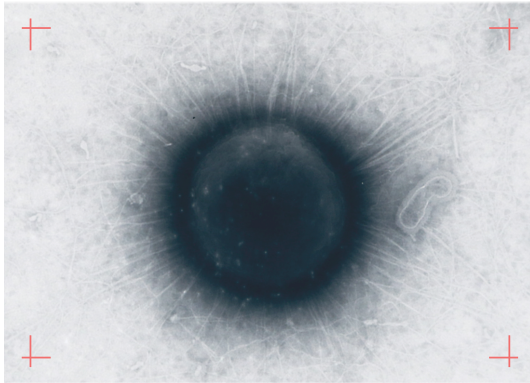


PETER KLOTZ

Verbreitung von Acinetobacter-Spezies bei
Rindern in Hessen unter Berücksichtigung
der antimikrobiellen Resistenz



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



édition scientifique
VVB LAUFFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

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

1. Auflage 2020

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 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuerin: Prof. Dr. habil. Christa Ewers

Verbreitung von *Acinetobacter*-Spezies bei Rindern in Hessen
unter Berücksichtigung der antimikrobiellen Resistenz

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

eingereicht von

PETER KLOTZ
Tierarzt aus Kempten

Gießen 2019

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. habil. Christa Ewers
PD Dr. Marlene Sickinger

Prüfer: Prof. Dr. Sabine Tacke

Tag der Disputation: 04.12.2019

Gewidmet den Menschen, die durch antibiotikaresistente Erreger ihr Leben verlieren und
den Menschen, die durch den fehlenden Zugang zu Antibiotika ihr Leben verlieren

(vgl. Laxminarayan et al. 2016)

I Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Taxonomie.....	2
2.2	Differenzierung von <i>Acinetobacter</i> spp.	3
2.2.1	Phänotypische Eigenschaften.....	3
2.2.2	Molekularbiologische Differenzierungsmethoden.....	4
2.2.3	Massenspektrometrie	6
2.3	Molekulare Epidemiologie von <i>Acinetobacter baumannii</i>	7
2.3.1	Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)	8
2.3.2	Repetitive extragenic palindromic (rep) PCR.....	8
2.3.3	Multiplex-PCR zum Nachweis von klonalen Linien	9
2.3.4	Multilokus-Sequenztypisierung.....	10
2.3.5	Core genome MLST	11
2.3.6	Analyse des Maximum Common Genomes	12
2.3.7	<i>bla</i> _{OXA-51} -Gen-Sequenzierung.....	12
2.3.8	Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)	13
2.4	Resistenz von <i>Acinetobacter</i> spp. gegen antimikrobielle Wirkstoffe	13
2.4.1	Methoden zur Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung	14
2.4.2	Standardisierung der Resistenztestung und ihrer Interpretation	16
2.4.3	Intrinsische Resistenzen	17
2.4.4	Erworbene Resistenzen	19
2.4.5	Übertragung von Resistenzen	22
2.5	Verbreitung von <i>Acinetobacter</i>	24
2.5.1	<i>Acinetobacter</i> in der Umwelt	24
2.5.2	<i>Acinetobacter</i> beim Menschen	25
2.5.3	<i>Acinetobacter</i> bei Tieren	26
2.6	<i>Acinetobacter</i> als Zoonoseerreger	38
2.7	Pathogenese und Virulenz von <i>Acinetobacter</i>	39
2.7.1	Virulenzfaktoren.....	40
2.7.2	Methoden zur Untersuchung der Virulenz.....	42
3	Forschungsfragen	44
3.1	Prävalenz.....	44
3.2	Phylogenie	45
3.3	Antibiotikaresistenz	45
3.4	Virulenz.....	45

3.5	Biofilmbildung.....	45
4	Vorstellung der Publikationen	46
4.1	Publikation 1	46
4.2	Publikation 2	47
5	Zusätzliche Untersuchungen	48
5.1	Methoden	48
5.1.1	Methoden entsprechend den Publikationen	48
5.1.2	Methoden ergänzend zu den Publikationen	49
5.2	Ergebnisse in Ergänzung zu den Publikationen	51
5.2.1	Prävalenz von weiteren <i>Acinetobacter</i> spp.	51
5.2.2	Einflussfaktoren auf das Vorkommen von <i>A. indicus</i> bei Rindern.....	51
5.2.3	Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffen und genetischer Hintergrund	52
5.2.4	Phylogenie der <i>A. indicus</i> -Isolate	59
5.2.5	Virulenz der <i>A. indicus</i> -Isolate	61
5.2.6	Untersuchungen zur Biofilmbildung.....	64
6	Diskussion.....	69
6.1	<i>Acinetobacter indicus</i>	69
6.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	73
6.3	Vergleichende Untersuchungen zu Virulenz und Biofilmbildung	76
6.4	Limitationen.....	79
6.5	Ausblick.....	81
7	Zusammenfassung	83
8	Summary	84
9	Literaturverzeichnis.....	87
10	Danksagung	106
11	Selbstständigkeitserklärung.....	107
12	Eigenanteil in den Publikationen	107
13	Anhang	107
13.1	Übersicht verwendeter Stämme	107
13.2	Volltexte Publikation 1 und Publikation 2	113

II Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A.	<i>Acinetobacter</i>
Acb-Komplex	<i>Acinetobacter calcoacetocus-baumannii</i> Komplex
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis
BAG	Biofilm-assoziierte Gene
CC	Klonaler Komplex
cgMLST	core genome MLST
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DLV	Double Locus Variant
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECDC	European Center for Disease Control and Prevention
EFSA	European Food Safety Authority
EU-Klon	Europäischer Klon
EUCAST	European Commission on Antimicrobial Susceptibility Testing
GC	Globaler Klon
IC	Internationaler Klon
IS	Insertionssequenz
LDH	Laktatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry
MBL	Metallo-Beta-Laktamase
MCG	Maximum Common Genome
MH-Agar	Mueller-Hinton Agar
mind.	mindestens
MLST	Multilokus-Sequenztypisierung
MRGN	Multiresistente Gram-negative Stäbchen
MRS	Methicillin-resistente Staphylokokken
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
rep-PCR	repetitive palindromic PCR
rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
SLV	Single Locus Variant
u.a.	unter anderem
VAG	Virulenz-assoziierte Gene
WHO	World Health Organization
WW	Weltweiter Klon

III Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei den <i>A. indicus</i> -Isolaten IHIT31215, IHIT31220 und IHIT31669	53
Abbildung 2: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei dem <i>A. indicus</i> -Isolat IHIT31216.....	54
Abbildung 3: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei dem <i>A. indicus</i> -Isolat IHIT31227.....	54
Abbildung 4: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei dem <i>A. indicus</i> -Isolat IHIT33295.....	54
Abbildung 5: Genetische Umgebung des OXA-Gens bei dem <i>A. indicus</i> -Isolat IHIT31230	55
Abbildung 6: Genetische Umgebung des OXA-58-Gens bei dem <i>A. indicus</i> -Isolat IHIT31231	55
Abbildung 7: Genetische Umgebung des OXA-58-Gens bei dem <i>A. indicus</i> -Isolat IHIT31229	56
Abbildung 8: Phylogenetischer Baum erstellt mit der „maximum-likelihood“ Methode	60
Abbildung 9: Errechnete Schätzkurve zum Überleben der Wachsmottenlarven nach angenommenen Injektion von 10^6 KbE.	62
Abbildung 10: Übersicht über die Virulenz-assoziierten Gene der untersuchten Stämme	63
Abbildung 11: Spezifische Biofilmbildung von 17 <i>A. baumannii</i> - und 25 <i>A. indicus</i> -Isolaten in M-63-Medium, Speziesvergleich	65
Abbildung 12: Spezifische Biofilmbildung von <i>A. baumannii</i> -Isolaten (16 vom Rind und 1 vom Menschen) in M-63-Medium, Wirtsvergleich	65
Abbildung 13: Spezifische Biofilmbildung von <i>A. baumannii</i> -Isolaten (10 Feldstämme und 6 klinische Stämme) in M-63-Medium, Kategorienvergleich	66
Abbildung 14: Spezifische Biofilmbildung von <i>A. indicus</i> -Isolaten (21 vom Rind und 2 vom Menschen) in M-63-Medium Wirtsvergleich	66
Abbildung 15: Spezifische Biofilmbildung von <i>A. indicus</i> -Isolaten (14 Feldstämme, 7 klinische Stämme und 2 umweltassoziierte Stämme) in M-63-Medium, Kategorienvergleich	67
Abbildung 16: Spezifische Biofilmbildung von 17 <i>A. baumannii</i> - und 25 <i>A. indicus</i> -Isolaten in LB-Medium, Speziesvergleich	67
Abbildung 17: Spezifische Biofilmbildung von <i>A. indicus</i> -Isolaten (21 vom Rind und 2 vom Menschen) in LB Medium, Wirtsvergleich	68

Abbildung 18: Spezifische Biofilmbildung von <i>A. indicus</i> -Isolaten (14 Feldstämme, 7 klinische Stämme und 2 umweltassoziierte Stämme) in LB Medium,	
Kategorienvergleich	68

IV Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Intrinsische Resistenzen des <i>Acb</i> -Komplexes.....	18
Tabelle 2: Übersicht über Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> spp. von Kleintieren	30
Tabelle 3: Übersicht über Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> spp. von Pferden	32
Tabelle 4: Übersicht über Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> spp. von Rindern.	34
Tabelle 5: Übersicht über Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> spp. von Schweinen.....	35
Tabelle 6: Übersicht über Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> spp. von Geflügel	36
Tabelle 7: Übersicht über Carbapenemase-produzierende <i>Acinetobacter</i> spp. von weiteren Tierarten.....	38
Tabelle 8: Wichtige Virulenzfaktoren von <i>A. baumannii</i> , die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt wurden	41
Tabelle 9: Resistenzdeterminanten und MHK-Werte ausgewählter Beta-laktam- Antibiotika von <i>A. indicus</i> interpretiert nach CLSI (CLSI 2014).....	57
Tabelle 10: Ergebnisse des Biofilm-Assays.....	64
Tabelle 11: Auflistung der Stämme, die im <i>Galleria mellonella</i> -Modell verwendet wurden	108
Tabelle 12: Auflistung der Stämme, die im Biofilm-Assay verwendet wurden	111

V Publikationsverzeichnis

Die Ergebnisse der vorgelegten Dissertation haben Eingang in folgende Publikationen gefunden:

ORIGINALARTIKEL

- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Scheufen, S., Ewers, C. (2017)**
Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates; PLoS ONE 12(2): e0171986.
- **Klotz, P., Higgins, P. G., Schaubmar, A. R., Failing, K., Leidner, U., Seifert, H., Scheufen, S., Semmler, T., Ewers, C. (2019)**
Seasonal occurrence and carbapenem-susceptibility of bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany; Frontiers in Microbiology 10:272

VORTRÄGE

- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Scheufen, S., Ewers, C. (2016)**
Cattle as a source of *Acinetobacter baumannii* and Carbapenemase-positive *Acinetobacter indicus*; National Symposium on Zoonoses research Berlin, 13.-14.10.2016

POSTERPRÄSENTATIONEN

- **Klotz, P., Göttig, S., Prenger-Berninghoff E., Semmler, S., Scheufen, S., Ewers, C. (2015)**
Carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. in Hessian Cattle, Junior Scientist Zoonoses Meeting Oberschleißheim 08. – 10.06.2015
- **Klotz, P., Göttig, S., Prenger-Berninghoff E., Semmler, T., Scheufen, S., Ewers, C. (2015)**
Carbapenem-resistance in an *Acinetobacter indicus*-like strain from the nose of a calf, Antibiotic Resistance in Animals and the Environment (ARAE) Tours 29.06.–01.07.2015
- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Scheufen, S., Ewers, C. (2016)**
Acinetobacter sp. carrying Carbapenemase Genes isolated from cattle in Germany, Junior Scientist Zoonoses Meeting Göttingen, 01. – 03.06.2016
- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Scheufen, S., Ewers, C. (2016)**
Acinetobacter sp. carrying carbapenemase genes isolated from cattle in Germany, Tagung der DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft) Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie Jena, 31.08.-02.09.2016
- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Prenger-Berninghoff, E., Scheufen, S., Ewers, C. (2016)**
Acinetobacter baumannii of international clone II and *Acinetobacter indicus* carrying OXA-23 and OXA-58 carbapenemases in cattle, 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. Ulm, 11. - 14.09.2016

- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Scheufen, S., Ewers, C. (2017)**
Prevalence, pathogenicity and resistance of *Acinetobacter baumannii* in Hessian cattle, Junior Scientist Zoonoses Meeting Langen, 07. – 09.06.2017
- **Klotz, P., Göttig, S., Leidner, U., Semmler, T., Ewers, C. (2017)**
OXA-23 and OXA-58 carbapenemase-genes in *Acinetobacter indicus* isolates from cattle in Germany, Antibiotic Resistance in Animals and the Environment (ARAE) Braunschweig, 26. – 28.06.2017
- **Klotz, P., Semmler, T., Leidner, U., Ewers, C. (2017)**
High prevalence of *Acinetobacter baumannii* and of *Acinetobacter indicus* carrying OXA-23/-58-like genes in cattle from Hesse, Germany, International Symposium on the biology of Acinetobacter Sevilla, 20. – 22.09.2017
- **Klotz, P., Schaubmar, A. R., Failing, K., Higgins, P., Leidner, U., Scheufen, S., Ewers, C. (2018)**
Acinetobacter baumannii is a frequent *Acinetobacter* spp. in Hessian cattle: Analysis of putative determining factors, Tagung der DVG Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie Hannover, 30.05. – 01.06.2018

1 Einleitung

Acinetobacter sind Gram-negative Bakterien, von denen die meisten Arten in der Mikrobiota von Tieren, Pflanzen und der Umwelt weit verbreitet sind (Doughari et al. 2011). Einige *Acinetobacter* spp. sind zudem opportunistische Infektionserreger, die Infektionen bei Mensch und Tier verursachen können (Al Atrouni et al. 2016b). So gilt insbesondere die Spezies *Acinetobacter baumannii* als einer der wichtigsten Erreger von Krankenhausinfektionen weltweit (Rice 2008). Nach gegenwärtiger Lehrmeinung kommt *A. baumannii*, im Gegensatz zu vielen anderen *Acinetobacter*-Arten, nicht ubiquitär vor, sondern wird vorwiegend von Oberflächen in Kliniken und bei Ausbruchsgeschehen in Krankenhäusern isoliert (Towner 2009). Neben dem Vorkommen in Krankenhäusern wurde der Erreger außerdem mehrfach in Tierkliniken im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen nachgewiesen (Francey 2000; Zordan et al. 2011; Ewers et al. 2017). *A. baumannii* wurde aber auch aus der Umwelt und von Wild- und Nutztieren isoliert (Webb et al. 2016; Wilharm et al. 2017; Furlan et al. 2018).

Grund für die weltweite Verbreitung von *A. baumannii* als Erreger nosokomialer Infektionen ist seine Resistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotika, u.a. auch gegenüber den als Reserve-Antibiotika eingestuften Carbapenemen. Die WHO stuft Vertreter dieser Spezies daher in seiner „Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics“ in die höchste Prioritätsstufe für die Entwicklung neuer Antibiotika ein (Tacconelli et al. 2018).

Auch in Deutschland führen Infektionen mit Carbapenem-resistenten *A. baumannii* in Krankenhäusern zu schweren Krankheitsverläufen bis hin zu Todesfällen, insbesondere bei intensivmedizinisch betreuten Patienten (Borgmann et al. 2004; Gottig et al. 2014; Frankfurter Allgemeine Zeitung 2015; Molter et al. 2016). Hierbei handelt es sich immer häufiger auch um sogenannte nosokomiale Ausbrüche, die über das gehäufte Auftreten von Erkrankungen ausgehend von einem identischen Mikroorganismus in einem Krankenhaus definiert sind (Curran 2013).

Die ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) hat aufgrund der steigenden Bedeutung von *A. baumannii* im Jahr 2016 in einem „Rapid Risk Assessment“ die besondere Gefahr durch Carbapenem-resistente Isolate unterstrichen und eine bessere Überwachung des Erregers gefordert (Hutchings 2016).

Acinetobacter spp. kommen auch in der Tiermedizin als nosokomiale Erreger bei Hund und Katze vor (Hamouda et al. 2011; Guerra et al. 2014). Dabei erstreckt sich der Nachweis von Carbapenem-resistenten Isolatn nicht nur auf klinisch kranke Tiere (Zhang et al. 2013; Pomba et al. 2014), sondern sporadisch auch auf asymptomatische Träger bei Lebensmittel-liefernden Tieren (Poirel et al. 2012; Klotz et al. 2017a). Obwohl die Bedeutung dieses Infektionserregers für Tier und Mensch zunimmt, ist über seine Verbreitung in Tieren und sein natürliches Reservoir wenig bekannt. Das liegt unter anderem daran, dass *Acinetobacter* spp. im Gegensatz zu bestimmten Enterobacteriaceae (z.B.: *Escherichia* (*E.*) *coli*, *Klebsiella* (*K.*) spp.) nicht in systematischen, nationalen oder EU-weiten Monitoring-Programmen berücksichtigt werden. Die veterinärmedizinische Fachliteratur beschäftigt sich im Hinblick auf *Acinetobacter* überwiegend mit Nachweisen von *A. baumannii* bei erkrankten Kleintieren. Nur wenige Studien zielen hingegen auf den Nachweis dieses Bakteriums bei Rindern ab (siehe **Kapitel 2.5.3**). Ziel der Arbeit war es, einen Einblick in das Vorkommen von *Acinetobacter* spp., insbesondere *A. baumannii*, bei Rindern zu schaffen. Diese Rinder spielen als landwirtschaftliche Nutztiere eine wichtige Rolle bezüglich der öffentlichen Gesundheit (Public Health), beispielsweise als Reservoir für Shigatoxin bildende *E. coli* (STEC). Um die Bedeutung der nachgewiesenen *Acinetobacter* spp. einordnen zu können, sollten diese weitergehend bezüglich ihres phylogenetischen Hintergrundes, der Verbreitung von Resistenzgenen, ihrer Virulenz und Virulenz-assoziierten Genen (VAGs) sowie ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung und des Vorkommens Biofilm-assoziiierter Gene (BAGs) analysiert werden. Die erhobenen Daten sollen als Grundlage dazu dienen, das von bovinen *Acinetobacter* spp. ausgehende Risiko für die öffentliche Gesundheit besser einschätzen zu können.

2 Literaturübersicht

2.1 Taxonomie

Die Gattung *Acinetobacter* (*A.*) gehört zur Familie der Moraxellaceae innerhalb der Ordnung der Pseudomonadales und unterlag im Laufe des vergangenen Jahrhunderts mehrfach Änderungen ihrer taxonomischen Einordnung. Im Jahr 1911 wurde zum ersten Mal ein Bakterium beschrieben, das später dieser Gruppe zugeordnet wurde. Der als *Micrococcus calcoaceticus* beschriebene Organismus wurde von dem niederländischen Mikrobiologen

Martinus Beijerinck aus einer Bodenprobe nach deren Anreicherung mittels eines Minimalmediums mit Calciumacetat isoliert (Beijerinck 1911). Erst 60 Jahre später wurde das Bakterium zusammen mit vermeintlich anderen Arten wie *Mima polymorpha*, *Bacterium anitratum* oder *Neisseria winogradskyi* als *A. calcoaceticus* definiert (Lessel 1971). Das Isolat vom Beginn des 20. Jahrhunderts ist noch immer der Typ-Stamm (ATCC® 23055) für sowohl die Art als auch die Gattung (<http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/23055.aspx>). Durch die Etablierung neuer Typisierungsverfahren, zunächst die DNS-DNS-Hybridisierung, später die „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ (ARDRA), *rpoB*- und 16S-rDNS-Sequenzierung (siehe **Kapitel 2.2.2**) sowie schließlich die Sequenzierung des Gesamtgenoms, konnten die Vertreter der Gattung immer differenzierter beschrieben werden. So umfasst die Gattung *Acinetobacter* derzeit (Stand Mai 2019) 62 gültig benannte Arten (<http://www.bacterio.net/acinetobacter.html> (Euzéby 1997)). Darunter die größte infektionsmedizinische Bedeutung hat *A. baumannii*, v.a. als Erreger nosokomialer Infektionen. Außerdem werden unter anderen auch *A. nosocomialis* und *A. pittii* (Nemec et al. 2011), *A. dijkshoorniae* (Cosgaya et al. 2016) und *A. seifertii* (Nemec et al. 2015) in diesem Zusammenhang genannt.

2.2 Differenzierung von *Acinetobacter* spp.

2.2.1 Phänotypische Eigenschaften

Die fünf *Acinetobacter* spp., die häufig mit Krankenhaus-assoziierten Infektionen in Verbindung gebracht werden (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, *A. dijkshoorniae* und *A. seifertii*), lassen sich durch ihre phänotypischen Eigenschaften unzureichend voneinander abgrenzen. Sie werden daher gemeinsam mit *A. calcoaceticus* zum *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*-Komplex (*Acb*-Komplex) zusammengefasst (Gerner-Smidt et al. 1991). Im Folgenden wird nach der Beschreibung von Kultivierungstemperatur, Koloniemorphologie, mikroskopischem Bild und biochemischen Eigenschaften besonders auf molekularbiologische Methoden der Differenzierung eingegangen.

Das Spektrum der Wachstumstemperaturen liegt für *Acinetobacter* spp. zwischen 20 und 44 °C. Für die meisten beschriebenen Arten liegt die ideale Temperatur bei 33-35 °C, *A. Iwoffii* und *A. johnsonii* bevorzugen jedoch 25-30°C; *A. baumannii* und *A. nosocomialis* sind auch bei 44°C noch vermehrungsfähig (Bouvet und Grimont 1986; Tjernberg und Ursing

1989). Die Kolonien auf bluthaltigen Nährmedien zeigen nach einer Inkubation über 18 h bei 37 °C bei Vertretern des *Acb*-Komplexes ein glattes, erhabenes, teils schleimiges Wachstum mit Einzelkoloniedurchmessern von 1-2 mm. Bei *A. baumannii* kommen neben einem opaken Phänotyp auch Kolonien mit durchscheinendem Erscheinungsbild vor (Tipton und Rather 2016). Weitere Arten der Gattung zeigen vorwiegend letztere Variante und kleinere Koloniedurchmesser von < 1 mm. Einige Arten, wie *A. haemolyticus*, *A. junii* oder *A. beijerinckii* zeigen außerdem eine vollständige Hämolyse (Bouvet und Grimont 1987; Nemec et al. 2009). Im mikroskopischen Bild sind die Bakterien 1-1,5 µm x 1,5-2,5 µm große kokkoide Stäbchen. Sie lassen sich in der Gramfärbung meist als Gram-negativ, häufig jedoch auch als Gram-labil darstellen (Peleg et al. 2008). Acinetobacter zählen zur Gruppe der Nonfermenter, sie können Glukose also ausschließlich oxidativ abbauen. Außerdem fehlt ihnen das Enzym Cytochromoxidase. Sie verfügen über eine Katalase, mit deren Hilfe sie Wasserstoffperoxid aufspalten können (Bergey et al. 2005).

2.2.2 Molekularbiologische Differenzierungsmethoden

2.2.2.1 S1-Nuclease- Hybridisierung

Verschiedene Acinetobacter-Arten konnten erstmals erfolgreich durch die sogenannte DNS-Hybridisierung differenziert werden. Bouvet und Grimont stellten mit Hilfe der S1-Nuclease-Methode 12 verschiedene Hybridisierungsgruppen dar, die 12 verschiedenen Genomospezies zugeordnet wurden. Unter ihnen waren unter anderem *A. calcoaceticus* (Genomospezies 1) und *A. baumannii* (Genomospezies 2) vertreten (Bouvet und Grimont 1986). Diese Methode wurde durch die im Folgenden beschriebenen Methoden abgelöst und ist heute nicht mehr gebräuchlich.

2.2.2.2 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

Das 16S rRNS-Gen kodiert für einen Teil der 30S-Untereinheit des prokaryotischen Ribosoms und ist innerhalb einer Spezies hochkonserviert. Es eignet sich daher als Ziel-Gen für genomische Methoden zur Gattungs- und Speziesidentifizierung. Bei der „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ (ARDRA) wird das 16S rRNS-Gen nach der PCR-Amplifikation durch Restriktionsenzyme verdaut und anschließend mit Hilfe der Gelelektrophorese dargestellt. Die dadurch entstandenen Banden-Muster werden durch den

Vergleich mit Mustern von Referenzstämmen einer Spezies zugeordnet. Diese Methode hat sich jedoch nicht für alle *Acinetobacter*-Arten als zuverlässig erwiesen, da sowohl verschiedene Profile innerhalb einer Spezies, als auch gleiche Profile in verschiedenen Spezies vorkommen können (Dijkshoorn et al. 1998).

2.2.2.3 16S rRNS-Gen-Sequenzierung

Das für die 16S rRNS kodierende Gen wird in einer weiteren Methode mit einer PCR partiell amplifiziert und sequenziert. Anschließend wird die Basenabfolge mit bekannten 16S rRNS-Gen-Sequenzen verschiedener *Acinetobacter* spp. abgeglichen. Hierfür wird das „Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)“ der U.S. National Library of Medicine (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) genutzt. Jedoch hat sich die Methode für *Acinetobacter* als nicht zuverlässig erwiesen. So berichten Wang et al (2014), dass sich *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis* und *A. calcoaceticus* bei ihrer Untersuchung nicht mittels 16S rRNS-Gen-Sequenzierung differenzieren ließen (Wang et al. 2014). Mangelhafte Datenbankeinträge in der BLAST-Datenbank, die für einen Vergleich herangezogen werden, führen zusätzlich dazu, dass eine Differenzierung auf Art-Ebene mittels 16S rRNS-Gen-Analyse nicht verlässlich ist (Janda und Abbott 2007).

2.2.2.4 *rpoB*-Gen-Sequenzierung

Das *rpoB*-Gen kodiert für die RNS-Polymerase B Untereinheit und gehört zur Gruppe hochkonservierter prokaryotischer Gene, die als „Housekeeping“-Gene bezeichnet werden. Die Methodik gleicht der 16S rRNS-Gen-Sequenzierung, eignet sich aber besser zur Differenzierung von *Acinetobacter* spp. (La Scola et al. 2006). Daher ist sie derzeit als verlässliche Identifizierungsmethode anerkannt und wird in vielen Publikationen verwendet.

2.2.2.5 *gyrB*-PCR

Das *gyrB*-Gen kodiert für eine Gyrase und ist ein weiteres „Housekeeping“-Gen von *Acinetobacter* spp. Bei dieser Methode wird eine PCR genutzt, um mit Hilfe spezifischer Primer Sequenzunterschiede zwischen den *gyrB*-Genen verschiedener Spezies sichtbar zu machen. So können in einer Multiplex-PCR mit geringem Arbeitsaufwand *A. baumannii*, *A. nosocomialis*, *A. calcoaceticus* und *A. pittii* identifiziert und differenziert werden (Higgins et al. 2007; Higgins et al. 2010b). Diese Methode ermöglicht eine sichere Identifizierung vier

wichtiger *Acinetobacter* spp. und ist daher derzeit als Identifikationsmethode anerkannt. Zur Differenzierung weiterer Arten ist die *gyrB*-PCR nicht geeignet. Hier müssen andere Verfahren, wie die *rpoB*-Gen-Sequenzierung verwendet werden.

2.2.3 Massenspektrometrie

Matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry

Die „Matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry“ (MALDI-TOF MS) ist ein Verfahren zur Identifizierung von Bakterien, Archaeen und Pilzen. Es basiert auf der speziesspezifischen Zusammensetzung der Ribosomen aus Proteinen unterschiedlicher Masse. Dieses Prinzip wurde 1975 erstmals für die Identifizierung von Bakterien genutzt (Anhalt und Fenselau 1975). In den ersten Jahren des 21. Jahrhunderts wurde das Verfahren schließlich weiterentwickelt und kommerzialisiert, was zur breiten Anwendung der Technologie in mikrobiologisch-diagnostischen Laboren, unter anderem für die Identifizierung von *Acinetobacter* spp. führte (Fenselau und Demirev 2001). Die Bakterien werden bei dieser Methode entweder direkt oder nach einem Extraktionsverfahren auf eine Trägerplatte aus Edelstahl aufgebracht und mit der sogenannten Matrix überschichtet. Diese führt nach der Desorption durch einen Laserbeschuss zu einer Ionisation der Proteinmoleküle. Die Ionen werden anschließend in einem elektrischen Feld beschleunigt und ihre Flugzeit, die von ihrer Masse und Ladungszahl abhängig ist, gemessen. Dadurch können für jede Spezies individuelle Spektren erzeugt werden, die durch den Abgleich mit einer vom Hersteller zur Verfügung gestellten und regelmäßig aktualisierten Datenbank zur Identifikation eingesetzt werden. Eine Software erstellt auf Grundlage statistischer Ähnlichkeiten einen Wert zwischen 0 und 3. Je höher dieser Score, desto verlässlicher die Diagnose. Der Grenzwert für eine verlässliche Speziesidentifikation liegt bei 2,00 (Patel 2015). Durch die kontinuierliche Erweiterung der Datenbanken ist die MALDI-TOF MS eine zunehmend zuverlässige Methode zur Identifizierung verschiedener *Acinetobacter* spp. (Espinal et al. 2012; Li et al. 2018). Trotzdem sollte insbesondere die Identifizierung der Mitglieder des *Acb*-Komplexes durch eine weitere Methode (z.B. *gyrB*-PCR) verifiziert werden.

2.3 Molekulare Epidemiologie von *Acinetobacter baumannii*

Forschungsarbeiten zur Epidemiologie von *Acinetobacter* spp. sind hauptsächlich auf den im Zusammenhang mit Infektionen häufigsten und wichtigsten Vertreter der Gattung, *A. baumannii*, beschränkt. Um Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Stämme des weltweit vorkommenden Erregers beschreiben zu können, wurden verschiedene Methoden zur Gruppierung etabliert. Im Folgenden wird zunächst die Einteilung von *A. baumannii* in verschiedene phylogenetische Gruppen erläutert und anschließend auf die verwendeten Methoden eingegangen.

Phylogenetische Gruppen

A. baumannii ist weltweit Verursacher von Krankenhaus-assoziierten Infektionen. Um die globale Epidemiologie dieses Bakteriums zu verstehen und um die Pathogenese für die verschiedenen klonalen Linien vergleichend erforschen zu können, spielt eine einheitliche und eindeutige Zuordnung zu phylogenetischen Gruppen eine entscheidende Rolle. So ist inzwischen bekannt, dass bestimmte klonale Linien in besonderem Maß an schwerwiegenden Infektionen beteiligt sind und Multiresistenzen, u.a. gegen Carbapeneme, aufweisen.

Nach gegenwärtigem Kenntnisstand gehören die meisten klinischen *Acinetobacter*-Isolate zu sogenannten klonalen Gruppen, die keine Klone im engeren Sinn darstellen, sondern phylogenetisch auf gemeinsame Vorläufer zurückgehen und sich untereinander stark ähneln. Die gegenwärtig als internationale Klone bezeichneten Gruppen wurden erstmals von Dijkshoorn et al. als europäische Klone I und II (EUI und EUII) beschrieben (Dijkshoorn et al. 1996). Später wurde dieses Schema um den europäischen Klon III erweitert (van Dessel et al. 2004). Die Autoren stellten fest, dass in ihrer Stammsammlung von Europäischen *A. baumannii*-Isolaten die Gruppen I und II überrepräsentiert waren. In den Publikationen für diese Beschreibung wurde die „Amplified Fragment Length Polymorphism“-Analyse genutzt (siehe **Kapitel 2.3.1**). Higgins et al. konnten später durch die Untersuchung von 515 *A. baumannii*-Isolaten aus 32 Ländern und vier Kontinenten nachweisen, dass sich die Verbreitung der europäischen Klone nicht nur auf Europa beschränkt. Sie prägten daher den Begriff „weltweite klonale Linien“ („worldwide“ – WW). In ihrer Studie verwendeten sie ein kommerzielles „repetitive extragenic palindromic PCR“-System (siehe **Kapitel 2.3.2**) und zeigten, dass damit auch die EU-Klone I-III eindeutig identifiziert werden konnten, sowie fünf

weitere Linien (WW IV-VIII) (Higgins et al. 2010a). Im gleichen Jahr kamen Diancourt et al. zu dem Schluss, dass auch die durch Multilokus-Sequenztypisierung (siehe **Kapitel 2.3.4**) definierten Sequenztypen die EU-Klone abbildeten und prägten den Begriff der internationalen Klone („international clones“ – IC), der sich inzwischen bei den meisten Autoren durchgesetzt hat (Diancourt et al. 2010). Einige Arbeitsgruppen nutzen als Synonym für die internationalen Klone die Bezeichnung globale Klone („global clones“ – GC), die allerdings erst ein Jahr später erstmals erwähnt wurde und sich im internationalen Schrifttum nicht durchgesetzt hat (Nigro et al. 2011). Aus den bisher acht charakterisierten internationalen Klonen kommt dem IC2 eine besondere Bedeutung zu, da er einen großen Teil der klinischen Isolate bei Menschen ausmacht (Karah et al. 2012). Auch in der oben genannten Studie von Higgins et al. gehörte die Mehrheit der Isolate zu dieser Gruppe, die wiederholt mit Carbapenem-Resistenz assoziiert war (Higgins et al. 2012b; Zarrilli et al. 2013).

