates, 15 (3.2%) isolates carried a CP gene: *bla*_{OXA-58} in all cases (Table 1). Nine of these isolates were from clinical specimens that had been taken from six dogs (one dog was sampled twice at an interval of five days) and two cats. Five isolates were cultivated from medical devices, i.e., from central venous catheters, that were used along with the treatment of another three dogs and two cats. Finally, one isolate was cultivated from an air conditioner in a university clinic for small animals by pure chance. Among the second collection (*n* = 29) of pre-selected carbapenem non-susceptible *A. baumannii* isolates from dogs and cats, 27 (93.1%) isolates carried acquired CP genes, namely *bla*_{OXA-58} (*n* = 14/48.37%) and *bla*_{OXA-23} (*n* = 13/44.8%). For reasons of clarity, we will refer to the CP-positive *A. baumannii* isolates from the first and second sample collection as one group of 42 isolates. The 42 CP positive strains of this study were obtained from 22 veterinary clinics and practices (referred to as clinic-1 to clinic-22) in Germany (31 isolates; 13 clinics), France (9 isolates; 7 clinics), and Italy (2 isolates; 2 clinics). with a maximum of nine CR *A. baumannii* isolates obtained from one institution, namely clinic 4 (JLU university clinic). The NDM-1-producing isolate has recently been published by our group and will not be further considered in the Results section [13].

Table 1. Distribution of carbapenemase genes among *A. baumannii* isolates from animal sources.

Sample Collection *	<i>bla</i> _{OXA-23} <i>n</i> (%)	<i>bla</i> _{OXA-58} <i>n</i> (%)	Carbapenemase Positive <i>Ab</i> Isolates			
			Host/Origin	Country	IC	ST ^{Pa}
			<i>(n</i> Isolates)			
1 (<i>n</i> = 473 <i>Ab</i> Isolates)	0	15 (3.2)	dog (10), cat (4), air conditioner (1)	GER (15)	IC1 (15)	ST1 (15)
2 (<i>n</i> = 30 <i>Ab</i> Isolates)	13	14	dog/cat (18/10)	GER (16), FRA (9), ITA (3)	IC1 (13), IC7 (10), IC10 (1), n.a. (4)	ST1 (13), ST10 (1), ST25 (10), ST578 (1), ST602 (3)

* Sample collection 1: isolates not pre-selected for susceptibility to carbapenems or any other antibiotic class; sample collection 2: isolates pre-selected for carbapenem non-susceptibility by VITEK 2 (MICs \geq 2 mg/L for imipenem). Abbreviations: *Ab*, *A. baumannii* *n*, number; n.a., not assigned; GER, Germany; FRA, France; ITA, Italy; ST^{Pa}, multilocus sequence type according to the Pasteur scheme (https://pubmlst.org/bigsdbs?db=pubmlst_abaumannii_pasteur_seqdef; access on 20 May 2022).

2.2. MLST and Phylogenetic Analysis

The majority of CP-producing *A. baumannii* isolates belonged to the worldwide distributed sequence types ST1^P/ST231^{Ox} (66.7%; isolated from dogs and cats in Germany) and ST25^P/ST229^{Ox} (21.4%; isolated from dogs and cats in Germany, France, and Italy), representing international clones IC1 and IC7 (Table 2). Other STs determined were ST602^P/ST732^{Ox} (7.1%; isolated from three cats in France), ST10^P/ST447^{Ox} (2.4%; isolated from a dog in Italy), and ST578^P/ST799^{Ox} (2.4%; isolated from a dog in France). While ST10^P belongs to IC8, the other two STs could not be grouped to IC1-IC9 based on a

comparison of the genome of companion animal *A. baumannii* isolates with the genomes of representative members of international clones 1 to 9 (Supplementary Materials Figure S1).

Table 2. Characteristics of 42 carbapenamase-producing *Acinetobacter baumannii* isolates, sorted by ST^{Pa}.

Strain ID	Host	Source	Date of Isolation	Country	IC	ST ^{Pa}	ST ^{Ox}	cgMLST		VC ^a	Acquired OXA ^b	OXA-Flanking Pattern ^c	OXA-51 Type
								CT	Cluster				
IHIT28446	Cat	Urine	12/2014	DE	1	1	231	1808	1	1	58 ^{PL}	B	69
IHIT29418	Dog	Wound	06/2015	DE	1	1	231	1808	1	3	58 ^{PL}	C	69
IHIT29480	Cat	CVC	06/2015	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	C	69
IHIT29548	Env.	Air cond.	06/2015	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	C	69
IHIT29580	Cat	Phlegmon	06/2015	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	C	69
IHIT29983	Cat	Nose	06/2015	DE	1	1	231	1808	1	6	58 ^{PL}	D	69
IHIT29985	Dog	Abdomen	03/2015	DE	1	1	231	1808	1	1	58 ^{PL}	D	69
IHIT30000	Dog	Nose	05/2015	DE	1	1	231	1808	1	1	58 ^{PL}	B	69
IHIT33215	Dog	Urine	11/2015	DE	1	1	231	1808	1	6	58 ^{PL}	C	69
IHIT32291	Dog	Wound	12/2015	DE	1	1	231	1808	1	1	58 ^{PL}	B	69
IHIT31605	Dog	Wound	05/2016	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	A	69
IHIT31634	Dog	CVC	06/2016	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	A	69
IHIT31820	Dog	CVC	06/2016	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	A	69
IHIT32293	Dog	Wound	01/2016	DE	1	1	231	1808	1	13	58 ^{PL}	A	69
IHIT32295	Dog	Urine	03/2016	DE	1	1	231	1808	1	14	58 ^{PL}	A	69
IHIT32298	Cat	Urine	05/2016	DE	1	1	231	1808	1	1	58 ^{PL}	A	69
IHIT32299	Cat	Wound	06/2016	DE	1	1	231	1808	1	15	58 ^{PL}	A	69
IHIT33967	Cat	CVC	02/2017	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	A	69
IHIT34210	Dog	Throat	04/2017	DE	1	1	231	1808	1	17	58 ^{PL}	B	69
IHIT34211	Dog	Nose	04/2017	DE	1	1	231	2175	S	17	58 ^{PL}	B	69
IHIT34212	Dog	BAL	04/2017	DE	1	1	231	1808	1	17	58 ^{PL}	B	69
IHIT34531	Dog	Wound	05/2017	DE	1	1	231	1808	1	1	58 ^{PL}	B	69
IHIT34607	Dog	Abdomen	05/2017	DE	1	1	231	1808	1	17	58 ^{PL}	A	69
IHIT35448	Cat	Skin	10/2017	DE	1	1	231	1808	1	20	58 ^{PL}	B	69
IHIT36934	Cat	CVC	04/2018	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	A	69
IHIT36988	Dog	Wound	03/2018	DE	1	1	231	1808	1	21	58 ^{PL}	B	69
IHIT37071	Dog	BAL	05/2018	DE	1	1	231	1808	1	4	58 ^{PL}	A	69
IHIT38001	Dog	Skin	08/2018	DE	1	1	231	1808	1	22	58 ^{PL}	B	69
IHIT29027	Dog	Urine	07/2015	IT	8	10	447	2190	S	2	23 ^{CH}	b	68
IHIT29982	Dog	Urine	07/2015	FR	7	25	229	2184	3	5	23 ^{CH}	a	64
IHIT29995	Dog	Ear	07/2015	FR	7	25	229	2185	S	7	23 ^{CH}	a	64
IHIT30557	Dog	Urine	09/2015	FR	7	25	229	2184	3	5	23 ^{CH}	a	64
IHIT32250	Cat	Urine	08/2016	FR	7	25	229	2186	3	10	23 ^{CH}	a	64
IHIT32292	Dog	Paw	01/2016	DE	7	25	229	2177	4	12	23 ^{PL}	b	64
IHIT32297	Dog	Trachea	04/2016	DE	7	25	229	2177	4	12	23 ^{PL}	b	64
IHIT32362	Dog	Urine	10/2016	DE	7	25	229	2177	4	16	23 ^{PL}	b	64
IHIT34486	Cat	Wound	05/2017	IT	7	25	229	2182	S	18	23 ^{PL}	c	64
IHIT34502	Cat	Urine	05/2017	FR	7	25	229	2181	S	19	23 ^{PL}	d	64
IHIT29997	Dog	BAL	08/2015	FR	n.t.	578	799	2189	S	9	58 ^{PL}	E	65
IHIT29996	Cat	Tissue	06/2015	FR	n.t.	602	732	1368	2	8	23 ^{PL}	e	378
IHIT30558	Cat	Urine	09/2015	FR	n.t.	602	732	2191	2	8	23 ^{PL}	e	378
IHIT32289	Cat	Urine	01/2016	FR	n.t.	602	732	2191	2	11	23 ^{PL}	e	378

^a VC = veterinary clinic; different veterinary clinics are indicated by numbers 1–22. ^b Location of gene on plasmid (^{PL}) or chromosome (^{CH}) is indicated. ^c: as illustrated in Figures 3 and 4. Abbreviations: n.t., not typeable; Air cond., Air conditioner; BAL, bronchoalveolar lavage; CVC, central venous catheter; Env, environment; DE, Germany; IT, Italy; FR, France; IC, international clone; ST^{Pa}, multilocus sequence type according to the Pasteur scheme; ST^{Ox}, MLST type according to the Oxford scheme. CT, cluster type; S, singleton.

A minimum spanning tree based on cgMLST complex types (CT) of 42 CP-producing isolates was created (Figure 1). The cgMLST clustering was based on 2390 genes and broadly followed the grouping of the isolates into STs. As expected, cgMLST analysis revealed a higher resolution compared to the results from the seven-gene MLST. Twelve different cgMLST CTs were determined. Eight CTs were unique, the remaining four types were assigned to four clusters. With the exception of ST1 isolate IHIT34211 (CT-2175), that was cultivated from the nose of a dog from veterinary clinic-17 in Germany in 2017, the remaining 27 ST1 isolates belonged to the predominant complex-type CT-1808, given the species-specific threshold of ≤ 10 alleles differences. Accordingly, all these isolates belonged to a single cluster (cluster 1). They were restricted to Germany and were obtained from twelve veterinary clinics between December 2014 and August 2018 (Figure 1B, Table 2). Cluster 2 included three ST602 isolates (CT-1368 and CT-2191) from two veterinary clinics in France, and cluster 3 comprised three ST25 isolates (CT-2184 and CT-2186), also from two clinics in France. Finally, cluster 4 was made up of three ST-25 isolates (CT-2177) from

two clinics in Germany. Overall, the ST25 isolates were assigned to six different CTs that differed by 2 to 132 alleles.

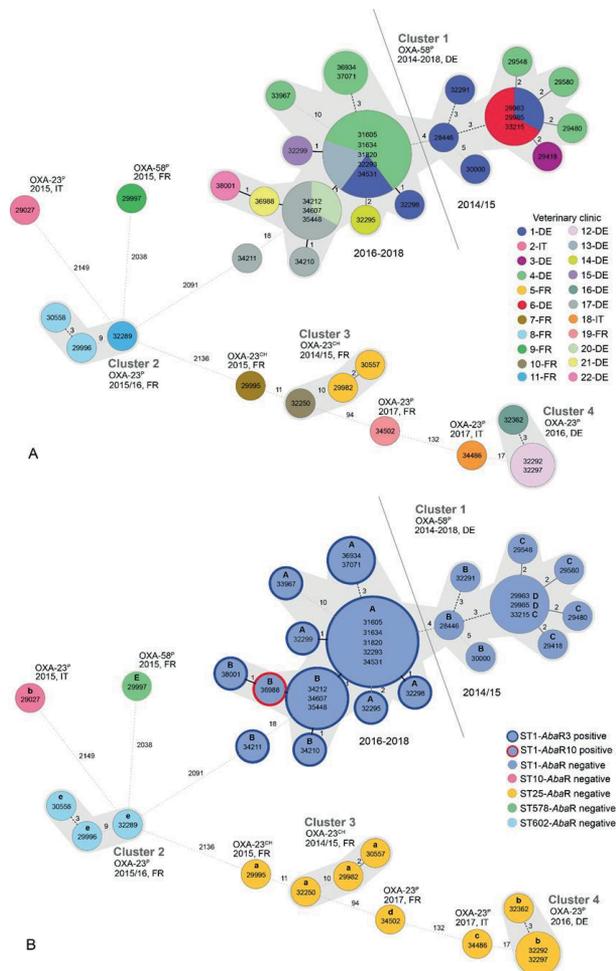


Figure 1. Minimum spanning tree based on cgMLST allelic profiles of 42 CP-producing *A. baumannii* isolates. (A) Distribution of cgMLST clusters with respect to the source of isolates regarding veterinary clinic and country (Germany = DE, France = F, and Italy = IT); (B) multilocus sequence type and presence of *A. baumannii* resistance islands. Each circle represents an allelic profile, i.e., complex type (CT), based on sequence analysis of 2390 target genes (pairwise ignoring missing values). The numbers inside the circles represent isolate designation. The numbers on the connecting lines illustrate the number of target genes with different alleles. Clonally related CTs (≤ 10 allele differences) are grey shaded and numbers of clusters are indicated. The presence of CPs OXA-23 and OXA-58 and their location (P = plasmid; CH = chromosomal) as well as the year of strain isolation are indicated. Patterns of flanking regions of the *bla*_{OXA-58} (A–D) and *bla*_{OXA-23} regions (a–e) are given above the strain names in part B of the figure.

A phylogenomic tree of all strains sequenced in the present study including relevant metadata is provided in the following figure (Figure 2).

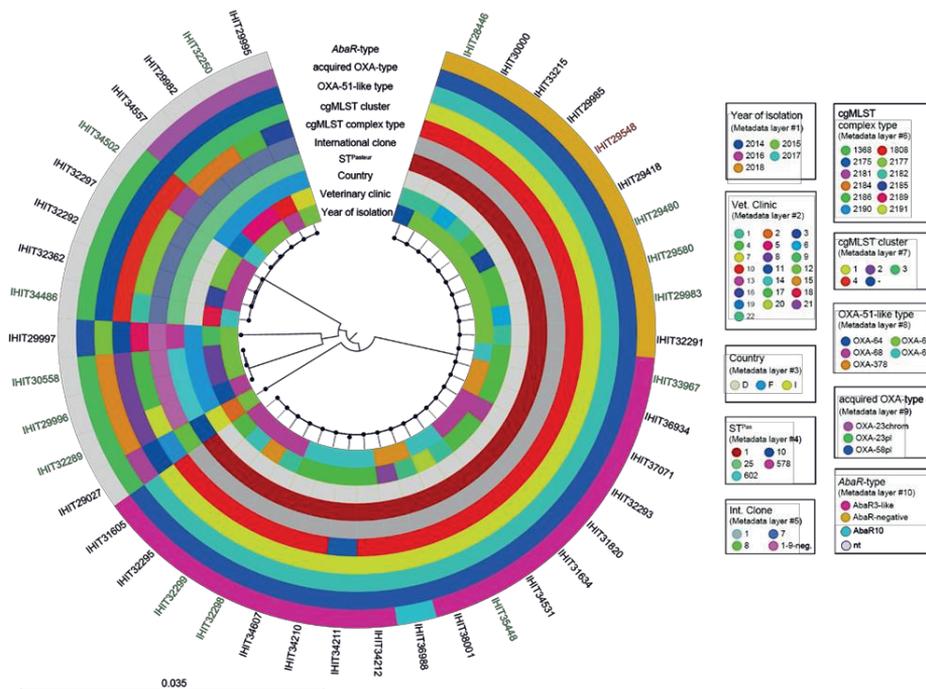


Figure 2. Maximum-likelihood tree of 42 genomes of carbapenemase-producing *A. baumannii* isolates. The phylogeny is based on 2,646 orthologous genes and was calculated by RAxML v8. Graphical visualization was achieved by iTOL v5. Colored rings represent (from inner to outer ring the (i) year of isolation, (ii) veterinary clinic, (iii) country of isolation, (iv) multilocus sequence type (Pasteur scheme), (v) international clone, (vi) core genome MLST complex type, (vii) core genome MLST cluster, (viii) OXA-51-like type, (ix) acquired oxacillinase type, and (x) *A. baumannii* resistance island type. Color of strain numbers indicates the origin of the isolates (green = cats; black = dogs; red = environment).

2.3. Genomic Location of Carbapenemase Genes and Transformation Assays

Southern blot hybridization of S1-Nuclease digested whole-cell DNA together with whole-genome sequence data analysis revealed the location of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} on plasmids for 38 *A. baumannii* isolates. The remaining four isolates, all ST25 (CT-2184, CT-2185, and CT-2186) and all from one veterinary clinic in France, carried their *bla*_{OXA-23} gene on the chromosome (Figure 3, pattern a). Data from bridging PCRs and amplicon sequencing revealed the presence of four different OXA-23 plasmids, varying from 41.2 kb (plasmid type d, 1 isolate) to 48.4 kb (b, 4 isolates), 55.8 kb (c, 1 isolate) and 71.3 kb (e, 3 isolates) in size. OXA-58 plasmids appeared in four different types with 21.1 kb (plasmid type A, 11 isolates), 11.3 kb (B, 10 isolates), 12.6 kb (C, 7 isolates), and 13.9 kb (D, 1 isolate) in size. None of the plasmids carried other antimicrobial resistance genes. The direct genetic environment of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} genes in the different plasmid types is illustrated in Figures 3 and 4, and the assignment of isolates to plasmid types is provided in Table 2.

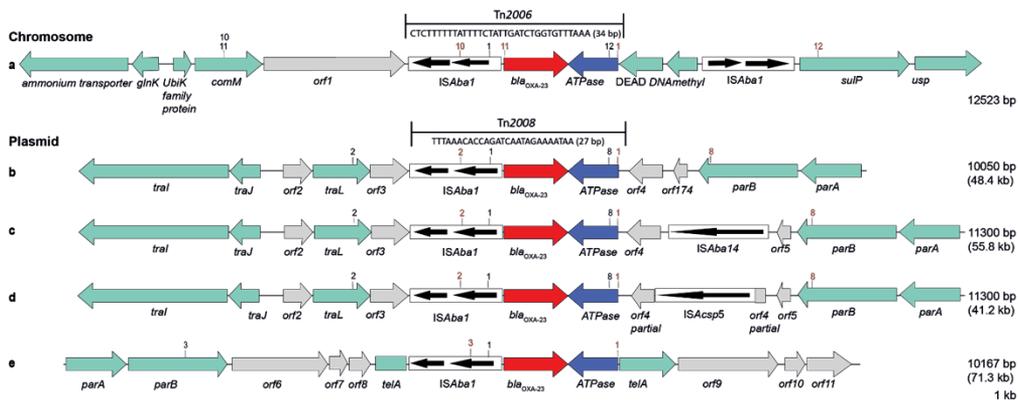


Figure 3. Genetic environment of *bla*_{OXA-23} genes in 13 *A. baumannii* from dogs and cats. (a): Chromosomally located *bla*_{OXA-23}; (b–e): *bla*_{OXA-23} located on plasmids (partially shown).

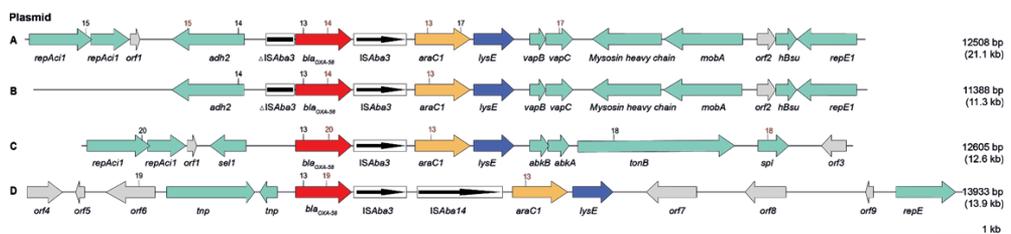


Figure 4. Genetic environment of *bla*_{OXA-58} genes in 29 *A. baumannii* isolates from dogs and cats. (A–D) *bla*_{OXA-58} located on different plasmids. Extent and orientation of genes and open reading frames (*orf*) are shown by a horizontal arrow with the gene names below. The *bla*_{OXA-58} gene is shown in red, *araC1* in yellow, *lysE* in blue, *orfs* in grey and other genes in light green. Insertion sequence (IS) elements are represented by a black framed box with the orientation of the transposase genes shown within. Primer pairs used for bridging PCRs are shown as numbers (forward primer in black, reverse primer in red) above the respective genes (Supplementary Materials Table S3). Numbers to the right indicate the size of the genetic regions displayed in the figure and the estimated total size of the plasmids (shown in brackets).

Distinct plasmid types were basically linked with a certain ST and CT, but distinct STs and CTs could also reveal the presence of different plasmid types. For example, OXA-58 plasmid type A appeared solely in ST1/CT-1808 isolates. However, ST1/CT-1808 isolates carried not only OXA-58 plasmids of type A, but also of types B, C, and D. In contrast, OXA-23 plasmids were not detected among ST1/CT-1808 isolates but were distributed among ST10, ST25 and ST602 isolates in Germany, Italy and France. Notably, OXA-23 plasmid type b was detected in three ST25 isolates from Germany and in one ST10 isolate from Italy. Regarding this exception, OXA-23 and OXA-58 plasmid types differed according to STs and country of origin. Veterinary clinics where at least two CP-producing isolates were obtained mostly revealed more than one plasmid type, i.e., clinic 1 (OXA-58 plasmid type A, B and D), clinic 4 (type A and C) and clinic 6 (group C and D) (Table 2).

A total of 24 of the 38 CR-*A. baumannii* with plasmid-located OXA-23 ($n = 8$) and OXA-58 ($n = 16$) CP genes, representing different MLST types, animal hosts and isolation dates, were included in transformation assays. Except for three OXA-23 plasmids, the OXA-

23/OXA-58 plasmids of the remaining 21 isolates were transformable. Compared with the *A. baumannii* recipient strain ATCC 17978, the transformants showed increased MICs for piperacillin (≥ 128 mg/L; 100% resistant) and imipenem ($2\text{--}\geq 16$ mg/L; 63% resistant) (Supplementary Materials Table S1).

2.4. Resistance Phenotype and Genotype

All 42 CP-producing isolates were resistant to imipenem (MIC ≥ 8 mg/L) (Supplementary Materials Table S2). According to the results from E-Test, 27 isolates were resistant to meropenem (MIC from 8 to ≥ 32 mg/L) and 21 isolates were resistant to doripenem (MIC from 6 to ≥ 32 mg/L). All isolates showed resistance (either acquired or intrinsic) to ampicillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam, amoxicillin/clavulanate, cephalotin, cephalexin, chloramphenicol, tetracycline, and nitrofurantoin. In addition, a different number of strains was resistant to ceftiofur (23.8%), gentamicin (54.8%), ciprofloxacin (90.5%), moxifloxacin (88.1%), enrofloxacin (90.5%), marbofloxacin (90.5%), and to the sulfamethoxazole–trimethoprim combination (59.5%). Colistin MICs ranged from 0.5 to 2.0 mg/L (all susceptible), while low MICs were observed for tigecycline (S MIC $\leq 0.5\text{--}1$ mg/L, 100%), amikacin (S ≤ 2 mg/L, $n = 40$, 95.2%; I = 32 mg/L, $n = 2$, 4.8%) and tobramycin (S ≤ 1 mg/L, $n = 41$; 97.6%; I = 8 mg/L, $n = 1$, 2.4%).

Multiple antimicrobial-resistance (AMR) genes and profiles were detected in the CP-producing *A. baumannii* isolates. We identified β -lactamase genes *bla*_{ADC-2}-like (2.4%), *bla*_{ADC-11} (66.7%), *bla*_{ADC-26} (21.4%), *bla*_{ADC-32} (7.1%), *bla*_{ADC-76} (2.4%), and *bla*_{TEM-1} (42.9%), aminoglycoside modifying enzymes *aac*(3)-Ia (40.5%), *aac*(3)-IIa (11.9%), *aad*(3')-IVa (2.4%), *aac*(6')-Iaa (11.9%), *aadA1* (40.5%), *aph*(3')-Ia (2.4%), *aph*(3')-VIa (4.8%), *aph*(3'')-Ib (21.4%), and *aph*(6)-Id (21.4%), tetracycline genes *tet*(A) (40.5%), *tet*(B) (14.3%) and *tet*(R) (54.8%), sulphonamide-resistance genes *sul1* (42.9%) and *sul2* (14.3%), chloramphenicol acetyltransferase gene *catA1* (40.5%), and trimethoprim-resistance gene *dhfrA1* (2.4%). In addition, the distribution of antibiotic efflux pump genes was as follows: *abeS*, *abaF*, *abaQ*, *amvA*, *adeF*, *adeJ*, *adeK*, and *adeL* (100% each), *adeC* (69.0%), *adeG* (73.8%), *adeH* (69.0%), *adel* (78.6%), *adeN* (88.1%), and *adeR* (97.6%). The disinfectant efflux pump gene *qacEΔ1* was present in 40.5% of the isolates. *Acinetobacter baumannii* antibiotic resistance islands (*AbaR*) were detected in 64.3% of the 28 ST1 isolates, whereas isolates belonging to ST10, ST25, ST578 and ST602 were *AbaR*-negative. Notably, ST1 isolates from earlier than 2016 were also *AbaR*-negative, while all isolates obtained since 2016 carried either an *AbaR3*-like structure ($n = 17$) or *AbaR10* ($n = 1$; isolate from 2018) (Supplementary Table S2; Figure 1B). As originally described, the *AbaR3*-like island consisted of a Tn6019 backbone, was embedded in the chromosomal ATPase gene *comM* [20,21] and carried a multiple antibiotic resistance region (MARR) in the center in transposon Tn6018 containing *bla*_{TEM-1}, *aacC1*, *aadA1*, *tet*(A), *tet*(R), *sul1* and *catA1*. In contrast to the original *AbaR3* island, which is 63 kb in size in the human IC1-A *baumannii* strain A85 [22], the *AbaR3*-like island lacked the Tn6020-related gene *aphA1* and revealed a disruption in the *ISAbal* sequences that are usually flanking both sides of the kanamycin gene. As previously described for strain AB058, the *AbaR10* island was 31 kb in size and carried only *sul1* in the MARR of Tn6018 [23]. OXA-58 *A. baumannii* strains assigned to cgMLST CT-1808 showed a very similar profile of efflux systems. All CT-1808 isolates that carried the *AbaR3*-like island also carried efflux genes of the major facilitator superfamily MFS (*abaF*, *abaQ*, *amvA* and *qacEΔ1*), the resistance-nodulation-cell-division (RND) family (*adeC*, *adeF*, *adeG*, *adeH*, *adel*, *adeJ*, *adeK*, *adeL*, *adeN* and *adeR*) and the small multidrug resistance (SMR) family (*abeS*). The *AbaR10* positive strain and *AbaR*-negative strains of CT-1808 revealed the same efflux gene profile but lacked *qacEΔ1*. Only one *bla*_{OXA-58} strain assigned to ST578/CT-2189 showed a unique efflux gene profile (*abeS*, *abaF*, *abaQ*, *amvA*, *adeF*, *adeH*, *adel*, *adeJ*, *adeK*, *adeL*, *adeN* and *adeR*). None of the *bla*_{OXA-23} isolates carried either *qacEΔ1* or *adeH*. Strains of the same ST also showed a similar efflux gene profile, except for one ST25 strain, that did not possess *adeN* (Supplementary Materials Table S2).

All 42 isolates carried intrinsic oxacillinases that correlated well with the sequence types of the isolates: ST1^P - OXA-69, ST25^P - OXA-64, ST10^P - OXA-68, ST578^P - OXA-65, and ST602^P - OXA-378. Only one ST25 strain, which was isolated from the urine of a cat from France (IHIT34502), revealed the presence of insertion sequence *ISAbal1* upstream of the oxacillinase gene *bla*_{OXA-64} and also upstream of its *bla*_{ADC-26} gene.

2.5. Flanking Region of Carbapenemase Genes

To characterize the *bla*_{OXA-23} genomic region in the different strains, WGS contigs of 175 bp to 57,862 bp in size were used to create primer pairs for PCR mapping. In the case of *bla*_{OXA-58} plasmids, one to ten contigs between 74 bp and 21,069 bp per isolate were concatenated in silico based on PCR mapping results.

The transposons Tn2008 and Tn2006 were identified as genetic structures harbouring the *bla*_{OXA-23} gene (Figure 3). In Tn2008, the *bla*_{OXA-23} gene was flanked by the insertion sequence *ISAbal1* 27 bp upstream, and by a putative *ATPase* gene downstream. Tn2006 is similar to Tn2008, but here, the *bla*_{OXA-23} gene is flanked by two copies of *ISAbal1*, which are located in opposite orientations. In our isolates, the transposon structures Tn2008 and Tn2006 were embedded in different genomic regions (a–e), as shown in Figures 3 and 1B. The *bla*_{OXA-58} genes were located on four different plasmid structures (A–D), as shown in Figure 4 and indicated in Figure 1B.

The extent and orientation of genes and open reading frames (*orf*) are shown by a horizontal arrow with the gene names below. The *bla*_{OXA-23} gene is shown in red, the *ATPase* gene in blue, *orfs* in grey, and other genes in light green. Insertion sequence (IS) elements are represented by a black framed box with the orientation of the transposase genes shown within. Transposons Tn2006 and Tn2008 are shown above with an arrow indicating their location. Sequences below the transposon labels indicate the distance between *ISAbal1* and the *bla*_{OXA-23} start codon. Primer pairs used for bridging PCRs are shown as numbers (forward primer in black, reverse primer in red) above the respective genes (Supplementary Materials Table S3). Numbers to the right indicate the size of the genetic regions displayed in the figure and the estimated total size of the plasmids (shown in brackets).

3. Discussion

A. baumannii is a globally distributed pathogen associated with clinical infections in both humans and animals. The emergence of multidrug-resistant isolates drastically limits antibiotic treatment options, particularly in intensive-care medicine [24]. Data on the antimicrobial resistance and phylogenetic background of *A. baumannii* isolates from diseased animals are quite limited. Only a few studies systematically screened a representative number of *A. baumannii* isolates for carbapenemases that are most common among humans, and even less made use of whole genome sequence analysis to provide a detailed characterization of the isolates [8,9,13,16,19,25].

In this study, we provide a comprehensive analysis of CP-producing *A. baumannii* isolates from animals that were either hospitalized or treated in veterinary clinics in Germany ($n = 13$ clinics), France ($n = 7$) and Italy ($n = 2$) during the years 2014 and 2018. We could show that OXA-23 and OXA-58, which are globally distributed CPs in humans, are frequently present in *A. baumannii* isolates obtained from clinical samples of cats and dogs and from medical devices used for the treatment of these animals. In contrast, none of the *A. baumannii* isolates from livestock animals ($n = 50$ isolates), horses ($n = 46$), small animals ($n = 15$), and other animals ($n = 10$) harboured a carbapenemase. To date, to the best of our knowledge, merely 12 studies described the occurrence of CPs, predominantly OXA-23, but also OXA-72 and NDM-1, in *Acinetobacter baumannii* from cats and dogs in Germany, France, Portugal, Italy, Serbia, Pakistan and Thailand [8–13,19,25–28] (Table 3).

Table 3. Carbapenemase-positive *A. baumannii* from small animals according to the current literature.