2.3.1 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Mit Hilfe der Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse (AFLP) wird ein genomischer Fingerabdruck eines Isolats erstellt, der mit Hilfe von spezialisierter Software (z.B. Bionumerics, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) mit den Bandenmustern weiterer Isolate verglichen werden kann. Hierfür erfolgt zunächst die Restriktion der genomischen DNS mit zwei Enzymen. In den weiteren Schritten werden einzelne Fragmente durch selektive Primer amplifiziert und anschließend durch eine Gelelektrophorese dargestellt. Anhand der Muster können Isolate bestimmten Gruppen zugeordnet werden. Ergebnisse unterschiedlicher Labore sind jedoch nicht vergleichbar (Vos et al. 1995). Aufgrund der Schwierigkeiten Ergebnisse zu reproduzieren, dem vergleichsweise aufwändigen Protokoll und der Verfügbarkeit der im Folgenden erläuterten modernen Alternativmethoden wird die AFLP heute nicht mehr für die Analyse phylogenetischer Gruppen empfohlen.

2.3.2 Repetitive extragenic palindromic (rep) PCR

Die „repetitive extragenic palindromic (rep) PCR“ ist eine PCR-basierte „fingerprinting“-Methode. Dabei werden sogenannte REP-Sequenzen, die meist auf nicht kodierenden Abschnitten des Genoms liegen, durch spezifische Primer amplifiziert, wodurch ein stammspezifisches Muster für den Vergleich von Stämmen innerhalb einer Art erstellt wird

(Versalovic et al. 1991). Mit Hilfe biomathematischer Verfahren werden die Muster schließlich gruppiert. Es eignet sich dadurch für die Zuordnung von Isolaten zu den sogenannten Internationalen Klonen. Neben diesen können sich aber auch weitere Gruppen bilden. Zu beachten ist, dass zwar die Muster einzelner Isolate sich in verschiedenen Laboren unterscheiden können, eine Gruppenbildung aber reproduzierbar ist (Higgins et al. 2012a). So ermöglicht die rep-PCR zwar eine schnelle Genotypisierung von Isolaten, sie wird zur Analyse von Ausbrüchen aber zunehmend von Ganzgenom-basierten Verfahren abgelöst. In der klinischen Diagnostik wird häufig das semi-automatisierte rep-PCR-Verfahren der DiversiLab Stammtypisierungs-Plattform (bioMérieux, Nürtingen, Germany) angewendet (Healy et al. 2005).

2.3.3 Multiplex-PCR zum Nachweis von klonalen Linien

Eine weitere sequenzbasierte Typisierungsmethode teilt *A. baumannii*-Isolate in 3 Gruppen ein (SGI-III), die den Internationalen Klonen IC1-IC3 entsprechen (SGI: IC2, SGII: IC1, SGIII: IC3). Hierfür werden in zwei PCR-Ansätzen Teile der Gene *csuE*, *bla_{OXA-51}* und *ompA* amplifiziert, die in der Gelelektrophorese für die jeweilige Gruppe spezifische Muster abbilden (Turton et al. 2007). Diese Methode wird in der Literatur auch als „3-locus sequence typing“ (3LST) bezeichnet (Giannouli et al. 2010). Da bereits anhand der Bandenmuster der PCR Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit zu den ICs gezogen werden können, eignet sich die Methode auch für ein schnelles Screening ohne die Sequenzierung der PCR-Produkte. Es hat sich allerdings gezeigt, dass sich viele Stämme mit dieser Methode nicht zuordnen lassen. Dies liegt nicht nur an der kleinen Anzahl an bereits definierten Gruppen, sondern auch an der unzureichenden Spezifität der Primer für die Targetgene in vielen Stämmen (Martins et al. 2016). Es hat sich außerdem gezeigt, dass die Verwendung des *csuE*-Gens im 3LST-Schema zu einer falschen Zuordnung führen kann, wenn dieses von einem anderen *A. baumannii* Stamm erworben wurde (Pournaras et al. 2014). Zusammenfassend eignet sich die Methode für schnelle Übersichtsuntersuchungen zur Identifizierung der IC1-IC3. Die Ergebnisse müssen aber in jedem Fall durch eine weitere Methode, etwa eine MLST-Untersuchung, überprüft werden.

2.3.4 Multilokus-Sequenztypisierung

Bei der Multilokus-Sequenztypisierung (MLST) werden Abschnitte von sieben „Housekeeping“-Genen sequenzanalysiert und je einem Alleltyp zugeordnet. Derzeit werden für *A. baumannii* weltweit zwei Schemata analog verwendet, die Vergleiche zwischen den verschiedenen Stämmen ermöglichen: das von Bartual et al. entwickelte „Oxford (Ox)“-Schema (Bartual 2005) und das von Diancourt et al. etablierte „Pasteur (Past)“-Schema (Diancourt et al. 2010). Bei der Pasteur-MLST werden die „Housekeeping“-Gene *cpn60*, *fusA*, *gltA*, *pyrG*, *recA*, *rplB* und *rpoB*, bei der Oxford-MLST die Gene *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* und *rpoD* verwendet. Über das resultierende Allel-Profil (z.B. 1-1-1-1-1-1-6 Pasteur-Schema) wird ein Sequenztyp bestimmt (z.B. ST1^{Past}). Von beiden Schemata hat die Oxford-MLST eine größere Auflösung, sodass daraus mehrere STs^{Ox} dem ST1^{Past} des Pasteur-Schemas zugeordnet werden können. Dahingegen bildet das Pasteur-Schema genauer die Einteilung in internationale Klone ab (Tomaschek et al. 2016). So lässt sich hier beispielsweise ST1^{Past} dem IC1 und ST2^{Past} dem IC2 zuordnen. Beide Schemata sind über die Homepage www.pubmlst.org/abaumannii/ öffentlich verfügbar. Über diese können auch neue Allele oder Allelkombinationen eingereicht werden. Für die Pasteur-MLST existieren momentan 1.325 Sequenztypen, für die Oxford-MLST 1.962 (Stand Juli 2019). Neben *A. baumannii* sind weitere *Acinetobacter* spp. in der Datenbank hinterlegt, unter anderem *A. pittii*, *A. dijksboorniae*, *A. seifertii* und *A. nosocomialis*.

Die jeweiligen Sequenztypen lassen sich über eine eBurst-Analyse zu den sogenannten klonalen Komplexen (CC) zusammenfassen. Dabei wird über statistische Methoden der Gründer der CCs vorausgesagt, nach dessen ST die Benennung des Komplexes erfolgt. In der Regel werden dem Gründer dann alle Profile zugeordnet, die sich in maximal einem Locus des Allelprofils (single locus variant – SLV) von anderen Profilen unterscheiden (Feil et al. 2004). Einzelne Autoren begrenzen die Anzahl der zugehörigen STs außerdem dadurch, dass sie nur STs einschließen, die sich in einem (SLV) (Al Atrouni et al. 2016a) oder in zwei Loci vom Gründer unterscheiden (double locus variant – DLV) (Tomaschek et al. 2016). Bei der Interpretation und insbesondere beim Vergleich von Studienergebnissen ist daher zu beachten, welche Definition herangezogen wurde um einen CC festzulegen. Im Einzelfall kann es sonst dazu führen, dass Isolate in einen CC ein- oder ausgeschlossen werden, möglicherweise mit Konsequenzen für weitergehende Untersuchungen oder epidemiologische Rückschlüsse.

Die MLST ermöglicht eine gut reproduzierbare Methode zur Untersuchung von phylogenetischen Zusammenhängen, für die Analyse von Ausbrüchen ist sie aber aufgrund der niedrigen Auflösung nur bedingt geeignet. Diese wird durch eine signifikante Erhöhung der Anzahl verwendeter Genloci in der folgenden Methode, der „core genome MLST“, verbessert.

2.3.5 Core genome MLST

Die „core genome MLST“ (cgMLST) ist eine Weiterentwicklung der klassischen MLST, bei der ebenso die Allele aller Gene des Kerngenoms (basiert also nicht auf „single nucleotide polymorphisms“ – SNPs) für die Definition des Sequenztyps herangezogen werden. Dies wird durch eine vorhergehende Gesamtgenomsequenzierung („whole genome sequencing“ – WGS) der betreffenden Stämme ermöglicht. Grundsätzlich kommen für die Definition der je nach Spezies unterschiedlich großen Kerngenome zwei Verfahren zum Einsatz: Beim weniger strikt definierten Kerngenom wird eine beliebige, möglichst große Anzahl an Genomen verglichen und jene Gene ausgewählt, die, meist unter Verwendung eines Grenzwertes, in möglichst vielen Genomen (z.B. Grenzwert von > 95 % der Genome) vorhanden sind (Kaas et al. 2012). Beim strikt bzw. eng definierten Kerngenom wird zunächst eine begrenzte Zahl an Genomen festgelegt, die die Diversität der Spezies repräsentieren. Als Kerngenom werden dann die Gene definiert, die in allen ausgewählten Genomen vorkommen. Ein solches Schema kam erstmals im Jahr 2011 im Rahmen des *E. coli* O104:H4-Ausbruchs in Deutschland zum Einsatz (Mellmann et al. 2011), wobei der Begriff der cgMLST erstmals 2013 in einer Veröffentlichung von Maiden et al. diskutiert wurde (Maiden et al. 2013). In den letzten Jahren nimmt die Zahl an standardisierten cgMLST-Schemata zu, die über die Software SeqSphere+ (Ridom GmbH, Münster, Germany) erstellt wurden (Übersicht auf <https://www.cgmlst.org/ncs>) und bei denen meist ein eng definiertes Kerngenom verwendet wird. Hier reichen die Zahlen der verwendeten Gene von 425 bei *Mycoplasma gallisepticum* bis 2.891 bei Vertretern des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes. Higgins et al. etablierten 2017 ein cgMLST-Schema für *A. baumannii*, das auf den Sequenzen von 53 Isolaten aus Deutschland basiert. Die für das cgMLST-Schema definierten 2.390 Gene konnten zu 98,4 % in 1.339 öffentlich zugänglichen *A. baumannii*-Genomen nachgewiesen werden (Higgins et al. 2017). Die Auflösung des Schemas erhöht sich durch die Verwendung einer größeren Anzahl an Genen im Vergleich mit anderen Methoden wie rep-PCR oder

klassischer MLST. So konnten Venditti et al. bei der Untersuchung eines nosokomialen Ausbruchs durch *A. baumannii* in einem Krankenhaus in Rom mit Hilfe der cgMLST zwei Übertragungsketten nachweisen, was weder mittels rep-PCR noch mittels MLST möglich war (Venditti et al. 2018). Bei der Verwendung einer standardisierten Datenbank sind die Untersuchungen im Unterschied zur Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), dem früheren Gold-Standard für die Untersuchung von Ausbruchsgeschehen (siehe **Kapitel 2.3.8**), nicht mehr vom durchführenden Labor abhängig. Da für die cgMLST anwenderfreundliche Software zur Verfügung steht, ist die *in silico*-Auswertung der WGS-Daten im Vergleich zu der im Folgenden beschriebenen Methode deutlich vereinfacht.

2.3.6 Analyse des Maximum Common Genomes

Ähnlich der cgMLST basiert die Analyse des „maximum common genomes“ (MCG) auf Ganzgenomdaten. Im Rahmen der Analyse werden orthologe Gene innerhalb der Vergleichsgruppe als MCG definiert. Als ortholog gelten die Gene, wenn sich ihre Nukleinsäuresequenzen zu einem definierten Grenzwert (z.B. 70 %) gleichen. Im Unterschied zur cgMLST werden bei der MCG-Analyse nicht die Allele betrachtet, sondern die orthologen Gene auf Ebene der SNPs verglichen. Dadurch erhöht sich die Auflösung der MCG im Vergleich zur cgMLST. Eine Zuordnung zu definierten phylogenetischen Gruppen ist hierbei nur beschränkt und im direkten Vergleich zu den jeweiligen Isolaten möglich. Durch biomathematische Verfahren kann jedoch die stammesgeschichtliche Nähe der Isolate zueinander beschrieben werden weshalb sie sich auch zum Vergleich verschiedener Arten eignet (Mentzer et al. 2014; Klotz et al. 2017a). Außerdem kann das Verfahren auch zur Analyse von Ausbruchsgeschehen eingesetzt werden, wobei sich die biomathematische Aufarbeitung der Daten etwas komplexer darstellt als bei der cgMLST. Einige Autoren argumentieren zudem, dass die SNP-basierte hohe Auflösung zu anfällig für spontane Mutationen innerhalb eines Ausbruchstammes sein könnte (Higgins et al. 2017).

2.3.7 *bla*_{OXA-51}-Gen-Sequenzierung

Natürlicher Bestandteil des Genoms von *A. baumannii* ist das *bla*_{OXA-51}-like Gen. Dieses kodiert für eine intrinsische Carbapenemase, die in geringem Maße exprimiert wird und in der Regel nicht zu einer Resistenz gegenüber Carbapenemen führt. Für die Analyse des Gens wird es zunächst mit einer PCR amplifiziert, dann sequenziert und mit öffentlich verfügbaren

Sequenzen abgeglichen. Derzeit sind die Gen- und Aminosäuresequenzen von 272 (Stand Juni 2019) OXA-51-like Carbapenemasen in der „Beta-lactamase Database“ veröffentlicht (Naas et al. 2017). Es konnte gezeigt werden, dass diese intrinsischen Oxacillinase-Typen mit den Sequenztypen nach MLST-Analysen korrelieren (Hamouda et al. 2010; Pournaras et al. 2014). So kann beispielsweise *bla*_{OXA-69} dem IC1, *bla*_{OXA-66} dem IC2 und *bla*_{OXA-71} dem IC3 zugeordnet werden.

2.3.8 Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE)

Bei der PFGE wird das Genom des Bakteriums unter Verwendung eines Restriktionsenzym (bei *A. baumannii* meist ApaI) an spezifischen Stellen geschnitten, wodurch je nach Genomsequenz des Isolats unterschiedlich große Fragmente entstehen (Längenpolymorphismus) (Allardet-Servent et al. 1989; Gouby et al. 1992). Diese können mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese dargestellt werden (Schwartz und Cantor 1984). Aufgrund der Größe der Fragmente ist dafür ein spezielles Verfahren notwendig, in der die Spannung in verschiedenen Winkeln und Pulszeiten angelegt wird. Die Darstellung der Fragmentmuster wird auch als Fingerabdruck bezeichnet und Isolate mit gleichen Mustern werden als Klone definiert. So können Stämme einer umschriebenen Herkunft und eines bestimmten Zeitraumes miteinander verglichen werden. Bis vor einigen Jahren war diese Methode der Gold-Standard für die epidemiologische Aufklärung von nosokomialen Ausbrüchen. Inzwischen wird sie zunehmend durch andere Methoden wie die cgMLST ersetzt. Grund sind die Einschränkungen bezüglich der Reproduzierbarkeit und der Vergleichbarkeit von Isolaten über größere Zeiträume bzw. verschiedene Regionen hinweg. Zur vorläufigen Identifizierung von Klonen in Probenmaterial kann die PFGE jedoch genutzt werden (Seifert und Gerner-Smidt 1995; Janssen und Dijkshoorn 1996; Koeleman et al. 1998).

2.4 Resistenz von *Acinetobacter* spp. gegen antimikrobielle Wirkstoffe

Acinetobacter spp. können eine Vielzahl von Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe verschiedener Gruppen zeigen. Insbesondere *A. baumannii* verfügt über ein großes Repertoire an Resistenzmechanismen. Neben seinen Virulenzfaktoren (siehe **Kapitel 2.7.1**) und der hohen Tenazität ist dies ein wichtiger Grund für seine große Bedeutung im Zusammenhang mit überwiegend nosokomialen Infektionen. Dabei ist zu beachten, dass nicht alle Autoren der aktuellen Nomenklatur zur Beschreibung von Multiresistenz

(„multidrug resistance“ – MDR) gleiche Resistenzprofile zugrunde legen. Magiorakos et al. teilen die antimikrobiellen Wirkstoffe in Kategorien gemäß ihren Antibiotikaklassen auf und definieren die Resistenz wie folgt (Magiorakos et al. 2012):

- MDR (multidrug resistant) als Unempfindlichkeit gegenüber mindestens einem Wirkstoff in drei oder mehr Antibiotikaklassen.
- XDR (extensively drug resistant) als Unempfindlichkeit gegenüber mindestens einem Wirkstoff in allen außer zwei oder weniger Antibiotikaklassen.
- PDR (pandrug resistance) als Unempfindlichkeit gegenüber allen Wirkstoffen in allen Antibiotikaklassen.

Eine weitere Definition von Multiresistenz bei *A. baumannii* ist der Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) zu entnehmen (Wendt et al. 2012):

- Als 3MRGN (Multiresistente Gram-negative Stäbchen) werden Isolate bezeichnet, die gegen die vorgegebenen Antibiotikaklassen Acylureidopenicilline, 3./4.-Generation Cephalosporine und Fluorchinolone resistent sind.
- Als 4MRGN werden Isolate bezeichnet, die gegen Carbapeneme resistent sind.

2.4.1 Methoden zur Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung

Zur Untersuchung der Resistenz stehen heute verschiedene Methoden zur Verfügung, von denen die wichtigsten hier kurz vorgestellt werden. Das Ergebnis der Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung beeinflusst maßgeblich die Wahl des Therapeutikums und hat damit auch direkten Einfluss auf den Therapieerfolg am Patienten. Daher muss bei der Wahl des passenden Verfahrens die Verlässlichkeit der Ergebnisse bei akkurater Durchführung im Vordergrund stehen. In einigen Fällen sind außerdem wichtige Limitationen zu beachten (siehe **Kapitel 2.4.1.2**).

2.4.1.1 Bouillon-Dilutionstest

Bei dieser Methode werden verschiedene Konzentrationen eines Wirkstoffs in Lösung gebracht. Darin wird der Erreger kultiviert und das Wachstum anhand der optischen Dichte gemessen. Die kleinste Konzentration, bei der kein Wachstum erfolgt, wird als minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet. Anhand von Grenzwerten werden die MHKs zur Beurteilung der Resistenz in die drei Kategorien „Resistent“, „Intermediär resistent“ und

„Sensibel“ herangezogen (siehe **Kapitel 2.4.2**). Diese Methode wird auch in teilweise automatisierten Systemen wie MICRONAUT-S (MERLIN Diagnostica GmbH, Bornheim, Deutschland) und VITEK2 (Biomérieux, Nürtingen, Deutschland) angewendet.

2.4.1.2 Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest ermöglicht es, eine Vielzahl von antimikrobiellen Substanzen in einem Arbeitsschritt zu testen und erfordert keine speziellen Geräte. Das macht diesen weitverbreiteten Test zu einer kostengünstigen und leicht anwendbaren Methode. Dabei wird auf einem standardisierten Nährmedium (Mueller-Hinton (MH) Agar) ein zu testender Erreger in einer vorgegebenen Keimdichte ausgestrichen. Anschließend wird ein mit Antibiotikum versetztes Plättchen darauf platziert. Der Wirkstoff diffundiert in den Agar und um das Plättchen entsteht ein Konzentrationsgradient. Wird das Wachstum des Bakteriums durch den Wirkstoff gehemmt, entsteht um das Plättchen ein Hemmhof. Je größer der Durchmesser, desto kleiner die Konzentration, die für die Hemmung des Bakteriums benötigt wird. Bei diesem Test wird der Durchmesser des Hemmhofs zur Beurteilung der Resistenz herangezogen. Er wurde im Jahr 1959 entwickelt (Bauer et al. 1959), von Kirby und Bauer 1966 standardisiert (Bauer et al. 1966) und ist die Grundlage für den vom europäischen Komitee für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung („European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ – EUCAST) verwendeten Agardiffusionstest. Der Test ist u.a. stark von der Eigenschaft des Wirkstoffs abhängig durch den Agar zu diffundieren. Da diese bei großen Molekülen eingeschränkt ist, warnt das Komitee z.B. vor der Verwendung des Agardiffusionstests für die Empfindlichkeitsprüfung gegen Colistin und empfiehlt hier die Boullion-Dilutions-Methode (Matuschek et al. 2018).

2.4.1.3 Epsilometertest

Der Epsilometertest (E-Test) ist eine spezielle Art des Agardiffusionstests. Anstatt eines Plättchens mit nur einer Konzentration wird ein Trägerstreifen auf den beimpften Agar aufgebracht. Dieser ist mit einer aufsteigenden Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffs versetzt und mit einer Skala beschriftet. Anhand dieser lässt sich direkt die MHK in Abhängigkeit von der Hemmung des Bakterienwachstums ablesen. Der E-Test kann als Bestätigungstest für automatisierte Verfahren zum Einsatz kommen, wenn Ergebnisse für

einzelne Wirkstoffe nachgetestet werden sollen bzw. die alleinigen Daten der automatisierten Verfahren nicht anerkannt sind.

2.4.2 Standardisierung der Resistenztestung und ihrer Interpretation

Nachdem im 20. Jahrhundert zahlreiche Verfahren zur Resistenztestung publiziert wurden, etablierten sich zunächst nationale Richtlinien zur Methodik und der Festlegung von klinischen Grenzwerten für die Humanmedizin. Diese wurden um die Jahrtausendwende auf europäischer Ebene durch das 1997 gegründete „European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ (EUCAST) harmonisiert und standardisiert (Kahlmeter et al. 2003).

Klinische Grenzwerte stellen den Evaluationsrahmen für die Bestimmung der antimikrobiellen Empfindlichkeit des jeweils getesteten Isolats im Hinblick auf eine Therapie des Patienten dar. Im Gegensatz dazu gibt es sogenannte epidemiologische Cut-offs (ECOFFS), die nicht mit den klinischen Grenzwerten verwechselt werden dürfen. Die ECOFFS beziehen sich auf die Verteilung der MHK innerhalb einer Spezies und grenzen die Wildtyppopulation von der non-Wildtyppopulation ab.

Die klinischen Grenzwerte ermöglichen die Einteilung der Empfindlichkeit in drei Kategorien, die bis 2018 als sensibel (S), intermediär resistent (I, nicht immer vorhanden), resistent (R) bezeichnet wurden. Ab dem Jahr 2019 hat die EUCAST die Kategorien zur Beurteilung der Sensitivität angepasst. Dabei wurde „intermediär resistent“ in „empfindlich bei erhöhter Dosis“ geändert. Es bleibt bestehen, dass Präparate auch in dieser Kategorie angewendet werden können, wenn sie in erhöhter Dosis verabreicht, oder durch pharmakokinetische Effekte in Zielgeweben angereichert werden. Eine sogenannte technische Unsicherheit, wie in der ursprünglichen intermediären Kategorie eingeschlossen, spielt nun keine Rolle mehr. Dafür wurden in einigen Fällen separate MHK-Bereiche mit der Bezeichnung ATU („Area of technical uncertainty“) eingeführt (EUCAST 2019). Auch das „Clinical & Laboratory Standards Institute“ (CLSI) in den USA veröffentlicht Leitlinien zur Durchführung und Auswertung von Antibiotika-Resistenztests (CLSI 2014). Neben Grenzwerten zur Anwendung in der Humanmedizin bietet die CLSI auch eine Richtlinie für den veterinärmedizinischen Bereich (Lubbers 2018). Gleiches wird in Europa auch vom „Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ (VetCAST) angestrebt (Toutain et al. 2017). Grund für diese Entwicklung sind unter anderem a) Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Arzneimitteln abhängig von der therapierten Spezies und b)

Unterschiede in den angewendeten Arzneimitteln (z.B. durch Zulassungsbeschränkung auf Tiere). Bisher stehen in der Veterinärmedizin für viele Wirkstoffe sowie Wirts- und Erregerspezies noch keine Grenzwerte zur Verfügung, was die Interpretation antimikrobieller Empfindlichkeit hier einschränkt.

2.4.3 Intrinsische Resistenzen

A. baumannii verfügt über eine Vielzahl an intrinsischen Antibiotikaresistenzen (siehe **Tabelle 1**). Als Hauptursache wird hierfür die geringe Membranpermeabilität angeführt, wodurch die Wirkstoffe schwerer in das Bakterium eindringen können. Zwei Faktoren können hierfür als ursächlich angesehen werden: a) die Membran ist hauptsächlich mit unspezifischen Porinen mit langsamer Durchflussrate, etwa OmpA, ausgestattet (Sugawara und Nikaido 2012) und b) eine erhöhte Aktivität von Efflux-Transportern, etwa AdeJK, ermöglicht den schnellen Abtransport von antimikrobiellen Molekülen (Bonomo und Szabo 2006; Yoon et al. 2015). Außerdem vermitteln eine AmpC Beta-Laktamase und eine OXA-51-like Oxacillinase eine intrinsische Resistenz gegen zahlreiche Beta-Laktam-Antibiotika (Corvec et al. 2003; Brown et al. 2005; Merkier und Centrón 2006; Turton et al. 2006b).

Tabelle 1: Intrinsische Resistenzen des *Acb*-Komplexes
nach EUCAST (EUCAST 2016) und CLSI (CLSI 2014)

Wirkstoff	EUCAST	CLSI
Ampicillin	R	R
Amoxicillin-Clavulansäure	R	R
Cefazolin	R	R
Cefalothin	R	R
Cefalexin	R	R
Cefadroxil	R	R
Cefotaxim	R	keine Angabe
Ceftriaxon	R	keine Angabe
Aztreonam	R	R
Ertapenem	R	R
Trimethoprim	R	R
Fosfomycin	R	R
Tetracyclin	R	keine Angabe
Cefoxitin	keine Angabe	R
Cefotetan	keine Angabe	R
Clindamycin	keine Angabe	R
Daptomycin	keine Angabe	R
Fusidinsäure	keine Angabe	R
Vancomycin	keine Angabe	R
Teicoplanin	keine Angabe	R
Linezolid	keine Angabe	R
Erythromycin	keine Angabe	R
Azithromycin	keine Angabe	R
Clarithromycin	keine Angabe	R
Quinupristin-Dalfopristin	keine Angabe	R
Rifampicin	keine Angabe	R

2.4.4 Erworbene Resistenzen

2.4.4.1 Carbapenem-Resistenz

Der Resistenz gegen Betalaktam-Antibiotika der Klasse der Carbapeneme ist im klinischen Kontext die größte Bedeutung beizumessen. Nach Dijkshoorn et al. kann das zunehmende Vorkommen von Carbapenem-resistenten *A. baumannii* und die damit verbundene massive Einschränkung der Behandlungsoptionen in Zusammenhang mit hohen Todesraten gebracht werden (Dijkshoorn et al. 2007). Laut Erhebung des „European Centre for Disease Prevention and Control“ (ECDC) machten in Deutschland im Jahr 2017 Carbapenem-resistente Isolate einen Anteil von 4,4 % der aus invasiven Infektionen nachgewiesenen *A. baumannii* aus. In südlichen Ländern Europas liegen die Anteile mit 78,7 % in Italien, 96,2 % in Kroatien und 94,8 % in Griechenland deutlich höher (ECDC 2018). Die im Folgenden erläuterten enzymatischen Mechanismen führen meist erst durch die Kombination mit Porinen und Efflux-Pumpen zu einer entsprechenden Resistenz von *A. baumannii* (Vila et al. 2007). Bei Letzteren spielen vor allem Vertreter der „Resistance-Nodulation-Cell Division“ (RND)-Gruppe eine wichtige Rolle, zu denen unter anderem AdeABC, AdeFGH und AdeIJK zählen (Yoon et al. 2016).

2.4.4.1.1 Enzyme der Ambler Klasse D (Oxacillinasen)

Oxacillinasen sind die häufigsten Carbapenemasen bei *Acinetobacter* spp. (Peleg et al. 2008). Bereits im Jahr 1985 wurde mit *bla*_{OXA-23} das erste plasmidlokalisierte Carbapenem-Resistenzgen gefunden, das heute weltweit verbreitet ist (Paton et al. 1993; Mugnier et al. 2010). Daneben sind *bla*_{OXA-24/40} und *bla*_{OXA-58} die wichtigsten Carbapenemase-Gene bei *Acinetobacter*, die sowohl chromosomal als auch auf Plasmiden nachgewiesen wurden. Auf Basis der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenzen werden den oben genannten Carbapenemase-Genen zahlreiche weitere *bla*_{OXA}-Gene zugeordnet, die entsprechend als *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-24/40-like} oder *bla*_{OXA-58-like} bezeichnet werden. Träger dieser Resistenzgene synthetisieren Enzyme, die in der Lage sind Carbapeneme durch Hydrolyse zu deaktivieren. In der Regel wird die Expression dieser häufig erworbenen, aber auch die der intrinsischen Oxacillinase-Gene (z.B. *bla*_{OXA-51}) durch den Genen vorgeschaltete Insertionselemente (z.B. *ISAbal1*) verstärkt (Poirel et al. 2005; Turton et al. 2006a).

2.4.4.1.2 Enzyme der Ambler Klasse B (Metallo Beta-Laktamasen) und A

Eine wesentlich höhere hydrolytische Aktivität als die Vertreter der Klasse D zeigen Beta-Laktamasen der Ambler-Klasse B, die auch als Metallo-Beta-Laktamasen (MBLs) bezeichnet werden (Poirel und Nordmann 2006a). Bei *A. baumannii* wurden bisher die MBLs IMP (von „active on imipenem“), VIM (von „Verona integron-encoded metallo- β -lactamase“), NDM (von „New Delhi metallo- β -lactamase“) und SIM (von „Seoul imipenemase“) nachgewiesen (Poirel et al. 2011). Grundsätzlich scheinen diese Enzyme bei *Acinetobacter* aber seltener zu sein als Carbapenemasen der Ambler Gruppe D. Vereinzelt konnten außerdem KPC (von „*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase“) und GES (von „Guiana extended spectrum“), beide der Ambler Gruppe A zugehörig, bei *A. baumannii* nachgewiesen werden (Bonnin et al. 2011; Martinez et al. 2016).

2.4.4.2 Cephalosporin-Resistenz

Neben Carbapenemasen spielen hier auch Beta-Laktamasen der Ambler Klasse A eine Rolle, die als „Extended-Spektrum Beta-Laktamasen“ (ESBL) bezeichnet werden. Als ESBL werden Beta-Laktamasen bezeichnet, die Oxyimino-Cephalosporine katalysieren, aber durch Hemmstoffe (z.B: Clavulansäure) inhibiert werden können (Bradford 2001). ESBL kommen weit häufiger in *E. coli*, *K. pneumoniae* und anderen Enterobacteriaceae vor, können jedoch auch bei *Acinetobacter* vereinzelt ESBL-Enzyme, unter anderem aus den Familien TEM, PER, VEB, SHV und CTX-M nachgewiesen werden (Poirel et al. 2011).

2.4.4.3 Colistin-Resistenz

Da Colistin bei Carbapenem-resistenten Stämmen häufig eines der letzten verbleibenden Therapie-Optionen darstellt, kommt der Resistenz gegen diesen Wirkstoff eine besondere Bedeutung zu. Bei *Acinetobacter* ist bekannt, dass Veränderungen von Lipid A, einem Bestandteil der Lipopolysaccharid (LPS)-Membran, durch Punktmutationen zu einer Resistenz gegen Polymyxine führen können. In *A. baumannii* kann dies durch Punktmutationen in den *pmrA*-, *pmrB*- und *pmrC*-Genen (Arroyo et al. 2011) oder den *lpxA*-, *lpxC*- und *lpxD*-Genen (Moffatt et al. 2010) verursacht werden. Plasmid-vermittelte Resistenzen gegen Colistin, wie von Enterobakterien bekannt (*mcr1* - *mcr9*), wurden bei *Acinetobacter* spp. bisher selten nachgewiesen (Jeannot et al. 2017; Lima et al. 2018; Ma et al. 2019).

2.4.4.4 Sulfonamid-Resistenz

Sulfonamide binden ein Enzym des Folsäurestoffwechsels und werden meist in Kombination mit Trimethoprim, einem weiteren Hemmstoff dieses Metabolismus, eingesetzt. Resistenzen gegen diese Wirkstoffkombination sind bei *Acinetobacter* spp. weit verbreitet. So zeigt ein Übersichtsartikel von Falagas et al. aus dem Jahr 2015 bei der Mehrzahl der gesichteten Studien eine Resistenzrate von über 50 %. Im Fall von multiresistenten (nach Magiorakos et al.) und Carbapenem-resistenten Isolaten zeigte sich eine noch höhere Rate von bis zu 100 % (Falagas et al. 2015). Ein Resistenzmechanismus gegen Sulfonamide ist die Produktion alternativer Dihydropteroat-Enzyme, die weniger von den antimikrobiellen Wirkstoffen gehemmt werden. Diese Enzyme werden von den Genen *sul1*, *sul2* und *sul3* kodiert, die oftmals auf Plasmiden lokalisiert sind und alle bereits bei *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden konnten (Byrne-Bailey et al. 2009). Auch der *A. baumannii* Typstamm ATCC 19606 ist Träger von *sul2* (Hamidian und Hall 2017), ebenso *A. baumannii* ATCC 17978 (Nigro und Hall 2011).

2.4.4.5 Chinolon-Resistenz

Wie bei anderen bakteriellen Spezies ist die Resistenz gegen Chinolone und Fluorchinolone auch bei *Acinetobacter* spp. in erster Linie auf eine stufenweise Mutation in den für eine DNS-Gyrase bzw. Topoisomerase IV kodierenden Genen *gyrA* und *parC* begründet (Vila et al. 1995; Vila et al. 1997). Durch eine Strukturänderung der Gyrase bzw. Topoisomerase kann das Antibiotikum nicht mehr an sein Zielmolekül binden. Weiterhin spielen die bereits erwähnten Efflux-Pumpen eine Rolle bei der Resistenz gegen Fluorchinolone. Plasmidkodierte Chinolon-Resistenzmechanismen wurden bei *Acinetobacter* bisher nicht beschrieben.