Host	Country	Year	Source	CP Type	CR Isolates/Total No. of Isolates	Localization of CP	Carbapenem Resistance	IC	ST ^{Pa/Ox}	Ref.
Cat	DE	2000	Ur	n.s.	1/52	n.s.	IMP	n.s.	n.s.	[29]
Cat	DE	2000	Ur	OXA-23	1/1	P, Tn2008	IMP	1	1/231	[9]
Cat, dog	CH	2005, 2009	Ur, Wo, Bl	ISAbal1-OXA-51	2/19	C	IMP, MER	1, 2	12 ^{Ox} & 15 ^{Ox}	[10]
Cat	PT	2009	Ur	OXA-23	1/1	C, Tn2006	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[11]
Dog	DE	2011	Ur, Sk	OXA-23	3/223	P, Tn2008	IMP, MER	1, 8	10/585	[8]
Cat, dog	FR	2011–2015	Ur	OXA-23	7/41	C	IMP, MER	7	25 ^{Past}	[19]
Cat, dog	IT	2014, 2015	Fe	NDM-1	5/5	C, Tn125	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[25]
Dog	FR	2015	Or, Re	OXA-23	2/4 CR	n.s.	IMP, MER, DOR	7	25 ^{Past}	[12]
Dog	RS	2016	Ur	OXA-72	1/1	P	IMP, MER	1	1 ^{Past}	[27]
Dog	TH	2017	Ur	OXA-23	1/1	Tn2006	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[26]
Grey Parrot	LUX	2016	Cho	OXA-72	1/1	P	IMP, MER	n.s.	294 ^{Past}	[30]
Cat	PK	2020	Ur	OXA-23	1/1	n.s.	IMP, MER	2	2 ^{Past}	[28]
Cat	IT	2021	Ur	NDM-1	1/1	C	none	7	25 ^{Past}	[13]

CP: carbapenemase; CR: carbapenem-resistant; IC: international clone, ST: sequence type. CH: Switzerland, DE: Germany, FR: France, IT: Italy, PK: Pakistan, PT: Portugal, RS: Serbia, TH: Thailand. UR: urine, Wo: wound, Bl: blood, Sk: skin, Fe: feces, Or, oral, Re, rectal, Cho, Choane. P: plasmid, C: chromosome, Tn: Transposon. DOR: doripenem, IMP: imipenem, MER: meropenem, n.s.: not specified, Ref.: reference. Multilocus sequence types are provided according to the schemes used in the original publications (^{Past} = Pasteur; ^{Ox} = Oxford).

Infrequent findings of CP-producing isolates that were clearly assigned to the species *A. baumannii* have been reported from livestock animals, i.e., from cattle [15,31], sheep [18] swine [14,15,32], and poultry [15] from France, Croatia, Lebanon, Pakistan, and Canada. OXA-23 was the most frequently found CP in these studies while OXA-40, OXA-58, NDM-1 and PER-1 were single findings.

We determined OXA-58 as the predominant CP type (69.1%), while about one third of the CP-producing isolates in our study carried the *bla*_{OXA-23} gene. Of note, nearly all OXA-58 isolates (96.6%) were from companion animals in Germany, while the majority of OXA-23 isolates (76.9%) were from companion animals in France and Italy, indicating a country-specific distribution. On the other hand, more than two thirds (69.2%) of the OXA-23 isolates were assigned to ST25, whereas OXA-58 was almost (96.6%) restricted to ST1 isolates.

In Europe and also worldwide, OXA-23 is by far the most common β -lactamase among *A. baumannii* strains from human patients, including those involved in hospital outbreaks [7,33–37]. In Germany, the National Reference Laboratory for multidrug-resistant Gram-negative bacteria rated OXA-23 as predominant and OXA-72 as the second most common CP among *A. baumannii* isolates that were sent by nationwide microbiology laboratories for clarification of phenotypic carbapenem-resistance over the last years [38]. In contrast, OXA-58 was found in significantly lower numbers ranking between the third and tenth position between 2015 and 2020 but was not detected in 2021. The fact that 11 of 13 German veterinary clinics revealed the presence of OXA-58-producing isolates suggests a different distribution of this CP type in companion animals compared to what is going on in the medical field in our country. While this could indicate different sources of infections in humans and animals, a spillover of OXA-58 plasmids from humans to animals can still not entirely be ruled out.

As the predominant ST among CP-producing *A. baumannii* in humans is ST2^{Pa} and our OXA-58 isolates all belonged to ST1 and almost always to cgMLST cluster type CT-1808, a transmission of isolates from humans to animals is less likely than an initial transfer of an OXA-58 plasmid by horizontal gene transfer and a subsequent clonal dissemination of CT-1808 among companion animals in Germany.

The random finding of an OXA-58-producing *A. baumannii* isolate from an air conditioner in one of the veterinary clinics underlines the relevance of the clinical environment as a putative source of MDR bacteria. This has recently been shown for high-risk clone ST11 of CP-producing *Klebsiella pneumoniae* in a veterinary referral hospital in Switzerland.

Brilhante et al. (2021) showed that clinical CP *K. pneumoniae* strains were highly related to those contaminating the clinical environment [39]. The strain from an air conditioner in the present study belonged to the most common cgMLST type 1808 and carried the same *bla*_{OXA-58} plasmid group C as the clinical strains detected in the same veterinary clinic. These results highlight the probability that MDR *A. baumannii* survive in the clinical environment and may be further dispersed and transferred to animals and humans.

Regarding France and Italy, where isolates from dogs and cats nearly always carried OXA-23, the situation appeared much more similar to that in humans in those countries. In a cross-sectional countrywide survey on the distribution of carbapenem-resistant *A. baumannii* in Italy, Principe et al. (2014) reported that among 25 centers, OXA-23 was the predominant CP (81.6%) followed by OXA-58 (4.5%), indicating an epidemic diffusion of OXA-23 [34]. Jeannot et al. (2014) determined *bla*_{OXA-23} in 82% of the samples that were collected along with 37 outbreaks in France, while *bla*_{OXA-58} was only present in 7% of the isolates [40]. Our group previously detected OXA-23 from an ST1^P isolate originating from a cat with urinary tract infection treated in clinic 4 of the present study in the year 2000 [8,9]. This isolate belonged to cgMLST type CT-720 and revealed up to 84 different alleles to CT-1808, suggesting that it is not a direct ancestor of this epidemic lineage. In addition, we recently described OXA-23 strains isolated from two dogs treated in veterinary clinics that are not included in the current study [8]. The two isolates belonged to ST10^P/585^{Ox} and thus to the same ST that has been observed for one OXA-23 isolate of the present study, which originated from a dog in Italy (IHIT29027; ST10^P/447^{Ox}). However, the strain from Italy (CT-2190) and previous isolates from Germany (CT-717) differed in their cgMLST types by 425 alleles, indicating only moderate relatedness from a whole genome sequence perspective. As the fraction of animal isolates from France and Italy was quite low in the present study, conclusions should be considered with caution.

The majority of our OXA-23 isolates (69.2%) belonged to ST25, which is a globally distributed clone that has been associated with infections and outbreaks in humans, particularly in the ICUs, in Europe, South America, and Asia [3,41,42]. Nine ST25 isolates were separated into six CTs and revealed three antimicrobial resistance patterns, underlining the phylogenetic and genomic diversity of the ST25 lineage as previously shown for human clinical isolates [3]. In Germany, CT-2177 seems to be established in the veterinary environment, while the strains from France showed from 2 to 94 allele differences, indicating an independent spread of different CTs. In 2017, Lupo and co-workers reported that OXA-23-ST25 *A. baumannii* might be endemically distributed in companion animals in France [19]. They investigated 41 *A. baumannii* isolates from diseased pets from 2011 to 2015 and determined seven OXA-23-producing *A. baumannii* that belonged to ST25. As the seven isolates originated in five departments in two regions, the authors suggested a clonal dissemination among companion animals in France. In support of this, Herivaux and co-workers identified a high rate of asymptomatic dog carriers of ST25-OXA-23-*A. baumannii* isolates (2.7%) in France in 2015 and suggested that pets could serve as a possible reservoir of community acquired infections [12]. Notably, in Switzerland, ST25 and ST1 are also the predominant *A. baumannii* lineages in hospitalized animals, although OXA-23 and OXA-58-producing isolates have not been described [43].

In a previous survey on *A. baumannii* isolates obtained from diseased companion animals in Germany between 2000 and 2013, we could show that ST2 was the major lineage among carbapenem-susceptible isolates. A very recent report from the Netherlands described two unrelated ST2 lineages of carbapenem non-resistant *A. baumannii* as a cause of two outbreaks in a companion animal ICU that occurred in 2012 and 2014. This, together with sporadic findings of carbapenemase-producing ST2-*A. baumannii* isolates in companion animals in Portugal [11], Italy [25], Thailand [26] and Pakistan [28], underlines that, with ST2, ST1 and ST25, three of the most relevant sequence types globally distributed in the human domain are also disseminated among companion animals. In a recent study from Germany, Schleicher et al. demonstrated that the population structure of carbapenem-susceptible *A. baumannii* from humans is highly diverse, whereas imipenem

non-susceptibility was strongly linked with the clonal lineages IC2 and IC1, suggesting a high clonality of carbapenem-resistant isolates [44].

According to cgMLST analysis, the 42 carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates were assigned to 12 cluster types. Five of these CTs were assigned to four clusters (cluster 1–4), while the remaining seven CTs were unique. As already mentioned, CT-1808 was predominant in Germany, where it occurred in 11 veterinary clinics. The repeated finding of this type over longer periods in VCs 1 ($n = 6$; 2014–2017) and 6 ($n = 9$; 2015–2018) underlines a putative nosocomial spread within these clinics. Most notably, earlier ST1/CT-1808 isolates from 2014 and 2015 ($n = 10$) only possessed cephalosporinase gene *bla*_{ADC-11} in addition to their *bla*_{OXA-58} gene. Later isolates collected between 2016 and 2018 have acquired either an *AbaR3*-like island ($n = 16$) or *AbaR10* ($n = 1$) (Figure 1B). At least for clinic 1 and clinic 4, which yielded carbapenem-resistant ST1 isolates in both time periods, the emergence of *AbaR3*-like positive isolates could have occurred within the clinics, while the original entry of this resistance island into the population remains unsolved. Along with the uptake of the *AbaR3*-like island, the isolates gained resistance genes *tet*(A), *tet*(R), *sul1* and *catA1*, and the cassette-associated *aacC1* and *aadA1* genes (Supplementary Materials Table S2). Accordingly, they showed phenotypic resistance to gentamicin and to the trimethoprim–sulfamethoxazole combination and higher MICs (≥ 16 mg/L) to tetracycline as compared to the earlier ST1 isolates. Additionally, *AbaR10*, which was first described by Adams et al. (2010), rendered isolate IHIT36988 additional resistance to the trimethoprim-sulfamethoxazole combination as it encodes the *sul1* gene [23].

To date, the majority of human clinical IC1 isolates carry either *AbaR0* or its derivative *AbaR3*, which arose around 1990, or a variant from one of them, that has evolved since then [22,45]. *AbaR3* is a large genomic-resistance island within a complex transposon that is located at a specific position in the ATPase-encoding *comM* gene, which is involved in natural transformation of *A. baumannii* [21,46,47]. Previous variants arose by different mechanisms, including recombination events, gene cassette addition or replacement, and what also happened in our isolates: deletions caused by one of three internal IS26 sequences [22,45]. We could show that complex *A. baumannii* resistance islands are not only globally distributed in IC1-*A. baumannii* isolates from humans but that they occur frequently among veterinary isolates and may undergo evolutionary changes. By that, the isolates might gain a selective advantage towards a certain antimicrobial selective environment in a VC, similar to what has happened in the animal field. Here, the selective advantage provided by *AbaR3* or its variants could have played a role in the spread of IC1 in European hospitals in the 1980s, as the resistance mechanisms encoded by *AbaR3* were effective against many antibiotics used at that time [46]. Most notably, a number of other variants of the *A. baumannii* resistance island arisen since then confer resistance to critical important antibiotics including fluoroquinolones, cephalosporins, and aminoglycosides [22,45] and thus contribute to the emergence of multi-drug-resistant strains [21,22,45].

All 29 OXA-58 positive isolates carried *bla*_{OXA-58} on a plasmid, almost always embedded in a previously described genetic context in human isolates with IS*Aba3*, *araC* and *lysE* [48,49]. However, when determining the wider environment, we identified four different patterns (A–D) around the *bla*_{OXA-58} gene, indicating different origins and evolutions of plasmids or genetic fragments. The patterns were always identical among isolates of the same complex-type but were not restricted to one CT. This could suggest both a clonal distribution of plasmids but also a spread by horizontal gene transfer. The genetic contexts of *bla*_{OXA-58} genes in our isolates shared high similarity with plasmids from human patients, such as pAba3207a of *A. baumannii* 3207 that was detected in Mexico [50], pWA3 of *A. baumannii* WA3 isolated in China [51], and pABIR of *A. baumannii* ABIR found in a patient in the Lebanon [52]. Tn2008 of the OXA-23-positive *A. baumannii* isolates from our study shared high similarity (99.96%) with the same genetic region that was determined in *A. baumannii* isolate IHIT7853 (ST1, CT-720), which was isolated from a cat treated in VC4 in 2010 [8]. Furthermore, *A. baumannii* DU202, detected in a patient in Korea [52] and *A. baumannii* K50 that was isolated from a wound in a human patient

in Kuwait, showed 99.9% identity with the transposon structure of our *bla*_{OXA-23}-positive *A. baumannii* isolates [53]. This, together with the sharing of clonal lineages of *A. baumannii* isolates maintaining the OXA-23 and OXA-58 plasmids, suggests at least partial overlaps between certain groups of carbapenemase-producing *A. baumannii* isolates from humans and animals. High-resolution genomic and plasmidomic analysis including combined short- and long-read sequencing techniques will help to further elucidate the similarities and differences between these bacteria in the different populations. It may also help to infer whether transmission events could have occurred between humans and animals and in which direction they have taken place.

4. Materials and Methods

4.1. Bacterial Strains and DNA Isolation

Acinetobacter baumannii strains were collected during routine microbiology investigations in two veterinary diagnostic laboratories in Germany. The first collection of 473 strains was isolated from clinical specimens ($n = 398$) or from different organs during necropsy ($n = 40$) obtained from dogs/cats ($n = 351$), livestock animals ($n = 50$), horses ($n = 46$), pets ($n = 15$), zoo animals ($n = 7$), and birds ($n = 3$) (Table 4). The samples were provided by 85 veterinary clinics and practices and by a university Institute of Veterinary Pathology in Germany between January 2013 and August 2018. Another 34 isolates of this first collection were obtained from clinical devices, such as catheter, tubes, and implants, used during therapeutic or surgical treatment of dogs and cats in three veterinary clinics; one strain was isolated from an air conditioner in a veterinary hospital. The 398 *A. baumannii* strains (all from Germany) from clinical specimens were isolated from wounds and abscesses (31.4%), respiratory tract and nasopharynx (21.1%), skin and hair (13.1%), the urinary tract (10.6%), and from various other body sites, as detailed in Supplementary Table S1.

Table 4. Sample collection of *A. baumannii* isolates investigated in this study.

Host/Source	Collection 1 * ($n = 473$)	Collection 2 * ($n = 29$)
Dog and cat	351 **	29
Horse	46	0
Rabbit, guinea pig, mouse	15	0
Livestock	50	0
Wild and zoo animals	7	0
Birds	3	0
Environment	1	0
Sample Source		
Wound, abscess, fistula	125	7
Respiratory tract, nasopharynx	83	4
Skin, hair	52	3
Urinary tract	42	14
Eye, ear	25	1
Faeces, gastrointestinal tract	18	0
Genital tract	17	0
Other clinical sites	36	0
Organ (after necropsy)	40	0
Catheter, implant, tube	34	0
Air conditioner	1	0
Country		
Germany	473	18
France	0	9
Italy	0	2

* Sample collection 1: isolates not pre-selected for susceptibility to carbapenems or any other antibiotic class; sample collection 2: isolates pre-selected for carbapenem non-susceptibility by VITEK 2 (MICs ≥ 2 mg/L for imipenem). ** 34 of 351 isolates were obtained from catheters, implants and tubes.

The second collection included carbapenem non-susceptible (imipenem MIC ≥ 2 mg/L) *A. baumannii* ($n = 29$) strains provided by an external veterinary diagnostic laboratory in

Germany (Table 4). These isolates were collected from the urinary tract ($n = 14$), wounds ($n = 7$), and from other clinical sites from dogs ($n = 19$) and cats ($n = 10$) in veterinary clinics in Germany ($n = 18$), France ($n = 9$), and Italy ($n = 2$).

All samples were initially cultivated on blood agar plates without antibiotics. Species identification was performed with MALDI-TOF MS using a Microflex LT/SH mass spectrometer and the biotyper database (Maldi Biotyper 3.0, V. 7.0) (both from Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and by performing *gyrB* multiplex PCR [53].

To extract genomic DNA, late log-phase cells were harvested and lysed with EDTA, lysozyme, and detergent treatment, followed by proteinase K and RNase digestion using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's recommendation. The DNA was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further use.

4.2. Detection of Carbapenemase Genes

Acinetobacter baumannii strains were screened for β -lactamase genes coding for CPs of the families OXA-23/-40/-58/-143/-235, VIM, NDM, KPC, OXA-48, GES, GIM, and IMP by PCR [54–59] using previously published primers and protocols (Supplementary Materials Table S4). The genomes of strains that possessed an acquired CP gene were further sequenced.

4.3. Antimicrobial Susceptibility Testing

A. baumannii strains that carried an acquired CP gene were tested for their antimicrobial susceptibility to 27 antimicrobial agents by using the VITEK 2 system (bioMérieux→, Nuertingen, Germany; AST cards GN38 and GN238). Antibiotic gradient strips (Liofilchem®[®], Roseto degli Abruzzi, Italy) were additionally used to test the susceptibility of the strains to imipenem, meropenem and doripenem. Susceptibility to colistin was determined by using the E1-102-040 plate of the MICRONAUT system (Merlin Diagnostics, Bornheim-Hersel, Germany). MICs were interpreted according to breakpoints defined for human *Acinetobacter* spp. by CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. Document M100S. Wayne, PA: CLSI; 2019). For antibiotics without a defined breakpoint for *Acinetobacter* spp., breakpoints of agents belonging to the same antibiotic class or breakpoints for Enterobacterales were used for interpretation.

4.4. Genome Sequencing and Annotation

Sequencing of *A. baumannii* genomes was performed using Illumina MiSeq 300 bp paired-end sequencing with an obtained coverage $> 90\times$. After quality control using the NGS tool kit13 (70% of bases with a phred score > 20), high-quality filtered reads were used for de novo assembly into contiguous sequences (contigs) and subsequently into scaffolds using SPAdes v3.9 (<http://bioinf.spbau.ru/spades>, accessed on 8 February 2022) [26]. Assembled draft genomes were annotated using Prodigal [27].

4.5. MLST, cgMLST and Phylogenetic Comparison

Multilocus sequence types were deduced from whole genome sequence data using MLST 2.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>, accessed on 10 February 2022) and the MLST scheme developed by the Pasteur Institute [60]. To determine the clonal relationship of CR-A. *baumannii* strains, core genome MLST (cgMLST) implemented in Ridom SeqSphere + version 7.7.0 (Ridom GmbH, Germany) was performed [61]. Allelic profiles were compared by using the “pairwise ignoring missing values” parameter during distance calculation. The cluster definition threshold was set at a maximum difference of 10 alleles in a pairwise comparison.

Phylogenetic relationships were determined by applying a gene-by-gene approach on the dataset to generate a core genome alignment and subsequently a phylogenetic tree. The core genome alignment was assembled by a gene-wise alignment with Mafft v7.407 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>, accessed on 2 June 2022) of 2646 core genes

that were present in at least 99% of the strains (sequence similarity min. 70%, sequence coverage min. 90%) and were concatenated afterwards. The resulting alignment was used to infer a phylogeny with 100 bootstrap replicates using RAxML v.8.2.10 (<https://github.com/stamatak/standard-RAxML>, accessed on 2 June 2022) with a general time-reversible model and gamma correction for site rate variation. iTOL v5 (<https://itol.embl.de/>, accessed on 2 June 2022) was used to visualize the population structure in the context of available metadata.

4.6. Identification of Antimicrobial Resistance Genes and Islands and of Genetic Regions Flanking Carbapenemase Genes

Services provided by the Center of Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>, accessed on 10 February 2022) were used to identify resistance genes (ResFinder v4.1). To investigate the genetic region surrounding CP genes, contigs that contained such genes were first compared with public sequences by BLASTn analysis, using Geneious v. R8.1 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand). The same contigs and all remaining contigs of an isolate were then mapped to the identified reference sequences using the “Map to reference tool” of Geneious v R8.1. In silico mapped contigs were ordered and oriented relative to one another with bridging PCRs and amplicon sequencing by using different primer pairs designed in the present study or previously published (Supplementary Materials Table S3) [62,63]. Insertion sequences (IS) were detected using ISfinder (<http://www-is.biotoul.fr>, France, accessed on 10 February 2022). *A. baumannii* resistance (*AbaR*) islands were initially identified based on the presence of antimicrobial resistance genes in the genome sequences by using ResFinder. PCR mapping was performed to confirm the genetic arrangements of *AbaR* in case the genome contigs did not comprise the entire island structure. Primers and expected amplicon sequences of mapping PCRs are given in Supplementary Materials Table S5).

4.7. Southern Blot Hybridization Analysis

The genomic location of CP genes was verified by S1-Nuclease digestion of whole-cell DNA, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Southern hybridisation with DNA probes consisting of a 642-bp internal PCR fragment specific for the *bla*_{OXA-23} gene (primers OXA23-FWD/OXA23-REV), a 456-bp internal PCR fragment specific for the *bla*_{OXA-58} gene (primers OXA58-FWD/OXA58-REV) [13,54] (Supplementary Materials Table S4).

4.8. Transformation of Plasmids Carrying Carbapenemase Genes

For transformation of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} encoding plasmids of *A. baumannii* isolates electrocompetent cells of *A. baumannii* strain ATCC 17978 were prepared as described previously [62]. Plasmid DNA of donor strains was isolated using the QIAprep Mini-spin kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Electroporation was carried out with the Eppendorf Eporator® (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the adjustments of 25 µF, 200 Ω and 2.5 kV. The transformants were selected on Mueller–Hinton agar plates containing 4 µg/mL meropenem [62]. The identity of transformants was tested by PCR targeting the CP genes, by PFGE of *Apal*-restricted genomes and by phenotypic susceptibility testing using the VITEK 2 system (bioMérieux, Nuertingen, Germany; AST cards GN38 and GN238).

5. Conclusions

Here, we describe the occurrence and molecular characteristics of OXA-23- and OXA-58-producing *A. baumannii* isolates obtained from clinical samples of companion animals belonging to the international successful clonal lineages ST1 and ST25. Together with the findings that *bla*_{OXA-23} was integrated into the transposon structures Tn2006 and Tn2008 as well as *bla*_{OXA-58} embedded in a previously described genetic context, our data suggest a transfer of acquired carbapenemases and multidrug-resistant *A. baumannii* lineages between humans and companion animals. These findings warrant further investigations on the epidemiology and underlying genetic mechanisms of carbapenem resistance in

Acinetobacter spp. strains from animals and on the processes that may favour the emergence and spread of such bacteria in veterinary settings.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics11081045/s1>, Figure S1: Neighbor Joining Tree of 28 *Acinetobacter baumannii* isolates based on 2,390 genes included in the cgMLST scheme of Ridom SeqSphere+. Table S1: MICs (mg/L) of *A. baumannii* recipient strain ATCC 17978 after transformation of *bla*_{OXA} plasmids from *A. baumannii*. Table S2: Antimicrobial resistance genes and antimicrobial susceptibility of carbapenemase-producing *A. baumannii* isolates from cats and dogs. Table S3: Primers used for the determination of genetic regions flanking the *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} genes in *Acinetobacter baumannii*. Table S4: Oligonucleotide primers used for single and multiplex PCRs to detect β -lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* isolates. Table S5: Oligonucleotide primers used for PCR mapping of *A. baumannii* resistance island *Aba*R3.

Author Contributions: Conceptualization, L.J., C.E. and T.S.; methodology, C.E. and L.J.; software, C.E., L.J. and T.S.; validation, C.E. and L.J.; formal analysis, C.E., L.J. and I.S.; investigation, C.E. and L.J.; resources, C.E., T.S. and I.S.; data curation, C.E. and L.J.; writing—original draft preparation, L.J. and C.E.; writing—review and editing, C.E., I.S., T.S. and L.J.; visualization, C.E. and L.J.; supervision, C.E.; project administration, C.E.; funding acquisition, C.E. and L.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: L.J. was financially supported by the “Akademie für Tiergesundheit e.V.” The APC was funded by the Open Access Publication Funds of the Justus Liebig University Giessen, granted by the German Research Foundation.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All relevant data are provided in the paper and its Supplements. Raw sequence reads of 42 *A. baumannii* genomes are provided under NCBI Bioproject ID PRJNA857701. Further raw data can be made available on reasonable request.

Acknowledgments: We would like to thank Ursula Leidner for her excellent technical support and our colleagues from the microbiological diagnostic laboratory of the Institute of Hygiene and Infectious Diseases, JLU Giessen, for collecting *Acinetobacter baumannii* isolates from veterinary clinical samples.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

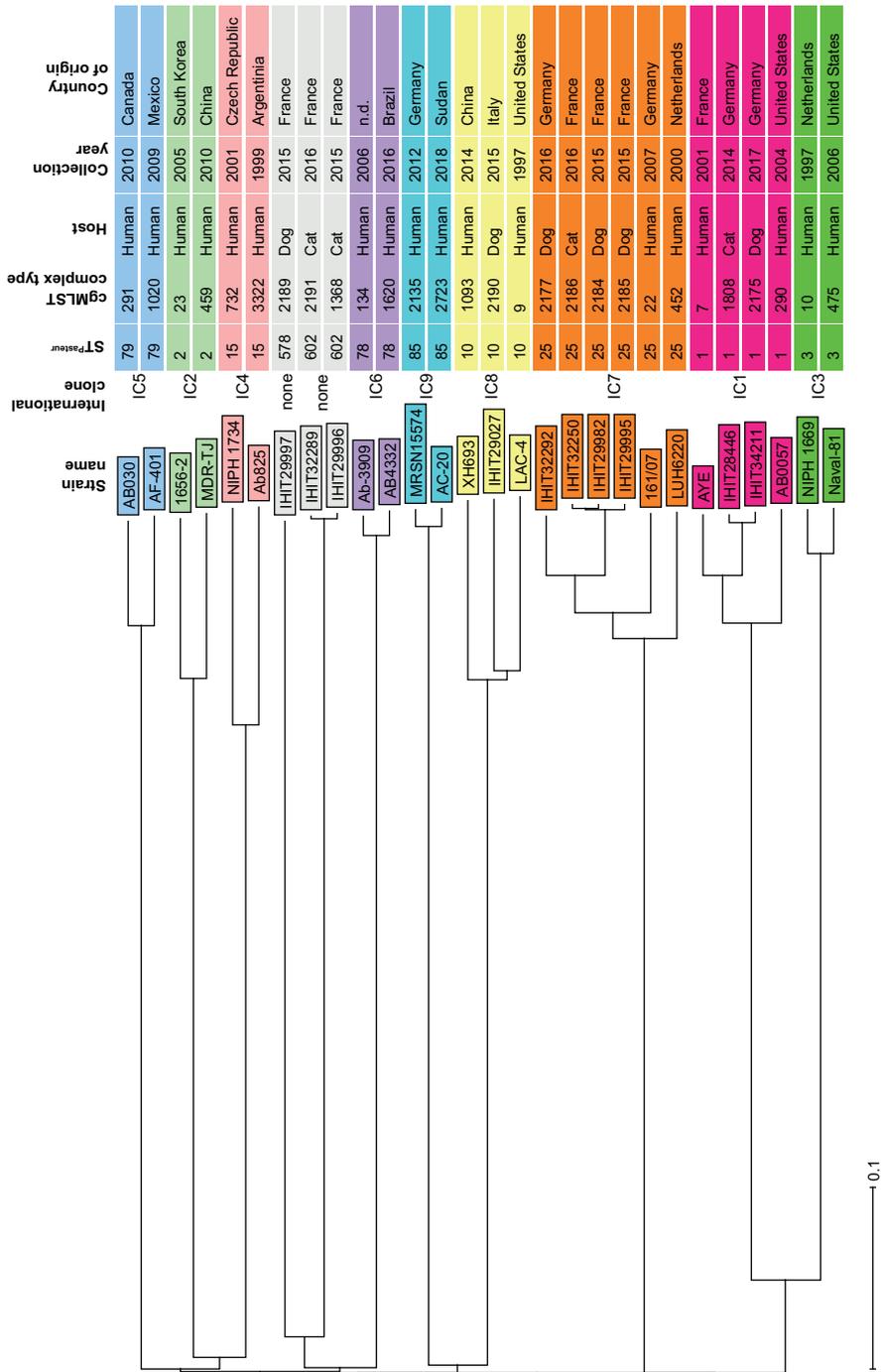
References

- Higgins, P.G.; Dammhayn, C.; Hackel, M.; Seifert, H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 233–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Adams-Haduch, J.M.; Onuoha, E.O.; Bogdanovich, T.; Tian, G.B.; Marschall, J.; Urban, C.M.; Spellberg, B.J.; Rhee, D.; Halstead, D.C.; Pasculle, A.W.; et al. Molecular epidemiology of carbapenem-nonsusceptible *Acinetobacter baumannii* in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 3849–3854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sahl, J.W.; Del Franco, M.; Pournaras, S.; Colman, R.E.; Karah, N.; Dijkshoorn, L.; Zarrilli, R. Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 15188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Belmonte, O.; Pailhories, H.; Kempf, M.; Gaultier, M.P.; Lemarie, C.; Ramont, C.; Joly-Guillou, M.L.; Eveillard, M. High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Vet. Microbiol.* **2014**, *170*, 446–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goettig, S.; Gruber, T.M.; Higgins, P.G.; Wachsmuth, M.; Seifert, H.; Kempf, V.A. Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* **2014**, *69*, 2578–2579. [[CrossRef](#)]
- Taconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [[CrossRef](#)]
- Nguyen, M.; Joshi, S.G. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, and their importance in hospital-acquired infections: A scientific review. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 2715–2738. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ewers, C.; Klotz, P.; Leidner, U.; Stamm, I.; Prenger-Berninghoff, E.; Gottig, S.; Semmler, T.; Scheufen, S. OXA-23 and ISAba1-OXA-66 class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2017**, *49*, 37–44. [[CrossRef](#)]