2.4.4.6 Tetrazyklin-Resistenz

Die wichtigsten Mechanismen der Tetrazyklin-Resistenz sind einerseits spezifische Efflux-Pumpen, die den Wirkstoff aus dem Bakterium befördern, sowie das Verhindern einer Bindung von Tetrazyklin an die Ribosomen durch Schutzproteine. Bei *Acinetobacter* spp. wurden beide Mechanismen bereits nachgewiesen. So kodieren die Gene *tet(A)* und *tet(B)* für Proteine von Effluxpumpen und *tet(M)* für ein Schutzprotein (Guardabassi et al. 2000; Ribera et al. 2003b; Ribera et al. 2003a).

2.4.4.7 Aminoglykosid-Resistenz

Als Ursachen für Resistenzen gegen Aminoglykoside wurden in *A. baumannii* Enzyme identifiziert, die die antimikrobiellen Wirkstoffe modifizieren (Phospho-, Acetyl- und Adenyltransferasen). Diese sind unter anderem durch die Gene *aph*, *aac*, *ant*, und *aad* und ihre zahlreichen Varianten kodiert (Goldstein et al. 1983; Seward et al. 1998). Die verschiedenen Gene kodieren hierbei für unterschiedliche Resistenzen, beispielsweise *aphA1* für Kanamycin- und Neomycinresistenz, *aphA6* für Amikacin-, Kanamycin- und Neomycinresistenz und *aadA1* für Streptomycin- und Spectinomycinresistenz. Letzteres ist bei *Acinetobacter* spp. chromosomal kodiert, *aadB* hingegen auch auf Plasmiden. Außerdem können RNS-Methylasen zu einer Resistenz gegen Aminoglykoside führen (Poirel et al. 2011). Ein weiterer Mechanismus wird durch *armA* kodiert, wobei hier eine 16S rRNA-Methylierung für eine Resistenz gegen alle eingesetzten Aminoglykoside verantwortlich ist (Doi et al. 2007). Wie bei vielen anderen Wirkstoffen können außerdem auch Efflux-Pumpen (z.B. im *adeABC* Gen-Cluster oder durch das *abeM*-Gen kodiert) zu einer Resistenz führen (Magnet et al. 2001; Su et al. 2005).

2.4.5 Übertragung von Resistenzen

Einige Resistenzgene von *Acinetobacter* spp. sind auf mobilen genetischen Elementen lokalisiert. Die wichtigste Rolle spielt dabei das oben bereits erwähnte *bla_{OXA-23}*. Dieses Gen ist bei *A. baumannii* häufig auf einem Plasmid lokalisiert. Währenddessen findet man *bla_{OXA-23}* als Bestandteil der chromosomalen DNS in der Spezies *A. radioresistens*, die als Ursprung dieses Resistenzgens gilt. Während *bla_{OXA-23}* in *A. baumannii* auf einem Transposon liegt, findet man in *A. radioresistens* nur das ATPase-Gen dieser Struktur (Poirel et al. 2008). Bei der Übertragung von Resistenzen mittels horizontalen Gentransfers können auch mehrere Resistenzgene gleichzeitig weitergegeben werden, sofern sie z.B. auf dem gleichen Plasmid liegen. So berichten Nigro et al. über ein IC1-Isolat, dass *bla_{OXA-23}* und *aphA6* auf einem repAci6-Plasmid trägt, wobei beide Resistenzgene in Transposon-Strukturen eingebettet sind (Nigro et al. 2014). In *A. pittii*-Isolaten von Hunden, Katzen und einem Kaninchen konnten wir ebenfalls ein Carbapenemase-Gen (*bla_{OXA-58}*), Aminoglykosid-Resistenzgene (*strA* [*aph(3)'Ib*], *strB* [*aph(6)-I*], *aacC2*) und Tetrazyklin-Resistenzgene (*tetA39*) gemeinsam auf einem Plasmid nachweisen (Klotz et al. 2017b).

Ursprünglich wurde angenommen, dass natürliche Transformation bei *Acinetobacter* spp. eine untergeordnete Rolle spielt, jedoch zeigen Studien unter Verwendung neuer Methoden einen größeren Anteil an Stämmen, die zur Transformation fähig sind (Wilharm et al. 2013; Godeux et al. 2018). Die Verbreitung mobiler genetischer Elemente ermöglicht außerdem eine Anhäufung von Resistenzgenen, die zu einer Panresistenz führen kann. Im Folgenden wird kurz auf die wichtigsten Strukturen im Zusammenhang mit der Übertragung von Resistenzen eingegangen.

2.4.5.1 IS-Elemente

Insertions-Sequenzen sind kurze übertragbare Elemente, die zwischen 500 und 2000 Basenpaare (bp) groß sind. Solche Sequenzen sind im Genom an der Bildung von Transposons beteiligt und können so zur Mobilisierung von Resistenzgenen beitragen. Die wichtigsten IS-Elemente in *A. baumannii* sind *ISAb1* (Corvec et al. 2003; Heritier et al. 2006; Turton et al. 2006a), *ISAb2* (Poirel und Nordmann 2006b), *ISAb3* (Poirel et al. 2005) und *ISAb4* (Corvec et al. 2007). Sie ermöglichen nicht nur die Verbreitung von Resistenzen, sondern verstärken auch die Expression nachfolgender Gene, wie oben bereits für *bla_{OXA-23}* und *bla_{OXA-51}* erläutert wurde (Pagano et al. 2016).

2.4.5.2 Transposon-Strukturen

Transposons sind genetische Elemente, die zwischen 3.000 und 40.000 bp groß sind. In *A. baumannii* sind bestimmte Transposons oft mit bestimmten Carbapenemase-Genen assoziiert. So kann *bla_{OXA-23}* häufig Tn2006, Tn2007 oder Tn2008 zugeordnet werden. In Tn2006 wird das Resistenzgen dabei beidseits von *ISAb1* flankiert. In Tn2008 ist *ISAb1* hingegen nur upstream von *bla_{OXA-23}* zu finden. Tn2007 ist mit *ISAb4* assoziiert (Pagano et al. 2016). Bisher wurde bei humanen *Acinetobacter* spp. im Zusammenhang mit *bla_{OXA-23}* am häufigsten Tn2006 festgestellt (Nigro und Hall 2016). Bei Tieren konnte neben diesem Transposon (Pomba et al. 2014; Brahmi et al. 2016) vor allem Tn2008 nachgewiesen werden (Poirel et al. 2012; Smet et al. 2012; Ewers et al. 2017; Linz et al. 2018).

2.4.5.3 Plasmide

Als Plasmide werden extrachromosomale DNS-Abschnitte bezeichnet, die sich semi-autonom replizieren können (Sherratt 1974). Sie tragen in der Regel keine für das Bakterium

essentiellen Gene, sondern solche, die ihnen bei der Anpassung an neue Lebensräume helfen (etwa Antibiotika-Resistenzgene, Virulenzgene oder auch Fitnessgene). Einige Plasmide können durch Konjugation an andere Bakterien weitergegeben werden und sind daher ein potentieller Vehikel für Antibiotikaresistenz. Verschiedene Resistenzen in *A. baumannii* können auf Plasmiden kodiert sein, unter anderem Carbapenem- und Aminoglykosid-Resistenzen (Peleg et al. 2009). Es konnte außerdem nachgewiesen werden, dass *bla*_{OXA-24/40}-tragende Plasmide durch „outer membrane vesicles“ (OMV) zwischen *A. baumannii*-Stämmen übertragen werden können (Rumbo et al. 2011).

Plasmide von *Acinetobacter* spp. werden nach Bertini et al. (2010) in sogenannte Replikontypen eingeteilt. Dabei werden die Plasmide mit Hilfe von PCR-Analysen auf Grundlage der Ähnlichkeiten der Replikase-Gene auf Ebene der Nukleinsäuresequenz 19 Gruppen (GR1-19) zugeordnet. Am häufigsten sind nach gegenwärtigem Kenntnisstand Plasmide der rep-3 Superfamilie (Bertini et al. 2010). In einer Studie von Towner et al., in der europäische *A. baumannii*-Isolate untersucht wurden, waren Carbapenemase-Gene der *bla*_{OXA-58-like}-Gruppe mit den Replikase-Genen *repAci1*, *repAci3*, *repAci4* und *repAciX*, Gene der *bla*_{OXA-24/40-like}-Gruppe mit *repAci2* und p2ABSDF0001, und Gene der *bla*_{OXA-23-like}-Gruppe mit *repAci1* assoziiert (Towner et al. 2011). Die Assoziation von Resistenzgenen mit mobilen Elementen wie Insertionselementen, Transposons und Plasmiden ist ein wichtiger Anhaltspunkt für die Risikoabschätzung einer Resistenzübertragung auf andere Bakterien. Die Differenzierung dieser Elemente erlaubt es außerdem, auf die Verbreitungswege von Resistenzgenen Rückschlüsse ziehen zu können.

2.5 Verbreitung von *Acinetobacter*

2.5.1 *Acinetobacter* in der Umwelt

Die Gattung *Acinetobacter* ist in der Umwelt weit verbreitet, unter anderem wurden Vertreter im Boden, in Gewässern, Abwässern sowie Pflanzen entdeckt (Doughari et al. 2011). Bereits erwähnt wurde die Isolierung des *A. calcoaceticus* Typstamms durch Beijerinck aus Bodenproben. Aus solchen wurden ebenfalls bereits *A. pittii*, *A. indicus* und *A. baumannii* isoliert (Al Atrouni et al. 2016b). Bisher liegen keine systematischen Untersuchungen zur Prävalenz verschiedener *Acinetobacter* spp. in der Umwelt vor. Die Studien beschränken sich auf Berichte über einzelne Isolate. Erst vor kurzem gelang Hrenovic

et al. die Isolierung Carbapenem-resistenter *Acinetobacter* spp. aus Bodenproben in Kroatien, die mit illegaler Entsorgung von Müll assoziiert waren (Hrenovic et al. 2018). Speziell für *A. baumannii* scheinen Nachweise aus der Umwelt meist in einem anthropogenen Zusammenhang zu stehen. So wiesen Higgins et al. Carbapenem-resistente Isolate aus Kläranlagen in Kroatien– unter anderem IC1 und IC2 (Higgins et al. 2018) – und Girlich et al. einen OXA-23 positiven *A. baumannii* aus der Seine nach (Girlich et al. 2009).

2.5.2 *Acinetobacter* beim Menschen

Verschiedene *Acinetobacter* spp. können regelmäßig aus humanen, nicht Klinik-assoziierten Proben, unter anderem der Haut und Schleimhaut, nachgewiesen werden. *A. baumannii* als wichtigster Vertreter der Gattung *Acinetobacter* wird hingegen vor allem von Patienten im stationären Klinikbereich (Dijkshoorn et al. 2005) oder aus Oberflächenproben in Kliniken isoliert (Rose et al. 2014). In Stuhlproben stationär behandelter Patienten finden sich Prävalenzen von bis zu 40 % (Corbella Xavier 1996). Eine hohe Tenazität sowie die Fähigkeit zur Biofilmbildung werden als mögliche Faktoren genannt, die das Auftreten von *A. baumannii* im Klinikumfeld begünstigen (Villegas und Hartstein 2003; McConnell et al. 2013). Besonders problematisch sind diese Infektionen durch den hohen Anteil an multiresistenten Isolaten in vielen Ländern. Für Deutschland bewegt sich der Anteil Carbapenem-resistenter Stämme an invasiven *Acinetobacter*-Isolaten seit einigen Jahren um die 5 %. In Südeuropäischen Ländern wie Italien, Spanien und Griechenland ist der Anteil mit 60-90 % aber ungleich höher (ECDC 2018).

Bei Patienten mit künstlicher Beatmung kann *A. baumannii* schwer therapierbare Pneumonien mit hoher Sterblichkeit auslösen (Garnacho et al. 2003). Weiterhin verursacht der Erreger Meningitiden nach neurochirurgischen Eingriffen (Cascio et al. 2010), Wundinfektionen (Öncül et al. 2002; Scott et al. 2007; Huang et al. 2012; Moriel et al. 2013), Endokarditiden (Bhagan-Bruno et al. 2010) und Bakteriämien (Wisplinghoff et al. 2000). Ähnliche Infektionen werden in kleinerem Umfang auch von weiteren *Acinetobacter* spp., wie *A. lwoffii* oder *A. johnsonii* verursacht (Towner 2009). Neben diesen nosokomialen Infektionen treten seltener auch „community-acquired infections“ auf, die sich häufig als Pneumonien darstellen und in keinem Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt stehen. Meist treten sie in tropischen oder subtropischen Klimazonen auf, können jedoch auch in gemäßigten Breiten vorkommen. Typische Risikofaktoren sind missbräuchlicher

Alkoholkonsum, Diabetes mellitus, Rauchen und chronische Lungenerkrankungen (Dexter et al. 2015; Serota et al. 2018).

2.5.3 Acinetobacter bei Tieren

Acinetobacter spp. werden auch von tierischen Proben isoliert. Einige Studien weisen darauf hin, dass auch in Tierkliniken Vertreter des *Acb*-Komplexes, meist *A. baumannii*, an nosokomialen Infektionen beteiligt sind. Zunehmend werden auch Carbapenem-resistente Isolate nachgewiesen. Im Folgenden werden diese Nachweise nach Tierarten geordnet erläutert.

2.5.3.1 Kleintiere

Acinetobacter baumannii wurde erst im Jahr 1986 eindeutig als Spezies benannt (Bouvet und Grimont 1986) und auch in den darauf folgenden Jahren war die Identifizierung oftmals nicht verlässlich (Peleg et al. 2008). Vor diesem Hintergrund müssen Speziesbezeichnungen in Publikationen bis zur Jahrtausendwende mit Vorsicht interpretiert werden.

Erstmals wurden *Acinetobacter* bei Kleintieren von Saphir et al. im Jahr 1976 in Abstrichen der Gingiva von Hunden beschrieben (Saphir und Carter 1976). *A. calcoaceticus* wurde dabei in 10 % der Proben nachgewiesen. Im Jahr 1982 berichteten Mathewson et al. vom Nachweis von *A. calcoaceticus* im Rahmen der Untersuchung von 3.474 veterinärmedizinischen Proben (Mathewson und Simpson 1982). Unter 347 non-Fermenter-Isolaten identifizierten die Autoren mit klassischen biochemischen Methoden 50 *A. calcoaceticus* (14,5 %), meist isoliert von Pferden, gefolgt von Hunden, Rindern und Katzen. *Acinetobacter* stellt hier die zweithäufigste Gattung nach *Pseudomonas* (67,4 %) im klinischen Untersuchungsgut von Tieren dar. Die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika wurde weder von Saphir et al. noch von Mathewson et al. beschrieben. Im Jahr 2000 wurde erstmals über Infektionen mit *A. baumannii* bei hospitalisierten Tieren berichtet (Francey 2000). Anhand von 17 Hunden und zwei Katzen von Intensivstationen wurde die Bedeutung des Erregers erläutert. Die Fälle wurden primär auf zwei Ausbrüche in den Jahren 1995 und 1997 zurückgeführt, wobei die meisten Patienten in jeweils beiden Jahren zwischen Juli und November vorgestellt wurden. Die Proben stammten in absteigender Häufigkeit aus dem Urogenitaltrakt, Wundinfektionen, Atemtrakt, Blutkulturen und einem zentralen Venenkatheter. Nach Aussage der Autoren war die Infektion mit *A. baumannii* in fünf Fällen

der Hauptgrund für die Euthanasie der Tiere, in sechs Patienten trug der Erreger maßgeblich zur Pathogenese bei und bei acht Patienten machte sich die Infektion nicht oder nur schwach klinisch bemerkbar. Bei systemisch infizierten Tieren trat eine Letalität von 100 % auf. Einige Isolate zeigten unter anderem Resistenzen gegen Aminoglykoside, Trimethoprim-Sulfonamide und Fluorchinolone. Alle Isolate waren empfindlich gegenüber Imipenem und Colistin. Die Autoren zeigten mit einer Ribotypisierungsmethode (Verdau mit dem Restriktionsenzym BglII mit anschließendem Southern-Blot), dass während der jeweiligen Ausbrüche identische Stämme von verschiedenen Tieren isoliert wurden. Zu beachten ist hierbei, dass die verwendete Methode im Vergleich zur später entwickelten PFGE eine niedrigere Auflösung besitzt (Seifert und Gerner-Smidt 1995). Es besteht daher die Möglichkeit, dass die Stämme entgegen der damaligen Annahme nicht identisch waren und es sich um keinen klassischen nosokomialen Ausbruch handelte. Weiterhin waren einzelne Stämme in der Lage, über mehr als ein Jahr hinweg in der Klinik zu persistieren. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Boerlin et al. im Jahr 2001 (Boerlin et al. 2001) die, wie Francey et al. (2000), über klinikassoziierte Infektionen in der Kleintierklinik der Universität Bern berichteten. Neben *Enterococcus (E.) faecalis*, *E. faecium* und *Staph. intermedius* wurde die Übertragung von *A. baumannii* (16 Isolate) bei Hunden, Katzen und einem Pferd untersucht. Die Infektionen mit dem Erreger traten zunächst in den Jahren 1998 und 1999 auf und wurden durch Desinfektionsmaßnahmen auf der Intensivstation beendet. Ein zweiter Ausbruch ereignete sich im Jahr 2000 durch einen weiteren Stamm, der sich auch auf Patienten der benachbarten Pferdeklinik übertrug. Die nosokomiale Verbreitung der beiden für die Ausbrüche verantwortlichen Stämme konnte durch PFGE-Untersuchungen belegt werden. Wie schon bei Francey et al. traten die Ausbrüche in den warmen Sommermonaten auf. Die Mehrheit der Isolate zeigte Resistenzen gegen Gentamicin (n = 15); gegenüber Imipenem waren alle Isolate sensibel. In den folgenden Jahren wurden immer wieder Publikationen über Infektionen durch *Acinetobacter* spp. bei Kleintieren veröffentlicht. So beschrieben Brachelente et al. in einem Fallbericht 2007 eine Katze, ebenfalls aus der Kleintierklinik in Bern, mit nekrotisierender Faszitis und septischem Schock durch *A. baumannii* (Brachelente et al. 2007). Das Isolat wurde post mortem in Milz, Leber und Niere in Reinkultur nachgewiesen und konnte außerdem via PCR in Hautgewebeproben identifiziert werden. Auch in diesem Fall konnte keine Resistenz gegenüber Imipenem nachgewiesen werden, dafür aber gegenüber Fluorchinolonen. Die Autoren berichteten über

weitere *A. baumannii* Infektionen im selben Zeitraum mit gleichem Resistenzprofil bei Hunden und stellen daher die Vermutung einer nosokomialen Übertragung auf. Mohri et al. (2009) berichteten von dem Nachweis von *Acinetobacter* spp. in Kombination mit *Candida albicans* aus dem Perikard bei einem Hund mit purulenter Perikarditis (Mohri et al. 2009). Im gleichen Jahr veröffentlichten Black et al. eine retrospektive Studie, in der unter anderem das Vorkommen multiresistenter Bakterien bei 74 Hunden einer Intensivstation untersucht wurde. Dabei wurde ein Erreger als multiresistent bezeichnet, wenn er entweder in mindestens zwei der Gruppen Ceftazidime, Chinolone, Aminoglykoside, oder gegen Carbapeneme resistent war. In dieser Studie war *A. baumannii* zwar nicht die häufigste Art, wies jedoch am häufigsten einen multiresistenten Phänotyp auf (Black et al. 2009). Es zeigte sich nun nach und nach, dass die Veterinärisolate, vergleichbar mit der Humanmedizin, zu bestimmten phylogenetischen Gruppen gehörten. Endimiani et al. konnten in einer weiteren Studie aus der Universitätsklinik in Bern zeigen, dass Isolate von Hunden, Katzen und Pferden zu den internationalen Klonen (IC) 1 und 2 gehörten. Hier konnte bei einigen Isolaten erstmals eine Resistenz gegen Carbapeneme festgestellt werden (siehe **Tabelle 2**), die durch die verstärkte Expression intrinsischer OXA-51-like-Carbapenemasen durch Insertionselemente bedingt war (Endimiani et al. 2011). Das gehäufte Vorkommen von IC1 und IC2 bei Hunden und Katzen in Veterinärkliniken konnte auch von Zordan et al. bestätigt werden. Hier war von 52 *A. baumannii* nur ein IC1-Isolat resistent gegen Imipenem (Zordan et al. 2011). Eine enge phylogenetische Verwandtschaft wurde außerdem bei Isolaten aus Veterinärkliniken auf La Réunion nachgewiesen. Hierbei zeigte sich eine Häufung von ST25-Isolaten, jedoch keine Resistenz gegen Carbapeneme (Belmonte et al. 2014). Der erste Nachweis einer OXA-23 vermittelten Carbapenem-Resistenz wurde im Jahr 2014 veröffentlicht. Das *A. baumannii*-Isolat stammte von einer Harnwegsinfektion bei einer Katze in Portugal und konnte dem ST2/IC2 zugeordnet werden (Pomba et al. 2014). Ebenfalls aus der Harnwegsinfektion einer Katze konnten Ewers et al. einen *A. baumannii*-Stamm des IC1 isolieren, der eine OXA-23 vermittelte Carbapenem-Resistenz aufwies (Ewers et al. 2016). Das Vorkommen von nosokomialen IC2-Isolaten bestätigte sich in einer weiteren Studie der Autoren, in der außerdem 58 Isolate das Insertionselement *ISAbal* vor dem intrinsischen Oxacillinase-Gen trugen. Eine phänotypische Resistenz gegen Carbapeneme konnte hier aber nur bei zwei OXA-23-positiven IC8-Isolaten gezeigt werden (Ewers et al. 2017). Misis et al. isolierten ein Carbapenem-resistentes, *bla*_{OXA-72}-positives Isolat aus dem Urin eines Hundes

mit Harnwegsinfektion (Misić et al. 2018). Ebenso aus dem Urin eines Hundes mit Cystitis wurde in Thailand ein *bla*_{OXA-23}-positiver *A. baumannii*-Stamm in Reinkultur gewonnen (Chanchaithong et al. 2018). Neben den Oxacillinasen als Auslöser für einen resistenten Phänotyp wurde bei klinischen *A. radioresistens* von einem Hund und einer Katze außerdem die Metallo-Beta-Laktamase IMP-1 nachgewiesen (Kimura et al. 2017). Einer Veröffentlichung von Hérivaux et al. aus dem Jahr 2016 zufolge können Carbapenem-resistente *A. baumannii* auch bei nicht hospitalisierten Tieren nachgewiesen werden. Von 104 untersuchten Hunden trugen zwei OXA-23 produzierende Isolate (ST25) und zwei Carbapenem-empfindliche Isolate (ST250 und ST753) (Hérivaux et al. 2016). Im Gegensatz dazu konnten Gentilini et al. in einer Studie mit 105 hospitalisierten und 100 nicht hospitalisierten Hunden und Katzen nur in Krankenhaus-assoziierten Isolaten Carbapenem-resistenz nachweisen (Gentilini et al. 2018).

Tabelle 2: Übersicht über Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* spp. von Kleintieren

Art	Anzahl Isolate	Wirt	Carbapenemase	Carb.- Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Ab</i>	3	Hd, Ktz	ISAba1-OXA-51	IMP, MEM	1, 2	12 ^{Ox} , 15 ^{Ox}	(Endimiani et al. 2011)
<i>Ab</i>	1	Ktz	-	IMP	-	-	(Zordan et al. 2011)
<i>Ab</i>	1	Ktz	OXA-23	IMP, MEM	2	2 ^{Past}	(Pomba et al. 2014)
<i>Ab</i>	1	Ktz	OXA-23	IMP	1	1 ^{Past} , 231 ^{Ox}	(Ewers et al. 2016)
<i>Ab</i>	3	Hd, Ktz	OXA-23	IMP, MEM	1, 8	1 ^{Past} , 10 ^{Past} , 231 ^{Ox} , 585 ^{Ox}	(Ewers et al. 2017)
<i>Ab</i>	1	Hd	OXA-72	IMP, MEM	-	1 ^{Past}	(Misic et al. 2018)
<i>Ar</i>	2	Hd, Ktz	IMP-1	IMP, MEM	-	-	(Kimura et al. 2017)
<i>Ab</i>	2	Hd	OXA-23	DPM, IMP, MEM	-	25 ^{Past}	(Hérivaux et al. 2016)
<i>Ab</i>	5	Hd, Ktz	NDM-1	IMP, MEM	2	2 ^{Past}	(Gentilini et al. 2018)
<i>Ar</i>	1	Hd	OXA-23	IMP, MEM	-	-	(Gentilini et al. 2018)
<i>Ab</i>	1	Hd	OXA-23	IMP, MEM	2	2 ^{Past}	(Chanchaithong et al. 2018)

DPM = Doripenem, **IMP** = Imipenem, **MEM** = Meropenem, **Ab** = *A. baumannii*, **Ar** = *A. radioresistens*, **Hd** = Hund, **Ktz** = Katze, **ST** = Sequenztyp, **Past** = Pasteur-Schema, **Ox** = Oxford-Schema, - = unbekannt; **Carb.** = Carbapenem

2.5.3.2 Pferd

Die ersten Berichte über *Acinetobacter* spp. bei Pferden stammen aus den 70er Jahren. So berichten Cattabiani et al. über *A. Iwoffii* im Konjunktivalsack von Pferden (Cattabiani et al. 1976). Immer wieder werden *Acinetobacter* spp. als Teil der Mikrobiota sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Pferdeaugen isoliert (Moore et al. 1983; Moore et al. 1988; Moore et al. 1995; Gemensky-Metzler et al. 2005; Johns et al. 2011). Dickie et al. berichten 1978 von einer Myositis und Septikämie bei einer Stute, verursacht durch *A.*

calcoaceticus (Dickie und Regnier 1978), der auch in anderen Publikationen immer wieder mit klinischen Infektionen in Verbindung gebracht wird (Rajasekhar et al. 1978; Gibson und Eaves 1981). Leider ergeben sich aus diesen frühen Publikationen weder Hinweise auf die nach aktueller Nomenklatur zutreffende Spezies-Zugehörigkeit der Isolate, noch auf deren Resistenzlage gegenüber Carbapenemen. *A. baumannii* wird erstmals im Jahr 2000 mit Infektionen bei Pferden in Verbindung gebracht. Vaneechoutte et al. konnten von Venenkathetern Isolate nachweisen, die teils auch zu klinischen Symptomen geführt hatten. Einige der Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber Gentamicin und Enrofloxacin, über Resistenzen gegen Carbapeneme wurde nicht berichtet (Vaneechoutte et al. 2000). Im Gegensatz zu diesen milden Verlaufsformen berichten Bentz et al. über den Nachweis von *A. baumannii* bei einem Fohlen mit Thrombozytopenie und Sepsis (Bentz et al. 2002). Blanchard et al. berichten über eine Infektion der Sexualdrüsen eines Hengstes mit *A. calcoaceticus* (Blanchard et al. 2002). Weiterhin wurden *Acinetobacter* spp. im Zusammenhang mit Atemwegserkrankungen bei Fohlen nachgewiesen. Boguta et al. konnten die Erreger in 45 % der Tiere einer Gruppe von erkrankten Fohlen nachweisen. Die als Kontrollgruppe untersuchten gesunden Tiere waren hingegen frei (Boguta et al. 2002). Im Gegensatz dazu kommen Newton et al. in einer Studie mit 170 erkrankten und 632 gesunden Rennpferden zu dem Schluss, dass ein Nachweis von *Acinetobacter* spp. negativ mit dem Vorkommen von respiratorischen Erkrankungen korreliert (Newton et al. 2003). Im Jahr 2010 berichteten Jokisalo et al. über ein Fohlen mit einer Bronchopneumonie durch einen multiresistenten *A. baumannii*, wobei Multiresistenz hier als Resistenz gegen mindestens drei antimikrobielle Wirkstoffe, unabhängig von der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Antibiotikaklasse, definiert wurde (Jokisalo et al. 2010). Wie bereits erwähnt kommen *Acinetobacter* spp. bei Pferden ebenfalls im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen vor. In einigen Fällen sind die Infektionen sogar Teil eines speziesübergreifenden Ausbruchsgeschehens (Boerlin et al. 2001; Endimiani et al. 2011). Dabei wurden Isolate beispielsweise bei Septikämien oder Wundinfektionen nachgewiesen. Das erste Carbapenem-resistente *Acinetobacter*-Isolat (*A. gandensis*, siehe **Tabelle 3**) wurde 2012 aus einer Kotprobe eines hospitalisierten Pferdes isoliert und trug das *bla*_{OXA-23}-Gen (Smet et al. 2012; Smet et al. 2014). *A. equi* wurde 2016 aus Kotproben von Pferden isoliert und nach seinem Wirt benannt, leider wurde die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika aber nicht thematisiert (Poppel et al. 2016). Eine retrospektive Studie der Universität Zürich aus dem

gleichen Jahr beschäftigte sich mit dem Vorkommen multiresistenter Gram-negativer Bakterien, u.a. bei Pferden, wobei *A. baumannii* die höchste Rate an Multiresistenz aufwies. Dabei wurde Multiresistenz als Resistenz gegen 3 oder mehr Antibiotikaklassen definiert. Die häufigste Infektionsart wurde im Zusammenhang mit chirurgischen Eingriffen festgestellt, gefolgt von Weichteilinfektionen und Infektionen des Bewegungsapparates. Die Isolate zeigten sich meist resistent gegen Aminoglykoside und Fluorchinolone, in einem Fall auch gegenüber Imipenem (van Spijk et al. 2016). Über die Verteilung der Sequenztypen bei equinen *A. baumannii*-Isolaten ist bisher nichts bekannt. Walther et al. fanden in Nasentupfern und Kotproben von 341 hospitalisierten Pferden neun *A. baumannii*, von denen ein Isolat erhöhte MHK-Werte gegenüber Gentamicin, Tetrazyklin, Tobramycin und Trimethoprim-Sulfamethoxazol aufwies. Die Sequenztypen der Isolate wurden nicht untersucht (Walther et al. 2018).

Tabelle 3: Übersicht über Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* spp. von Pferden

Art	Anzahl Isolate	Carbapenemase	Carbapenem-Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Ag</i>	2	OXA-23	IMP, MEM	-	-	(Smet et al. 2012)
<i>Ab</i>	1	-	IMP	-	-	(van Spijk et al. 2016)

IMP = Imipenem, **MEM** = Meropenem, **Ag** = *A. gandensis*, **Ab** = *A. baumannii*, - = unbekannt

2.5.3.3 Rinder

Die ersten Berichte über *Acinetobacter* spp. bei Rindern stammen aus dem Jahr 1982. Mathewson et al. berichten über zwei *A. calcoaceticus*-Isolate aus 3.474 klinischen Proben (Mathewson und Simpson 1982). Über weitere *A. calcoaceticus*-Isolate berichten Rahman et al. und Diker et al. in den Jahren 1985 und 1986. Die Isolate wurden aus klinischen Fällen von Mastitis und Metritis isoliert (Rahman und Baxi 1985; Diker et al. 1986). In einer Studie aus dem Jahr 2008 wurden 390 Proben aus Ohren, Nasen und Kot von Rindern in schottischen Schlachthöfen entnommen und sechs *A. baumannii*-Isolate aus Kot und zwei aus Nasentupfern isoliert. Keine *A. baumannii* konnten von Ohrtupfern, Hauttupfern, Milch oder Fleischprodukten isoliert werden (Hamouda et al. 2008; Hamouda et al. 2011). Im Gegensatz dazu wiesen Ercolini et al. *A. baumannii* in tiefgefrorenem Fleisch nach (Ercolini et al. 2009). Nam et al. konnten in einer Studie, die sich über sechs Jahre erstreckte, *A. junii* und *A. lwoffii* aus Mastitiden isolieren (Nam et al. 2009). Der erste Nachweis eines Carbapenem-

resistenten *Acinetobacter*-Isolates wurde im Jahr 2012 veröffentlicht (siehe **Tabelle 4**). Poirel et al. berichteten über einen OXA-23 produzierenden *A. variabilis* (ursprünglich Genomspesies 15TU) mit einer Tn2008-Struktur aus einer Kotprobe (Poirel et al. 2012). Kurz darauf berichteten Lupo et al. über eine hohe Prävalenz (12 %) von *A. baumannii* in Rindfleisch aus der Schweiz (Kalb 18 %, Rind 6 %). Eine Resistenz gegen Carbapeneme konnte nicht festgestellt werden, ebenso wenig eine Zugehörigkeit zu IC1-IC8. Die MLST-Ergebnisse der Stämme (inkl. Isolate aus Geflügel- und Schweinefleisch) spiegelten eine große Diversität mit 29 verschiedenen STs (davon 24 neue STs) wieder. Nur ein einziger ST (ST109) war vorher bereits mit humanen klinischen Isolaten assoziiert worden. Außerdem war der klonale Komplex CC32 (ST357) vertreten, der bereits für Ausbrüche nosokomialer Infektionen beim Menschen verantwortlich gemacht worden war (Da Silva et al. 2014; Lupo et al. 2014). Eine weitere vom Rind isolierte *Acinetobacter* spp. ist *A. gandersis*. Carbapenem-resistente Vertreter dieser Spezies konnten bereits von Pferden isoliert werden, beim Rind ist dies noch nicht berichtet worden (Smet et al. 2012; Smet et al. 2014). Das erste bovine *A. baumannii*-Isolat mit dem klinisch bedeutsamen ST2 wurde von Al Bayssari et al. im Libanon isoliert. Dieses Isolat war zudem Träger von OXA-23 und Carbapenem-resistent (Al Bayssari et al. 2015). Ebenfalls im Libanon untersuchten Rafei et al. *Acinetobacter* von Rindern und anderen Tierarten. Es konnten 17 *A. baumannii*, 14 *A. pittii*, vier *A. calcoaceticus*, ein *A. beijerinckii*, zwei *A. variabilis* und 20 potentiell neue *Acinetobacter* spp. von Rindern isoliert werden. Erneut wiesen die Isolate eine sehr hohe Diversität bezüglich ihrer Sequenztypen auf (Rafei et al. 2015). Neben dem Nachweis aus direkten Proben von Tieren oder aus Fleisch ist es bereits gelungen, *Acinetobacter* spp. aus tierassoziierten Umweltproben zu isolieren. So konnten Fernando et al. sowohl *A. baumannii* als auch *A. indicus* aus Oberflächenwasser und Gülle isolieren (Fernando et al. 2016). Im Jahr 2016 wurde erstmals über ein OXA-24/-40 positives, Carbapenem-resistentes *A. baumannii*-Isolat aus einem Maultupfer von einem Rind berichtet. In der Studie wurden auf La Réunion sechs Tiere beprobt, von denen fünf *A. baumannii* trugen. Jedes Isolat hatte einen anderen Sequenztyp und vier waren bisher noch nicht beschrieben. Das Carbapenem-resistente Isolat gehörte zu ST587 (Pailhoriès et al. 2016). Ein weiteres *A. baumannii*-Isolat (ST742, OXA-497) wurde 2016 von Webb et al. bei einer Untersuchung von 159 Kotproben in den USA isoliert (Webb et al. 2016).

Tabelle 4: Übersicht über Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* spp. von Rindern

Art	Anzahl Isolate	Carbapenemase	Carbapenem -Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Av</i>	1	OXA-23	DPM, IMP, MEM	-	-	(Poirel et al. 2012)
<i>Ab</i>	1	OXA-23	IMP	2	2 ^{Past}	(Al Bayssari et al. 2015)
<i>Ab</i>	1	OXA-24/-40	-	-	587 ^{Past}	(Pailhoriès et al. 2016)

DPM = Doripenem, **IMP** = Imipenem, **MEM** = Meropenem, **Av** = *A. variabilis*, **Ab** = *A. baumannii*, **Past** = Pasteur-Schema, - = unbekannt

2.5.3.4 Schweine

Auch bei Schweinen konnten *Acinetobacter* spp. bereits nachgewiesen werden. Hamouda et al. untersuchten 247 Schweine in Schottland (Ohr, Nase, Haut, Kot) und konnten acht *A. baumannii* isolieren. Die Isolate zeigten keine erhöhte Resistenz gegen Carbapeneme und unterschieden sich phylogenetisch von humanen Isolaten (Hamouda et al. 2008). Im Jahr 2009 gelang Byrne-Bailey et al. der Nachweis von *A. baumannii* aus Bodenproben von mit Schweinedung behandelten Feldern. Der Fokus dieser Studie lag auf der Untersuchung von Resistenzen gegen Sulfonamide und unter den Trägern von Sulfonamid-Resistenzgenen war *Acinetobacter* die häufigste Gattung. Neben weiteren Spezies konnte auch *A. baumannii* nachgewiesen werden (Byrne-Bailey et al. 2009). Der erste Nachweis eines Carbapenem-resistenten Isolates stammt aus dem Jahr 2013 (siehe **Tabelle 5**). Zhang et al. konnten bei der Untersuchung von 1.293 Proben aus Schweinen, Hühnern und Enten aus China einen *A. baumannii*-Stamm isolieren, der das Neu-Delhi-Metalloprotease-Gen *bla*_{NDM-1} trug und einen Carbapenem-resistenten Phänotyp zeigte. Das Schwein, aus dem der Erreger stammte, zeigte vorberichtlich eine Pneumonie und Sepsis, sowie eine Vorbehandlung mit Betalaktam-Antibiotika, Aminoglykosiden und Chinolonen (Zhang et al. 2013). Lupo et al. konnten Carbapenem-empfindliche *A. baumannii* außerdem in drei von 50 Schweinefleischproben aus der Schweiz nachweisen (Lupo et al. 2014). Al Bayssari et al. isolierten im Libanon ein Carbapenem-resistentes, *bla*_{OXA-23}-positives *A. baumannii*-Isolat des neuen ST491 aus der Kotprobe eines Schweins (Al Bayssari et al. 2015). Keine Carbapenem-Resistenz konnte hingegen von McLellan et al. in *Acinetobacter* spp. aus 60 Schweinefleisch-Proben in Australien festgestellt werden. *A. baumannii* war in dieser Studie jedoch der häufigste

Erreger mit Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der dritten Generation (McLellan et al. 2018).

Tabelle 5: Übersicht über Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* spp. von Schweinen

Art	Anzahl Isolate	Carbapene-mase	Carbapenem -Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Ab</i>	1	NDM-1	IMP, MEM	-	-	(Zhang et al. 2013)
<i>Ab</i>	1	OXA-23	IMP	-	491 ^{Past}	(Al Bayssari et al. 2015)

IMP = Imipenem, **MEM** = Meropenem, **Ab** = *A. baumannii*, **Past** = Pasteur-Schema, - = unbekannt

2.5.3.5 Geflügel

Der erste Bericht von *Acinetobacter* spp. bei Geflügel stammt aus dem Jahr 1988. Erganis et al. berichten über einen Fall von Septikämie bei Hühnern durch *A. calcoaceticus* (Erganis et al. 1988). Ein ähnlicher Fall wird 1989 in Zusammenhang mit einer Infektion mit *A. Iwoffii* gebracht (Kaya et al. 1989). Über zwei Jahrzehnte später berichten Wang et al. ebenfalls von einem Nachweis von *A. Iwoffii* aus einem Huhn, isoliert aus einem Kloaken-Tupfer im Rahmen einer Beprobung von 146 Hühnern in China. Dieses Isolat war resistent gegen Carbapeneme (siehe **Tabelle 6**) und trug *bla*_{NDM-1} auf einem Plasmid (Wang et al. 2012). Eine besonders hohe Prävalenz wiesen Lupo et al. in Geflügelfleisch aus der Schweiz nach. Von 94 Proben aus Hühnerfleisch waren 43 positiv für *A. baumannii*, von vier Proben aus Putenfleisch sogar alle. Carbapenem-resistente Isolate konnten hier nicht nachgewiesen werden (Lupo et al. 2014). Im Rahmen der oben bereits mehrfach erwähnten Studie konnten Al Bayssari et al. drei Carbapenem-resistente Stämme aus Kotproben von Geflügel isolieren (siehe **Tabelle 6**). Davon gehörten zwei zu den neuen ST492 und ST493 und trugen *bla*_{OXA-23}. Ein Isolat war zusätzlich noch Träger von *bla*_{OXA-58} und gehörte zum ST20 (Al Bayssari et al. 2015). Eine weitere Publikation aus China berichtet über die Isolierung eines *A. baumannii*-Stammes aus einem seuchenhaften Geschehen bei Küken, der ebenfalls Carbapenem-resistent war (siehe **Tabelle 6**) (Liu et al. 2016b). Eine umfangreiche Studie aus dem Jahr 2017 untersuchte das Vorkommen von *A. baumannii* bei Geflügel in Deutschland. Die Autoren konnten aus 220 Hühnern sechs *A. baumannii* isolieren. Diese zeigten weder Resistenzen gegenüber Carbapenemen noch waren sie den IC1-IC8 zuzuordnen. Gleiches galt

für drei Isolate aus 40 Gänsen (Wilharm et al. 2017). Die Untersuchung von Hühnerfleisch in Australien zeigte, dass *A. baumannii* den größten Anteil an Bakterien ausmachte, die gegen Cephalosporine der dritten Generation resistent waren. Keines der 34 Isolate aus 60 Proben zeigte jedoch Resistenzen gegen Carbapeneme (McLellan et al. 2018).

Tabelle 6: Übersicht über Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* spp. von Geflügel

Art	Anzahl Isolate	Carbapene-mase-Gen	Carbapenem -Resistenz	IC	ST	Referenz
<i>Al</i>	1	NDM-1	IMP, MEM	-	-	(Wang et al. 2012)
<i>Ab</i>	3	OXA-23, OXA-58	IMP	-	20 ^{Past} , 492 ^{Past} , 493 ^{Past}	(Al Bayssari et al. 2015)
<i>Ab</i>	1	unbekannt	IMP	-	-	(Liu et al. 2016b)

IMP = Imipenem, **MEM** = Meropenem, **Al** = *A. lwoffii*, **Ab** = *A. baumannii*, **Past** = Pasteur-Schema, - = unbekannt

2.5.3.6 Nachweise aus weiteren Tieren

Auch bei Zoo- und Wildtieren konnten *Acinetobacter* spp. nachgewiesen werden, die zum Teil auch Carbapenem-Resistenzen aufwiesen (siehe **Tabelle 7**). Iverson et al. berichten im Jahr 1981 von einem Orang-Utan in den USA, der an einer chronischen Atemwegserkrankung starb. Im Rahmen der pathologischen Untersuchung konnte *A. calcoaceticus* var. *lwoffii* nachgewiesen werden (Iverson und Connolly 1981). Im Jahr 1986 wurde *A. calcoaceticus* mit Aborten bei Wasserbüffeln in Zusammenhang gebracht (Das und Paranjape 1986). Bei der systematischen Untersuchung von 232 Isolaten Gram-negativer Bakterien aus einem japanischen Zoo konnte ein Carbapenem-sensibler *A. baumannii*-Stamm aus dem Kot eines Vogels isoliert werden (Ahmed et al. 2007). Von einer hohen *A. baumannii*-Prävalenz wurde in einer Studie aus Nigeria berichtet, bei der die Autoren Proben an Feldern sammelten, an denen Abwässer verrieselt wurden. Aus 48 Kotproben von Wildvögeln wurden 15 *A. baumannii* isoliert. Die Isolate wurden weder auf ihre phylogenetischen Eigenschaften noch hinsichtlich ihrer Carbapenem-Resistenz untersucht. Allerdings konnten Resistenzen gegenüber Gentamicin und dem Fluorchinolon Pefloxacin nachgewiesen werden (Dahiru und Enabulele 2015). Im gleichen Jahr isolierten Rafei et al. ein Carbapenem-resistentes *A. pittii* Isolat aus dem Maul eines Kaninchens. Weitere Carbapenem-resistente Isolate wurden 2016 in Fischen gefunden. Brahmi et al. fanden in

300 Proben aus Fischen aus dem Mittelmeer zwei *A. baumannii*-Isolate, die das *bla*_{OXA-23}-Gen trugen und dem ST2 zugeordnet werden konnten (Brahmi et al. 2016). Ein weiteres Carbapenem-resistentes Isolat konnte 2017 von einem Schwarzhalssschwan in Brasilien nachgewiesen werden. Es wurde bei einer Beprobung von 37 Schwänen isoliert, als *A. seifertii* differenziert und war Träger des *bla*_{OXA-58}-Gens. Interessanterweise zeigte das Isolat ein identisches PFGE-Muster zu brasilianischen Isolaten, die in den 90er Jahren isoliert wurden (Narciso et al. 2017). Neben den oben erwähnten Geflügelproben untersuchten Wilharm et al. auch Proben von Störchen. Im Zeitraum von 2012-2016 sammelten die Autoren 745 Proben von 661 Störchen und konnten 212 *A. baumannii*-Isolate von 187 Störchen kultivieren. Das entspricht einer Isolationsrate von 25 %, die in einzelnen Regionen und Zeiträumen aber auch deutlich höher lag (bis zu 48 % in 2015). Die Isolate konnten weder den IC1-IC8 zugeordnet werden, noch zeigten sie erworbene Resistenzen gegen antimikrobielle Wirkstoffe inklusive Carbapenemen (Wilharm et al. 2017). Unsere Arbeitsgruppe konnte ein *A. baumannii*-Isolat aus einem Graupapagei mit einer Atemwegserkrankung charakterisieren. Dabei konnte eine Carbapenem-resistenz aufgrund von OXA-72 nachgewiesen werden (Klotz et al. 2018). Linz et al. berichten zum ersten Mal von einer durch *A. baumannii* verursachten seuchenhaften klinischen Erkrankung in Schafen, die zum Tod von 473 von 1.200 Tieren führte. Der isolierte *A. baumannii*-Stamm war Träger von *bla*_{PER-1} und *bla*_{OXA-23} (Linz et al. 2018).

Tabelle 7: Übersicht über Carbapenemase-produzierende *Acinetobacter* spp. von weiteren Tierarten

Art	Anzahl Isolate	Wirt	Carbapenemase	Carb.-Res.	IC	ST	Referenz
Ap	1	Kaninchen	OXA-24/40	DPM, IMP, MEM	-	-	(Rafei et al. 2015)
Ab	2	Fisch	OXA-23	DPM, IMP, MEM	2	2 ^{Past}	(Brahmi et al. 2016)
As	1	Schwan	OXA-58	IMP, MEM	-	-	(Narciso et al. 2017)
Ab	1	Schaf	OXA-23, PER-1	-	2	2 ^{Past} , 452 ^{Ox}	(Linz et al. 2018)
Ab	1	Grau-papagei	OXA-72	IMP, MEM	-	294 ^{Past}	(Klotz et al. 2018)

DPM = Doripenem, **IMP** = Imipenem, **MEM** = Meropenem, **Ab** = *A. baumannii*, **Past** = Pasteur-Schema, - = unbekannt, **Carb.-Res.** = Carbapenem-Resistenz

2.6 *Acinetobacter* als Zoonoseerreger

Als Zoonosen werden im Allgemeinen Krankheiten bezeichnet, die zwischen Mensch und Tier übertragbar sind (entweder vom Menschen auf das Tier (Anthropozoonose) oder vom Tier auf den Menschen (Zooanthroponose)). Dies ist über direkten Kontakt oder über Vektoren möglich. Mögliche Übertragungswege von Infektionserregern vom Tier auf den Menschen sind beispielsweise i) Bisse oder Kratzer, ii) mit tierischen Fäkalien verunreinigte Lebensmittel (primär tierischen Ursprungs), iii) direkter Kontakt mit Haustieren oder Nutztieren, iv) Arthropoden (Fliegen, Mücken, Läuse, etc.), und v) Übertragung über kontaminierten Boden oder Wasser (Cantas und Suer 2014). Die Übertragung antibiotikaresistenter Bakterien vom Tier auf den Menschen ist bei einigen Bakterienarten bereits belegt, etwa bei Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRS) (Cuny et al. 2015). Wie oben deutlich wird, wurden *Acinetobacter* spp. bereits bei Fischen, Vögeln und Säugetieren (inkl. Mensch) nachgewiesen. Dabei sind bestimmte Arten, allen voran *A. baumannii*, auch mit klinischen Erkrankungen assoziiert. Insbesondere nosokomiale Erreger in der Kleintiermedizin unterscheiden sich in ihren phylogenetischen Charakteristika und Resistenzeigenschaften oft nicht von humanen klinikassoziierten Isolaten. Ein konkreter Fall der Übertragung von *A. baumannii* vom Tier auf den Menschen oder umgekehrt wurde

bisher aber noch nicht beschrieben. Dem Erreger wird daher bisher kein gesichertes zoonotisches Potential zugesprochen (EFSA 2015). Trotzdem bezeichnen mehrere Autoren das Vorkommen von Carbapenem-resistenten Isolaten bei Tieren als Gefahr für die öffentliche Gesundheit, nicht zuletzt aufgrund der Gefahr einer Übertragung von Resistenzgenen (Smet et al. 2012; Guerra et al. 2014; Müller et al. 2014; Damborg et al. 2016; Pomba et al. 2017). Tatsächlich schätzt die *“European Food Safety Authority”* (EFSA) das Vorkommen und die mögliche Ausbreitung Carbapenemase-produzierender Bakterien in lebensmittelliefernden Tieren als wichtig für die Einschätzung des zoonotischen Potentials eines Erregers ein.

Nach dem Durchführungsbeschluss 2013/652/EU ist nur eine Untersuchung auf ESBL- und AmpC-positive *Escherichia coli* und *Salmonella* spp. für alle Mitgliedsstaaten verpflichtend, die Untersuchungen auf Carbapenemase-Produktion sowie *Acinetobacter* spp. sind es hingegen nicht. (EFSA 2013; European Commission 2013). Seit 2017 wird in Deutschland bundesweit auf freiwilliger Basis bei den im Beschluss 2013/652/EU genannten Erregern auf Carbapenemase-Produktion hin untersucht.

2.7 Pathogenese und Virulenz von *Acinetobacter*

Die Entstehung und Entwicklung einer Krankheit wird durch den Begriff der Pathogenese beschrieben. Der Vorgang der Pathogenese ist einerseits von Faktoren des Erregers (z.B. die Anheftungsfähigkeit oder die Fähigkeit zur Toxinbildung), andererseits von Faktoren des Wirts abhängig (z.B. Faktoren des Immunsystems). Die Virulenz eines Stammes beschreibt seine Eigenschaft den Wirtsorganismus in einem bestimmten Ausmaß zu schädigen (quantitativer Begriff). Im deutschen Sprachgebrauch wird davon die Pathogenität abgegrenzt, die sich auf die grundlegend krankmachende Eigenschaft des Erregers in Abhängigkeit von einem Wirt bezieht (qualitativer Begriff). Im englischen Sprachgebrauch werden die Begriffe Pathogenität („pathogenicity“) und Virulenz („virulence“) häufig gleichbedeutend gebraucht (Selbitz et al. 2013). Wie *Acinetobacter* zu einer Erkrankung führen, ist noch nicht im Detail verstanden. Vermutlich spielt die Fähigkeit, dem Komplementsystem und der Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten zu entkommen, eine Schlüsselrolle. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Polysaccharid-Kapsel (Li et al. 2019). Im Anschluss kann es dann zu einer durch LPS verursachten, Toll-like Rezeptor 4 (TLR4)-vermittelten Sepsis kommen (Wong et al. 2017).

Faktoren, die diese und weitere Mechanismen ermöglichen, wurden bereits in zahlreichen Studien identifiziert und werden als Virulenzfaktoren bezeichnet, die im folgenden Abschnitt näher beschrieben werden (siehe **Tabelle 8**). Aufgrund der großen Bedeutung von *A. baumannii* beschränken sich Studien zu diesem Thema aber meist auf diese Spezies.

2.7.1 Virulenzfaktoren

Ein Hauptfaktor der Virulenz von *A. baumannii* ist die Kapsel, möglicherweise als Mittel der Immunevasion (Russo et al. 2010; Wong et al. 2017). Vieles deutet außerdem darauf hin, dass das Oberflächenprotein OmpA eine zentrale Rolle in der Pathogenese im Rahmen der Anheftung des Erregers an das Epithel, sowie für die Einleitung der Apoptose der Wirtszelle spielt (Choi et al. 2008). Obwohl die Spezies ursprünglich als unbeweglich angesehen wurde (akinetos: griechisch für unbeweglich), sind inzwischen verschiedene Mechanismen bekannt, die *A. baumannii* eine Fortbewegung ermöglichen. Neben der „twitching motility“ (Lautrop 1962) wird über eine „surface associated motility“ (Henrichsen und Blom 1975) berichtet. Faktoren wie Typ-IV-Pili (Mattick 2002), die im Zusammenhang mit diesen Mechanismen stehen, werden als Virulenzfaktoren diskutiert, etwa im Kontext mit der Überwindung von Wirtsbarrieren oder der Ausbreitung in bestimmten Organen. Als weiterer Virulenzmechanismus wird die Biofilmbildung von *A. baumannii* gesehen. Dabei bietet die Formation von Mono- und Multispezies-Biofilmen dem Erreger einen erhöhten Schutz gegen Therapeutika und Immunreaktionen des Wirtes. Dies spielt einerseits bei der Verbreitung über medizinische Apparaturen und Einrichtungsgegenstände, andererseits bei der Besiedlung von Wunden und Implantaten eine Rolle (Wand et al. 2012). Ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen bakterielle Infektionen ist die Bindung essentieller Nährstoffe wie Zink, Kupfer und Eisen. Dadurch stehen diese dem bakteriellen Stoffwechsel nicht mehr zur Verfügung. Daher sind z.B. Eisenakquisitions-Systeme, die die Aufnahme eines dieser Nährstoffe erleichtern, wichtige Virulenzdeterminanten von *A. baumannii* (Gaddy et al. 2012). Faktoren, die bei Zielzellen zu einer Apoptose führen können werden ebenfalls als potentielle Virulenzfaktoren betrachtet. Dazu gehören neben bereits genannten OmpA-Proteinen, oft in Verbindung mit Outer-membrane-vesicles (Jun et al. 2013), auch Phospholipasen (Stahl et al. 2015). Obwohl kein klassischer Virulenzfaktor, so hat doch die Antibiotikaresistenz eines Stammes einen signifikanten Einfluss auf die Letalität einer

Infektion. Grund hierfür ist vermutlich der entscheidende Einfluss auf den Therapieerfolg im nosokomialen Umfeld (Wong et al. 2017).

Tabelle 8: Wichtige Virulenzfaktoren von *A. baumannii*, die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt wurden

Gen	Produkt	Funktion	Referenz
<i>plc1</i>	Phospholipase C1	Zytotoxizität	(Fiester et al. 2016)
<i>plc2</i>	Phospholipase C2	Zytotoxizität	(Fiester et al. 2016)
<i>pld1</i>	Phospholipase D1	Zytotoxizität	(Jacobs et al. 2010; Stahl et al. 2015)
<i>pld2</i>	Phospholipase D2	Zytotoxizität	(Jacobs et al. 2010; Stahl et al. 2015)
<i>pld3</i>	Phospholipase D3	Zytotoxizität	(Jacobs et al. 2010; Stahl et al. 2015)
<i>bauA</i>	Acinetobactin Membranprotein	Eisenaufnahme	(Gaddy et al. 2012)
<i>tssM</i>	Typ 6 Sekretionsprotein	Interpezies-Kompetenz	(Repizo et al. 2015)
<i>atA</i>	Autotransporter Adhesin	Adhäsion	(Weidensdorfer et al. 2015)
<i>surA1</i>	Oberflächenantigen 1	unbekannt	(Liu et al. 2016a)
<i>adeRS</i>	Regulator Protein Effluxpumpe	Genregulation	(Richmond et al. 2016)
<i>adeAB</i>	Protein Effluxpumpe	Antibiotikaresistenz	(Richmond et al. 2016)
<i>arpA</i>	Protein Effluxpumpe	Phasenvariation	(Tipton et al. 2017)
<i>arpB</i>	Protein Effluxpumpe	Phasenvariation	(Tipton et al. 2017)
<i>sod2343</i>	Superoxid-Dismutase B	Abwehr oxidativer Stress	(Heindorf et al. 2014)
<i>comEC</i>	DNS Aufnahmekanal Protein	DNS Aufnahme	(Wilharm et al. 2013)
<i>ompA</i>	Äußeres Membranprotein A	Zytotoxizität, Adhäsion	(Schweppe et al. 2015)
<i>omp33</i>	Äußeres Membranprotein 33	Zytotoxizität, Adhäsion	(Smani et al. 2013)
<i>epsA</i>	Kapselprotein	Immunevasion	(Russo et al. 2010)
<i>ptk</i>	Kapselprotein	Immunevasion	(Russo et al. 2010)
<i>znuA</i>	Zink-Aufnahmesystem	Zinkaufnahme	(Gebhardt et al. 2015)
<i>znuB</i>	Zink-Aufnahmesystem	Zinkaufnahme	(Gebhardt et al. 2015)
<i>znuC</i>	Zink-Aufnahmesystem	Zinkaufnahme	(Gebhardt et al. 2015)
<i>cpaA</i>	CpaA Metalloprotease	Immunevasion	(Tilley et al. 2014)
<i>lipA1</i>	Lipase	Aufbau von LOS	(Johnson et al. 2015)
<i>csuA</i>	Csu Pilus Untereinheit A	Biofilmbildung	(Tomaras et al. 2003)
<i>csuB</i>	Csu Pilus Untereinheit B	Biofilmbildung	(Tomaras et al. 2003)
<i>csuC</i>	Csu Pilus Untereinheit C	Biofilmbildung	(Tomaras et al. 2003)

Fortsetzung Tabelle 8: Wichtige Virulenzfaktoren von *A. baumannii*, die im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigt wurden

Gen	Produkt	Funktion	Referenz
<i>csuD</i>	Csu Pilus Untereinheit D	Biofilmbildung	(Tomaras et al. 2003)
<i>csuE</i>	Csu Pilus Untereinheit E	Biofilmbildung	(Tomaras et al. 2003)
<i>bap</i>	Biofilm-assoziiertes Protein (Bap)	Biofilmbildung	(Loehfelm et al. 2008)
<i>blp1</i>	Bap-ähnliches Protein	Biofilmbildung	(Gregorio et al. 2015)
<i>blp2</i>	Bap-ähnliches Protein	Biofilmbildung	(Gregorio et al. 2015)
<i>pilA</i>	Typ 4 Pilus Untereinheit A	Motilität, Adhäsion	(Eijkelkamp et al. 2011)

2.7.2 Methoden zur Untersuchung der Virulenz

Zur Untersuchung der Virulenz von *A. baumannii* wurden verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Methoden etabliert, von denen die Wichtigsten im Folgenden beschrieben werden.

2.7.2.1 *In vivo*-Methoden

2.7.2.1.1 Maus

Für *A. baumannii*-Infektionen ist die Maus, wie auch in vielen anderen Bereichen der tierexperimentellen Forschung, die wichtigste Spezies. Sie wird unter anderem in Modellen für Pneumonien, Weichteilinfektionen und Septikämien eingesetzt (McConnell et al. 2013). So untersuchten Jacobs et al. (2010) die Bedeutung des Virulenzfaktors Phospholipase D (kodiert durch das Gen *pld*, siehe **Tabelle 8**) im Tiermodell. Dabei wurden acht Wochen alte C57BL/6-Mäuse intranasal mit 30 µl Bakteriensuspension ($3,6 \times 10^8$ koloniebildende Einheiten (KbE) der Wildtyp-Stämme bzw. $3,8 \times 10^8$ KbE der *pld*-Mutanten) infiziert. Die Mäuse wurden nach 24 h oder 48 h euthanasiert und die Bakterienanzahl in Blut, Lunge, Herz und Leber wurde ermittelt. Außerdem wurden histopathologische Untersuchungen der Organe durchgeführt. Die Autoren konnten zeigen, dass nach 48 h einer Infektion mit *pld*-Mutanten gegenüber der Infektion mit Wildtypstämmen deutlich geringere Bakterienzahlen in Blut, Herz und Leber nachweisbar waren. Daraus wurde gefolgert, dass die Phospholipase D als Virulenzfaktor einerseits für die Ausbreitung des Erregers über das Blut, andererseits für eine Persistenz in verschiedenen Organen von Bedeutung ist (Jacobs et al. 2010). Um die Bedeutung von Acinetobactin (kodiert durch das Gen *bauA*, siehe **Tabelle 8**) zu untersuchen, verwendeten Gaddy et al. (2012) ein Maus-Septikämiemodell. Hierbei wurden C57BL/6 Mäuse intraperitoneal mit dem *A. baumannii*-Typstamm ATCC 19606 sowie *bauA*-Mutanten

infiziert. Es zeigte sich, dass sowohl die Bakterienzahl in den Geweben als auch die Sterblichkeit bei der Infektion mit dem Typstamm höher war als bei den Mutanten. Die Autoren leiten daraus eine Bedeutung von Acinetobactin für die Virulenz von *A. baumannii* ab (Gaddy et al. 2012). Studien zum systematischen Vergleich der Virulenz verschiedener *A. baumannii* Genotypen in einem Maus-Modell existieren bislang nicht.

2.7.2.1.2 *Caenorhabditis elegans*

Der Nematode *Caenorhabditis* (*C.*) *elegans* ernährt sich von Bakterien und wurde ebenfalls für die Untersuchung von *A. baumannii* eingesetzt. Neben dem Überleben des Modell-Organismus wird das Wachstum des Wurms gemessen, oder die Anzahl der gelegten Eier bestimmt, um die Virulenz von *A. baumannii*-Stämmen quantitativ vergleichen zu können. So analysierten Smith et al. 1.324 Mutanten in diesem Modell und konnten dadurch unter anderem Hinweise auf die Relevanz des Typ IV-Sekretionssystems, der Eisenakquisitionssysteme und der Fimbriengene finden (Smith et al. 2007). Espinal et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Resistenzmechanismen auf die Virulenz in diesem Modell. Sie konnten zeigen, dass Carbapenem-resistente Isolate keine Unterschiede in der Virulenz zu den isogenen Carbapenem-empfindlichen Stämmen zeigten. Der Verlust von äußeren Membranproteinen und LPS (der auch eine Colistin-Resistenz bedingte) führte hingegen zu einem signifikanten Abfall der Virulenz (Espinal et al. 2019).

2.7.2.1.3 *Galleria mellonella*

Ein weiteres Invertebraten-Modell ist die Große Wachsmotte *Galleria mellonella*. Hierbei kann anhand der Sterblichkeit der Mottenlarven nach Injektion einer Bakteriensuspension in das Coelom die Virulenz des Erregers abgeschätzt werden. Weiterhin kann durch Administration von Antibiotika in infizierte Raupen die Wirksamkeit von antimikrobiellen Substanzen *in vivo* abgeschätzt werden. Erstmals wird dieses Modell von Peleg et al. im Jahr 2009 für *A. baumannii* angewendet. Die Autoren konnten zeigen, dass diese Spezies im Vergleich zu *A. baylii* und *A. lwoffii* schneller eine größere Anzahl an Motten tötet, woraus sie eine höhere Virulenz ableiteten. Außerdem war es möglich, die Motten nach Infektion mit verschiedenen antimikrobiellen Substanzen zu behandeln, damit die Überlebenszeit zu verlängern und die Effektivität der Wirkstoffe miteinander zu vergleichen (Peleg et al. 2009).

2.7.2.2 *In vitro*-Methoden

Neben den *in vivo*-Modellen werden auch *in vitro*-Zellkultur-Modelle zur Untersuchung der Virulenz von *A. baumannii* eingesetzt. Dabei werden häufig humane Lungenepithelzellen (A549) eingesetzt (Smani et al. 2012), es kommen aber auch Larynxepithelzellen (HEp-2), Zellen aus humanen Monozyten (U937) und Nierenzellen von grünen Meerkatzen (Cos-7) zum Einsatz (Choi et al. 2008). Unter Verwendung dieser Zellen werden die Zytotoxizität anhand von Laktatdehydrogenase (LDH)-Analysen oder Fluoreszenz-Mikroskopie sowie die Adhäsions- oder Invasionsfähigkeit der Erreger gemessen. Mit Hilfe dieser Methoden untersuchten Smani et al. die Virulenz Ciprofloxacin-resistenter und -sensibler *A. baumannii* Stämme und kamen zu dem Schluss, dass die Ausbildung des resistenten Phänotyps zu einer verminderten Virulenz führte. *In vitro*-Methoden eignen sich außerdem zur Aufklärung von zellulären Prozessen im Rahmen von *A. baumannii*-Infektionen. In der oben bereits erwähnten Studie von Choi et al. untersuchten die Autoren den Mechanismus, durch den das Oberflächenprotein OmpA zur Apoptose von Wirtszellen führen kann. Sie beschreiben im Detail, dass diese durch Translokation von OmpA in den Zellkern ausgelöst wird (Choi et al. 2008).

3 Forschungsfragen

Zu Beginn des Dissertationsprojektes lagen keine Daten zur Verbreitung und zu genomischen Eigenschaften von *Acinetobacter* spp. bei Nutztieren in Deutschland vor. Da in verschiedenen Studien aus jüngerer Vergangenheit über Carbapenem-resistente bovine *Acinetobacter* berichtet wurde und das Vorkommen dieser Gattung aus der institutseigenen Routinediagnostik bekannt war, wurden folgende Forschungsfragen formuliert:

3.1 Prävalenz

- Wie hoch sind die Prävalenzen von den Vertretern des *Acb*-Komplexes, d.h. *A. baumannii*, *A. pittii*, *A. nosocomialis*, und *A. calcoaceticus* (*A. seifertii* wurde erst 2015 und *A. dijkshoorniae* erst 2016 benannt und wurden nicht berücksichtigt) bei Rindern in Hessen?
- Gibt es Unterschiede in der Verteilung bzgl. der Landkreise, der Nutzungsart oder der Probenart?
- Gibt es Risikofaktoren für das Vorkommen der Erreger bei Rindern?

- Kommen weitere *Acinetobacter* spp. außerhalb des *Acb*-Komplexes bei Rindern vor?

3.2 Phylogenie

- Kommen bei Rindern *A. baumannii*-Isolate der klonalen Linien vor, die bei Menschen oder anderen Tierarten im Zusammenhang mit Krankenhaus-assoziierten Infektionen und antibiotikaresistenten Isolaten stehen?

3.3 Antibiotikaresistenz

- Zeigen *Acinetobacter*-Isolate von Rindern Resistenzen gegenüber bestimmten Antibiotika (speziell der Klasse der Carbapeneme)?
- Sind *Acinetobacter*-Isolate von Rindern Träger erworbener Antibiotika-Resistenzgene?
- Wie sind mögliche Resistenzgene hinsichtlich ihrer Mobilität und genetischen Umgebung organisiert?
- Gibt es Risikofaktoren für das Vorkommen von Resistenzgenen bei *Acinetobacter*-Isolaten von Rindern?

3.4 Virulenz

- Unterscheiden sich die *Acinetobacter* spp. von Rindern untereinander und zu Isolaten anderen Ursprungs?

3.5 Biofilmbildung

- Zeigen *Acinetobacter* spp. von Rindern Unterschiede in der Ausprägung von Biofilmen untereinander und zu Isolaten anderen Ursprungs?

4 Vorstellung der Publikationen

4.1 Publikation 1

“Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates”

Carbapenem-Resistenz und Pathogenität boviner *Acinetobacter indicus*-like-Isolate

Publiziert in PLOS ONE 12(2): e0171986

DOI 10.1371

Eingegangen: 20.09.2016

Angenommen: 30.01.2017

Zu Beginn der Dissertation stieß ich in Voruntersuchungen auf Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp., die als *A. indicus* identifiziert werden konnten. Die Ergebnisse der Untersuchung dieser Isolate finden sich in **Publikation 1**. Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Anhang.