9. Ewers, C.; Klotz, P.; Scheufen, S.; Leidner, U.; Gottig, S.; Semmler, T. Genome sequence of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* IHIT7853, a carbapenem-resistant strain from a cat belonging to international clone IC1. *Gut Pathog.* **2016**, *8*, 37. [\[CrossRef\]](#)
10. Endimiani, A.; Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Bertschy, I.; Rossano, A.; Koch, C.; Gerber, V.; Francey, T.; Bonomo, R.A.; Perreten, V. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: Molecular characterization and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 2248–2254. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Pomba, C.; Endimiani, A.; Rossano, A.; Saial, D.; Couto, N.; Perreten, V. First report of OXA-23-mediated carbapenem resistance in sequence type 2 multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* associated with urinary tract infection in a cat. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, *58*, 1267–1268. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Herivaux, A.; Pailhories, H.; Quinqueneau, C.; Lemarie, C.; Joly-Guillou, M.L.; Ruvoen, N.; Eveillard, M.; Kempf, M. First report of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* carriage in pets from the community in France. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48*, 220–221. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Jacobmeyer, L.; Stamm, I.; Semmler, T.; Ewers, C. First report of NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain from a pet animal in Europe. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2021**, *26*, 128–129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Zhang, W.J.; Lu, Z.; Schwarz, S.; Zhang, R.M.; Wang, X.M.; Si, W.; Yu, S.; Chen, L.; Liu, S. Complete sequence of the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1681–1682. [\[CrossRef\]](#)
15. Al Bayssari, C.; Dabboussi, F.; Hamze, M.; Rolain, J.M. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 950–951. [\[CrossRef\]](#)
16. Pailhories, H.; Belmonte, O.; Kempf, M.; Lemarie, C.; Cuziat, J.; Quinqueneau, C.; Ramont, C.; Joly-Guillou, M.L.; Eveillard, M. Diversity of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: An exploratory study. *Int. J. Infect. Dis.* **2015**, *37*, 64–69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. van Spijk, J.N.; Schmitt, S.; Furst, A.E.; Schoster, A. A retrospective analysis of antimicrobial resistance in bacterial pathogens in an equine hospital (2012–2015). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* **2016**, *158*, 433–442. [\[CrossRef\]](#)
18. Linz, B.; Mukhtar, N.; Shabbir, M.Z.; Rivera, I.; Ivanov, Y.V.; Tahir, Z.; Yaqub, T.; Harvill, E.T. Virulent Epidemic Pneumonia in Sheep Caused by the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2616. [\[CrossRef\]](#)
19. Lupo, A.; Chatre, P.; Ponsin, C.; Saras, E.; Boulouis, H.J.; Keck, N.; Haenni, M.; Madec, J.Y. Clonal Spread of *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 Carrying *bla*_{OXA-23} in Companion Animals in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e01881-16. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Post, V.; White, P.A.; Hall, R.M. Evolution of *AbaR*-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1162–1170. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Hamidian, M.; Hall, R.M. The *AbaR* antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1-Structure, origin and evolution. *Drug Resist. Updates Rev. Comment. Anticancer Chemother.* **2018**, *41*, 26–39. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Hamidian, M.; Hawkey, J.; Wick, R.; Holt, K.E.; Hall, R.M. Evolution of a clade of *Acinetobacter baumannii* global clone 1, lineage 1 via acquisition of carbapenem- and aminoglycoside-resistance genes and dispersion of *ISAbA1*. *Microb. Genom.* **2019**, *5*, e000242. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Adams, M.D.; Chan, E.R.; Molyneux, N.D.; Bonomo, R.A. Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 3569–3577. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Wong, D.; Nielsen, T.B.; Bonomo, R.A.; Pantapalangkoor, P.; Luna, B.; Spellberg, B. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: A Century of Challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 409–447. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Gentilini, F.; Turba, M.E.; Pasquali, F.; Mion, D.; Romagnoli, N.; Zambon, E.; Terni, D.; Peirano, G.; Pitout, J.D.D.; Parisi, A.; et al. Hospitalized Pets as a Source of Carbapenem-Resistance. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2872. [\[CrossRef\]](#)
26. Chanchaithong, P.; Prapasarakul, N.; Sirisopit Mehl, N.; Suanpairintr, N.; Teankum, K.; Collaud, A.; Endimiani, A.; Perreten, V. Extensively drug-resistant community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 2 in a dog with urinary tract infection in Thailand. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2018**, *13*, 33–34. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
27. Mistic, D.; Asanin, J.; Spersger, J.; Szostak, M.; Loncaric, I. OXA-72-Mediated Carbapenem Resistance in Sequence Type 1 Multidrug (Colistin)-Resistant *Acinetobacter baumannii* Associated with Urinary Tract Infection in a Dog from Serbia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00219-18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Taj, Z.; Rasool, M.H.; Almatroudi, A.; Saqalein, M.; Khurshid, M. Extensively Drug-resistant *Acinetobacter baumannii* Belonging to International Clone II from A Pet Cat with Urinary Tract Infection; The First Report from Pakistan. *Pol. J. Microbiol.* **2020**, *69*, 231–234. [\[CrossRef\]](#)
29. Zordan, S.; Prenger-Berninghoff, E.; Weiss, R.; van der Reijden, T.; van den Broek, P.; Baljer, G.; Dijkshoorn, L. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1751–1754. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Klotz, P.; Jacobmeyer, L.; Stamm, I.; Leidner, U.; Pfeifer, Y.; Semmler, T.; Prenger-Berninghoff, E.; Ewers, C. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST294 harbouring the OXA-72 carbapenemase from a captive grey parrot. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, *73*, 1098–1100. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Pailhories, H.; Kempf, M.; Belmonte, O.; Joly-Guillou, M.L.; Eveillard, M. First case of OXA-24-producing *Acinetobacter baumannii* in cattle from Reunion Island, France. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2016**, *48*, 763–764. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

32. Hrenovic, J.; Seruga Music, M.; Durn, G.; Dekic, S.; Hunjak, B.; Kisic, I. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Recovered from Swine Manure. *Microb. Drug Resist.* **2019**, *25*, 725–730. [CrossRef] [PubMed]
33. Kohlenberg, A.; Brummer, S.; Higgins, P.G.; Sohr, D.; Piening, B.C.; de Grahl, C.; Halle, E.; Ruden, H.; Seifert, H. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 1499–1507. [CrossRef] [PubMed]
34. Principe, L.; Piazza, A.; Gianni, T.; Bracco, S.; Caltagirone, M.S.; Arena, F.; Nucleo, E.; Tammaro, F.; Rossolini, G.M.; Pagani, L.; et al. Epidemic diffusion of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates in Italy: Results of the first cross-sectional countrywide survey. *J. Clin. Microbiol.* **2014**, *52*, 3004–3010. [CrossRef]
35. Hsu, L.Y.; Apisarnthanarak, A.; Khan, E.; Suwantararat, N.; Ghafur, A.; Tambyah, P.A. Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *Enterobacteriaceae* in South and Southeast Asia. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 1–22. [CrossRef]
36. Lukovic, B.; Gajic, I.; Dimkic, I.; Kekic, D.; Zornic, S.; Pozder, T.; Radisavljevic, S.; Opavski, N.; Kojic, M.; Ranin, L. The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: Emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2020**, *9*, 101. [CrossRef] [PubMed]
37. Mugnier, P.D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 35–40. [CrossRef]
38. Pfennigwerth, N.; Schauer, J. Bericht des Nationalen Referenzzentrums für gramnegative Krankenhausreger-Zeitraum 1. Januar 2021 bis 31. Dezember 2021. *Epidemiol. Bull.* **2022**, *19*, 3–9. [CrossRef]
39. Jeannot, K.; Diancourt, L.; Vaux, S.; Thouverez, M.; Ribeiro, A.; Coignard, B.; Brisse, S. Molecular Epidemiology of Carbapenem Non-Susceptible *Acinetobacter baumannii* in France. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e115452. [CrossRef]
40. Giannouli, M.; Antunes, L.C.; Marchetti, V.; Triassi, M.; Visca, P.; Zarrilli, R. Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infect. Dis.* **2013**, *13*, 282. [CrossRef]
41. da Silva, K.E.; Maciel, W.G.; Croda, J.; Cayo, R.; Ramos, A.C.; de Sales, R.O.; Kurihara, M.N.L.; Vasconcelos, N.G.; Gales, A.C.; Simionato, S. A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0209367. [CrossRef] [PubMed]
42. Puentener-Simmen, S.; Zurfluh, K.; Schmitt, S.; Stephan, R.; Nuesch-Inderbinen, M. Phenotypic and Genotypic Characterization of Clinical Isolates Belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* (ACB) Complex Isolated From Animals Treated at a Veterinary Hospital in Switzerland. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 17. [CrossRef]
43. Schleicher, X.; Higgins, P.G.; Wisplinghoff, H.; Korber-Irrgang, B.; Kresken, M.; Seifert, H. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 737–742. [CrossRef]
44. Bi, D.; Zheng, J.; Xie, R.; Zhu, Y.; Wei, R.; Ou, H.Y.; Wei, Q.; Qin, H. Comparative Analysis of *AbaR*-Type Genomic Islands Reveals Distinct Patterns of Genetic Features in Elements with Different Backbones. *mSphere* **2020**, *5*, e00349-20. [CrossRef] [PubMed]
45. Krizova, L.; Dijkshoorn, L.; Nemeč, A. Diversity and evolution of *AbaR* genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 3201–3206. [CrossRef] [PubMed]
46. Godeux, A.S.; Svedholm, E.; Lupo, A.; Haenni, M.; Venner, S.; Laaberki, M.H.; Charpentier, X. Scarless Removal of Large Resistance Island *AbaR* Results in Antibiotic Susceptibility and Increased Natural Transformability in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e00951-20. [CrossRef]
47. Evans, B.A.; Hamouda, A.; Townner, K.J.; Amyes, S.G. Novel genetic context of multiple bla_{OXA-58} genes in *Acinetobacter* genospecies 3. *J. Antimicrob. Chemother.* **2010**, *65*, 1586–1588. [CrossRef] [PubMed]
48. Ayibieke, A.; Kobayashi, A.; Suzuki, M.; Sato, W.; Mahazu, S.; Prah, I.; Mizoguchi, M.; Moriya, K.; Hayashi, T.; Suzuki, T.; et al. Prevalence and Characterization of Carbapenem-Hydrolyzing Class D beta-Lactamase-Producing *Acinetobacter* Isolates From Ghana. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 587398. [CrossRef] [PubMed]
49. Castro-Jaimes, S.; Salgado-Camargo, A.D.; Grana-Miraglia, L.; Lozano, L.; Bocanegra-Ibarias, P.; Volkow-Fernandez, P.; Silva-Sanchez, J.; Castillo-Ramirez, S.; Cevallos, M.A. Complete Genome Sequence of a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolate Obtained from a Mexican Hospital (Sequence Type 422). *Genome Announc.* **2016**, *4*, e00583-16. [CrossRef]
50. Fu, Y.; Jiang, J.; Zhou, H.; Jiang, Y.; Fu, Y.; Yu, Y.; Zhou, J. Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of bla_{OXA-58} in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84680. [CrossRef]
51. Zarrilli, R.; Vitale, D.; Di Popolo, A.; Bagattini, M.; Daoud, Z.; Khan, A.U.; Afif, C.; Triassi, M. A plasmid-borne bla_{OXA-58} gene confers imipenem resistance to *Acinetobacter baumannii* isolates from a Lebanese hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 4115–4120. [CrossRef] [PubMed]
52. Higgins, P.G.; Lehmann, M.; Wisplinghoff, H.; Seifert, H. *gyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 4592–4594. [CrossRef] [PubMed]
53. Groebner, S.; Linke, D.; Schutz, W.; Fladerer, C.; Madlung, J.; Autenrieth, I.B.; Witte, W.; Pfeifer, Y. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J. Med. Microbiol.* **2009**, *58*, 912–922. [CrossRef]
54. Higgins, P.G.; Lehmann, M.; Seifert, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 305. [CrossRef] [PubMed]

55. Higgins, P.G.; Zander, E.; Seifert, H. Identification of a novel insertion sequence element associated with carbapenem resistance and the development of fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter radioresistens*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 720–722. [[CrossRef](#)]
56. Pfeifer, Y.; Witte, W.; Holfelder, M.; Busch, J.; Nordmann, P.; Poirel, L. NDM-1-producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1318–1319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Poirel, L.; Dortet, L.; Bernabeu, S.; Nordmann, P. Genetic features of bla_{NDM-1}-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 5403–5407. [[CrossRef](#)]
58. Poirel, L.; Walsh, T.R.; Cuvillier, V.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2011**, *70*, 119–123. [[CrossRef](#)]
59. Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Hulten, E.A.; Bajaksouzian, S.; Adams, J.M.; Donskey, C.J.; Ecker, D.J.; Massire, C.; Eshoo, M.W.; Sampath, R.; et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 4114–4123. [[CrossRef](#)]
60. Diancourt, L.; Passet, V.; Nemeč, A.; Dijkshoorn, L.; Brisse, S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10034. [[CrossRef](#)]
61. Higgins, P.G.; Prior, K.; Harmsen, D.; Seifert, H. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0179228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Grimm, V.; Ezaki, S.; Susa, M.; Knabbe, C.; Schmid, R.D.; Bachmann, T.T. Use of DNA microarrays for rapid genotyping of TEM beta-lactamases that confer resistance. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 3766–3774. [[CrossRef](#)]
63. Choi, K.H.; Kumar, A.; Schweizer, H.P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *64*, 391–397. [[CrossRef](#)]



Supplementary Figure S1: Neighbor Joining Tree of 28 *Acinetobacter baumannii* isolates based on 2,390 genes included in the cgMLST scheme of Ridom SeqSphere+. The tree is based on a comparison of publicly available *A. baumannii* genomes representing international clones IC1 (AYE, GenBank No. NC_010410.1; AB0057, NC011586.2), IC2 (1656-2, NC_017162.1; MDR-TJ, NC_017847.1), IC3 (NIPH 1669, APOQ01.1; Naval-81, AFB02.1), IC4 (NIPH 1734, APOX01.1; Ab825, NTFR01.1), IC5 (AB030, NZ_CP009257.1; AF-401, NZ_CP018254.1), IC6 (Ab-3909, AEOZ01.1; AB4332, RJLV01.1), IC7 (161/07, JZCA01.1; LUH_6220, JZBA01.1), IC8 (XH693, LYV01.1; LAC-4, NZ_CP007712) and IC9 (MRSN15574, VHGP01.1; AC-20, JABESZ01.1), and CP positive *A. baumannii* isolates from this study that could not be assigned to a known IC by PCR.

Supplemental Table S1: MICs (mg/L) of *A. baumannii* recipient strain ATCC 17978 after transformation of *bla_{OXA}* plasmids from *A. baumannii*.

Strain	Trans-formant	IMP (VITEK)	IMP (E-test)	PIP	CPD	CTF	AMK	GEN	TOB	ENR	MAR	TET	NIT	CHL	PMB	SXT
OXA-23-producing isolates																
IHIT29027	CE-AB12	≥16	≥32	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	32	1	160
IHIT30558	CE-AB18	≥16	≥32	≥128	≥8	≥8	32	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT32292	CE-AB14	≥16	≥32	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT32297	CE-AB16	≥16	≥32	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT34486	CE-AB19	≥16	≥32	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
OXA-58-producing isolates																
IHIT29480	CE-AB24	≥16	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT29985	CE-AB25	≥16	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT29997	CE-AB26	8	6	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT31605	CE-AB27	≥16	6	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT31634	CE-AB28	8	3	≥128	4	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	256	≥64	1	160
IHIT31820	CE-AB29	≥16	4	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	0.5	160
IHIT32291	CE-AB30	≥16	6	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT32293	CE-AB31	8	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	2	256	≥64	1	160
IHIT32295	CE-AB32	8	6	≥128	4	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	256	≥64	0.5	160
IHIT32298	CE-AB33	≥16	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	0.5	160
IHIT32299	CE-AB34	≥16	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	0.5	160
IHIT33967	CE-AB35	≥16	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	0.5	160
IHIT34210	CE-AB36	≥16	8	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT34211	CE-AB37	≥16	6	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT34212	CE-AB38	≥16	6	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
IHIT34607	CE-AB39	≥16	6	≥128	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	1	160
ATCC 17978	Recipient	≤1	≤1	16	≥8	≥8	≤2	≤1	≤1	≤0.12	≤0.5	≤1	≥512	≥64	2	160

MICs were determined with the VITEK 2 system; (MICs for imipenem were additionally determined by antibiotic gradient strips (E-test); all isolates were resistant to ampicillin, amoxicillin/clavulanate, cephalixin, and chloramphenicol in accordance to the definitions of intrinsic resistance for *Acinetobacter* spp. set by EUCAST and CLSI. IMP, imipenem; PIP, piperacillin; CPD, ceftiofloxime; CTF, ceftiofur; ENR, enrofloxacin; MAR, marbofloxacin; AMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; PMB, polymyxin B; SXT, sulfamethoxazole/trimethoprim; NIT, nitrofurantoin.

Supplemental Table S3: Primers used for the determination of genetic regions flanking the *bla_{OXA-23}* and *bla_{OXA-58}* genes in *Acinetobacter baumannii*

PCR	Target region	Primer name (Primer ID IHIT)	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size	Primer reference	OXA-23	OXA region with positive PCR reaction*
1	<i>ISAbal1</i> <i>ATPase</i>	ISAbal1-A_RP ATPase-univ-R	CCACGATAAACGATTGCGAGCA GCAACCGTCGACATCTGTTA	1,703 bp	PS [1]		a, b, c, d, e
2	<i>ISAbal1</i> <i>traL</i>	ISAbal1-B_RP TraL_RP	CGGTGAGCAGTGGTTTACAT CTTCAAGACCGCATCCAACA	1,362 bp	PS PS		b, c, e
3	<i>ISAbal1</i> <i>korB</i>	ISAbal1_FWD KorB_RP	TTGGTTGGTCCGGTGAAGCT AAGAAGGCGTGGCAGAGAAT	3,660 bp	PS PS		e
4	<i>traD</i> <i>Hypothetical protein</i>	TraD_Fwd HP4_IHIT29996_REV	AGGCCGACTTACCCAAATCAC TTGGCTGCATCAITTTTCAGC	2,212 bp	PS PS		e
5	<i>Replication protein</i> <i>strB</i>	RepIP_FWD StrB_RP	TGGCACTATCAITTCCTGGAC CGATCAAGCAGGTGCGACA	3,023 bp	PS [3]		b
6	<i>strA</i> <i>topB</i>	StrA-RP TopB_RP	GCAACCAGTCAGAAATGCCAT GGTCATGTTCTGCATATCCTA	1,856 bp	[3] PS		b
7	<i>ATPase</i> <i>parB</i>	ATPase-intern1 ParB-RP	TCAGGAAGATCGGACAGATC CATCTAGCAGAGCTTCGCAA	1,092 bp (b); 2,504 bp (c); 2,383 bp (d)	[1] PS		b, c, d
8	<i>Hypothetical protein</i> <i>higB2</i>	HP2_IHIT32289_REV HigB2_FWD	ATCCGGGTGCATGAGTGAC AACTGGGGCCAAAATCTAGGC	2,192 bp	PS PS		e
9	<i>dnaJ</i> <i>Hypothetical protein</i>	DnaJ_FWD HP3_IHIT29996_REV	ATATCTTCAGTCGAGCCGCC AACGGTGGAGCAGAGAAGAAAGT	1,604 bp	PS PS		e
10	<i>ISAbal1</i> <i>comM</i>	ISAbal1_FWD ComM-REV	TTGGTTGGTCCGGTGAAGCT TTGCCTCTGGTCAACTTCCG	3,270 bp	PS PS		a
11	<i>bla_{OXA-23}</i> <i>comM</i>	OXA-23_FWD ComM-REV	TGTCCTTGAACAAATCTGACTC TTGCCTCTGGTCAACTTCCG	4,087 bp	[1] PS		a
12	<i>suIP</i> <i>ATPase</i>	SuIP_FWD ATPase-intern1	TCAACGCCTGCAATAATGG TCAGGAAGATCGGACAGATC	2,258 bp	PS [1]		a

PCR Target region	Primer name (Primer ID IHIT)	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size	Primer reference	OXA region with positive PCR reaction*
OXA-58					
13	<i>bla</i> _{OXA-58} <i>araC</i>	OXA-58_FWD AraC_REV	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CGTAGGGTTGATTCGATAGCA	[2] [3]	A, B, C, D
14	<i>adh</i> <i>bla</i> _{OXA-58}	Adh_FWD OXA-58_REV	ACCAAGATCCGTTCCACAAA TCAACTTCCGTGCCTATTG	PS [2]	A, B
15	<i>repE</i> <i>adh</i>	RepE_FWD Adh_REV	ATGCTACAAGATCCCGCTCA ACGTTGGTGTGCATGGTAAG	PS PS	A
16	<i>adh</i> <i>tonB</i>	Adh_FWD TonB_REV	ACCAAGATCCGTTCCACAAA ATTCCGTACCCAAGGCATCC	PS PS	A
17	<i>araC</i> <i>vapC</i>	AraC_FP VapC_REV	ACAAACACTCAACATTTGGTG CCATAAGCATGGGCACATGT	[3] PS	A
18	<i>tonB</i> <i>spl</i>	TonB_FWD Spl_REV	TTACCTCTGCTCGTTTGGG ATGCCACITTAITTCGCCGG	PS PS	C
19	<i>Hypothetical protein</i> <i>bla</i> _{OXA-58}	HP6_IHIT29997_FWD OXA-58_REV	ACAAGCCTGGAATTAGAGCCA TCAACTTCCGTGCCTATTG	PS [2]	D
20	<i>repE</i> <i>bla</i> _{OXA-58}	RepE_FWD OXA-58_REV	ATGCTACAAGATCCCGCTCA TCAACTTCCGTGCCTATTG	PS [2]	C
21	<i>Hypothetical protein</i> <i>open reading frame</i>	HP3_IHIT29985_FWD ORF_IHIT29985_REV	ACCTCATCTTAGAAGCCCA TTGTACACACCACCGCATCT	PS PS	C

* see Figures 2 and 3 of the main text for genetic structures of OXA regions; PS = present study

Primer references:

1. Klotz P, Goettig S, Leidner U, Semmler T, Scheutens S, Ewers C. 2017. Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter baumannii*-like isolates. PLOS ONE 12(2):e0171986. doi: 10.1371/journal.pone.0171986
2. Groebner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. Journal of Medical Microbiology 58:912–922. doi: 10.1099/jmm.0.005850-0.
3. Klotz P, Jacobmeyer L, Leidner U, Stamm I, Semmler T, Ewers C. 2018. *Acinetobacter pittii* from Companion Animals Co-harboring *bla*_{OXA-58}, the *tet*(39) Region, and Other Resistance Genes on a Single Plasmid. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 62(1):e01993-17. doi: 10.1128/AAC.01993-17.

Supplemental Table S3 continued:

According to the different genetic environments of *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58} genes (see Figure 2 and Figure 3 of the main text), *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-58}-positive *A. baumannii* strains revealed different PCR results:

OXA gene flanking pattern	Location of <i>bla</i> _{OXA} gene and/or plasmid size	PCR numbers (positive PCR results are indicated by blue-filled boxes)																				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
OXA-23																						
a	chromosome	■								■	■	■										
b	48.4 kb	■	■		■																	
c	55.8 kb	■	■																			
d	unknown	■	■																			
e	71.3 kb	■							■													
OXA-58																						
A	21.1 kb											■	■	■	■	■	■					
B	11.3 kb												■	■								
C	12.6 kb												■	■							■	
D	12.3 kb												■						■			■

Supplemental Table S4: Oligonucleotide primers used for single and multiplex PCRs to detect β -lactamase genes in *Acinetobacter baumannii* isolates

Target gene	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size	Primer reference
<i>bla</i> _{OXA-23}	OXA-23 fwd	AACCCCGAGTCAGATTGTTC	642 bp	[1]
	OXA-23 rev	ATTTTCCATCTGGCTGCTC		
<i>bla</i> _{OXA-40}	OXA-40 fwd	GTTTCTCTCAGTCATGTTTCATC	246 bp	[1]
	OXA-40 rev	CGAATAGAACCAGACATTCCTTC		
<i>bla</i> _{OXA-58}	OXA-58 fwd	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599 bp	[1]
	OXA-58 rev	TCAACTTCCGTGCCTATTTG		
<i>bla</i> _{OXA-143}	OXA-143 fwd	TGGCACTTTCAGCAGTTTCCT	149 bp	[2]
	OXA-143 rev	TAATCTTGAGGGGGCCAACC		
<i>bla</i> _{OXA-235}	OXA-235 fwd	TTGTGCCTTACTTAGTTGC	768 bp	[3]
	OXA-235 rev	CAAAATTTAAGACGGATCG		
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-1_F	CTGAGCACCGCATTAGCC	754 bp	[4]
	NDM-1_R	GGGCCGTATGAGTGATTGC		
<i>bla</i> _{KPC}	KPC_F	CAGCTCATTCAAGGGCTTTC	533 bp	[1]
	KPC_R	AGTCATTGCCGTGCCATAC		
<i>bla</i> _{VIM}	VIM_F	AGTGGTGAGTATCCGACAG	261 bp	[1]
	VIM_R	ATGAAAGTGCCTGGAGAC		
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	743 bp	[5]
	OXA-48B	GAGCACITCTTTTGTGATGCC		
<i>bla</i> _{GES}	GES_Fwd	GAAGCTAGAGCGCGAAAAAAG	744 bp	[6]
	GES_Rev	ACTTGACCGACAGAGGCAAC		
<i>bla</i> _{GIM}	GIM-ges F	TGTAGCGTTGCCAGCTTTAG	700 bp	[7]
	GIM-ges R	GGTCGGTTGCATTAATTTGTTAG		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP_F	GGAATAGAGTGCTTAAAYTCTC	233 bp	[8]
	IMP_R	GGTTTAAAYAAAACAACCACC		

Primer references

- Groebner, S.; Linke, D.; Schutz, W.; Fladerer, C.; Madlung, J.; Autenrieth, I.B.; Witte, W.; Pfeifer, Y. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of medical microbiology* 2009, 58, 912-922, doi:10.1099/jmm.0.005850-0.
- Higgins, P.G.; Lehmann, M.; Seifert, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International journal of antimicrobial agents* 2010, 35, 305, doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014.
- Higgins, P.G.; Perez-Llarena, F.J.; Zander, E.; Fernandez, A.; Bou, G.; Seifert, H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013, 57, 2121-2126, doi:10.1128/AAC.02413-12.
- Pfeifer, Y.; Witte, W.; Holfelder, M.; Busch, J.; Nordmann, P.; Poirel, L. NDM-1-producing *Escherichia coli* in Germany. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011, 55, 1318-1319, doi:10.1128/AAC.01585-10.
- Poirel, L.; Dortet, L.; Bernabeu, S.; Nordmann, P. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011, 55, 5403-5407, doi:10.1128/AAC.00585-11.

6. Eller, C. Molecular analysis of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae as colonisers and pathogens in humans. 2014. Dissertation; Faculty of Life Sciences, Technical University Braunschweig, Germany. doi: 10.24355/dbbs.084-201411260838-0.
7. Pfeifer, Y., Robert-Koch Institute Wernigerode, Germany; personal communication
8. Poirel, L.; Walsh, T.R.; Cuvillier, V.; Nordmann, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2011, 70, 119-123, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.



First report of NDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain from a pet animal in Europe

Editor: Dr J. Hobman



Sir,

Multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*, including carbapenem-resistant strains carrying New Delhi metallo- β -lactamase 1 (NDM-1), have emerged as a major cause of healthcare-associated infections worldwide [1]. Although carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. strains have been reported from animals, NDM-1-producing strains are still rare. They mainly occurred in livestock animals in China and were often identified in non-*baumannii* strains [2–4].

Here we report an NDM-1-positive, carbapenem-resistant *A. baumannii* strain belonging to a globally distributed clonal lineage isolated from a dog suffering from a urinary tract infection in Europe. Strain IHIT38008, identified as *A. baumannii* by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) (Bruker Daltonik, Bremen, Germany), was isolated from the urine of a dog from Italy during routine diagnostics in a veterinary microbiology laboratory in Germany in 2018. Antimicrobial susceptibility was determined using VITEK®2 (bioMérieux, Nürtingen, Germany; cards AST-GN38 and AST-N248), antibiotic gradient strips in the case of carbapenems (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy) and a MICRONAUT system (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Germany) for colistin. According to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints, the isolate was resistant to all β -lactams, including the carbapenems imipenem [minimum inhibitory concentration (MIC) = 8 mg/L], doripenem (MIC > 32 mg/L) and meropenem (MIC = 8 mg/L). It was also resistant to enrofloxacin (MIC \geq 4 mg/L), marbofloxacin (MIC \geq 4 mg/L) and nitrofurantoin (MIC \geq 512 mg/L) but showed susceptibility to amikacin, gentamicin, tobramycin, trimethoprim/sulfamethoxazole and colistin. The genome was sequenced using MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) (Sequence Read Archive no. [SDSK000000001](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SDSK000000001)), and de novo assembly and annotation of sequences were performed with SPAdes v.3.15.1 (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>) and RAST v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org/>), respectively. Using ResFinder 4.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), we identified the carbapenemase gene *bla*_{NDM-1} and the intrinsic β -lactamase genes *bla*_{OXA-64} and *bla*_{ADC-25-like}. In accordance with the resistance observed for fluoroquinolones, we identified mutations in the quinolone resistance-determining region of DNA gyrase (GyrA; S83L) and topoisomerase IV (ParC; E84K). Other known resistance genes or mechanisms were not present.

NDM-producing *Acinetobacter* spp. strains have been frequently reported from humans [1,5], but there are much fewer findings in animals [2–4,6]. In China, the *bla*_{NDM-1} gene was identified in *A. baumannii* and *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from pigs, in

Acinetobacter lwoffii from chicken and cat, and recently in *Acinetobacter indicus*, *Acinetobacter schindleri* and *A. lwoffii* from waterfowl [2,4]. So far, there is only one report regarding an NDM-1-positive *Acinetobacter* sp. strain in Europe, namely an *Acinetobacter radiorensistens* strain isolated from a rectal swab of a hospitalised dog in Italy in 2014 [6].

The *bla*_{NDM-1} gene in strain IHIT38008 was identified on a whole-genome sequencing contig of 345 993 bp in size. This, together with the results from mlplasmids (<https://sarredondo.shinyapps.io/mlplasmids/>) analysis, indicated the chromosomal location of the gene, which was confirmed by S1 nuclease digestion and subsequent pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Southern blot hybridisation. By analysing the genetic environment of *bla*_{NDM-1} using Geneious v.R8.1 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand), we could locate the gene inside the composite transposon Tn125 (Fig. 1). This transposon structure was first described in a clinical *A. baumannii* strain (161/07) from a hospitalised patient in Germany with travel history to Serbia in 2007 [5]. Of note, the ~10.1-kb transposon structure of IHIT38008 (GenBank accession no. [ML467522.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/ML467522.1)) revealed > 99.9% sequence identity with that of the human strain 161/07. In addition, it was also almost similar to transposon sequences previously identified in *A. baumannii* strain JH from Switzerland and on plasmid pNDM-Iz4b of feline *A. lwoffii* strain Iz4b [1,3,5]. In addition, the NDM-1-positive *A. radiorensistens* strain from a hospitalised dog in Italy shows this genetic environment [6]. In contrast, plasmids pNDM-AB and pAL-1, both identified in *Acinetobacter* spp. from livestock animals in China, differed from the previous ones by carrying a partial Tn125 (Fig. 1). In strain IHIT38008, Tn125 was inserted into a gene encoding a protein of unknown function (GenBank no. [ML467522.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclseq/ML467522.1), locus_id QBQ02716.1). This insertion site differs from those previously published (Fig. 1). These data further confirm that independent transposition events targeted the chromosomes and plasmids of different *Acinetobacter* spp. strains and that the Tn125 transposon likely contributes to the global spread of NDM-1 [1,2].

Our strain was assigned to ST25^{Pasteur} (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>) and international clone VII, an emerging genotype that has been associated with epidemics in humans worldwide.

A core genome comparison of 39 *A. baumannii* ST25 strains (Supplementary Table S1) revealed that IHIT38008 clustered closely [maximum of 568 single nucleotide polymorphisms (SNPs) among 2,222 orthologous genes] to strains previously isolated from human patients (Supplementary Fig. S1). Only 179 SNPs distinguished IHIT38008 from strain 1429530 obtained from a perirectal swab of a human in the USA. Strains from Europe were less related, as exemplified by 161/07 (Germany; 1,861 SNPs), RUH1486 (The Netherlands; 2,882 SNPs) and 4190 (Italy; 5,708 SNPs).