Zusammenfassung (übernommen aus der Originalpublikation)

Nach der Isolierung *bla*_{OXA-23}-positiver *A. indicus* aus Probenmaterial von Rindern sollten die Isolate näher charakterisiert werden. Dies schloss genomische und phylogenetische Analysen, die Testung der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen sowie die Einschätzung der Pathogenität *in vitro* und *in vivo* ein. Hierzu wurden Nasen- und Rektaltupfer (n = 45) von Rindern aus Hessen auf Carbapenem-unempfindliche *Acinetobacter* spp. gescreent. Dabei wurden zwei Carbapenem-resistente *Acinetobacter* spp. aus den Nasenhöhlen zweier Kälber isoliert. MALDI-TOF-Massenspektrometrie und 16S rDNA-Sequenzierung identifizierten diese Isolate als „*A. indicus*-like“. Ein phylogenetischer Baum basierend auf partiellen *rpoB*-Sequenzen wies auf eine enge Verwandtschaft der beiden bovinen Isolate zu dem *A. indicus*-Stamm A648T und zu humanen klinischen *A. indicus*-Isolaten hin, während ein Gesamtgenomvergleich eine erhebliche intra-Spezies-Diversität aufdeckte. Hohe minimale Hemmkonzentrationen wurden für Carbapeneme und andere antibiotische Wirkstoffe beobachtet, eingeschlossen Fluorchinolone und Gentamicin. Ganzgenomsequenzierung und PCR-Mapping zeigten, dass *bla*_{OXA-23} bei beiden Isolaten chromosomal vorlag und von unterbrochenen Tn2008-Transposonstrukturen umgeben war. Da das pathogene Potential von *A. indicus* nicht bekannt ist, wurde dieses mit Hilfe des

Galleria (G.) *mellonella* Infektionsmodells und eines *in vitro*-Zytotoxizitätsassays unter Verwendung von A459 humanen Lungenepithelzellen untersucht. Im Vergleich zu dem humanen Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 17978 war die Pathogenität der beiden *A. indicus*-like-Isolate *in vivo* (*G. mellonella*-Modell) und *in vitro* (Zytotoxizitätsassay) erniedrigt. Verglichen mit dem *A. Iwoffii* Referenzstamm ATCC 15309 blieb die Pathogenität hingegen in beiden Modellen unverändert. Die verminderte Pathogenität von *A. indicus* im Vergleich zu *A. baumannii* korrelierte mit der Abwesenheit von Virulenzgenen, wie beispielsweise die Phospholipasen C1+C2, das Membranprotein BauA, die Effluxsystemproteine AdeRS und AdeAB oder der Autotransporter Ata. Das Auftreten Carbapenem-resistenter *A. indicus*-like Stämme vom Rind, die das *bla*_{OXA-23}-Gen auf mobilen genetischen Elementen tragen und eine genetische Verwandtschaft mit humanen klinischen Isolaten aufweisen, machen weitere Untersuchungen hinsichtlich des pathogenen Potentials, genomischer Charakteristika, zoonotischem Risiko und möglicher weiterer Quellen dieser neuen *Acinetobacter*-Spezies notwendig.

4.2 Publikation 2

„Seasonal occurrence and carbapenem susceptibility of bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany“

Jahreszeitliches Vorkommen und Carbapenem-Empfindlichkeit von bovinen *Acinetobacter baumannii* in Deutschland

Publiziert in *Frontiers in Microbiology* 2019 Feb22; 10:272

DOI: 10.3389/fmicb.2019.00272

Eingegangen am: 06.12.2018

Angenommen am: 01.02.2019

Publikation 2 fasst die Ergebnisse der unter **Kapitel 3.1** bis **Kapitel 3.3** genannten Forschungsfragen in Bezug auf *A. baumannii* zusammen. Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Anhang.

Zusammenfassung (übernommen aus der Originalpublikation)

Acinetobacter baumannii ist einer der Hauptursachen für nosokomiale Infektionen bei Menschen. Um die Prävalenz, Verteilung von Sequenztypen (STs) und antimikrobielle

Resistenz von Isolaten bei Rindern zu untersuchen, beprobten wir 422 Rinder, davon 280 Milchkühe, 59 Mastrinder und 83 Kälber, in einem Zeitraum von 14 Monaten. Metadaten, etwa über den vorhergehenden Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen und die Fütterung, wurden gesammelt um mögliche Risikofaktoren zu identifizieren. Die Bakterienisolate wurden mittels MALDI-TOF/MS und PCR identifiziert, die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde mit VITEK2 und Gradiententests beurteilt, Resistenzgene wurden mittels PCR identifiziert. Insgesamt trugen 15,6 % der Rinder *A. baumannii*, hauptsächlich in der Nase (60,3 % der *A. baumannii*-Isolate). Das Bakterium war häufiger in Milchkühen (21,1 %) als in Mastvieh (6,8 %) und Kälbern (2,4 %) vorhanden. Ein saisonales Auftreten konnte mit einem Hoch zwischen Mai und August gezeigt werden. Die Nachweishäufigkeit von *A. baumannii* war mit dem Einsatz von Cephalosporinen der dritten Generation sechs Monate vor der Beprobung assoziiert. Die Multilokus-Sequenztypisierung (Pasteur-Schema) deckte 83 verschiedene STs bei 126 Isolaten auf. Neun der bovinen STs waren zuvor mit humanen Infektionen in Verbindung gebracht worden. Außer den bei dieser Spezies bekannten intrinsischen Resistenzen zeigten die bovinen Isolate keine zusätzlichen Resistenzen gegen die getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe, eingeschlossen Carbapeneme. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Rinder kein Reservoir für nosokomiale *A. baumannii* sind, sondern eine höchst diverse Population dieser Spezies tragen. Trotzdem scheinen einige STs fähig zu sein, sowohl Rinder als auch Menschen zu besiedeln.

5 Zusätzliche Untersuchungen

Neben den Ergebnissen der Publikationen wurden im Rahmen dieser Dissertation weitere Untersuchungen durchgeführt, um die in **Kapitel 3** aufgeführten Fragen zu beantworten.

5.1 Methoden

5.1.1 Methoden entsprechend den Publikationen

Die Beschreibung folgender Methoden kann den Publikationen entnommen werden:

5.1.1.1 Publikation 1

- Identifikation von *Acinetobacter* spp.

- *Galleria mellonella*-Assay
- Ganzgenom-Sequenzierung
- Phylogenetische Analyse
- Untersuchung der Resistenzgene

5.1.1.2 Publikation 2

- Studiendesign
- Statistische Analyse der Metadaten
- Antibiotika-Empfindlichkeitsprüfung
- MLST-Analyse

5.1.2 Methoden ergänzend zu den Publikationen

5.1.2.1 MSP Erstellung und *in silico* Analyse

Zu Beginn der Arbeit im Jahr 2014 stand kein „mass spectrum profile“ (MSP) für die Spezies *Acinetobacter indicus* aus der Datenbank des Geräteherstellers zur Verfügung. Grund war, dass diese Art erst kurz zuvor, im Jahr 2012, erstmals benannt wurde. Im Rahmen der vorgelegten Studie konnten in den *Acinetobacter* spp.-Isolaten IHIT27630 und IHIT27599, die aus klinischen Proben von Kälbern isoliert wurden, Carbapenemase-Gene nachgewiesen werden. Die Isolate waren mit der damaligen Datenbank mit niedrigem Score als *A. calcoaceticus* identifiziert worden. Daraufhin wurden mit dem Microflex Massenspektrometer (Bruker, Bremen, Deutschland) und der Software Biotyper 3 ein MSP erstellt. Neben den beiden oben genannten Stämmen dienten die ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit aus Sammelkotproben gewonnenen Isolate IHIT29013 (01/2015, Wächtersbach), IHIT31223 (12/2015, Gedern) und IHIT31230 (01/2016, Edermünde) als Grundlage. Deren Spezieszugehörigkeit als *A. indicus* war zuvor mittels Ganzgenom-Sequenzierung bestätigt worden. Hierfür wurden die Sequenzen wie in **Publikation 1** beschrieben ermittelt und über die Internetseite <http://jspecies.ribohost.com/jspeciesws/> einer „Tetra Correlation Search (TCS)“ unterzogen. Dabei wird das Genom von Interesse mit einer Datenbank aus Referenzgenomen verglichen um einer Spezies zugeordnet werden zu können. Retrospektiv wurden alle im Rahmen der vorliegenden Studie gemessenen Spektren mit dem neu erstellten MSP abgeglichen und so weitere *A. indicus*-Isolate identifiziert. Pro Probe wurde

höchstens ein auf diese Weise identifiziertes Isolat dokumentiert, um im Sinne einer konservativen Schätzung die Berücksichtigung von Klonen auszuschließen.

5.1.2.2 Statistische Analyse der Daten aus dem *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Die statistische Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit der AG für Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs 10 durchgeführt. Es wurde das Programmpaket BMDP/Dynamic, Release 8.1, verwendet (Dixon 1992). Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte mit Hilfe einer Cox-Regression mit dem Programm 2L. Als Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0,05$ festgelegt.

5.1.2.3 Untersuchungen zur Biofilmbildung

Für die Biofilmuntersuchungen wurde ein Kristallviolett Mikrotiterplattentest in Anlehnung an die Calgary Biofilm-Methode (Ceri et al. 1999) durchgeführt wie von Martinez-Medina et al. beschrieben (Martinez-Medina et al. 2009). Es wurden Übernachtskulturen (LB- und M63-Medium) der jeweiligen Stämme auf eine OD₆₀₀ von 0,05 eingestellt und jeweils in einem Dreifachansatz in zwei 96-well Platten für 24 bzw. 48 Stunden bei 28°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Wachstum der Bakterien als OD₅₉₅ gemessen und der Biofilm nach mehreren Waschschritten mit Methanol fixiert. Anschließend folgten die Färbung mit Kristallviolett und die Messung der OD₅₇₀. Für die statistische Auswertung wurde der „*Specific Biofilm Formation* (SBF)“-Koeffizient verwendet (Niu und Gilbert 2004). Dieser errechnet sich aus der OD₅₇₀ der anhaftenden Bakterienzellen abzüglich des Leerwerts, geteilt durch die OD₅₉₅ des Bakterienwachstums nach Inkubation.

5.1.2.4 Statistische Analyse der Daten aus den Biofilmuntersuchungen

Für die statistische Auswertung wurde die Software IBM SPSS Statistics 22 (IBM, Armonk, USA) verwendet. Die Berechnung erfolgte mit einer univariaten GLM Analyse unter Verwendung des Bonferroni-Posthoc-Tests. Als Signifikanzgrenze wurde $p \leq 0,05$ festgelegt.

5.2 Ergebnisse in Ergänzung zu den Publikationen

5.2.1 Prävalenz von weiteren *Acinetobacter* spp.

Unter den systematisch erfassten *Acinetobacter* spp. des *Acb*-Komplexes konnten aus 1.197 Proben (422 Nasentupfer, 422 Rektaltupfer, 353 Sammelkotproben) neben der in **Publikation 2** beschriebenen 126 *A. baumannii* noch 20 *A. calcoaceticus*, drei *A. nosocomialis* und ein *A. pittii* nachgewiesen werden. Im Laufe der Untersuchungen stellte sich außerdem heraus, dass häufig *A. indicus* aus den Proben isoliert werden konnte und dieser Erreger auch Träger von Resistenzgenen war. Daher wurde im Nachhinein über die abgespeicherten Spektren der MALDI-TOF-Untersuchung die Anzahl der isolierten *A. indicus*-Isolate erfasst. So konnte die Prävalenz in den Tieren und den Sammelkotproben ermittelt werden. Von den systematisch erfassten *Acinetobacter* spp. war *A. indicus* die zweithäufigste Art nach *A. baumannii*. Von 422 Tieren waren 53 positiv (12,6 %) für *A. indicus*. In den Sammelkotproben zeigte *A. indicus* mit 17,8 % eine noch höhere Prävalenz. Da die pathogenetische Bedeutung der erst seit dem Jahr 2012 bekannten Spezies *A. indicus* zu Beginn der Untersuchung nicht klar war und sich erst im Laufe des Untersuchungszeitraumes eine auffallende Häufung der Isolierung dieser Spezies herausstellte, wurden nur 36 der 207 Isolate für spätere Untersuchungen konserviert. Die hohe Zahl von über 200 Isolaten erklärt sich dadurch, dass oftmals mehrere Isolate pro Tier oder Sammelkotprobe vorlagen. Eine Überprüfung auf Klonalität war aber nicht mehr möglich, da die Isolate zum Zeitpunkt der retrospektiven Auswertung nicht mehr als Kultur vorlagen. Von den 36 vorliegenden Isolaten wurden mittels PFGE drei als potentielle Klone identifiziert. Weiterhin wurden folgende *Acinetobacter* spp., die ebenso wie *A. indicus* nicht dem *Acb*-Komplex zugehörig waren, isoliert und asserviert: *A. guillouiae* (n = 8), *A. haemolyticus* (n = 4), *A. gernerii* (n = 4), *A. gandensis* (n = 3), *A. junii* (n = 1), *A. townneri* (n = 1) und *A. lwoffii* (n = 1).

5.2.2 Einflussfaktoren auf das Vorkommen von *A. indicus* bei Rindern

Analog zu **Publikation 2** wurden mögliche Einflussfaktoren auf die Prävalenz von *A. indicus* anhand der erhobenen Daten aus dem Fragebogen (siehe Anhang von **Publikation 2, Kapitel 13.2**) mittels einer logistischen Regression ermittelt. Wie in **Publikation 2** beschrieben, ließ sich für *A. baumannii* für (i) die Kategorie (Milch, Mast, Kalb), (ii) den Einsatz von Drittgeneration-Cephalosporinen auf dem Betrieb sowie (iii) dem Trimester der

Probennahme ein Zusammenhang mit der Prävalenz belegen. Im Unterschied dazu hatte das Trimester der Probennahme keinen signifikanten Einfluss auf die Prävalenz von *A. indicus* bei den beprobten Rindern (132 Isolate aus 53 Tieren, eingeschlossen retrospektiv identifizierte Isolate). Im Vergleich zwischen den verschiedenen Probenarten zeigten die Sammelkotproben die höchste Prävalenz (17,8 %), gefolgt von Nasentupfern (8,1 %) und Rektaltupfern (5,5 %). Die Prävalenz in den Sammelkotproben unterschied sich signifikant von den Nasentupfern und Rektaltupfern ($p < 0.0001$). Das Vorkommen des Erregers unterschied sich nicht statistisch signifikant zwischen den Kategorien Milch, Mast und Kalb. In der multiplen logistischen Regression zeigte die Variable „Fütterung mit Soja“ einen signifikanten positiven Zusammenhang mit der Nachweishäufigkeit von *A. indicus*, die Variable „Fütterung mit Heu“ hingegen einen signifikant negativen. Werden Variablen mit weniger als 200 Beobachtungen ausgeschlossen zeigen sich keine signifikanten Zusammenhänge. Eine größere Zahl an Tieren auf dem Betrieb konnte außerdem mit dem vermehrten Auftreten des Bakteriums in Sammelkot in Zusammenhang gebracht werden. Das Vorkommen von Carbapenemase-Genen war abhängig von (i) der Anwendung von Florfenicol auf dem Betrieb in den letzten sechs Monaten ($p = 0.031$), (ii) dem Einsatz von Sulfonamiden auf dem Betrieb innerhalb der letzten sechs Monate ($p = 0.045$) und (iii) der Häufigkeit der Anwendung von Antibiotika auf dem Betrieb ($p = 0.017$).

5.2.3 Resistenz gegen antimikrobielle Wirkstoffen und genetischer Hintergrund

Außer *A. indicus* zeigten andere *Acinetobacter* spp. keine Resistenzen gegen Carbapeneme und waren im PCR-basierten Screening auf Carbapenemase-Gene negativ. Von den 36 *A. indicus*-Isolaten, die als Kultur zur Verfügung standen, wuchsen 19 auf mit Meropenem angereichertem Mueller-Hinton (MH) Agar. Alle 36 Isolate waren gegenüber Amikacin und Polymyxin B empfindlich (CLSI 2014; EUCAST 2018). Hierbei ist zu beachten, dass für *Acinetobacter* spp. keine veterinärmedizinischen Grenzwerte vorliegen. Die Einteilung anhand der vorhandenen Normen kann also keine absolute Aussage bezüglich einer therapeutischen Wirksamkeit von antimikrobiellen Wirkstoffen bieten. Erhöhte MHK-Werte wurden bei einigen Isolaten für mehrere antimikrobielle Wirkstoffe beobachtet, wodurch ein Isolat als intermediär resistent gegen Gentamicin (MHK 8 mg/L) und ein Isolat intermediär resistent gegen Enrofloxacin (MHK 2 mg/L) eingestuft wurde. Ein Isolat wurde in der Analyse mit VITEK2 als resistent gegen Imipenem eingestuft (MHK 8 mg/L), was im E-test nicht

bestätigt werden konnte. Hier traten bei einigen Isolaten nur leicht erhöhte MHKs auf (0,25 - 3 mg/L). Die verminderte Empfindlichkeit gegenüber Imipenem war in neun von zehn Fällen mit dem Nachweis eines Carbapenemase-Gens assoziiert. Sieben Isolate waren positiv für *bla*_{OXA-23}-ähnliche, zwei Isolate für *bla*_{OXA-58}-ähnliche Gene. Im Folgenden wurden 22 *A. indicus*-Isolate Ganzgenom sequenziert, eingeschlossen alle Stämme mit erworbenen Oxacillinase-Genen und weitere 13 bovine Isolate als Vergleich. Dabei war ein weiteres Auswahlkriterium das Wachstum auf MH-Agar mit 4 mg/L Meropenem. Die restlichen Isolate wurden zufällig ausgewählt, wobei auf eine möglichst gleichmäßige Verteilung der geographischen Herkunft, Probenart, Alter des Wirtstieres und Isolationszeitpunkt geachtet wurde. Wir konnten Gene finden, die Resistenzen gegen Aminoglykoside (*aadA1*, *aadB*), Tetracykline (*tet(A)*, *tet(U)*, *tet(X)*, *tet(Y)*) und Sulfonamide (*sul2*) begründen (siehe **Tabelle 9**).

Alle Carbapenemase-Gene waren chromosomal lokalisiert und konnten als *bla*_{OXA-146}, *bla*_{OXA-225} (jeweils *bla*_{OXA-23}-ähnlich) und als *bla*_{OXA-58} identifiziert werden. Die OXA-146- und OXA-225-Gene befanden sich alle innerhalb eines Tn2008-Kontexts. Bei den Stämmen, die keinen Resistenzphänotyp gegen Imipenem zeigten, waren jeweils das Insertionselement *ISAbal1*, und damit auch das Transposon unterbrochen. Dies lag entweder an einem (IHIT31215, IHIT31220 und IHIT31669) oder zwei (IHIT31216, IHIT31227 und IHIT33295) *ISAcsp2*-Kopien, von dem eines vollständig und eines unvollständig vorlag (siehe **Abbildungen 1-4**).

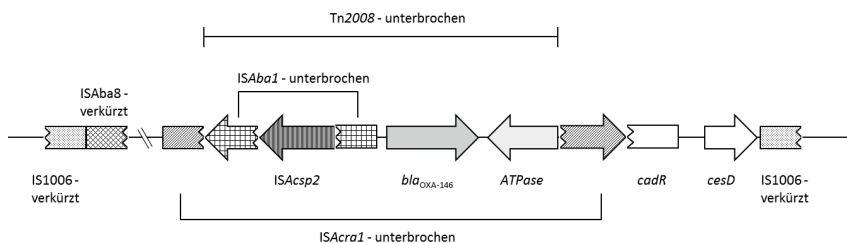


Abbildung 1: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei den *A. indicus*-Isolaten IHIT31215, IHIT31220 und IHIT31669

IHIT31215 (09/2015, Willingen, Sammelkot), IHIT31220 (12/2015, Bad Wildungen, Sammelkot) und IHIT31669 (09/2015, Willingen, Sammelkot), ATPase: Gen für AAA ATPase, *cadR*: Gen für Transkriptionsfaktor für Cadmiumresistenz, *cesD*: Gen für ein Kobalt-Zink-Cadmium Resistenzprotein.

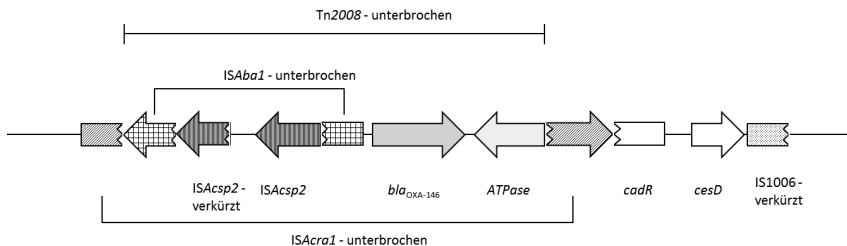


Abbildung 2: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei dem *A. indicus*-Isolat IHIT31216 (11/2015, Schwarzenborn, Sammelkot), ATPase: Gen für AAA ATPase, *cadR*: Gen für Transkriptionsfaktor für Cadmiumresistenz, *cesD*: Gen für ein Kobalt-Zink-Cadmium Resistenzprotein.

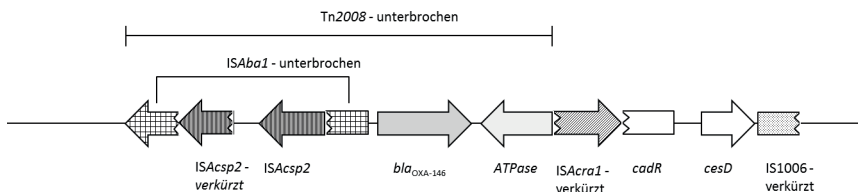


Abbildung 3: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei dem *A. indicus*-Isolat IHIT31227 (12/2015, Guxhagen, Nase), ATPase: Gen für AAA ATPase, *cadR*: Gen für Transkriptionsfaktor für Cadmiumresistenz, *cesD*: Gen für ein Kobalt-Zink-Cadmium Resistenzprotein.

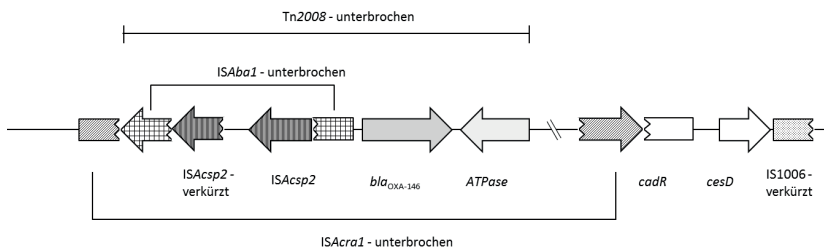


Abbildung 4: Genetische Umgebung des OXA-146-Gens bei dem *A. indicus*-Isolat IHIT33295 (11/2015, Rauschenberg, Sammelkot), ATPase: Gen für AAA ATPase, *cadR*: Gen für Transkriptionsfaktor für Cadmiumresistenz, *cesD*: Gen für Kobalt-Zink-Cadmium Resistenzprotein.

Der Stamm mit den höchsten MHK-Werten gegenüber Imipenem IHIT31230 (01/2016, Edermünde, Sammelkot) trug hingegen ein vollständiges Tn2008 (siehe **Abbildung 5**)

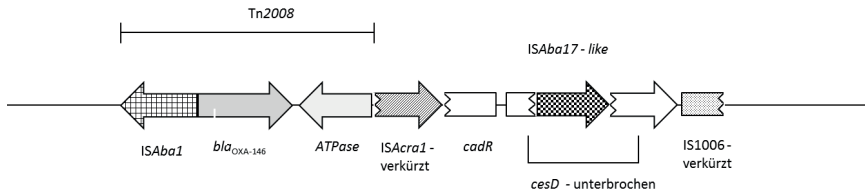


Abbildung 5: Genetische Umgebung des OXA-Gens bei dem *A. indicus*-Isolat IHIT31230

ATPase: Gen für AAA ATPase, *cadR*: Gen für Transkriptionsfaktor für Cadmiumresistenz, *cesD*: Gen für Kobalt-Zink-Cadmium Resistenzprotein.

Der Stamm IHIT31231 (02/2016, Viernheim, Sammelkot) wies oberhalb von *bla*_{OXA-58} ein unvollständiges *ISAbal3* und unterhalb ein vollständiges *ISAbal3* Insertionselement gefolgt von einem *araC* und einem unvollständigen *lysE* auf (siehe **Abbildung 6**)

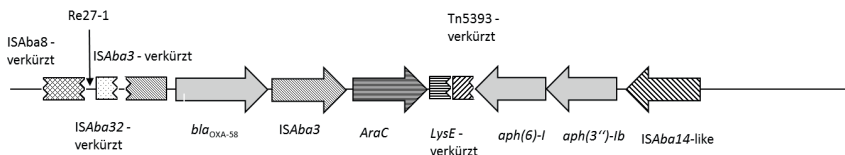


Abbildung 6: Genetische Umgebung des OXA-58-Gens bei dem *A. indicus*-Isolat IHIT31231

AraC: Transkriptionsregulator-Protein, *LysE*: Threonin-Exkretionspumpen-Protein, *aph(6)-I*: Aminoglykosid-Phosphotransferase, *aph(3'')-Ib*: Aminoglykosid-Phosphotransferase.

Auch bei IHIT31229 (01/2016, Ottrau, Rektum) konnte ein unvollständiges *ISAb_a3* vor dem OXA-Gen nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Gene wurden nicht ermittelt (siehe **Abbildung 7**)

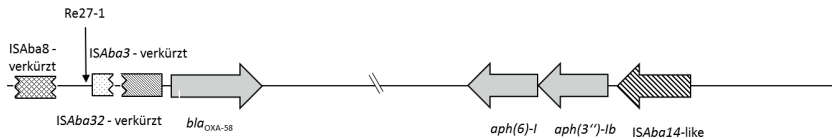


Abbildung 7: Genetische Umgebung des OXA-58-Gens bei dem *A. indicus*-Isolat IHIT31229
aph(6)-I: Aminoglykosid-Phosphotransferase, *aph(3'')-Ib*: Aminoglykosid-Phosphotransferase

Diese OXA-positiven *A. indicus*-Isolate zeigten in den meisten Fällen erhöhte MHK-Werte gegenüber Imipenem, Ampicillin, Piperacillin, Ceftiofur und Cefpirom im Vergleich zu OXA-negativen Isolaten. Der einzige Träger von *aadA1* und *aadB* zeigte auch als einziges Isolat erhöhte MHK-Werte (8 mg/L) gegenüber Gentamicin und Tobramycin, was darauf schließen lässt, dass dieser Genotyp den entsprechenden Resistenz-Phänotyp bedingt. Gleiches gilt für weitere Gene: Ausschließlich die Träger von *tet(Y)*, *tet(X)*, *tet(U)* und *tet(A)* zeigten hohe MHK-Werte gegenüber Tetrazyklin (≥ 16 mg/L) und die Träger von *su12* zeigten alle erhöhte MHK-Werte (≥ 40 mg/L) gegenüber Trimethoprim-Sulfamethoxazol (siehe **Tabelle 9**).

Tabelle 9: Resistenzdeterminanten und MHK-Werte ausgewählter Beta-laktam-Antibiotika von *A. indicus* interpretiert nach CLSI (CLSI 2014)

IHIT-Nr.	Datum Isolierung	Herkunft	OXA-Multiplex-PCR	Resistenzgene (WGS)	Ampicillin	Piperacillin	Ceftiofur	Cefprozol	Imipenem ¹	Imipenem ²	Gentamicin	Tetrazyklin
31215	03.09.2015	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-146}	≥32	≥128	≥8	16	≤1	0,38	≤1	≤1
31216	11.11.2015	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-225} , <i>aph</i> (3')-Ic, <i>strA</i> , <i>strB</i>	≥32	≥128	4	32	≤1	0,5	≤1	≤1
31218	24.11.2015	Nase	0	0	≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,125	≤1	≤1
31220	01.12.2015	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-146} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i>	≥32	64	4	8	≤1	0,38	≤1	≤1
31223	03.12.2015	Sammelkot	0	0	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
31224	10.12.2015	Sammelkot	0	0	≤2	≤4	≤1	≤1	≤1	0,125	≤1	≤1
31225	15.12.2015	Nase	0	<i>strA</i> , <i>strB</i>	≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,19	≤1	≤1
31228	20.01.2016	Nase	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-146} , <i>sul2</i> , <i>floR</i>	≥32	≥128	≥8	16	≤1	0,38	≤1	≤1
31229	28.01.2016	Rektum	<i>bla</i> _{OXA-58} -like	<i>bla</i> _{OXA-58} , <i>strA</i> , <i>strB</i>	≤2	≤4	2	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
31230	28.01.2016	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-146} , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>tet</i> (Y), <i>tet</i> (X)	≥32	≥128	≥8	≥64	8	3	≤1	≥16
31231	18.02.2016	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-58} -like	<i>bla</i> _{OXA-58} , <i>strA</i> , <i>strB</i>	≥32	32	4	≤1	≤1	0,5	≤1	≤1
31232	19.02.2016	Nase	0	0	≤2	≤4	2	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
31669	03.09.2015	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-146}	≥32	32	4	4	≤1	0,38	≤1	≤1
32429	22.10.2015	Sammelkot	0	<i>strA</i> , <i>strB</i>	16	16	≥8	2	≤1	0,25	≤1	≤1
32859	01.09.2015	Sammelkot	0	0	≤2	n.t.	n.t.	≤1	≤1	0,064	≤1	≤1
32860	01.09.2015	Rektum	0	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i>	≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,047	≤1	≤1
32861	08.09.2015	Nase	0	<i>strA</i> , <i>strB</i>	≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,064	≤1	≤1
32862	08.09.2015	Sammelkot	0	<i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>sul2</i>	≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,064	≤1	≤1
33295	17.11.2015	Sammelkot	<i>bla</i> _{OXA-23} -like	<i>bla</i> _{OXA-146} , <i>tet</i> (X), <i>tet</i> (Y), <i>aph</i> (3')-Ic, <i>aadA1</i> , <i>aadB</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i>	≥32	≥128	≥8	16	≤1	0,5	8	≥16
33298	19.02.2016	Sammelkot	0	0	≤2	n.t.	n.t.	≤1	≤1	0,047	≤1	≤1

Fortsetzung Tabelle 9: Resistenzdeterminanten und MHK-Werte ausgewählter Beta-laktam-Antibiotika von *A. indicus* interpretiert nach CLSI (CLSI 2014)

IHIT-Nr.	Datum		OXA-Multiplex-PCR	Resistenzgene (WGS)			Ampicillin	Piperacillin	Ceftiofur	Cefpirom	Imipinem ¹	Imipinem ²	Gentamicin	Tetracyklin
	Isolierung	Herkunft												
33301	17.11.2015	Sammelkot	0	strA, strB, sul2, tet(U), tet(A)			≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,064	≤1	≥16
29010	28.01.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
29013	29.01.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
29018	24.02.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	4	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
29023	17.03.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	n.t.	n.t.	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
29025	19.03.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	n.t.	n.t.	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
31217	12.11.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,125	≤1	≤1
31219	26.11.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
31221	02.12.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
31222	02.12.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,19	≤1	≤1
31226	15.12.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	4	≤1	≤1	n.t.	≤1	≤1
32428	15.10.2015	Nase	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,125	≤1	≤1
32430	22.10.2015	Sammelkot	0	n.t.			≤2	≤4	4	≤1	≤1	0,094	≤1	≤1
32858	20.08.2015	Nase	0	n.t.			≤2	≤4	2	≤1	≤1	0,064	≤1	≤1
32863	09.09.2015	Rektum	0	n.t.			n.t.	n.t.	n.t.	≤1	≤1	0,047	≤1	≤1

Schwarz = R, grau = I, ohne Farbhinterlegung = S

n.t.: nicht getestet (Testung des Wirkstoffs wurde durch das Gerät mindestens drei Mal abgebrochen), 0: Untersuchung negativ, S: Sensibel, I: Intermediär resistent, R: Resistent;

Abgebildet sind MHK-Werte [mg/l] ausgewählter Beta-Laktam-Antibiotika, untersucht mit der Karte AST-GN38 (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland). Weitere Wirkstoffgruppen werden aus Gründen der Übersichtlichkeit ausschließlich im Fließtext erwähnt. Für Imipenem wurde sowohl die 1) AST-GN38 (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) als auch 2) der Epsilometertest (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italien) angewendet.

5.2.4 Phylogenie der *A. indicus*-Isolate

In der auf einem Vergleich des „maximum common genome“ basierenden Analyse (Klotz et al., unpublished) gruppieren sich 24 bovine *A. indicus*-Isolate (davon zwei aus **Publikation 1** und 22 aus zusätzlichen Untersuchungen) getrennt von den drei Umwelt-assoziierten Stämmen, die von einer Deponie in Indien, einer Blei-Zink Mine in China sowie einem Fluss in Malaysia stammen (Malhotra et al. 2012; Nemec und Radolfova-Krizova 2017). Außerdem unterschieden sie sich klar von zwei OXA-58-positiven Stämmen, die von humanen Patienten in Frankreich und den Niederlanden stammen. Sieben von neun bovinen *bla*_{OXA-23}-Trägern bildeten eine Gruppe, die auch die beiden in **Publikation 1** beschriebenen Stämme enthielten. In diesem Cluster gruppierte sich das Isolat IHIT31230 (Edermünde, 01/2016, OXA-146) sehr nah mit dem Isolat IHIT27599 (Gießen, 10/2014, OXA-23), trotz unterschiedlicher geografischer und zeitlicher Probennahme und unterschiedlicher Carbapenemase-Gene. Ein epidemiologischer Zusammenhang ist nicht bekannt. Die beiden *bla*_{OXA-58}-tragenden bovinen Isolate schienen zufällig im Baum verteilt und ließen keinen verwandtschaftlichen Zusammenhang zueinander erkennen (siehe **Abbildung 8**).

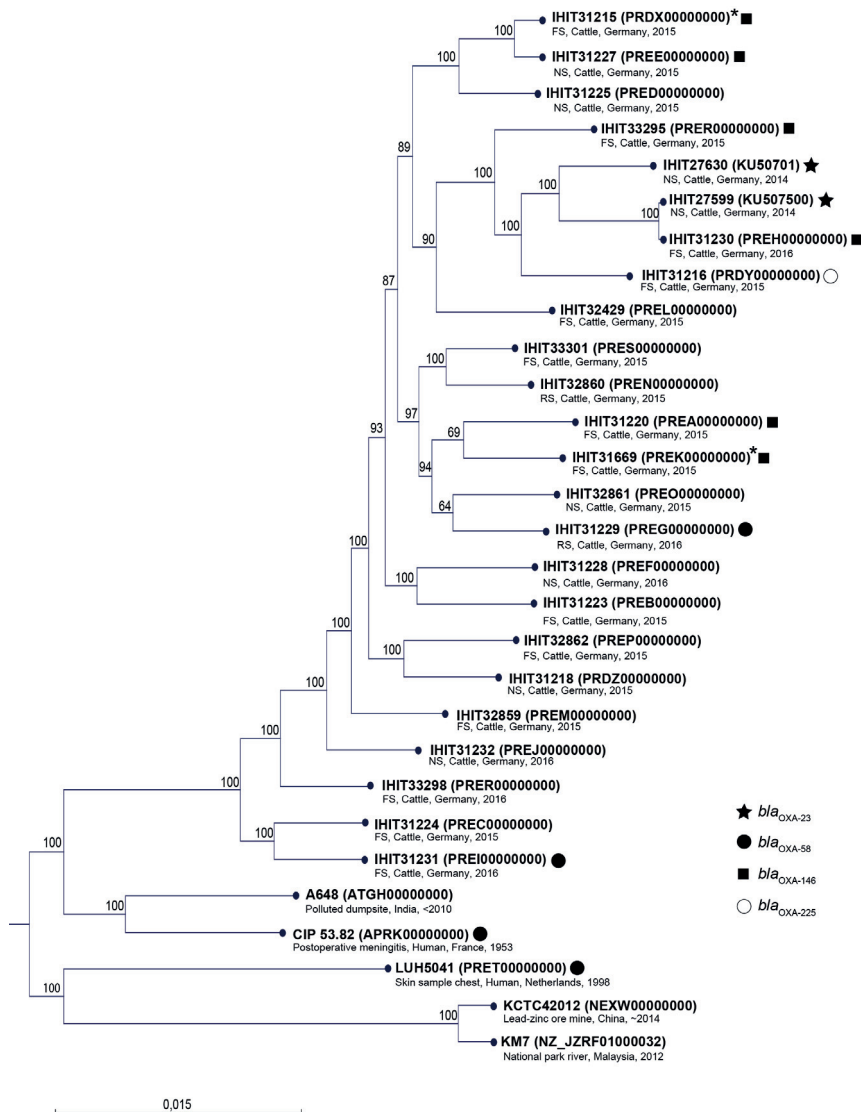


Abbildung 8: Phylogenetischer Baum erstellt mit der „maximum-likelihood“ Methode
aus 1.647 orthologen Genen von fünf öffentlich zugänglichen *A. indicus*-Stämmen (A648, CIP 53.28, LUH5041, KCTC42012 und KM7) und 24 bovinen *A. indicus*-Isolaten. Bootstrap values (> 50 %) nach 1.000 Simulationen an Knotenpunkten abgebildet, GenBank Accession-Nummern in Klammern, weitere Metadaten unterhalb der Stammbezeichnung; *: gleicher Betrieb (Klotz et al. unpublished)

5.2.5 Virulenz der *A. indicus*-Isolate

5.2.5.1 *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Für die Infektion von *Galleria mellonella* wurden alle vorliegenden *A. indicus* Feldstämme ($n = 36$) ausgewählt. Ganzgenom-Sequenzen lagen von 22 dieser Isolate vor. Als *A. baumannii*-Vergleichsstämme ($n = 16$) wurden ausschließlich Stämme ausgewählt, von denen Ganzgenomsequenzen vorlagen. Außerdem wurde auf eine gleichmäßige Verteilung der geographischen Herkunft, Probenart, Alter des Wirtstieres, und Isolationszeitpunkt geachtet. Insgesamt waren von beiden Spezies neben Feldisolaten ($n = 47$) Isolate von erkrankten Tieren ($n = 11$) und Menschen ($n = 3$) sowie aus der Umwelt ($n = 2$) vertreten (siehe **Tabelle 11**). Die Larven der großen Wachsmotte wurden in vier verschiedenen Verdünnungsstufen mit Keimzahlen von $3,5 \times 10^1$ bis $12,8 \times 10^5$ koloniebildende Einheiten (KbE) infiziert. Bei der Infektion mit 18 *A. baumannii* und 46 *A. indicus*-Isolaten zeigte die Keimzahl der injizierten Bakterien erwartungsgemäß einen signifikanten Einfluss auf die Sterblichkeit der Mottenlarven sowohl bei *A. baumannii* ($p < 0,0001$) als auch bei *A. indicus* ($p = 0,0001$). Mit jeder Log₁₀-Stufe stieg die Sterblichkeit bei *A. baumannii* um das 2,6-fache, bei *A. indicus* um das 1,3-fache an. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Sterblichkeit der Mottenlarven bei *A. baumannii* signifikant höher ist als bei *A. indicus* ($p < 0,0001$) (siehe **Abbildung 9**).

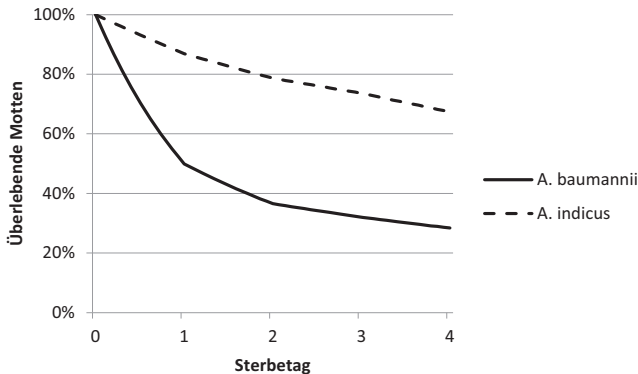


Abbildung 9: Errechnete Schätzkurve zum Überleben der Wachsmottenlarven nach angenommener Injektion von 10^6 KbE.

Es wurde die Überlebenszeit anhand der Daten aller Infektionsversuche (siehe **Tabelle 11**) ermittelt und rechnerisch für eine Keimzahl von 10^6 KbE angegeben.

5.2.5.2 Analyse der Virulenzgene

Der in **Publikation 1** beschriebene Unterschied der Virulenz-assoziierten Gene (VAGs) zwischen *A. baumannii* und *A. indicus* konnte auf breiterer Basis bestätigt werden. Analysiert wurde hierzu der Genotyp von 16 *A. baumannii*- und 34 *A. indicus*-Isolaten, deren Phänotyp zuvor im *Galleria mellonella*-Modell untersucht wurde. Zusätzlich zu **Publikation 1** wurden Gene betrachtet, für die in früheren Studien gezeigt wurde, dass sie im Zusammenhang mit der Biofilmbildung (*csuABC*, *bap*, *blp1*, *blp2*), Kapsel (*epsA*, *ptk*), Zinkaufnahme (*znuABCDE*), Motilität (*pilA*) und Interaktion mit dem Immunsystem (*lipA1*, *epaA*) zur Virulenz von *Acinetobacter* beitragen. Bei den in dieser Arbeit gewählten Schwellenwerten (Nukleotidsäuren-Sequenzähnlichkeit zur Referenz ≥ 90 %, Längenübereinstimmung ≥ 80 %) konnten diese VAGs bei *A. indicus* nicht nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 10**).

[illegible]

Abbildung 10: Übersicht über die Virulenz-assoziierten Gene der untersuchten Stämme

Accession-Nummern: ATCC 17978: CP012004; ATCC 19606: ACQB01000015.1 für *pld1* und Spalte und GG704576.1 für *pilA*; AB307-0294: CP001172.2 für *epsA* und Spalte und EU117203.1 für *bap*; AB031: CP009256.1 für *bap* und KJ461713.1 für *cpaA*; AYE: CU459141.1; AB5075-UW: NZ_CP008706.1; LAC-4: CP007712.1; CIP 53-82: APRK01000000; A648T: NZ_BBSF00000000.1, CIP110367, ATGH000000000; ANC5077: NEXW01.1; KM7: JZRF01000070; KCTC42012: NEXW000000000, 1. A. *indicus*: IHIT27599 und IHIT27630 aus Publikation 1, restliche Isolate aus weiteren Untersuchungen (siehe **Tabelle 9**). Msch.: Mensch; dunkel: Gen vorhanden (Nukleotidsäuren-Sequenzähnlichkeit zur Referenz $\geq 90\%$, Längenübereinstimmung $\geq 80\%$), weiß: Gen bei gewählten Ähnlichkeitsparametern nicht vorhanden.

5.2.6 Untersuchungen zur Biofilmbildung

Um die Biofilmbildung *in vitro* vergleichend zu untersuchen, wurden Feldstämme (10 *A. baumannii*, 14 *A. indicus*), bovine klinische Isolate (sechs *A. baumannii*, sieben *A. indicus*), humane klinische Isolate (ein *A. baumannii*, zwei *A. indicus*) und umweltassoziierte *A. indicus* ($n = 2$) untersucht (siehe **Tabelle 12**). Dabei wurden nur Feldisolate ausgewählt, von denen auch Ganzgenom-Sequenzdaten vorlagen. Außerdem wurde, wie schon bei den Infektionsversuchen, auf eine gleichmäßige Verteilung der geographischen Herkunft, Probenart, Alter des Wirtstieres, und Isolationszeitpunkt geachtet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 10** zusammengefasst. *A. baumannii* zeigte sowohl bei 24 h also auch bei 48 h Inkubationszeit sowie in M-63- und in LB-Medium eine signifikant stärkere Biofilmbildung als *A. indicus* ($p < 0,0001$) (**Abbildung 11**, **Abbildung 16**). Es zeigte sich in M-63-Medium zudem, dass *A. baumannii* von Rindern stärker Biofilm bildeten als Stämme humanen Ursprungs ($p \leq 0,001$) und bovine Feldstämme stärker als bovine klinische Stämme ($p < 0,0001$) (siehe **Abbildung 12**, **Abbildung 13**). Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich in LB-Medium nicht. *A. indicus* von Rindern bildeten in LB-Medium mehr Biofilm als Umwelt-assoziierte Stämme ($p \leq 0,009$), gleiches traf auf die Feldstämme zu ($p \leq 0,004$). Weiterhin bildeten Feldstämme mehr Biofilm als Isolate klinischen Ursprungs ($p \leq 0,033$). Einzig nach 48 h zeigte sich, dass bovine Isolate mehr Biofilm bildeten als humane Isolate ($p = 0,037$) (**Abbildung 17**, **Abbildung 18**).

Tabelle 10: Ergebnisse des Biofilm-Assays

	M-63	LB
24 h	<i>A. baumannii</i> > <i>A. indicus</i> ($p < 0,0001$) <u><i>A. baumannii</i></u> bovin > human ($p = 0,001$) Feld > klinisch ($p < 0,0001$)	<i>A. baumannii</i> > <i>A. indicus</i> ($p < 0,0001$) <u><i>A. indicus</i></u> bovin > Umwelt ($p = 0,009$) Feld > klinisch ($p = 0,033$) Feld > Umwelt ($p = 0,004$)
48 h	<i>A. baumannii</i> > <i>A. indicus</i> ($p < 0,0001$) <u><i>A. baumannii</i></u> bovin > human ($p < 0,0001$) Feld > klinisch ($p < 0,0001$) <u><i>A. indicus</i></u> bovin > Umwelt ($p = 0,03$) Feld > Umwelt ($p = 0,002$)	<i>A. baumannii</i> > <i>A. indicus</i> ($p < 0,0001$) <u><i>A. indicus</i></u> bovin > human ($p = 0,037$) bovin > Umwelt ($p = 0,004$) Feld > klinisch ($p < 0,0001$) Feld > Umwelt ($p = 0,001$)

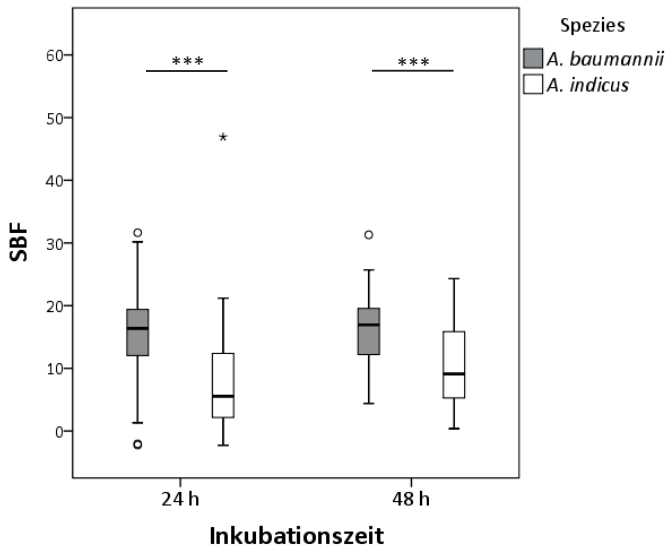


Abbildung 11: Spezifische Biofilmbildung von 17 *A. baumannii*- und 25 *A. indicus*-Isolaten in M-63-Medium, Speziesvergleich

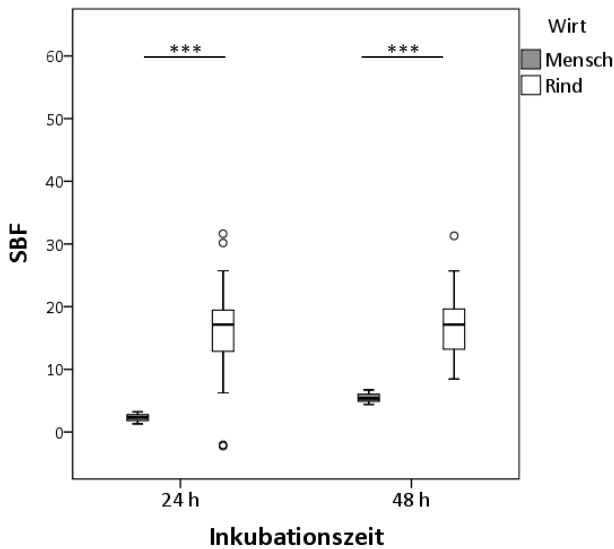


Abbildung 12: Spezifische Biofilmbildung von *A. baumannii*-Isolaten (16 vom Rind und 1 vom Menschen) in M-63-Medium, Wirtsvergleich

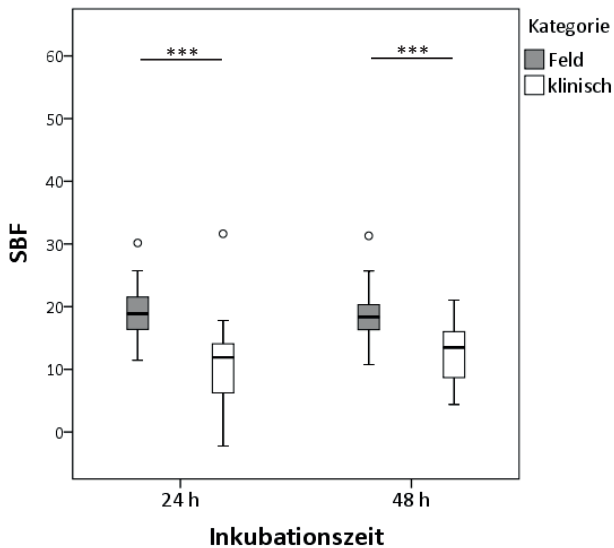


Abbildung 13: Spezifische Biofilmbildung von *A. baumannii*-Isolaten (10 Feldstämme und 6 klinische Stämme) in M-63-Medium, Kategorienvergleich

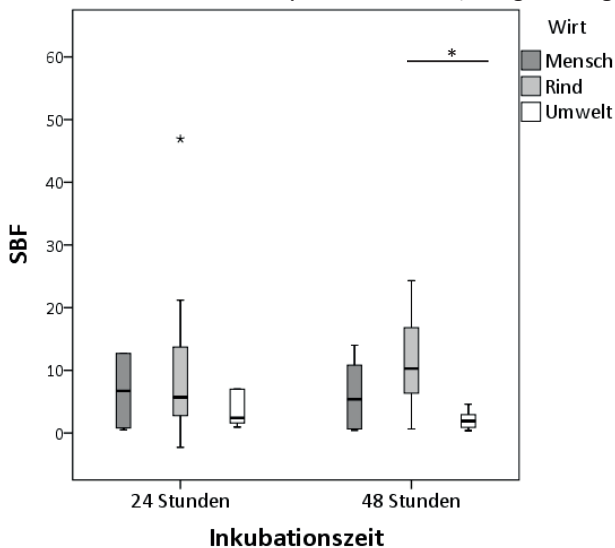


Abbildung 14: Spezifische Biofilmbildung von *A. indicus*-Isolaten (21 vom Rind und 2 vom Menschen) in M-63-Medium Wirtsvergleich

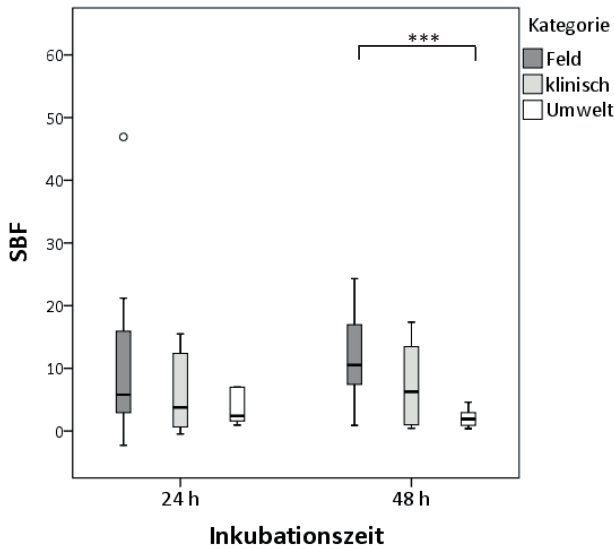


Abbildung 15: Spezifische Biofilmbildung von *A. indicus*-Isolaten (14 Feldstämme, 7 klinische Stämme und 2 umweltassoziierte Stämme) in M-63-Medium, Kategorienvergleich

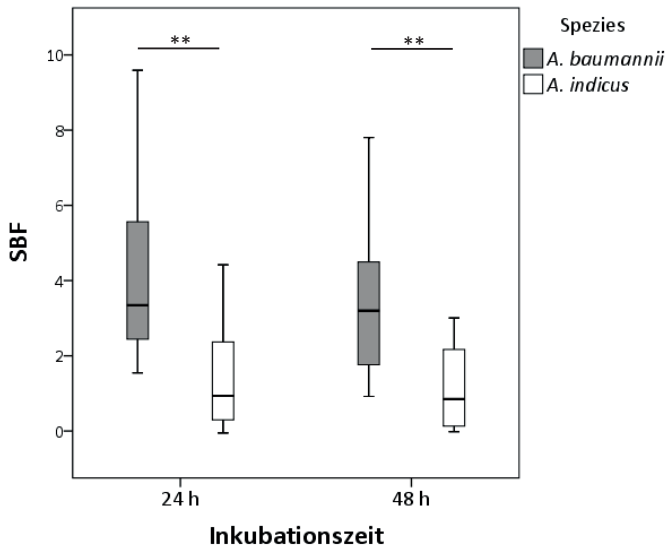


Abbildung 16: Spezifische Biofilmbildung von 17 *A. baumannii*- und 25 *A. indicus*-Isolaten in LB-Medium, Speziesvergleich

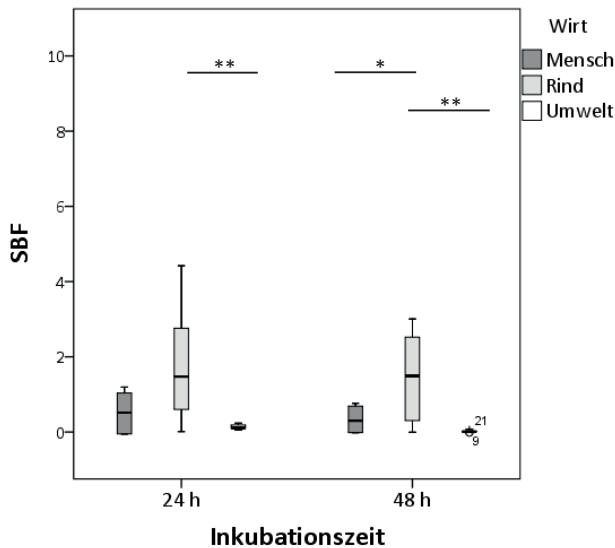


Abbildung 17: Spezifische Biofilmbildung von *A. indicus*-Isolaten (21 vom Rind und 2 vom Menschen) in LB Medium, Wirtsvergleich

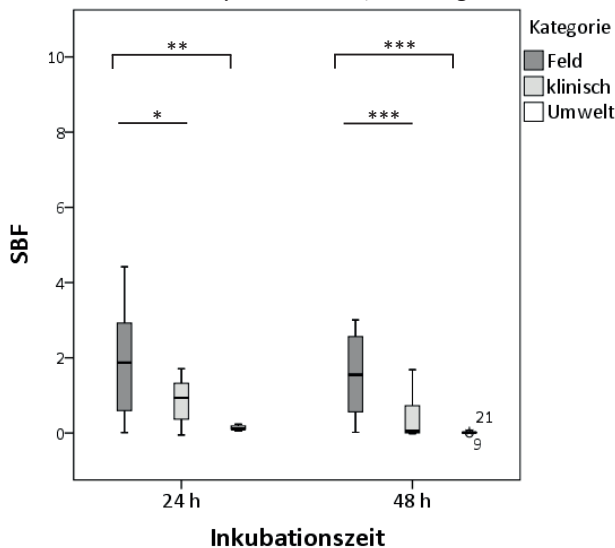


Abbildung 18: Spezifische Biofilmbildung von *A. indicus*-Isolaten (14 Feldstämme, 7 klinische Stämme und 2 umweltassoziierte Stämme) in LB Medium, Kategorienvergleich

6 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Überblick über das Vorkommen von *Acinetobacter* spp. in der hessischen Rinderpopulation zu schaffen. Das Augenmerk lag hierbei auf i) dem bedeutendsten Vertreter der Gattung, *A. baumannii*, der als opportunistischer Erreger für Krankenhaus-assoziierte Infektionen weltweit verantwortlich ist, ii) seinen drei am nächsten verwandten Arten, *A. nosocomialis* und *A. pittii*, sowie dem als apathogen geltenden *A. calcoaceticus* und iii) weiteren *Acinetobacter* spp., die eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen aufweisen. Die erst 2015 und 2016 benannten Vertreter des *Acb*-Komplexes, *A. seifertii* und *A. dijkshoorniae* wurden in unseren Untersuchungen im Rahmen der MALDI-TOF Analyse nicht berücksichtigt da keine MSPs in der Datenbank des Herstellers hinterlegt waren. Bei den Analysen des Gesamtgenoms wurde kein Vertreter der beiden Arten identifiziert. Es wurde eine randomisierte repräsentative Stichprobe aus der hessischen Rinderpopulation gezogen und Metadaten, wie beispielsweise zur Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen auf den Betrieben, zu Vorerkrankungen bzw. zur Fütterung der Rinder mit Hilfe eines Fragebogens erfasst (siehe Anhang von **Publikation 2, Kapitel 13.2**). Alle isolierten Stämme wurden auf die verminderte Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen (vor allem Carbapenemen), mögliche genetische Resistenz-Determinanten, klonale Verwandtschaft, Virulenz und Fähigkeit zur Biofilmbildung vergleichend charakterisiert.

6.1 *Acinetobacter indicus*

Acinetobacter indicus wurde im Jahr 2012 erstmals beschrieben (Malhotra et al. 2012). Daten zur Verbreitung dieser Spezies bei Tieren oder Menschen liegen bisher kaum vor. Zwei Jahre nach der Beschreibung durch Malhotra et al. konnten Bonnin et al. Carbapenem-resistente *A. indicus* von einem Menschen isolieren (Bonnin et al. 2014). **Publikation 1** dieser Dissertation stellt den ersten Bericht über *A. indicus* bei Rindern dar (Klotz et al. 2017a). In eigenen Voruntersuchungen zu dieser Arbeit konnten bei der Beprobung von 45 Tieren Carbapenem-resistente *A. indicus*-Isolate aus Nasentupfern von Kälbern isoliert werden, deren nähere Charakterisierung den Inhalt von **Publikation 1** der vorliegenden kumulativen Dissertation bildet. Während es sich dabei um Isolate von hospitalisierten Tieren handelte, wurden im Verlauf der Studie weitere 36 *A. indicus*-Isolate auch von gesunden Tieren aus landwirtschaftlichen Betrieben isoliert. Dies gelang vor allem durch das während dieser

Arbeit etablierte MSP, das erstmals eine spezifische Diagnose von *A. indicus* mittels MALDI-TOF-MS-Analyse erlaubte (**Publikation 1**). Die *A. indicus*-Isolate wurden im Rahmen der Arbeit näher charakterisiert, wodurch ein erster Einblick in die Verbreitung, das Vorkommen von Resistenzdeterminanten, die Virulenz und die Fähigkeit zur Biofilmbildung boviner Isolate dieser relativ neuen Spezies geschaffen werden konnte.

Die Prävalenz von *A. indicus* beträgt bei hessischen Rindern in der vorgelegten Untersuchung (n = 422 Tiere) 12,6 %. Eine Fütterung mit Soja hat einen positiven Einfluss auf das Vorkommen des Bakteriums, eine Fütterung mit Heu einen negativen Einfluss. Elf Isolate wurden im Vorfeld und während der Studie als Träger von Carbapenemase-Genen (*bla*_{OXA-23} und *bla*_{OXA-58}) identifiziert. Das Vorkommen der Gene konnte mit einem häufigeren Einsatz von Antibiotika auf dem entsprechenden Herkunftsbetrieb der Tiere sowie dem Einsatz der Wirkstoffgruppen Florfenicol und Sulfonamid in Verbindung gebracht werden. Die Mehrzahl der Gene lag auf einer Tn2008 Transposon-Struktur, die auch von krankenhaussassoziierten *A. baumannii*-Isolaten bekannt ist. Diese Struktur war bei allen Isolaten, die keinen Resistenzphänotyp für Carbapeneme ausbildeten, durch ein oder mehrere Insertionselemente unterbrochen.

Die Resistenz gegenüber Antibiotika, in der Hauptsache gegen Carbapeneme, ist das wichtigste Merkmal von krankenhaussassoziierten *A. baumannii*. Sämtliche dominanten klonalen Linien (IC1 und IC2) sind damit assoziiert. Antibiotikaresistenz ist mehr als alle bisher identifizierten Virulenzfaktoren der bedeutendste Faktor für den Verlauf einer Krankenhausinfektion mit diesem Erreger (Abbo et al. 2007; Wong et al. 2017). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten, dass die in **Kapitel 6.2** beschriebenen *A. baumannii*-Isolate zwar keines der erworbenen Carbapenem-Resistenzgene trugen, jedoch einige der *A. indicus*-Isolate mit OXA-23-like und OXA-58 diese bedeutsamen Resistenzdeterminanten trugen. Derzeit existiert nur ein weiterer Bericht über Carbapenemase-produzierende *A. indicus*. Bonnin et al. berichten 2014 von einem OXA-23-positiven humanen Isolat, das aus einem Rektaltupfer von einem Patienten isoliert wurde, der nach einem Verkehrsunfall in Algerien in ein französisches Krankenhaus verlegt worden war (Bonnin et al. 2014). Hingegen existieren inzwischen wenige Berichte über das Vorkommen von *A. indicus* im Zusammenhang mit Tierhaltungen. Fernando et al. gelang der Nachweis von *A. indicus* zusammen mit *A. baumannii* in Rindermist, die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen wurde in dieser Studie aber nicht untersucht (Fernando et al. 2016). Im gleichen

Jahr veröffentlichten Leclercq et al. einen Bericht über *A. indicus* aus Schweinemist und Bodenproben. Die Autoren konnten die Resistenzgene *strB*, *sul2*, *aadA2*, *aac(6')-Ib* und *floR* nachweisen, die ebenfalls bei einigen unserer Isolate vorkommen (siehe **Tabelle 9**). Auf Resistenzdeterminanten gegenüber Carbapenemen wurde nicht untersucht (Leclercq et al. 2016). Die Isolationsorte der oben genannten Studien (Rinder- und Schweinemist) fügen sich insoweit in den Kontext unserer Ergebnisse gut ein, als dass wir *A. indicus* am häufigsten aus Sammelkotproben isolieren konnten. Als Ursache für deutlich geringere Nachweishäufigkeit in Rektaltupfern (5,5 % vs. 17,8 %) könnte in Betracht kommen i) eine geringere Sensitivität bei der Kultivierung von Rektaltupferproben (oftmals weniger Kotmaterial) gegenüber Sammelkotproben und ii) die Tatsache, dass *A. indicus* möglicherweise weniger mit den Tieren direkt assoziiert ist, sondern vorwiegend über eine andere Eintragsquelle in die Sammelkotproben gelangt. Als Eintragsquelle kommt etwa das Futter in Frage. So konnten wir zeigen, dass die Chance *A. indicus* zu isolieren größer war, wenn die Betriebe Soja an die Rinder verfütterten. Da die bakteriologische Analyse des Futters nicht Bestandteil der vorliegenden Studie war, kann diese Hypothese erst in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. Bemerkenswert war außerdem, dass die Fütterung von Heu den gegenteiligen Effekt zu haben scheint. Grund dafür könnte sein, dass die verminderte Feuchtigkeit im Heu das Überleben von *A. indicus* im Futter erschwert. Da jedoch bisher keine Arbeiten zur Tenazität von *A. indicus* vorliegen, sind auch diese Überlegungen ohne weitergehende Untersuchungen als hypothetisch zu betrachten. Neben Faktoren, die das Vorkommen von *A. indicus* beeinflussen könnten, erschien die Untersuchung von Faktoren, die einen Einfluss auf das Vorkommen der Oxacillinase-Gene bei diesen Bakterien haben, aus nachfolgendem Grund von großem Interesse zu sein: Aufgrund der häufigen Lokalisation vieler dieser Gene auf mobilen genetischen Elementen, besteht eine mögliche Gefahr ihrer Ausbreitung von der Nutztierpopulation auf den Menschen und schließlich auf humane Infektionserreger. Man geht davon aus, dass das derzeit weltweit bedeutsamste Oxacillinase-Gen, *bla_{OXA-23}*, ursprünglich von *A. radioresistens* stammt. In dieser Spezies ist es intrinsisch auf dem Chromosom vorhanden. Durch die Aufnahme von Insertionselementen wie *ISAba1* ist dieses Gen vermutlich mobilisiert und auf *A. baumannii* übertragen worden. Ein ähnliches Szenario ist auch für Oxacillinase-Gene denkbar, die von *A. indicus* stammen. Da die Prävalenz der fraglichen Gene zu gering war, um sie mit Hilfe einer logistischen Regression analysieren zu können, wurde der Zusammenhang anhand von

Häufigkeitstabellen abgeschätzt. Die Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Anwendung bestimmter antimikrobieller Wirkstoffe mit dem Vorkommen der Resistenzgene in Verbindung stehen könnte. Allerdings betraf dies nicht die Beta-Laktam-Antibiotika, die durch Oxacillinasen inaktiviert werden könnten, sondern um Florfenicol und Sulfonamide. Die Resistenzgene für diese Wirkstoffe, *sul2* und *floR*, konnten neben den Oxacillinase-Genen in einzelnen *A. indicus*-Isolaten nachgewiesen werden. Eine Co-Selektion dieser Eigenschaften scheint daher möglich. Die in den Feldisolaten gefundenen Oxacillinase-Gene waren *bla*_{OXA-58} und die *bla*_{OXA-23}-like Varianten *bla*_{OXA-146} und *bla*_{OXA-225}. Alle Gene waren auf dem Chromosom lokalisiert. Die Enzyme OXA-146 und OXA-225 gehören zur gleichen Gruppe wie OXA-23 und unterscheiden sich nur in je einer Aminosäure von dieser. Sie haben eine mit OXA-23 vergleichbare Fähigkeit Carbapeneme zu hydrolysieren, verfügen aber über eine stärkere hydrolytische Aktivität gegenüber Aztreonam, Cefotaxim, Ceftriaxon und Ampicillin (Kaitany et al. 2013; Mitchell et al. 2015). Die Umgebung dieser *bla*_{OXA-23}-ähnlichen Gene der sieben in der vorliegenden Arbeit identifizierten positiven Isolate wies eine hohe Übereinstimmung auf. Das Gen liegt bei allen Isolaten in einer Tn2008 Transposon-Struktur. Wie im Literaturteil beschrieben (siehe **Kapitel 2.5.3**), zeigen auch Isolate von Katzen, Hunden, Schafen und Rindern aus anderen Publikationen diese genetische Struktur. Das *bla*_{OXA-23}-Gen des bisher einzigen, bereits oben erwähnten humanen *A. indicus*-Isolates RAB1 liegt hingegen auf einem Tn2007-Transposon (Bonnin et al. 2014). Bei allen *A. indicus*-Isolaten der vorliegenden Arbeit, die keine Carbapenem-Resistenz aufwiesen, war Tn2008 innerhalb des *ISAbal* durch das Insertionselement *ISAcsp2* unterbrochen. So wurde es auch in **Publikation 1** und der Veröffentlichung von Poirel et al. aus dem Jahr 2012 beschrieben (Poirel et al. 2012). Da *ISAbal* bekanntermaßen mit einer Promotor-ähnlichen Funktion die Expression des Gens verstärkt, lässt sich der fehlende Resistenzphänotyp auf die Inaktivierung des Promotors aufgrund der Insertion von *ISAcsp2* zurückführen. In einer „maximum common genome“ (MCG)-Analyse wurden einige der in dieser Arbeit isolierten bovinen *A. indicus*-Stämme *in silico* mit umweltassoziierten und humanen Isolaten verglichen. Hier konnte gezeigt werden, dass *A. indicus*-Isolate von Rindern möglicherweise eine eigene phylogenetische Gruppe darstellen. Dass humane Isolate, wie anhand der Daten aus **Publikation 1** angenommen werden konnte, in einen phylogenetischen Zusammenhang mit bovinen Isolaten gebracht werden können, hat sich in den umfassenderen Analysen nicht bestätigt. In der ersten Publikation wurde der Verwandtschaftsgrad unter den

Stämmen nur anhand der Sequenzen des *rpoB*-Gens untersucht. Dies hat aufgrund des hohen Grads an Konservierung innerhalb der Spezies nur eine beschränkte Aussagekraft im Unterschied zu Vergleichen, die auf Ganzgenom-Sequenzdaten basieren. Ob es phylogenetische Gruppen gibt, die vermehrt im klinischen Kontext auftreten, bleibt zu überprüfen. Hierzu ist der Vergleich einer größeren Anzahl von Genomen klinischer Isolate notwendig, die bisher nicht vorliegen. Zu beachten ist, dass derzeit in der humanmedizinischen mikrobiologischen Diagnostik nicht gezielt auf *A. indicus* untersucht wird, da die diagnostischen Voraussetzungen, z.B. über die Einbettung von *A. indicus*-Spektren in die MALDI-TOF Hersteller-Datenbank zum großen Teil nicht gegeben ist. Interessant ist, dass sich Träger der *bla*_{OXA-23}-ähnlichen Gene in einem im Rahmen der Dissertation erstellten phylogenetischen Baums (siehe **Abbildung 8**) zusammen gruppieren, unabhängig ob sie aus hospitalisierten Tieren isoliert wurden oder ob es sich um Feldisolate handelt. Möglicherweise ist das Tragen dieser Gene analog zu *A. baumannii* mit bestimmten phylogenetischen Gruppen verknüpft (Higgins et al. 2010a). Um vor diesem Hintergrund die Selektion von Antibiotikaresistenz-Genen zu vermeiden, sollte der Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen auf Rinderbetrieben sorgfältig abgewogen werden. Auch wenn Carbapeneme in der Landwirtschaft nicht zugelassen sind, lassen unsere Untersuchungen den Schluss zu, dass Carbapenemase-positive *A. indicus* aufgrund einer Co-Selektion durch andere Antibiotika, speziell Florfenicol und Sulfonamide, vermehrt auftreten. Diese Wirkstoffe werden häufig bei Atemwegserkrankungen, auch im Rahmen metaphylaktischer Therapien, eingesetzt.