In summary, we describe the first case of an NDM-1-producing *A. baumannii* belonging to the successful clonal ST25 lineage from a pet in Europe. Together with the finding that *bla*_{NDM-1} was integrated into transposon Tn125, which is a major vehicle for NDM-

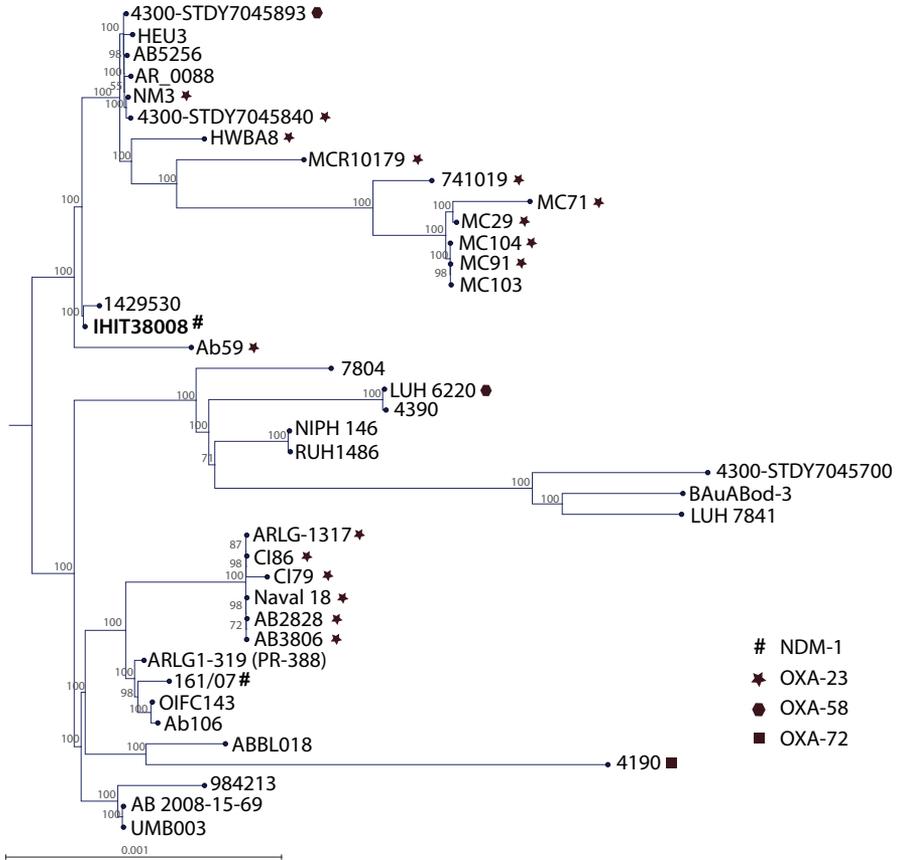
Supplementary Table 1: Metadata associated with 39 ST25^{Fasteur}-*A. baumannii* strains* included in the core genome comparison

Strain	Origin	Isolate source	Country	Year	Oxford ST	Resistance genes	GenBank accession No.
741019	Human	Pleural fluid	Argentina	2011	ST1489	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (B)	JZBX000000000.1
984213	Human	Perirectal	USA	<=2014	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	JEVZ000000000.1
1429530	Human	Perirectal	USA	<=2014	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	JEWJ000000000.1
161-07	Human	Respiratory tract	Germany (travel history Serbia)	2007	ST440	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A NDM-1, <i>bla</i> _A OXA-64	JZCA000000000.1
4190	Human	Blood	Italy	2009	ST992	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A CTX-M-32, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>bla</i> _A OXA-72	AEPA000000000.1
4300STDY7045700	Human	NA	Thailand	2016	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	UFJ000000000.1
4300STDY7045840	Human	NA	Thailand	2016	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>bla</i> _A PER-7, <i>mph</i> (E)-like, <i>msr</i> (E), <i>ARR-2</i>	UFNJ000000000.1
4300STDY7045893	Human	NA	Thailand	2016	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-88, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>bla</i> _A PER-1-like, <i>tet</i> (B), <i>mph</i> (E), <i>msr</i> (E)	UFPC000000000.1
4390JZBY000000000	Human	Bronchial	Greece	2003	ST1641	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	JZBY000000000.1
Ab106	Human	Blood	USA	2008/2009	ST364	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>bla</i> _A PER-1-like	UCPA000000000.1
AB-2008-15-69	Human	NA	NA	2008	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A CARB-2, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>mph</i> (E)-like, <i>msr</i> (E)	AMHN000000000.1
AB2828	Human	Blood	USA	2006	ST993	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (39)	LRDT000000000.1
AB3806	Human	Trauma site	USA	2007	ST993	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (39)	LRDY000000000.1
AB5256	Human	Blood	USA	2009	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (B)	AHA100000000.1
ABBL018	Human	Blood	USA	2005	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-83, <i>bla</i> _A SHV-12, <i>aac</i> (6)/ <i>lb</i> -cr-like	LLCY000000000.1
ARLG-1317	Human	NA	NA	NA	ST993	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (39)	NGHO000000000.1
BAuABod-3	Turkey environment	Environment	Germany	2015	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	NIWN000000000.1
C179	Human	Respiratory tract	Iraq	2005	ST993	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (39)-like	AVOD000000000.1
C186	Human	Wound	Iraq	2005	ST993	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-23, <i>bla</i> _A OXA-64, <i>tet</i> (39)	AVOB000000000.1
CP022283 (Ab strain 7804)	Human	Bronchoalveolar lavage fluid	Mexico	2006	ST490	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	NZ_CP022283.1
CP027530 (strain AR_0088)	Human	NA	NA	NA	ST229	<i>bla</i> _A DC-25-like, <i>bla</i> _A OXA-64	NZ_CP027530.1

Strain	Origin	Isolate source	Country	Year	Oxford ST	Resistance genes	GenBank accession No.
D46	Human	unknown infection site	Australia	2010	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B), <i>mpt</i> (E), <i>msr</i> (E)	UCOV000000000.2
HEU3	Human	Cornea secretion	Honduras	2016	ST1588	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64}	NGXG000000000.1
HWBA8_CP020597	Human	Sputum	South Korea	2013	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64}	NZ_CP020597.1
IHT38008	Dog	Urine	Italy	2018	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{NDM-1} , <i>bla</i> _{OXA-64}	SDSK000000000
LUH_6220	Human	Sputum	Netherlands	2000	ST1641	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64}	JZBW000000000.1
LUH_7841	Human	Venous catheter tip	Netherlands	2002	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64}	JZBX000000000.1
MC103	Human	Pleural fluid	Bolivia	2016	ST1489	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>tet</i> (B)-like	QXOB000000000.1
MC104	Human	Cellulitis, wound secretion	Bolivia	2016	ST1489	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B)-like	QXOA000000000.1
MC29	Human	Urine	Bolivia	2016	ST1519	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B)	QYCW000000000.1
MC71	Human	Osteomyelitis, leg exsudate	Bolivia	2016	ST1528	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B)	QXOP000000000.1
MC91	Human	Chronic kidney disease, urine	Bolivia	2016	ST1489	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B)-like	QXOI000000000.1
MCR10179	Human	Endobronchial tube	Honduras	2015	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B)	NGXG000000000.1
Naval-18	Human	NA	USA	2006	ST993	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (39)	AFDA000000000.2
NIPH 146	Human	Wound	Czech	1993	ST276	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64}	APOU000000000.1
NM3	Human	Sputum	UAE	2008	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (B)	JZBV000000000.1
OIFC143	Human	NA	USA	2003	ST1691	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>bla</i> _{PER-1} -like	AFDL000000000.1
PR-388 (ARLG-1319)	Human	NA	NA	NA	ST11760	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>tet</i> (39)	NGEV000000000.1
RUH1486	Human	Umbilicus	Netherlands	1985	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{OXA-64}	JZBU000000000.1
UMB003	Human	Wound	NA	NA	ST229	<i>bla</i> _{ADC-25} -like, <i>bla</i> _{CARB-2} , <i>bla</i> _{OXA-64} , <i>mpt</i> (E), <i>msr</i> (E)	AEMP000000000

NA = not available

*To select ST25^{Pasteur} *A. baumannii* from publicly available genomes we downloaded 3,088 genomes of *A. baumannii* from the NCBI website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) (available at 07.01.2021) and determined MLST types.



Supplementary Fig. S1. Core genome-based phylogeny of *Acinetobacter baumannii* strain IHIT38008 and publicly available genomes of *A. baumannii* belonging to the ST25 lineage. To create a core genome-based alignment, open reading frames of the *A. baumannii* genomes were predicted by Prokka and were used as input for Roary v.3.12.0 (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>) to calculate the core genome with a sequence identity threshold of 95% for similarity. Orthologous genes ($n = 2222$) were individually aligned with MAFFT v.7.407 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>) and subsequently concatenated. This core gene alignment was used as input for the calculation of a maximum likelihood-based phylogeny with RAxML v.8.2.10 (<https://github.com/stamatak/standard-RAxML>) using a general time reversible model and gamma correction for among site rate variation. Carbapenemase genes of each genome were determined using ResFinder 4.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) and are indicated in the figure. Metadata associated with the ST25 isolates are provided in Supplementary Table S1.



Acinetobacter pittii from Companion Animals Coharboring *bla*_{OXA-58}, the *tet*(39) Region, and Other Resistance Genes on a Single Plasmid

Peter Klotz,^a Lisa Jacobmeyer,^a Ursula Leidner,^a Ivonne Stamm,^b Torsten Semmler,^c Christa Ewers^a

^aInstitute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

^bVet Med Labor GmbH, Division of IDEXX Laboratories, Ludwigsburg, Germany

^cNG1 Microbial Genomics, Robert Koch Institute, Berlin, Germany

KEYWORDS *Acinetobacter pittii*, carbapenemase, companion animal, OXA-58, *tet*(39)

Besides *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* is an important nosocomial pathogen (1, 2). Carbapenems are the antimicrobial agents of choice for the treatment of infections with multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. However, the incidence of carbapenem-resistant strains has risen over the last decade, mainly because of the acquisition of oxacillinases (OXA-23, -40, -58, -143, and -235) and less frequently of metallo-beta-lactamases (e.g., NDM, GIM, IMP) and the overexpression of the intrinsic OXA-51-like oxacillinase (2, 3). Also for human *A. pittii* isolates, different carbapenemase genes have been determined, including *bla*_{OXA-58} and *bla*_{NDM-1} (4–12). However, in animals, there is only one report of a carbapenem-resistant *A. pittii* isolate, namely, an OXA-40-positive strain from a rabbit in Lebanon (13).

In the present study, a PCR-based screening of 200 clinical *A. pittii* isolates from dogs ($n = 110$), cats ($n = 48$), rabbits ($n = 13$), horses ($n = 10$), and other animals ($n = 19$) collected between 2008 and 2017 for β -lactamase genes *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-40-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{NDM-like} and *bla*_{IMP-like} (14, 15) revealed five (2.5%) *bla*_{OXA-58}-positive strains (Table 1). All of the carriers had different owners and had been admitted to two epidemiologically unlinked veterinary clinics in Germany between February 2014 and September 2016. Pulsed-field gel electrophoresis (15) divided the strains into pulsotypes A and B according to their origin from veterinary clinics A and B, respectively. This suggests the maintenance of pulsotype A strains in clinic A for >2 years and pulsotype B strains in clinic B for about 1 month.

On the basis of whole-genome sequencing data and the use of MLST (multilocus sequence type) Finder 1.8 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>), all isolates were assigned to sequence type 93 (ST93) according to the Pasteur scheme (<http://pubmlst.org/abaumannii>). A maximum common genome (MCG) analysis based on 2,770 orthologous genes of 17 publicly available genomes of ST93 and OXA-58-positive *A. pittii* isolates from humans and our isolates was performed (16, 17). Pulsotype A isolates clustered separately from pulsotype B isolates but together with strains isolated from human patients in Germany and the United States (Fig. 1). The high relatedness (88 single nucleotide polymorphisms in the MCG) of feline OXA-58 strain IHIT29469 to GIM-1-positive clinical strain UKK-0555, which was isolated in 2011 in Germany, indicates that humans and companion animals may be infected by similar *A. pittii* genotypes, which has already been reported for other bacteria, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, extended-spectrum beta-lactamase producers, and multidrug-resistant *A. baumannii* (15, 18, 19).

We detected *aacC2*, *aph*(3')-Ic, *strA*, *strB*, *sul2*, and *tet*(39) as additional resistance genes in our *A. pittii* isolates (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>). They all

Accepted manuscript posted online 6 November 2017

Citation Klotz P, Jacobmeyer L, Leidner U, Stamm I, Semmler T, Ewers C. 2018. *Acinetobacter pittii* from companion animals coharboring *bla*_{OXA-58}, the *tet*(39) region, and other resistance genes on a single plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01993-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01993-17>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Christa Ewers, christa.ewers@vetmed.uni-giessen.de.

P.K. and L.J. contributed equally to this study.

TABLE 1 Characteristics of OXA-58-producing *A. pittii* isolates from companion animals in Germany

Strain	Date of isolation	Host	Sample (disease)	Other bacteria isolated	Veterinary clinic	Pulsotype	ST	Antimicrobial resistance ^a	Resistance genes
IHT24944	2/2014	Dog 1	Nose swab (rhinitis, sinusitis)	<i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Bacillus</i> sp., <i>Micrococcus</i> sp.	A	A	93	FEP, CTZ, FEP, CFP, CTU, GEN, CIP, MOX, ENR, MAR, TET, TOB, NIT, SXT	<i>aacc2</i> , <i>aph(3')-Ic</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>suI2</i> , <i>bla</i> _{OXA-50p} , <i>bla</i> _{ADC-18-IIIer}
IHT32473	7/2016	Dog 2	Bronchial fluid (respiratory tract infection)	<i>Acinetobacter johnsonii</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida</i> sp.	A	A	93	FEP, CTZ, FEP, CFP, CTU, CPD, GEN, CIP, MOX, ENR, MAR, TET, TOB, NIT, SXT	<i>aacc2</i> , <i>aph(3')-Ic</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>suI2</i> , <i>bla</i> _{OXA-50p} , <i>bla</i> _{ADC-18-IIIer}
IHT32685	9/2016	Rabbit	Nose (none, screening)	<i>Bacillus</i> sp., <i>Candida</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp.	A	A	93	FEP, CTZ, FEP, CFP, CTU, CPD, GEN, CIP, MOX, ENR, MAR, TET, TOB, NIT, SXT	<i>aacc2</i> , <i>aph(3')-Ic</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>suI2</i> , <i>bla</i> _{OXA-50p} , <i>bla</i> _{ADC-18-IIIer}
IHT29469	5/2015	Cat 1	Nose swab (suppurating rhinitis)	<i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Micrococcus</i> sp.	B	B	93	CPD, CTU, GEN, CIP, MOX, ENR, TET, NIT, SXT	<i>aacc2</i> , <i>aph(3')-Ic</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>suI2</i> , <i>bla</i> _{OXA-50p} , <i>bla</i> _{ADC-18-IIIer}
IHT29592	6/2015	Cat 2	Skin swab (purulent dermatitis)	<i>Acinetobacter</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Pasteurella multocida</i>	B	B	93	CPD, CTU, CFP, GEN, CIP, MOX, ENR, TET, NIT, SXT	<i>aacc2</i> , <i>aph(3')-Ic</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>suI2</i> , <i>bla</i> _{OXA-50p} , <i>bla</i> _{ADC-18-IIIer} , <i>bla</i> _{OXA-58} , <i>tet(39)</i>

^aAll isolates were resistant to ampicillin (AMP), amoxicillin-clavulanate (AMC), chloramphenicol (CHL), fosfomicin (FOS), cephalosin (LEX), and piperacillin (PIP) in accordance with the definitions of intrinsic resistance for members of the *Acinetobacter baumannii* complex set by EUCAST and CLSI. All isolates were susceptible to amikacin (AMK), imipenem (IPM), meropenem (MER), polymyxin B (PMB), tigecycline (TGC), tobramycin (TOB), and piperacillin/tazobactam (TZP). CPD, cefpodoxime; CTZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CFP, cefpirime; CTU, ceftiofur; ENR, enrofloxacin; GEN, gentamicin; MAR, marbofloxacin; TET, tetracycline; SXT, sulfamethoxazole-trimethoprim; CIP, ciprofloxacin; MOX, moxifloxacin; FOS, fosfomicin; CHL, chloramphenicol; TZP, piperacillin-tazobactam.

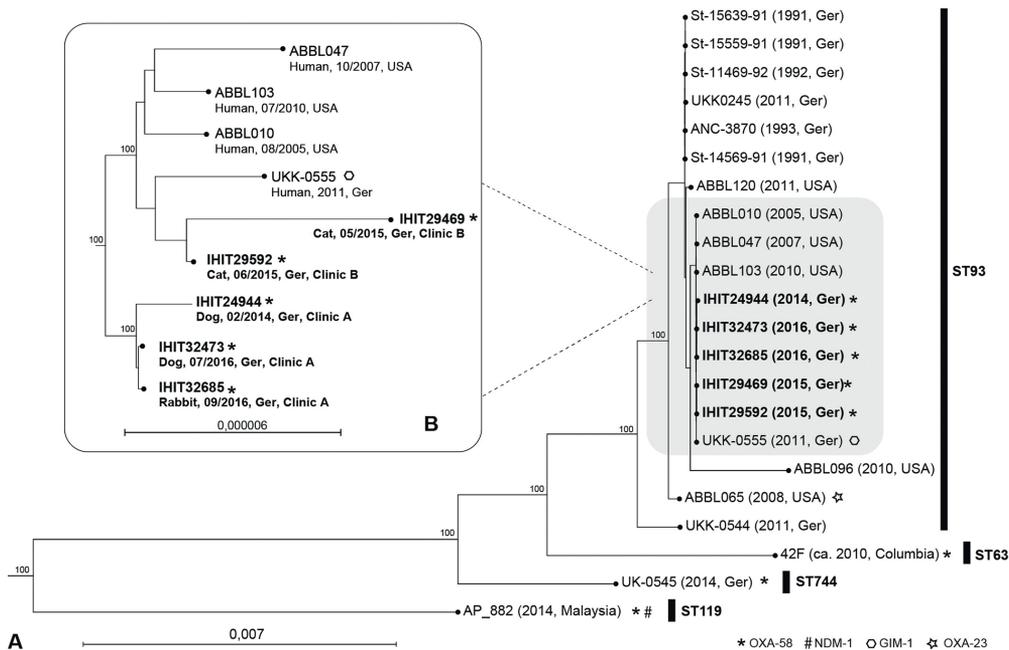


FIG 1 (A) Maximum-likelihood tree (based on 2,770 orthologous genes) of 17 publicly available genomes of ST93 and/or OXA-58-positive *A. pittii* isolates from humans (lightface) and five animal isolates (bold) from this study. (B) Excerpt of the tree in panel A providing higher resolution of closely related animal and human strains. The host, isolation date, and country are shown with the strain number. Scales indicate the numbers of nucleotide substitutions per site. Bootstrap values are based on 1,000 iterations. Ger, Germany.

showed resistance to ampicillin, amoxicillin-clavulanate, piperacillin, cephalixin, ceftiofur, gentamicin, enrofloxacin, marbofloxacin, tetracycline, nitrofurantoin, and sulfamethoxazole-trimethoprim but were susceptible to imipenem (VITEK2, bioMérieux, AST-card GN38), as interpreted according to breakpoints defined for human *Acinetobacter* spp. by either EUCAST or CLSI (20, 21). The hydrolytic activity of oxacillinases is normally low, and OXA-58 only confers a resistance phenotype when its expression is enhanced via insertion elements (22). Nevertheless, in *A. pittii*, OXA-58 does not always confer resistance, even when associated with insertion elements (9). We reassessed the MIC of imipenem after serial passages in broth containing increasing concentrations of meropenem (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). The imipenem MICs for the OXA-58 isolates increased >8-fold (from ≥ 1 to 8 mg/liter), while this was not the case for an *A. pittii* isolate without an acquired oxacillinase gene, which served as a control.