6.2 *Acinetobacter baumannii*

Die **Publikation 2** stellt die Ergebnisse bezüglich der Prävalenz von *A. baumannii* dar, einschließlich einer Analyse möglicher Faktoren, die einen Einfluss auf das Auftreten von *A. baumannii* bei Rindern haben könnten. Hierzu wurden von Januar 2015 bis Februar 2016 aus 422 Tieren auf 353 Betrieben 126 *A. baumannii*-Isolate gewonnen. Neben der epidemiologischen Fragestellung werden in der Publikation auch mögliche Resistenzdeterminanten für Carbapenem-Resistenz, die korrespondierenden Phänotypen sowie die Zugehörigkeit zu phylogenetischen Gruppen untersucht.

Zusammenfassend lassen sich folgende Ergebnisse festhalten: *A. baumannii* lässt sich aus 15,6 % der Rinder in Hessen isolieren. Die Chance den Erreger nachzuweisen ist erhöht bei

Milchkühen, in wärmeren Monaten, und wenn Cephalosporine der dritten Generation auf dem Betrieb eingesetzt wurden. Die Diversität innerhalb der bovinen *A. baumannii*-Population ist sehr hoch. Die überwiegende Mehrzahl der Isolate gehört nicht zu denselben phylogenetischen Gruppen wie Isolate, die an Infektionen, inklusive nosokomialer Geschehen in der Humanmedizin beteiligt sind. Die klonalen Linien, die für den Großteil der weltweiten Krankenhausinfektionen verantwortlich sind und, die mit einer Resistenz gegen Carbapeneme assoziiert sind (IC1 und IC2), finden sich in unserer Studienpopulation nicht. Passend dazu zeigen die bovinen *A. baumannii*-Isolate weder eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber Carbapenemen, noch tragen sie erworbene Resistenzdeterminanten bezüglich dieser Betalaktam-Antibiotika oder anderer antimikrobieller Wirkstoffe (intrinsische Resistenzmechanismen ausgenommen). Die Untersuchungen zur Virulenz zeigen, dass bovine Stämme eine vergleichbare Sterblichkeit in Wachsmottenlarven verursachen wie die untersuchten Stämme humanen Ursprungs.

In der vorgelegten Studie wurden weltweit erstmals repräsentative Daten zum Vorkommen von *A. baumannii* bei einer lebensmittelliefernden Tierart generiert. In ihrem Review betonten Müller et al. (2014) den Bedarf für solche Untersuchungen: „As valid data is lacking, further studies regarding the origin of multidrug resistant strains and possible transmission mechanisms should implicitly be conducted. In this context more focus should be placed on the role of livestock in the epidemiology of *A. baumannii* of animal origin“ (Müller et al. 2014). Wir konnten zeigen, dass Rinder in Hessen derzeit vermutlich keine Quelle für Krankenhaus-assoziierte *A. baumannii* darstellen. Auch wenn die wichtigsten im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen beschriebenen Klone nicht nachgewiesen werden konnten, so ergaben sich doch Hinweise darauf, dass einige der bei den bovinen Isolaten gefundenen Sequenztypen sporadisch bereits bei Patienten aufgetreten waren (Klotz et al. 2019). Grund dafür könnten einzelne „Spill-over“-Ereignisse vom Tier zum Menschen oder auch umgekehrt sein. Damit kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden, ob Rinder eine mögliche Quelle für *Acinetobacter* spp. darstellen, die Infektionen beim Menschen verursachen können. Die hohe Prävalenz von *A. baumannii* anderer phylogenetischer Gruppen ist ebenfalls ein interessanter Befund, der zum Verständnis um die Entwicklung des Erregers vom Kommensalen zum Opportunisten beitragen kann. Wie in **Publikation 2** ausführlich diskutiert, konnten in anderen Studien bisher keine vergleichbaren Prävalenzen bei Rindern ermittelt werden, was sich primär durch das unterschiedliche

Studiendesign erklären lässt. Die beiden anderen *Acinetobacter* spp. mit zunehmender Bedeutung für Krankenhaus-assoziierte Infektionen, *A. pittii* und *A. nosocomialis*, kommen in dem Untersuchungsgut der vorgelegten Studie mit insgesamt vier Isolaten nur selten vor.

Die Studie untersuchte außerdem einige putative Einflussfaktoren auf die Prävalenz von *A. baumannii* bei Rindern. Neben den bereits bei der Stichprobenplanung berücksichtigten Faktoren „Landkreis“ und „Kategorie“ (Milchvieh, Mastvieh, Kälber) umfasste die Analyse viele Faktoren, die über einen Fragebogen erhoben wurden, wie etwa die Anwendung von antimikrobiellen Wirkstoffen auf dem Betrieb (siehe Anhang von **Publikation 2, Kapitel 13.2**). Es konnte gezeigt werden, dass der Landkreis, in dem die Probe genommen wurde, keinen Einfluss auf das Vorkommen von *A. baumannii* hat, durchaus aber die Kategorie. Wie oben bereits kurz erwähnt, war die Nachweishäufigkeit von *A. baumannii* in der Untersuchung in den Sommermonaten signifikant erhöht (5,1 % vs. 44,3 %; $p < 0.03$, OR 42,9). Daher ist vor dem Hintergrund der Klimaerwärmung (Luterbacher et al. 2014) anzunehmen, dass die Prävalenz von *A. baumannii* in Rinderbeständen in Hessen in den nächsten Jahren ansteigen könnte. Die Tatsache, dass in warmen Ländern die Inzidenz nosokomialer Infektionen mit *A. baumannii* höher ist (European Centre for Disease Prevention and Control 2017) und in tropischen Ländern Infektionen ohne Zusammenhang zu Krankenhäusern vorkommen, ist außerdem ein Hinweis darauf, dass wärmere Temperaturen das Vorkommen von *A. baumannii* erleichtern. Dazu passt auch ein Bericht von den tropischen Inseln La Réunion, der von einer hohen *A. baumannii*-Isolationsrate von 83 % in Maultupfern von Rindern aus einem Betrieb berichtet (Pailhoriès et al. 2016).

Schließlich zeigen wir in **Publikation 2**, dass für das Auftreten von *A. baumannii* ein Zusammenhang mit der Gabe von Cephalosporinen der dritten Generation besteht. Dies ist ein weiteres Argument für die Notwendigkeit eines verantwortungsvollen Antibiotikaeinsatzes. Beispielsweise werden Präparate mit dem Wirkstoff Ceftiofur bei Klauenerkrankungen, Entzündungen der Gebärmutter oder Atemwegsinfektionen bevorzugt angewendet, da die vorgegebene Wartezeit auf Milch bei vielen Präparaten null Tage beträgt (<https://www.vetpharm.uzh.ch>). Neben den oben genannten Faktoren, die das Vorkommen von *Acinetobacter* spp. beeinflusst haben, gab es viele, die keinen signifikanten Einfluss zeigten. So konnten wir beispielsweise weder Unterschiede im Zusammenhang mit ökologischer Bewirtschaftung, der Betriebsgröße, dem Alter der Tiere, dem Kontakt zu Haustieren, dem Einsatz von Trockenstellern oder mit Vorerkrankungen feststellen. Dies

könnte daran liegen, dass nicht allgemeine Rahmenbedingungen sondern konkrete Faktoren mit direktem Einfluss auf das Habitat der Bakterien die Häufigkeit des Vorkommens von *A. baumannii* bei Rindern überwiegend bestimmen. Zudem unterscheiden sich Betriebe gleicher Bewirtschaftungsformen und Betriebsgrößen trotz allem stark in ihrem individuellen Management, etwa was die Umsetzung von Hygienestandards oder die Therapie von Infektionskrankheiten angeht. Die Ergebnisse sind außerdem nur als Hinweise auf mögliche Einflussfaktoren zu sehen. Um ihre Auswirkungen auf die Prävalenz abschließend beurteilen zu können, sollte das jeweilige Studiendesign zukünftiger Untersuchungen diese Faktoren unbedingt berücksichtigen.

6.3 Vergleichende Untersuchungen zu Virulenz und Biofilmbildung

Neben Untersuchungen zur Prävalenz sowie zur antimikrobiellen Resistenz von *Acinetobacter* spp. bei Rindern, war ein Ziel dieser Arbeit Hinweise darauf zu ermitteln, welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen i) verschiedenen *Acinetobacter* spp. bei Rindern bestehen (*A. baumannii* vs. *A. indicus*) und ii) gleichen *Acinetobacter* spp. unterschiedlicher Wirte (Rind vs. Mensch vs. Umwelt – unabhängig vom klinischen Kontext und Spezies) und klinischer Kontexte (Feldisolat vs. klinisches Isolat – unabhängig von Wirt und Spezies) bestehen. Dem liegt folgende Fragestellung zugrunde: a) Warum kommen bei Rindern hauptsächlich andere *A. baumannii*-Genotypen vor als beim Menschen und b) verfügt die Spezies *A. indicus* über ein pathogenes Potential?

Eine unterschiedliche Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen könnte ein Grund dafür sein, dass *A. indicus* ein geringeres pathogenes Potential besitzt als *A. baumannii*. Es wurden daher ausgewählte Stämme von *A. baumannii* und *A. indicus* im Kristallviolett-Mikrotiterplattentest untersucht. Dabei wurden Feldstämme (10 *A. baumannii* verschiedener STs, 14 *A. indicus*), bovine klinische Isolate (sechs *A. baumannii*, sieben *A. indicus*), humane klinische Isolate (ein *A. baumannii*, zwei *A. indicus*) und umweltassoziierte *A. indicus*-Isolate (n = 2) verwendet. Die Untersuchungen geben erste Hinweise darauf, dass *A. baumannii* aller untersuchten Quellen stärker Biofilm bilden als *A. indicus*. Das könnte eine Voraussetzung für den Erfolg von *A. baumannii* als Krankenhaus-assoziiierter Erreger sein, müssen die Isolate zur Übertragung doch auf abiotischen Oberflächen überleben können. Biofilme bieten den Bakterien in Krankenhäusern einen gewissen Schutz vor Reinigung, Desinfektion und Austrocknung (Longo et al. 2014). Interessant ist, dass unter den im Mangelmedium (M63)

untersuchten *A. baumannii*-Isolate die bovinen Isolate einen signifikant höheren SBF-Koeffizienten zeigten als humane Isolate, entsprechend bovine Feldisolate einen höheren als bovine klinische Isolate und das humane klinische Isolat. Unter der Annahme, dass die bovinen Feldisolate eher zu der Gruppe der umweltassoziierten *A. baumannii* zählen, erscheint diese Tatsache nachvollziehbar. Umweltassoziierte Bakterien sind meist oberflächenassoziiert und damit einer Reihe von Umgebungseinflüssen ausgesetzt, etwa UV-Strahlung, Temperaturschwankungen und Austrocknung. Durch die Bildung von Biofilmen können bakterielle Gemeinschaften widerstandsfähiger gegen diese Einflüsse werden (Ansari et al. 2012). Wirtsassoziierte Bakterien könnten hingegen eher auf Mechanismen der Infektion spezialisiert sein, also die Anheftung an tierische Zellen, die Invasion in Organismen und die Vermehrung im Wirt, verbunden mit der Abwehr von Faktoren des Immunsystems. Um diese Annahmen in Bezug auf *Acinetobacter* weiter überprüfen und die verschiedenen Gruppen innerhalb der Spezies besser vergleichen zu können, sollte in zukünftigen Studien die Zahl der jeweils untersuchten klinischen und humanen Stämme erhöht werden, auch um eine Varianzhomogenität zu gewährleisten.

Bei der Betrachtung von *A. indicus* (n = 25) in diesem Versuch ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei *A. baumannii*, wobei sich aber die bovinen *A. indicus*-Isolate nicht signifikant von den humanen *A. indicus* unterscheiden sondern nur von den umweltassoziierten Isolaten. Womöglich haben sich hier die Isolate vom Rind bereits weiter von den umweltassoziierten Isolaten entfernt als dies bei *A. baumannii* der Fall ist. Auch in diesem Fall sind weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl an Isolaten notwendig, idealerweise Feldisolaten, umweltassoziierten Isolaten sowie klinischen Isolaten aus einem ähnlichen geographischen Kontext. Um Krankenhaus-assoziierte Infektionen verursachen zu können, müssen auch opportunistische Erreger eine gewisse Virulenz besitzen, die ihnen eine Infektion des häufig geschwächten Patienten ermöglicht. Daher wurden im Rahmen der vorgelegten Arbeit neben der Fähigkeit zur Biofilmproduktion auch die Virulenz der Isolate im Wachsmottenmodell vergleichend untersucht. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Wachsmotte ein geeignetes Modell ist, um die Virulenz unterschiedlicher Bakterienspezies, darunter *A. baumannii*, für den Menschen abzubilden (Aperis, G., Burgwynfuchs, B. et al. 2007; Mukherjee et al. 2009; Peleg et al. 2009; Cook und McArthur 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden bovine Feldisolate (11 *A. baumannii*, 36 *A. indicus*), bovine klinische Isolate (fünf *A. baumannii*, sechs *A. indicus*), humane klinische

Isolate (ein *A. baumannii*, zwei *A. indicus*) und umweltassoziierte Isolate (zwei *A. indicus*) verwendet. Wir konnten so die Ergebnisse aus **Publikation 1**, dass *A. indicus* bei der Betrachtung aller untersuchten Stämme eine schwächere Virulenz im Vergleich zu *A. baumannii* zeigen, reproduzieren. Dies passt zur höheren Relevanz von *A. baumannii* als Infektionserreger verglichen mit *A. indicus*, auch wenn bakterielle Erreger mit niedriger Virulenz grundsätzlich auch in der Lage sind, bakterielle Krankenhaus-assoziierte Infektionen zu verursachen. Trotzdem kann auf der Basis unserer Virulenz-Untersuchungen das Risiko, dass in Zukunft wesentlich häufiger *A. indicus* im Rahmen von Krankenhausinfektionen auftreten, als gering eingestuft werden. Vorausgesetzt, die Prävalenz dieser Spezies in klinischen Proben wurde bisher nicht durch die Anwendung unspezifischer diagnostischer Methoden unterschätzt.

Die Virulenz von Bakterien wird auf genetischer Ebene durch die sogenannten Virulenzfaktoren beeinflusst. Dabei gibt es entweder einzelne entscheidende Gene, die die Virulenz eines Erregers maßgeblich bestimmen (beispielsweise die Gene der F18-Fimbrien und des Shigatoxins 2e bei *E. coli*, die die Ödemkrankheit auslösen, oder Gene für die Bildung von Toxinen und Anheftungsmechanismen bei enterotoxischen und enteroaggregativen *E. coli*) (Dubreuil et al. 2016), oder eine Vielzahl von Genen ist an der Virulenz beteiligt. Letzteres ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand bei *Acinetobacter* der Fall. Um die Ergebnisse der Untersuchungen zu Virulenz und Biofilmbildung mit den potentiellen genetischen Determinanten vergleichen zu können, wurde der Virulenzgenotyp von 16 *A. baumannii*- und 34 *A. indicus*-Isolaten, deren Phänotyp zuvor im *Galleria mellonella*-Modell untersucht wurde, auf der Basis von Genomsequenzen analysiert. Dabei konnten erneut die Ergebnisse aus **Publikation 1** bestätigt werden, die darauf hinwiesen, dass sich Virulenz-assoziierte Gene, die für *A. baumannii* beschrieben wurden, bei *A. indicus* entweder gar nicht, oder lediglich mit geringer Sequenzhomologie und somit fraglicher funktionaler Homologie nachweisen lassen. Ob die höhere Sterblichkeit der Mottenlarven tatsächlich mit den einzelnen Virulenzfaktoren, die in der vorgelegten Arbeit berücksichtigt wurden, korreliert, ist auf der Basis dieser Untersuchungen abschließend nicht zu beurteilen. Dies kann nur durch systematische Studien unter Nutzung definierter Mutanten untersucht werden. So konnten einige Autoren bereits Virulenzfaktoren bei *A. baumannii* mit der Sterblichkeit im Wachsmottenmodell in Verbindung bringen. Dies betrifft unter anderen auch die in der vorliegenden Arbeit berücksichtigten Virulenz-assoziierten Gene *bauA*

(Gaddy et al. 2012), *znuA*, *znuB*, *znuC* (Gebhardt et al. 2015) sowie *pld1*, *pld2* und *pld3* (Stahl et al. 2015), die nicht in *A. indicus* aber bis auf wenige Ausnahmen in *A. baumannii* nachgewiesen werden konnten (siehe **Tabelle 8**).

6.4 Limitationen

Wie bei jeder wissenschaftlichen Arbeit sind bei dieser Dissertation einige Limitationen zu beachten, die bei der Interpretation der Ergebnisse und der Durchführung vergleichbarer Studien bedacht werden sollten und bereits teilweise in den beiden Publikationen diskutiert wurden. Von den im Vorfeld der Studie per Post kontaktierten 352 Landwirten meldeten sich zunächst 17 % zurück und 14 % erklärten sich mit der Beprobung einverstanden. Für Landwirte, die eine Ablehnung geschickt hatten, wurden neue Kandidaten ausgewählt und per Post kontaktiert. Die 83 % der Landwirte, die sich nicht zurückgemeldet hatten, wurden wenn möglich, per Telefon kontaktiert. Dieses Verfahren war zeitaufwändig, denn für die meisten Betriebe musste die Telefonnummer erst über öffentliche Verzeichnisse ausfindig gemacht werden. Konnte ein Landwirt nach dreimaligem Versuch nicht telefonisch erreicht werden, wurde per Zufallsliste ein neuer Kandidat ausgewählt und per Post kontaktiert. Gleiches galt für eine telefonische Ablehnung. Im November 2014 wurde mit der Rekrutierung der Probanden begonnen, die bis Anfang des Jahres 2015 abgeschlossen sein sollte. Letztlich wurden über die gesamte Studienzeit hinweg schriftlich und telefonisch Probanden rekrutiert, bis in den Februar 2016. Für eine zukünftige Durchführung ähnlicher Studien könnte a) früher mit der Rekrutierung begonnen werden (mind. 6 Monate vor Beginn der Probennahme) und b) mehr Betriebe kontaktiert werden (mind. die doppelte Menge der benötigten Betriebe).

Das könnte dazu beitragen den avisierten Studienzeitraum besser einhalten zu können. So war die Beprobung für den Zeitraum eines Jahres geplant, es wurden aber 14 Monate für die Durchführung benötigt. Die Teilnahme an der Studie basierte auf freiwilliger Basis, was natürlicherweise zur Auswahl von bestimmten Betrieben mit motivierten Betreibern führte. Die Metadaten wurden hauptsächlich über einen Fragebogen erhoben, weshalb sozial erwünschte Antworten wahrscheinlich einen gewissen Teil der Datenerhebung bilden. Beides kann die Ergebnisse verzerren. Für zukünftige Studien, etwa die Beprobung von Klärschlamm oder Futtermitteln, wäre ein obligatorischer Ansatz, beispielsweise über die unteren Veterinärbehörden, von Vorteil.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Vernachlässigung von *A. indicus* zu Beginn der Studie und die große Zahl an nicht näher charakterisierten Isolaten dieser relativ neuen Spezies. Sowohl die Relevanz als auch die Häufigkeit dieses Erregers war zunächst unbekannt und vor allem existierten zu Anfang der Studie keine Spezies-spezifischen Diagnostika. Um einen besseren Überblick über diese Spezies, insbesondere bezüglich der Prävalenz, der Diversität und Resistenzlage zu bekommen, sollte *A. indicus* bei einer erneuten Untersuchung von Beginn an in das Studiendesign eingeplant werden. Dies gilt gleichermaßen für Studien, die sich mit anderen Tierarten und dem Menschen beschäftigen, wo die Datenlage ebenso marginal ist.

Zu den *Galleria mellonella*-Infektionsversuchen zur Abschätzung der Virulenz von *A. baumannii* und *A. indicus* ist zu beachten, dass die Larven nicht aus standardisierten Haltungen stammten sondern im kommerziellen Futterfachhandel erworben wurden. Eine Qualitätssicherung nach wissenschaftlichen Standards war damit von Seiten des Lieferanten nicht gewährleistet. Es ist bekannt, dass bei solchen Tieren regelmäßig Kontaminationen mit Gram-negativen Bakterien (z.B. *Proteus* spp.) auftreten, die zum Absterben der Larven nach Inkubation bei 37°C führen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst versucht, die Tiere selbst zu züchten. Dafür wurden zwei Zuchtansätze genutzt, die jedoch nicht den nötigen Ertrag für die geplanten umfangreichen Experimente lieferten. Eine größere Zucht war aus logistischen Gründen nicht möglich, daher wurde dazu übergangen die Motten bei Fachhändlern zu erwerben. Um dem Risiko der Kontamination bestmöglich Rechnung zu tragen, wurden verschiedene Kontrollgruppen in die Untersuchungen einbezogen. Betrug die Sterblichkeit in einer dieser Kontrollgruppen über 80 %, wurde der Versuch wiederholt und die Daten nicht gewertet. Für zukünftige Versuche wäre eine eigene kontrollierte *Galleria mellonella*-Zucht vorzuziehen. Außerdem gibt es bereits kommerziell erhältliche, spezifisch pathogen freie Mottenlarven für wissenschaftliche Zwecke, die allerdings mit Kosten von 1,16 Euro pro Raupe (<https://biosystemstechnology.com>) im Vergleich zu 3 Cent pro Raupe aus dem Futterfachhandel (www.vivara.de) einen deutlich erhöhten Kostenaufwand bedeutet hätten.

Die Untersuchung der Virulenz-assoziierten Gene umfasst die in der Literatur im Zusammenhang mit dem *Galleria mellonella*-Modell erwähnten Determinanten, sowie weitere Gene, die zum Teil als ursächlich im Zusammenhang mit der Fähigkeit zur Biofilmbildung gebracht wurden. Umfangreiches Datenmaterial (Genomsequenzen), das für weitere Analysen zur Verfügung steht, ist jedoch hinsichtlich der Identifikation und der

Beurteilung der Relevanz weiterer potentieller virulenzassoziierter Gene noch nicht vollständig ausgewertet. Neben den im bakteriellen Genom vorhandenen Virulenzgenen als solche ist für die Ausprägung eines virulenten Phänotyps auch die Expression dieser Gene entscheidend. Untersuchungen dazu sind im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt worden und sollten für eine abschließende Beurteilung des genetischen Hintergrunds und dessen Einfluss auf die Virulenz der Isolate in zukünftigen Studien ergänzt werden. Gleiches gilt für die Untersuchung Biofilm-assoziierter Gene.

6.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *A. baumannii* und *A. indicus* häufig bei Rindern in Hessen vorkommen und bovine *A. indicus*-Isolate sogar relevante Resistenzgene tragen, die auch bei *A. baumannii* vorkommen, die im Zusammenhang mit Krankenhaus-assoziierten Infektionen stehen. Auch wenn auf Grundlage der phylogenetischen Analysen nur in begrenztem Umfang Hinweise auf ein zoonotisches Potential von *A. baumannii* gefunden werden konnte, ist dies doch Grund genug, bovinen *Acinetobacter* spp. eine erhöhte Aufmerksamkeit zu schenken. Es ist außerdem nicht auszuschließen, dass einige bisher ausschließlich beim Tier nachgewiesene STs in Zukunft auch in humanen Infektionen eine Rolle spielen könnten, zumal die Virulenz der von humanen Isolaten ähnlich zu sein scheint. Eine parallele Beprobung der Landwirte könnte etwa wichtige Erkenntnisse zur Übertragbarkeit der Erreger liefern. Hierfür kämen sowohl Rektaltupfer (Dijkshoorn et al. 2005) als auch Nasentupfer (Seifert et al. 1997) in Frage. Nicht nur sollten in weiteren Studien die Virulenz-assoziierten Genotypen und Phänotypen der Stämme weitergehend charakterisiert werden, auch ist die Aufnahme der Erreger in nationale und internationale Überwachungsprogramme Lebensmittel-liefernder Tiere notwendig, um der Gefahr der potentiellen Übertragung von bovinen *Acinetobacter* spp. und insbesondere deren Resistenzgenen in die Bevölkerung Rechnung zu tragen. Den Erkenntnissen dieser Arbeit folgend scheinen Nasentupfer ein geeignetes Probenmaterial für die Isolierung von *A. baumannii* von Rindern darzustellen. Auch wenn Milchkühe in unserer Studie die höchsten Prävalenzen für *A. baumannii* aufwiesen, sollten aus Sicht des Verbraucherschutzes auch Rinder, die in der Fleischproduktion eingesetzt werden, sowie Milch- und Fleischprodukte in zukünftigen Studien und Überwachungsprogrammen berücksichtigt werden. Für die Untersuchung von *A. indicus* stellen Sammelkotproben ein geeignetes Probenmaterial dar.

Die von uns ermittelten Einflussfaktoren auf das Vorkommen der Erreger sollten in weiterführenden Studien näher untersucht werden. Dabei könnte es aufschlussreich sein, Proben aus Klärschlamm und Futter (v.a. Soja) auf *Acinetobacter* spp. hin zu untersuchen.

Im Zusammenhang mit dem zoonotischen Potential bleibt außerdem abzuwarten, ob die bisher noch wenig untersuchte Spezies *A. indicus* in der Humanmedizin weiterhin eine untergeordnete Rolle spielen wird oder ob Sie aufgrund bis dato unzureichender Identifikationsmethoden bisher übersehen wurde.

Im Rahmen weiterer Studien, die parallel zu dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnten Carbapenem-resistente *A. baumannii*-Isolate bei Begleittieren nachgewiesen werden, die teils auch zu den weltweit verbreiteten nosokomialen Linien gehörten. Ebenso wurden *A. pittii* bei Begleittieren gefunden, die hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften und klonaler Herkunft eine hohe Verwandtschaft mit humanen Isolaten dieser Spezies zeigten (Ewers et al. 2016; Ewers et al. 2017; Klotz et al. 2017b; Klotz et al. 2018). Die *Acinetobacter*-Population unterscheidet sich nach bisherigem Kenntnisstand zwischen Rindern und Kleintieren also grundlegend. Wie dem Literaturteil zu entnehmen ist, stützen Publikationen von anderen Autoren diese Hypothese. Stämme von Kleintieren scheinen eher klinischen humanen Isolaten zu entsprechen, was auf einen Austausch zwischen Menschen und Kleintieren hindeutet.

A. baumannii-Stämme von Rindern hingegen zeigen eher die Diversität von Stämmen, die bei umweltassoziierten Isolaten (teils auch von Wildtieren) nachgewiesen werden (Pailhoriès et al. 2015; Bardbari et al. 2017; Wilharm et al. 2017). Verschieden Autoren spekulieren, dass solche Isolate damit möglicherweise einen phylogenetisch alten Pool an *Acinetobacter*-Stämmen repräsentieren, der jener Ursprungspopulation entspricht, aus der die Krankenhaus-assoziierten Stämme in der Vergangenheit durch ein Flaschenhals-Ereignis hervorgegangen sind (Diancourt et al. 2010; Touchon et al. 2014). Diese Theorie könnte mittels umfangreicher vergleichender genomischer Analysen repräsentativer Stämme der verschiedenen Habitate geprüft werden. Dies kann dazu beitragen, die Entstehung und Persistenz bestimmter klonaler *Acinetobacter*-Linien, einschließlich der dominanten Genotypen Krankenhaus-assoziiierter Stämme besser verstehen zu können. Nur über dieses bessere Verständnis können zukünftig Maßnahmen ergriffen werden, um die Selektion und Übertragung von diesen häufig Carbapenemase-produzierenden *Acinetobacter* spp. und ihren Resistenzdeterminanten zu minimieren, etwa durch adäquate Regelungen zur

Anwendung antimikrobieller Substanzen oder verpflichtende Überwachungskonzepte in der Lebensmittelkette.

7 Zusammenfassung

Acinetobacter baumannii ist einer der wichtigsten Erreger Krankenhaus-assoziiierter Infektionen beim Menschen. Zum Vorkommen bei Lebensmittel-liefernden Tieren ist wenig bekannt. Um die Prävalenz, den phylogenetischen Hintergrund, antimikrobielle Resistenzen, Virulenz und Biofilmbildung von bovinen *Acinetobacter*-Isolaten zu untersuchen, wurden 422 Rinder, davon 280 Milchkühe, 59 Mastrinder und 83 Kälber, in einem Zeitraum von 14 Monaten beprobt (Nasentupfer, Rektaltupfer, Sammelkotproben). Metadaten, wie etwa den vorhergehenden Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen und die Fütterung, wurden erhoben um mögliche Risikofaktoren für das Vorkommen von *Acinetobacter* spp. zu identifizieren. Die Bakterienisolate wurden mit MALDI-TOF/MS und PCRs identifiziert, die antimikrobielle Empfindlichkeit wurde mittels VITEK2 und Gradiententests beurteilt, Resistenzgene wurden mittels PCR identifiziert. Insgesamt trugen 15,6 % der Rinder *A. baumannii*, hauptsächlich in der Nase (60,3 % der *A. baumannii* Isolate). Das Bakterium konnte häufiger aus Milchkühen (21,1 %) als aus Mastvieh (6,8 %) und Kälbern (2,4 %) isoliert werden. Ein saisonales Auftreten konnte mit einem Maximum zwischen Mai und August gezeigt werden. Eine Analyse mittels logistischer Regression identifizierte den Einsatz von Cephalosporinen der dritten Generation sechs Monate vor der Beprobung, das Trimester der Probennahme und die Kategorie (Milch, Mast, Kalb) als mutmaßliche Risikofaktoren für das Auftreten von *A. baumannii*. Außer den bei dieser Spezies bekannten intrinsischen Resistenzen zeigten die bovinen *A. baumannii*-Isolate keine zusätzlichen Resistenzen gegen die getesteten antimikrobiellen Wirkstoffe, eingeschlossen Carbapeneme. Die Multilokus-Sequenztypisierung (Pasteur-Schema) deckte 83 verschiedene Sequenztypen (STs) auf. Davon waren neun bereits mit humanen Infektionen in Verbindung gebracht worden.