Only one kind of genetic context of *bla*_{OXA-58} containing *ISAb₃*, *araC*, and *lysE*, was present among the *A. pittii* isolates (Fig. 2). The direct surroundings of *bla*_{OXA-58} in strain IHIT24944 resemble those of carbapenem-susceptible *A. pittii* AG304 (23) but differ from those of carbapenem-resistant *A. baumannii* strain WH8144 (Fig. 2). In strain IHIT24944, *bla*_{OXA-58} was localized on a 53-kb contig that could be circularized by PCR (see Table S1 in the supplemental material) and sequencing. Plasmid pAP24944 (GenBank accession no. KY888886.1) was 53,802 bp in size, was non-self-transmissible, and additionally harbored genes for streptomycin (*strA* and *strB*), aminoglycoside (*aacC2*), sulfonamide (*sul2*), and tetracycline [*tetA*(39)/*tetR*(39)] resistance. We could determine OXA-58 plasmids similar in size and structure in all of the strains, and they

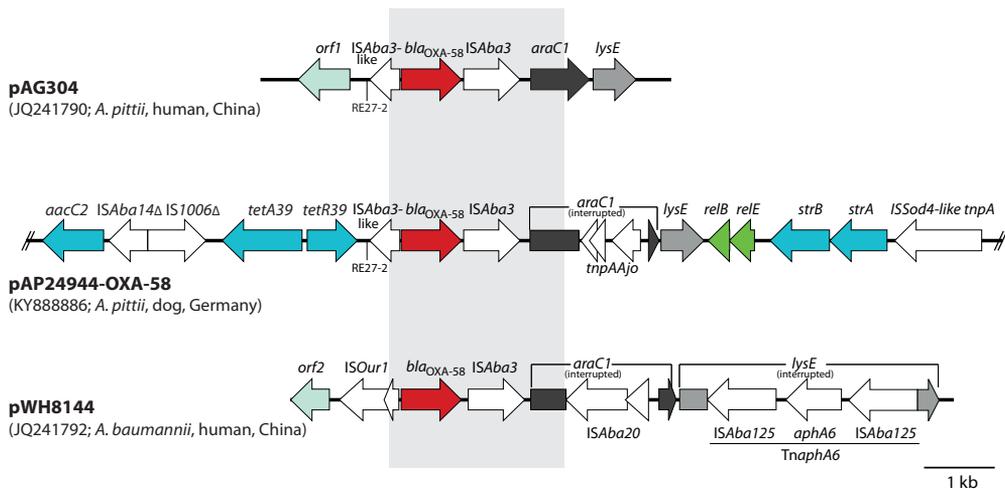


FIG 2 Comparison of the genetic region surrounding *bla*_{OXA-58} in pAP24944-OXA-58 (GenBank accession no. KY888886.1; only a partial sequence is shown) with the corresponding regions of pAG304 (JQ241790) of *A. pittii* strain AG304 and pWH8144 (JQ241792) of *A. baumannii* strain WH8144. Arrows indicate the extent and direction of genes and open reading frames. The genes (and encoded proteins) shown are *araC1* (transcription-regulating protein), *lysE* (threonine excretion pump protein), *aacC2* (aminoglycoside-3-*N*-acetyltransferase), *tetA(39)/tetR(39)* (tetracycline efflux pump), *relB/relE* (putative toxin-antitoxin system), and *strA/strB* (aminoglycoside 3'-phosphotransferases). *orf1*, DNA-binding response regulator gene; *orf2*, putative exodeoxyribonuclease VII subunit. The region with significant DNA sequence identity is shown as a gray box. RE27-2 regions (ATTTAACATAATGGCTGTATACGAAA) are indicated by vertical lines. The images are drawn to scale from the GenBank entries indicated in parentheses.

only partially overlapped published *Acinetobacter* sp. plasmid sequences, as identified by a BLAST search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Fig. S1).

This study provides the first evidence of the presence of OXA-58 plasmids in carbapenem-susceptible *A. pittii* isolates from pets. Colocalization of various resistance genes on these plasmids might enable their spread despite the rare use of carbapenems in these animals.

Accession number(s). The whole genome sequences of *A. pittii* strains have been assigned accession numbers NWWC01000000 (IHIT24944), NWWB01000000 (IHIT29469), NWWA01000000 (IHIT29592), NWWZ01000000 (IHIT32473), and NWWY01000000 (IHIT32685). The complete sequence of pAP24944-OXA-58 is available from the GenBank database under accession number KY888886.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.01993-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the team of curators of the Institut Pasteur *Acinetobacter* MLST system for curating the data and making them publicly available at <http://pubmlst.org/abaumannii/>.

Peter Klotz received grants from the Engemann Foundation and the Schaumann Foundation. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

1. Peleg AY, de Bree J, Adams MD, Cerqueira GM, Mocali S, Galardini M, Nibbering PH, Earl AM, Ward DV, Paterson DL, Seifert H, Dijkshoorn L. 2012.

The success of *Acinetobacter* species; genetic, metabolic and virulence attributes. *PLoS One* 7:e46984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046984>.

2. Dijkshoorn L, Nemeč A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
3. Zander E, Bonnin RA, Seifert H, Higgins PG. 2014. Characterization of *bla*_{OXA-143} variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:2704–2708. <https://doi.org/10.1128/AAC.02618-13>.
4. Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, Wang Y, Liu H, Zheng D, Xia Y, Yu R, Han X, Jiang G, Zhou Y, Zhou W, Hu X, Liang L, Han L. 2012. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin Microbiol Infect* 18: E506–E513. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12035>.
5. Pailhoriès H, Hadjadj L, Mahieu R, Crochette N, Rolain JM, Kempf M. 2017. Fortuitous diagnosis of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* carriage in a patient from France with no recent history of travel. *J Antimicrob Chemother* 72:942–944. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw505>.
6. Al Atrouni A, Joly-Guillou ML, Hamze M, Kempf M. 2016. Emergence of NDM-1 and OXA-72 producing *Acinetobacter pittii* clinical isolates in Lebanon. *New Microbes New Infect* 12:43–44. <https://doi.org/10.1016/j.nmi.2016.04.005>.
7. Hammerum AM, Hansen F, Littauer P. 2015. Use of whole-genome sequencing for characterisation of a ST119 NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* from a patient in Denmark with no history of recent travel. *Int J Antimicrob Agents* 46:351–352. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.05.005>.
8. Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, Nordmann P. 2015. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 45:444–445. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.12.011>.
9. Zander E, Fernandez-Gonzalez A, Schleicher X, Dammhayn C, Kamolvit W, Seifert H, Higgins PG. 2014. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 43: 375–377. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.01.012>.
10. Kaase M, Szabados F, Pfennigwerth N, Anders A, Geis G, Pranađa AB, Rossler S, Lang U, Gatermann SG. 2014. Description of the metallo- β -lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. *J Antimicrob Chemother* 69: 81–84. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt325>.
11. Zhou S, Chen X, Meng X, Zhang G, Wang J, Zhou D, Guo X. 2015. "Roar" of *bla*_{NDM-1} and "silence" of *bla*_{OXA-58} co-exist in *Acinetobacter pittii*. *Sci Rep* 5:8976. <https://doi.org/10.1038/srep08976>.
12. Schleicher X, Higgins PG, Wisplinghoff H, Korber-Irrgang B, Kresken M, Seifert H. 2013. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005–2009). *Clin Microbiol Infect* 19:737–742. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12026>.
13. Rafei R, Hamze M, Pailhoriès H, Eveillard M, Marsollier L, Joly-Guillou ML, Dabboussi F, Kempf M. 2015. Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl Environ Microbiol* 81:2359–2367. <https://doi.org/10.1128/AEM.03824-14>.
14. Gröbner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J Med Microbiol* 58:912–922. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.005850-0>.
15. Ewers C, Klotz P, Leidner U, Stamm I, Prenger-Berninghoff E, Gottig S, Semmler T, Scheufen S. 2017. OXA-23 and ISAb1-OXA-66 class D β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *Int J Antimicrob Agents* 49:37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.033>.
16. von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, Rasko DA, Joffe E, Corander J, Pickard D, Wiklund G, Svennerholm AM, Sjöling A, Dougan G. 2014. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nat Genet* 46: 1321–1326. <https://doi.org/10.1038/ng.3145>.
17. Klotz P, Gottig S, Leidner U, Semmler T, Scheufen S, Ewers C. 2017. Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates. *PLoS One* 12:e0171986. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171986>.
18. Ewers C, Stamm I, Pfeifer Y, Wieler LH, Kopp PA, Schonning K, Prenger-Berninghoff E, Scheufen S, Stolle I, Gunther S, Bethé A. 2014. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses. *J Antimicrob Chemother* 69:2676–2680. <https://doi.org/10.1093/jac/dku217>.
19. Ewers C, Bethé A, Wieler LH, Guenther S, Stamm I, Kopp PA, Grobbel M. 2011. Companion animals: a relevant source of extended-spectrum beta-lactamase-producing fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*. *Int J Antimicrob Agents* 37:86–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.09.007>.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2016. Performance standards of antimicrobial susceptibility testing, 26th ed. CLSI supplement M100S. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2016. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 6.0, 2016. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Basel, Switzerland. <http://eucast.org>.
22. Evans BA, Amey SG. 2014. OXA beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>.
23. Fu Y, Jiang J, Zhou H, Jiang Y, Fu Y, Yu Y, Zhou J. 2014. Characterization of a novel plasmid type and various genetic contexts of *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter* spp. from multiple cities in China. *PLoS One* 9:e84680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084680>.

TABLE S1: Oligonucleotide primers used for circularization of OXA-58 plasmid sequences in *Acinetobacter pittii* strains and their position in plasmid pAP-1HIT24944-OXA-58 (GenBank accession no. KY888886)

PCR	Target region	Primer name	Primer sequence (5' - 3')	Position in pAP24944-OXA-58	Amplicon size
1	<i>tetA</i>	TetA-FP	AGCACCATAGTGAACACCGC	4407-4426	1,957 bp
	<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA58-REV	TCAACTTCCGTGCCTATTTG	6344-6363	
2	IS26	IS-26-FP	ACTGTTGCAAATAGTCGGTGG	104-124	1,477 bp
	resolvase gene	Resolvase-RP-1	CACAGTTTGAACGTGAGATCA	52568-52588	
3	<i>bla</i> _{OXA-58-like}	OXA58-FWD	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	5908-5927	2,110 bp
	<i>araC</i>	AraC-RP	CGTAGGGTTGATTCGATAGCA	7997-8017	
4	<i>araC</i>	AraC-FP	ACAAACACTCTCAACATTGGTG	8237-8258	2,838 bp
	<i>strB</i>	StrB-RP	CGATCAAGCAGGTGCGACA	11056-11074	
5	cytoplasmic protein gene	CytProt-I-FP	AGCGCTATAAGGTCACCATTG	49400-49420	2,860 bp
	resolvase gene	Resolvase-RP-2	CTCACTCGCACATAGCCTACT	52239-52259	
6	methylase gene	Methyl-FP	TGTCTTATGCACCTTGGTTGC	44158-44177	2,695 bp
	cytoplasmic protein gene	CytProt-I-RP	GACCCTTCTGTAGCTGATCCA	46832-46852	
7	cytoplasmic protein gene	CytProt-II-FP	ACAGAGCATTGAGATTAGTGC	37546-37566	3,834 bp
	methylase gene	Methyl-RP	GTGCTTGCGGTGCGTATTT	41361-41379	
8	cell filament protein gene	Cell-fil-FP	AAGCAGTGATCGCAGGATGG	34741-34760	2,288 bp
	cytoplasmic protein gene	CytProt-II-RP	CTGATTCAGACGCTCATGTAT	37008-37028	
9	<i>sul2</i>	Sul2-FP-1	TGTCCGAGGTTATGTTGACG	16128-16147	2,078 bp
	hypothetical protein gene	HypProt-RP	GACACTTGTAGAGGGAAGTGA	18185-18205	
10	<i>sul2</i>	Sul2-FP -2	CGTCAACATAACCTCGGACA	16128-16147	3,514 bp
	<i>strA</i>	StrA-RP	GCAACCAGTCAGAATGCGAT	12634-12653	
11	<i>aac2</i>	Aac2-RV	CTAACCGGAAGGCTCGCAAG	829-848	2,637 bp
	<i>tetA39</i>	TetA39-RP	GACTCAGGCATCAGCTCCT	3447-3465	

Primers were designed in this study, except for OXA58-REV and OXA58-FWD (1) and Aac2-RV (2). All *bla*_{OXA-58}-positive *A. pittii* strains from this study gave positive results in PCRs 1-11; all PCR amplicons revealed the expected sizes.

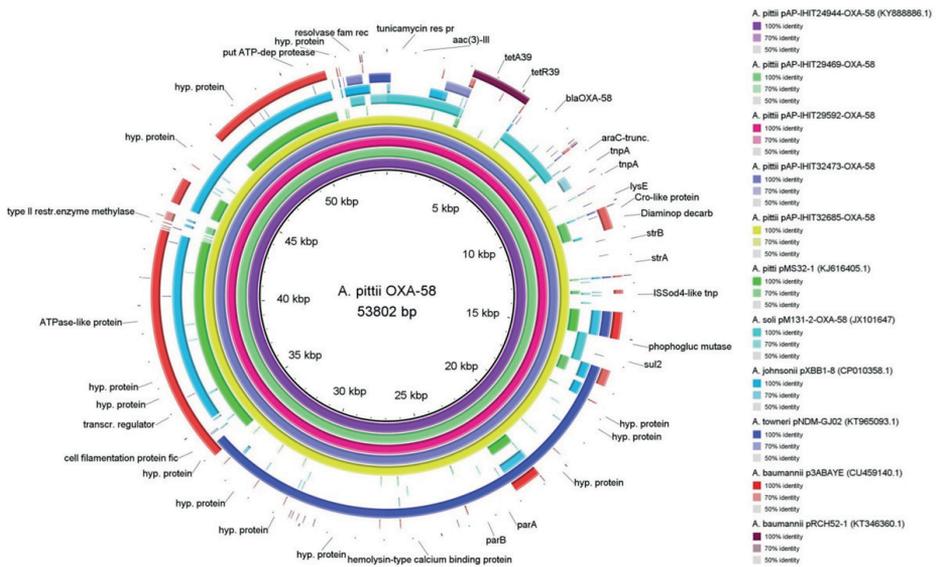


Fig S1: Comparison of OXA-58 plasmids from *A. pittii* animal isolates (*) with plasmids of other *Acinetobacter* spp. that revealed partial similarity based on BLAST search using BRIG (3). GenBank accession numbers are given in brackets.

References

- Grobner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y. 2009. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of medical microbiology* **58**:912–922.
- Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:4114-23.
- Alikhan NF, Petty NK, Ben Zakour NL, Beatson SA. 2011. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genomics* **12**:402.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978 3 8359 7151 6