Bei Voruntersuchungen und während der Durchführung der Studie wurden *A. indicus* nachgewiesen, die teils erhöhte MHK gegenüber Carbapenemen zeigten. Die Spezies wurde daraufhin ebenfalls bei der Auswertung berücksichtigt. Die Prävalenz von *A. indicus* lag bei 12,6 %. Eine Fütterung mit Soja hatte einen positiven Einfluss auf das Vorkommen des Bakteriums, eine Fütterung mit Heu einen negativen. Elf Isolate trugen Carbapenemase-

Gene. Das Vorkommen der Gene konnte mit einem häufigeren Einsatz von Antibiotika auf dem korrespondierenden Betrieb sowie dem Einsatz der Wirkstoffgruppen Florfenicol und Sulfonamide in Verbindung gebracht werden. Die Mehrzahl der Gene gehörte zur *bla*_{OXA-23}-like Gruppe und lag auf einer Tn2008 Transposon-Struktur, die auch von Krankenhaus-assoziierten *A. baumannii*-Isolaten bekannt ist. Diese Struktur war bei allen Isolaten, die keinen Resistenzphänotyp ausbildeten, durch ein oder mehrere Insertionselemente unterbrochen. *A. indicus* zeigen einen schwächeren Virulenz-Phänotyp im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell im Vergleich zu *A. baumannii*. Virulenz-assoziierte Gene, die für *A. baumannii* beschrieben wurden, lassen sich entsprechend bei *A. indicus* nicht oder mit geringer Sequenzähnlichkeit nachweisen. Auch bildet *A. indicus* einen signifikant schwächeren Biofilm aus. Auf Grundlage der phylogenetischen Analysen der vorliegenden Arbeit kann ein zoonotisches Potential von *A. baumannii* nicht ausgeschlossen werden. Daher sollten in weiteren Studien die Virulenz-assoziierten Genotypen und Phänotypen weitergehend charakterisiert werden. Die Aufnahme von *A. baumannii* in nationale und internationale Überwachungsprogramme bei Lebensmittel-liefernden Tieren sollte dringend in Erwägung gezogen werden, um der Gefahr einer potentiellen Übertragung von bovinen *Acinetobacter* spp. und insbesondere deren Resistenzgenen in die Bevölkerung Rechnung zu tragen. Vor diesem Hintergrund sollte das Auftreten von *A. indicus*-Stämmen vom Rind, die Carbapenemase-Gene auf genetisch mobilen Elementen tragen, hinsichtlich des pathogenen Potentials, genomischer Charakteristika, zoonotischem Risiko und weiterer Quellen weiter untersucht werden. Zukünftige Studien werden zeigen, ob *A. indicus* in der Humanmedizin weiterhin eine untergeordnete Rolle spielen wird, oder ob der Erreger aufgrund bis dato unzureichender Identifikationsmethoden bisher unterschätzt wurde.

8 Summary

Acinetobacter baumannii is one of the most important healthcare-associated opportunistic pathogens in humans. Data concerning the occurrence in livestock is scarce. To investigate the prevalence, the phylogenetic background, antimicrobial resistance, virulence and biofilm-formation of bovine *Acinetobacter* isolates, we sampled 422 cattle, thereof 280 dairy cows, 59 beef cattle and 83 calves, in a 14-month period (nasal swabs, rectal swabs, pen-floor fecal sample). Metadata, such as the previous use of antimicrobials or feeding were collected to identify possible risk factors for the occurrence of *Acinetobacter* spp. The isolates

were identified via MALDI-TOF/MS and PCR, the antimicrobial susceptibility was evaluated with VITEK2 and gradient tests, resistance genes were identified with PCR. In total 15.6 % of cattle carried *A. baumannii* mainly in the nose (60.3 % of *A. baumannii* isolates). The bacterium could be isolated more frequently from dairy cows (21.1 %) than from beef cattle (6.8 %) and calves (2.4 %). A seasonal occurrence could be demonstrated with a peak from Mai to August. A logistic regression analysis identified the use of third generation cephalosporins six months prior to sampling, the trimester of sampling and the category (dairy, beef, calf) as putative risk factors for the occurrence of *A. baumannii*. Apart from the typical intrinsic resistance of this species no resistance could be shown against the antimicrobial compounds tested, including carbapenems. Multilocus-sequence typing (Pasteur) revealed 83 different sequence types (STs). Thereof nine were linked with human infections in the past.

In preliminary investigations and during this study *A. indicus* were isolated, some of which showed increased MICs towards carbapenems. This species was furtheron included into the interpretation of the results. The prevalence of *A. indicus* was 12.6 %. Feeding with soy was positively correlated to the occurrence of the bacterium, feeding with straw was negatively correlated. Eleven isolates carried carbapenemase genes. The occurrence of the gene was associated with a more frequent use of antimicrobials on the farm and the use of florfenicol and sulfonamides. The majority of genes belonged to the *bla*_{OXA-23}-like group and was located on a Tn2008 transposon which is known from healthcare-associated *A. baumannii*. This structure was interrupted in all isolates lacking a resistance phenotype. *A. indicus* show a reduced virulence phenotype in the *Galleria mellonella* infection model compared to *A. baumannii*. Virulence-associated genes described in *A. baumannii* were either not present in *A. indicus* or revealed low sequence homology. *A. indicus* showed a lower biofilm-formation capability. Based on the phylogenetic analyses of this study a zoonotic potential of *A. baumannii* cannot be excluded. Therefore further studies should characterize virulence-associated genotypes and phenotypes. Due to the potential risk of the transmission of *Acinetobacter* spp. and particularly of their resistance genes to humans, their consideration in national and international surveillance programmes in livestock should carefully be discussed. The occurrence of bovine *A. indicus* strains which carry carbapenemase genes on mobile genetic elements should be investigated concerning the pathogenicity, genomic characteristics, putative zoonotic potential and further sources or reservoirs. Future

studies will show whether *A. indicus* will still play a marginal role in human medicine or if it has been underrated due to inappropriate identification methods.

9 Literaturverzeichnis

- Abbo, A.; Carmeli, Y.; Navon-Venezia, S.; Siegman-Igra, Y.; Schwaber, M. J.** (2007): Impact of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* on clinical outcomes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 26 (11), S. 793–800.
- Ahmed, A. M.; Motoi, Y.; Sato, M.; Maruyama, A.; Watanabe, H.; Fukumoto, Y.; Shimamoto, T.** (2007): Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology* 73 (20), S. 6686–6690.
- Al Atrouni, A.; Hamze, M.; Jisr, T.; Lemarié, C.; Eveillard, M.; Joly-Guillou, M.-L.; Kempf, M.** (2016a): Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *International Journal of Infectious Diseases* 52, S. 29–36.
- Al Atrouni, A.; Joly-Guillou, M.-L.; Hamze, M.; Kempf, M.** (2016b): Reservoirs of Non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *Frontiers in Microbiology* 7 (49).
- Al Bayssari, C.; Dabboussi, F.; Hamze, M.; Rolain, J.-M.** (2015): Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (3), S. 950–951.
- Allardet-Servent, A.; Bouziges, N.; Carles-Nurit, M. J.; Bourg, G.; Gouby, A.; Ramuz, M.** (1989): Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (9), S. 2057–2061.
- Anhalt, J. P.; Fenselau, C.** (1975): Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 47 (2), S. 219–225.
- Ansari, M. I.; Schiwon, K.; Malik, A.; Grohmann, E.** (2012): Biofilm formation by environmental bacteria. In: Abdul Malik und Elisabeth Grohmann (Hg.): Environmental protection strategies for sustainable development, Bd. 131. Dordrecht: Springer Netherlands, S. 341–377.
- Aperis, G.; Burgwynfuchs, B.; Anderson, C.; Warner, J.; Calderwood, S.; Mylonakis, E.** (2007): *Galleria mellonella* as a model host to study infection by the *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbes and Infection* 9 (6), S. 729–734.
- Arroyo, L. A.; Herrera, C. M.; Fernandez, L.; Hankins, J. V.; Trent, M. S.; Hancock, R. E. W.** (2011): The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (8), S. 3743–3751.
- Bardbari, A. M.; Arabestani, M. R.; Karami, M.; Keramat, F.; Bagheri, K. P.** (2017): Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. *Microbial Pathogenesis* 108, S. 122–128.
- Bartual, S. G.** (2005): Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (9), S. 4382–4390.
- Bauer, A. W.; Kirby, W. M.; Sherris, J. C.; Turck, M.** (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Technical bulletin of the Registry of Medical Technologists* 36 (3), S. 49–52.
- Bauer, A. W.; Perry, D. M.; Kirby, W. M.** (1959): Single-disk antibiotic-sensitivity testing of Staphylococci. *A.M.A. Archives of Internal Medicine* 104 (2), S. 208.

- Beijerinck, M.** (1911): Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl. Koninklijke Akad. Wetensch. Amsterdam* (19), S. 1092–1103.
- Belmonte, O.; Pailhoriès, H.; Kempf, M.; Gaultier, M. P.; Lemarié, C.; Ramont, C. et al.** (2014): High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. *Veterinary Microbiology* 170 (3-4), S. 446–450.
- Bentz, A. I.; Wilkins, P. A.; MacGillivray, K. C.; Barr, B. S.; Palmer, J. E.** (2002): Severe thrombocytopenia in 2 thoroughbred foals with sepsis and neonatal encephalopathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16 (4), S. 494–497.
- Bergey, David H.; Garrity, George M.; Boone, David R.; Brenner, Don J.; Vos, Paul de** (2005): *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. ed. New York: Springer Science + Business Media.
- Bertini, A.; Poirel, L.; Mugnier, P. D.; Villa, L.; Nordmann, P.; Carattoli, A.** (2010): Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (10), S. 4168–4177.
- Bhagan-Bruno, S.; Lather, N.; Fergus, I. V.** (2010): *Acinetobacter* endocarditis presenting as a large right atrial mass: an atypical presentation. *Echocardiography* 27 (4), E39-E42.
- Black, D. M.; Rankin, S. C.; King, L. G.** (2009): Antimicrobial therapy and aerobic bacteriologic culture patterns in canine intensive care unit patients. 74 dogs (January-June 2006). *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 19 (5), S. 489–495.
- Blanchard, T. L.; Woods, J. A.; Brinsko, S. P.; Varner, D. D.; Boothe, D. M.** (2002): Views theriogenology question of the month. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221 (6), S. 793–795.
- Boerlin, P.; Eugster, S.; Gaschen, F.; Straub, R.; Schawald, P.** (2001): Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology* 82 (4), S. 347–359.
- Boguta, L.; Gradzki, Z.; Borges, E.; Maurin, F.; Kodjo, A.; Winiarczyk, S.** (2002): Bacterial flora in foals with upper respiratory tract infections in Poland. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 49 (6), S. 294–297.
- Bonnin, R. A.; Nordmann, P.; Potron, A.; Lecuyer, H.; Zahar, J.-R.; Poirel, L.** (2011): Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (1), S. 349–354.
- Bonnin, R. A.; Poirel, L.; van der Reijden, Tanny J.K.; Dijkshoorn, L.; Lescat, M.; Nordmann, P.** (2014): Carbapenem-resistance in a human clinical isolate identified to be closely related to *Acinetobacter indicus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 44 (4), S. 345–350.
- Bonomo, R. A.; Szabo, D.** (2006): Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases* 43 Suppl 2, S49-S56.
- Borgmann, S.; Wolz, C.; Gröbner, S.; Autenrieth, I.B.; Heeg, P.; Goerke, C. et al.** (2004): Metallo- β -lactamase expressing multi-resistant *Acinetobacter baumannii* transmitted in the operation area. *Journal of Hospital Infection* 57 (4), S. 308–315.
- Bouvet, P. J. M.; Grimont, P. A. D.** (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*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36 (2), S. 228–240.
- Bouvet, P.J.M.; Grimont, P.A.D.** (1987): Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.* 138 (138), S. 569–578.

- Brachelente, C.; Wiener, D.; Malik, Y.; Huessy, D.** (2007): A case of necrotizing fasciitis with septic shock in a cat caused by *Acinetobacter baumannii*. *Veterinary Dermatology* 18 (6), S. 432–438.
- Bradford, P. A.** (2001): Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 14 (4), 933–951.
- Brahmi, S.; Touati, A.; Cadiere, A.; Djahmi, N.; Pantel, A.; Sotto, A. et al.** (2016): First description of two sequence type 2 *Acinetobacter baumannii* isolates carrying OXA-23 carbapenemase in *Pagellus acarne* fished from the mediterranean sea near Bejaia, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60 (4), S. 2513–2515.
- Brown, S.; Young, H. K.; Amyes, S. G. B.** (2005): Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection* 11 (1), S. 15–23.
- Byrne-Bailey, K. G.; Gaze, W. H.; Kay, P.; Boxall, A. B. A.; Hawkey, P. M.; Wellington, E. M. H.** (2009): Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (2), S. 696–702.
- Cantas, L.; Suer, K.** (2014): Review: The important bacterial zoonoses in "one health" concept. *Frontiers in Public Health* 2, S. 144.
- Cascio, A.; Conti, A.; Sinardi, L.; Iaria, C.; Angileri, F. F.; Stassi, G. et al.** (2010): Post-neurosurgical multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* meningitis successfully treated with intrathecal colistin. A new case and a systematic review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases* 14 (7), e572–e579.
- Cattabiani, F.; Cabassi, E.; Allodi, C.; Gianelli, F.** (1976): Flora batterica del sacco congiuntivale del cavallo. *Annali Sclavo; rivista di microbiologia e di immunologia* 18 (1), S. 91–119.
- Ceri, H.; Olson, M. E.; Stremick, C.; Read, R. R.; Morck, D.; Buret, A.** (1999): The Calgary Biofilm Device. New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* 37 (6), S. 1771–1776.
- Chanchaithong, P.; Prapasarakul, N.; Sirisopit Mehl, N.; Suanpirintr, N.; Teankum, K.; Collaud, A. et al.** (2018): Extensively drug-resistant community-acquired *Acinetobacter baumannii* sequence type 2 in a dog with urinary tract infection in Thailand. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 13, S. 33–34.
- Choi, C. H.; Hyun, S. H.; Lee, J. Y.; Lee, J. S.; Lee, Y. S.; Kim, S. A. et al.** (2008): *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cellular Microbiology* 10 (2), S. 309–319.
- CLSI** (2014): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th ed. CLSI Supplement M100S. Wayne, PA, USA, 2016.
- Cook, S. M.; McArthur, J. D.** (2013): Developing *Galleria mellonella* as a model host for human pathogens. *Virulence* 4 (5), S. 350–353.
- Corbella Xavier** (1996): Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases* 1996 (23), S. 329–334.
- Corvec, S.; Caroff, N.; Espaze, E.; Giraudeau, C.; Drugeon, H.; Reynaud, A.** (2003): AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (4), S. 629–635.

- Corvec, S.; Poirel, L.; Naas, T.; Drugeon, H.; Nordmann, P.** (2007): Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-23} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (4), S. 1530–1533.
- Cosgaya, C.; Mari-Almirall, M.; van Assche, A.; Fernández-Orth, D.; Mosqueda, N.; Telli, M. et al.** (2016): *Acinetobacter dijkshoorniae* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex mainly recovered from clinical samples in different countries. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66, S. 4105–4111.
- Cuny, C.; Wieler, L. H.; Witte, W.** (2015): Livestock-associated MRSA: The impact on humans. *Antibiotics (Basel)* 4 (4), S. 521–543.
- Curran, E. T.** (2013): Outbreak Column 7: Pseudo-outbreaks (part 1). *Journal of Infection Prevention* 14 (2), S. 69–74.
- Da Silva, G. J.; van der Reijden, T.; Domingues, S.; Mendonça, N.; Petersen, K.; Dijkshoorn, L.** (2014): Characterization of a novel international clonal complex (CC32) of *Acinetobacter baumannii* with epidemic potential. *Epidemiology and Infection* 142 (7), S. 1554–1558.
- Dahiru, M.; Enabulele, O. I.** (2015): *Acinetobacter baumannii* in birds' feces: a public health threat to vegetables and irrigation farmers. *Advances in Microbiology* 05 (10), S. 693–698.
- Damborg, P.; Broens, E. M.; Chomel, B. B.; Guenther, S.; Pasmans, F.; Wagenaar, J. A. et al.** (2016): Bacterial zoonoses transmitted by household pets: state-of-the-art and future perspectives for targeted research and policy actions. *Journal of Comparative Pathology* 155 (1 Suppl 1), S27–40.
- Das, A. M.; Paranjape, V. L.** (1986): *Acinetobacter calcoaceticus* in three cases of late abortion in water buffaloes. *The Veterinary Record* 118 (8), S. 214.
- Dexter, C.; Murray, G. L.; Paulsen, I. T.; Peleg, A. Y.** (2015): Community-acquired *Acinetobacter baumannii*. Clinical characteristics, epidemiology and pathogenesis. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 13 (5), S. 567–573.
- Diancourt, L.; Passet, V.; Nemec, A.; Dijkshoorn, L.; Brisse, S.; Ahmed, N.** (2010): The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* 5 (4), e10034.
- Dickie, C. W.; Regnier, J. O.** (1978): Equine myositis and septicemia caused by *Acinetobacter calcoaceticus* infection. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 172 (3), S. 357–359.
- Dijkshoorn, L.; Aucken, H.; Gerner-Smidt, P.; Janssen, P.; Kaufmann, M. E.; Garaizar, J. et al.** (1996): Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology* 34 (6), S. 1519–1525.
- Dijkshoorn, L.; Nemec, A.; Seifert, H.** (2007): An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology* 5 (12), S. 939–951.
- Dijkshoorn, L.; van Aken, E.; Shunburne, L.; van der Reijden, T. J. K.; Bernards, A. T.; Nemec, A.; Towner, K. J.** (2005): Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clinical Microbiology and Infection* 11 (4), S. 329–332.
- Dijkshoorn, L.; van Harsselaar, B.; Tjernberg, I.; Bouvet, P. J.M.; Vaneechoutte, M.** (1998): Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Acinetobacter* genomic species. *Systematic and Applied Microbiology* 21 (1), S. 33–39.
- Diker, K. S.; Arda, M.; Izgür, H.** (1986): Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from cows with metritis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 33 (8), S. 632–633.

- Dixon, Wilfrid Joseph** (1992): BMDP statistical software manual. Berkeley, Princeton, N.J.: University of California Press; California/Princeton Fulfillment Services.
- Doi, Y.; Adams, J. M.; Yamane, K.; Paterson, D. L.** (2007): Identification of 16S rRNA methylase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical strains in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (11), S. 4209–4210.
- Doughari, H. J.; Ndakidemi, P. A.; Human, I. S.; Benade, S.** (2011): The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp. *Microbes and Environments* 26 (2), S. 101–112.
- Dubreuil, J. D.; Isaacson, R. E.; Schifferli, D. M.** (2016): Animal enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* 7 (1).
- ECDC** (2018): Surveillance of antimicrobial resistance in Europe. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017.
- EFSA** (2013): Scientific opinion on carbapenem-resistance in food animal ecosystems. *EFSA Journal* 11 (12), S. 3501.
- EFSA** (2015): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food - borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 13 (12), S. 148.
- Eijkelkamp, B. A.; Stroeher, U. H.; Hassan, K. A.; Papadimitriou, M. S.; Paulsen, I. T.; Brown, M. H.; Lo, R.** (2011): Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiology Letters* 323 (1), S. 44–51.
- Endimiani, A.; Hujer, K. M.; Hujer, A. M.; Bertschy, I.; Rossano, A.; Koch, C. et al.** (2011): *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (10), S. 2248–2254.
- Ercolini, D.; Russo, F.; Nasi, A.; Ferranti, P.; Villani, F.** (2009): Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential in vitro and in beef. *Applied and Environmental Microbiology* 75 (7), S. 1990–2001.
- Erganis, O.; Corlu, M.; Kaya, O.; Ates, M.** (1988): Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from septicemic hens. *The Veterinary Record* 123 (14), S. 374.
- Espinal, P.; Pantel, A.; Rolo, D.; Marti, S.; López-Rojas, R.; Smani, Y. et al.** (2019): Relationship between different resistance mechanisms and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance* 25 (5), S. 752–760.
- Espinal, P.; Seifert, H.; Dijkshoorn, L.; Vila, J.; Roca, I.** (2012): Rapid and accurate identification of genomic species from the *Acinetobacter baumannii* group by MALDI-TOF MS. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (11), S. 1097–1103.
- EUCAST** (2016): Expert Rules Version 3.1. Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Tables. Online verfügbar unter http://www.eucast.org/expert_rules.
- EUCAST** (2018): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0. Online verfügbar unter <http://www.eucast.org>.
- EUCAST** (2019): Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 9.0, valid from 2019-01-01. Online verfügbar unter <http://www.eucast.org>.
- European Centre for Disease Prevention and Control** (2017): Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015- Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net).
- European Commission** (2013): Commission implementing decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. *Official Journal of the European Union* (L303/26).
- Euzéby, J. P.** (1997): List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Microbiology* 47, S. 590–592. Online verfügbar unter <http://www.bacterio.net>.

- Ewers, C.; Klotz, P.; Leidner, U.; Stamm, I.; Prenger-Berninghoff, E.; Gottig, S. et al. (2017): OXA-23 and ISAb1-OXA-66 class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49 (1), S. 37–44.
- Ewers, C.; Klotz, P.; Scheufen, S.; Leidner, U.; Gottig, S.; Semmler, T. (2016): Genome sequence of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* IHIT7853, a carbapenem-resistant strain from a cat belonging to international clone IC1. *Gut Pathogens* 8, S. 37.
- Falagas, M. E.; Vardakas, K. Z.; Roussos, N. S. (2015): Trimethoprim/sulfamethoxazole for *Acinetobacter* spp.: A review of current microbiological and clinical evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents* 46 (3), S. 231–241.
- Feil, E. J.; Li, B. C.; Aanensen, D. M.; Hanage, W. P.; Spratt, B. G. (2004): eBURST. Inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. *Journal of Bacteriology* 186 (5), S. 1518–1530.
- Fenselau, C.; Demirev, P. A. (2001): Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* 20 (4), S. 157–171.
- Fernando, D. M.; Khan, I. U. H.; Patidar, R.; Lapen, D. R.; Talbot, G.; Topp, E.; Kumar, A. (2016): Isolation and characterization of *Acinetobacter baumannii* recovered from *Campylobacter* selective medium. *Frontiers in Microbiology* 7, S. 1871.
- Fiester, S. E.; Arivett, B. A.; Schmidt, R. E.; Beckett, A. C.; Ticak, T.; Carrier, M. V. et al. (2016): Iron-regulated Phospholipase C activity contributes to the cytolytic activity and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* 11 (11), e0167068.
- Francey, T. (2000): The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2000 (14), S. 177–183.
- Frankfurter Allgemeine Zeitung (2015): Weiterer Infizierter in Kiel gestorben. *Frankfurter Allgemeine Zeitung*, 26.01.2015. Online verfügbar unter <http://www.faz.net/-gum-7z1a0>.
- Furlan, J. P. R.; Pitondo-Silva, A.; Stehling, E. G. (2018): New STs in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* harboring β -lactamases encoding genes isolated from Brazilian soils. *Journal of Applied Microbiology*.
- Gaddy, J. A.; Arivett, B. A.; McConnell, M. J.; López-Rojas, R.; Pachón, J.; Actis, L. A. (2012): Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. *Infection and Immunity* 80 (3), S. 1015–1024.
- Garnacho, J.; Sole-Violan, J.; Sa-Borges, M.; Diaz, E.; Rello, J. (2003): Clinical impact of pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* in intubated patients: A matched cohort study. *Critical Care Medicine* 31 (10), S. 2478–2482.
- Gebhardt, M. J.; Gallagher, L. A.; Jacobson, R. K.; Usacheva, E. A.; Peterson, L. R.; Zurawski, D. V.; Shuman, H. A. (2015): Joint transcriptional control of virulence and resistance to antibiotic and environmental stress in *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 6 (6), e01660-15.
- Gemensky-Metzler, A. J.; Wilkie, D. A.; Kowalski, J. J.; Schmall, L. M.; Willis, A. M.; Yamagata, M. (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), S. 800–811.
- Gentilini, F.; Turba, M. E.; Pasquali, F.; Mion, D.; Romagnoli, N.; Zambon, E. et al. (2018): Hospitalized pets as a source of carbapenem-resistance. *Frontiers in Microbiology* 9, S. 2872.
- Gerner-Smidt, P.; Tjernberg, I.; Ursing, J. (1991): Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 29 (2), S. 277–282.

- Giannouli, M.; Cuccurullo, S.; Crivaro, V.; Di Popolo, A.; Bernardo, M.; Tomasone, F. et al.** (2010): Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (4), S. 1223–1230.
- Gibson, J. A.; Eaves, L. E.** (1981): Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from an aborted equine foetus. *Australian Veterinary Journal* 57 (11), S. 529–531.
- Girlich, D.; Poirel, L.; Nordmann, P.** (2009): First isolation of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene from an environmental *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (1), S. 578–579.
- Godeux, A.-S.; Lupo, A.; Haenni, M.; Guette-Marquet, S.; Wilharm, G.; Laaberki, M. H.; Charpentier, X.** (2018): Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* 200 (19), e00181-18.
- Goldstein, F. W.; Labigne-Roussel, A.; Gerbaud, G.; Carlier, C.; Collatz, E.; Courvalin, P.** (1983): Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter*. *Plasmid* 10 (2), S. 138–147.
- Gottig, S.; Gruber, T. M.; Higgins, P. G.; Wachsmuth, M.; Seifert, H.; Kempf, V. A. J.** (2014): Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (9), S. 2578–2579.
- Gouby, A.; Carles-Nurit, M. J.; Bouziges, N.; Bourg, G.; Mesnard, R.; Bouvet, P. J.** (1992): Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 30 (6), S. 1588–1591.
- Gregorio, E. de; Del Franco, M.; Martinucci, M.; Roscetto, E.; Zarrilli, R.; Di Nocera, P. P.** (2015): Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 16), S. 933.
- Guardabassi, L.; Dijkshoorn, L.; Collard, J. M.; Olsen, J. E.; Dalsgaard, A.** (2000): Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. *Journal of Medical Microbiology* 49 (10), S. 929–936.
- Guerra, B.; Fischer, J.; Helmuth, R.** (2014): An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. *Veterinary Microbiology* 171 (3-4), 290-297.
- Hamidian, M.; Hall, R. M.** (2017): *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 carries *Glsu2* in a genomic island located in the chromosome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (1), e01991-16.
- Hamouda, A.; Evans, B. A.; Towner, K. J.; Amyes, S. G. B.** (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. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (7), S. 2476–2483.
- Hamouda, A.; Findlay, J.; Al Hassan, L.; Amyes, S. G.B.** (2011): Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38 (4), S. 314–318.
- Hamouda, A.; Vali, L.; Amyes, S. G. B.** (2008): Gram-negative non-fermenting bacteria from food-producing animals are low risk for hospital-acquired infections. *Journal of Chemotherapy* 20 (6), S. 702–708.
- Healy, M.; Huong, J.; Bittner, T.; Lising, M.; Frye, S.; Raza, S. et al.** (2005): Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 43 (1), S. 199–207.
- Heindorf, M.; Kadari, M.; Heider, C.; Skiebe, E.; Wilharm, G.** (2014): Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. *PLoS ONE* 9 (7), e101033.

- Henrichsen, J.; Blom, J.** (1975): Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica. Section B, Microbiology* 83 (2), S. 103–115.
- Heritier, C.; Poirel, L.; Nordmann, P.** (2006): Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (2), S. 123–130.
- Hérivaux, A.; Pailhoriès, H.; Quinqueneau, C.; Lemarié, C.; Joly-Guillou, M.-L.; Ruvoen, N. et al.** (2016): First report of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* carriage in pets from the community in France. *International Journal of Antimicrobial Agents*.
- Higgins, P. G.; Dammhayn, C.; Hackel, M.; Seifert, H.** (2010a): Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (2), S. 233–238.
- Higgins, P. G.; Hrenovic, J.; Seifert, H.; Dekic, S.** (2018): Characterization of *Acinetobacter baumannii* from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant. *Water research* 140, S. 261–267.
- Higgins, P. G.; Hujer, A. M.; Hujer, K. M.; Bonomo, R. A.; Seifert, H.** (2012a): Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates. *Journal of Medical Microbiology* 61 (Pt 1), S. 137–141.
- Higgins, P. G.; Janssen, K.; Fresen, M. M.; Wisplinghoff, H.; Seifert, H.** (2012b): Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bloodstream isolates obtained in the United States from 1995 to 2004 using rep-PCR and multilocus sequence typing. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (11), S. 3493–3500.
- Higgins, P. G.; Lehmann, M.; Wisplinghoff, H.; Seifert, H.** (2010b): *GyrB* multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Journal of Clinical Microbiology* 48 (12), S. 4592–4594.
- Higgins, P. G.; Prior, K.; Harmsen, D.; Seifert, H.** (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.
- Higgins, P. G.; Wisplinghoff, H.; Krut, O.; Seifert, H.** (2007): A PCR-based method to differentiate between *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU. *Clinical Microbiology and Infection* 13 (12), S. 1199–1201.
- Hrenovic, J.; Ivankovic, T.; Durn, G.; Dekic, S.; Kazacic, S.; Kisic, I.** (2018): Presence of carbapenem-resistant bacteria in soils affected by illegal waste dumps. *International Journal of Environmental Health Research* 29 (2), S. 1–10.
- Huang, X.-Z.; Chahine, M. A.; Frye, J. G.; Cash, D. M.; Lesho, E. P.; Craft, D. W. et al.** (2012): Molecular analysis of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from US service members wounded in Iraq, 2003–2008. *Epidemiology and Infection* 140 (12), S. 2302–2307.
- Hutchings, K.** (2016): Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings. *ECDC, Rapid Risk Assessment*.
- Iverson, W. O.; Connelly, M. R.** (1981): *Acinetobacter* infection associated with pneumonia in an orangutan. *Primates* 22 (4), S. 587–589.
- Jacobs, A. C.; Hood, I.; Boyd, K. L.; Olson, P. D.; Morrison, J. M.; Carson, S. et al.** (2010): Inactivation of Phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and Immunity* 78 (5), S. 1952–1962.
- Janda, J. M.; Abbott, S. L.** (2007): 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory. Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* 45 (9), S. 2761–2764.

- Janssen, P.; Dijkshoorn, L. (1996): High resolution DNA fingerprinting of *Acinetobacter* outbreak strains. *FEMS Microbiol Lett* 196 (142), S. 191–194.
- Jeannot, K.; Bolard, A.; Plésiat, P. (2017): Resistance to polymyxins in gram-negative organisms. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49 (5), S. 526–535.
- Johns, I. C.; Baxter, K.; Booter, H.; Hicks, C.; Menzies-Gow, N. (2011): Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Veterinary Ophthalmology* 14 (3), S. 195–199.
- Johnson, T. L.; Waack, U.; Smith, S.; Mobley, H.; Sandkvist, M. (2015): *Acinetobacter baumannii* is dependent on the type II secretion system and its substrate LipA for lipid utilization and *in vivo* fitness. *Journal of Bacteriology* 198 (4), S. 711–719.
- Jokisalo, J.; Bryan, J.; Legget, B.; Abbott, Y.; Katz, L. M. (2010): Multiple-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bronchopneumonia in a colt following intensive care treatment. *Equine Veterinary Education* 22 (6), S. 281–286.
- Jun, S. H.; Lee, J. H.; Kim, B. R.; Kim, S. I.; Park, T. I.; Lee, J. C.; Lee, Y. C. (2013): *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins. *PLoS ONE* 8 (8), e71751.
- Kaas, R. S.; Friis, C.; Ussery, D. W.; Aarestrup, F. M. (2012): Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. *BMC Genomics* 13, S. 577.
- Kahlmeter, G.; Brown, D. F. J.; Goldstein, F. W.; MacGowan, A. P.; Mouton, J. W.; Osterlund, A. et al. (2003): European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (2), S. 145–148.
- Kaitany, K.-C. J.; Klinger, N. V.; June, C. M.; Ramey, M. E.; Bonomo, R. A.; Powers, R. A.; Leonard, D. A. (2013): Structures of the class D Carbapenemases OXA-23 and OXA-146. Mechanistic basis of activity against carbapenems, extended-spectrum cephalosporins, and aztreonam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (10), S. 4848–4855.
- Karah, N.; Sundsfjord, A.; Towner, K.; Samuelsen, Ø. (2012): Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates* 15 (4), S. 237–247.
- Kaya, O.; Ates, M.; Erganis, O.; ÇOrlu, M.; Sanlioglu, S. (1989): Isolation of *Acinetobacter lwoffii* from hens with septicemia. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 36 (1-10), S. 157–158.
- Kimura, Y.; Miyamoto, T.; Aoki, K.; Ishii, Y.; Harada, K.; Watarai, M.; Hatoya, S. (2017): Analysis of IMP-1 type metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter radioresistens* isolated from companion animals. *Journal of infection and chemotherapy* 23 (9), S. 655–657.
- Klotz, P.; Gottig, S.; Leidner, U.; Semmler, T.; Scheufen, S.; Ewers, C. (2017a): Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates. *PLoS ONE* 12 (2), e0171986.
- Klotz, P.; Higgins, P. G.; Schaubmar, A. R.; Failing, K.; Leidner, U.; Seifert, H. et al. (2019): Seasonal occurrence and carbapenem susceptibility of bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Frontiers in Microbiology* 10 (272).
- Klotz, P.; Jacobmeyer, L.; Leidner, U.; Stamm, I.; Semmler, T.; Ewers, C. (2017b): *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.
- Klotz, P.; Jacobmeyer, L.; Stamm, I.; Leidner, U.; Pfeifer, Y.; Semmler, T. et al. (2018): Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST294 harbouring the OXA-72 carbapenemase from a captive grey parrot. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73 (4), S. 1098–1100.

- Koeleman, J.; Stoof, H.; Biesmanns, D.; Savelkoul, P.; Vanderbroucke-Grauls, C.** (1998): Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomic species and typing of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology* 36 (9), S. 2522–2529.
- La Scola, B.; Gundi, V. A. K. B.; Khamis, A.; Raoult, D.** (2006): Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (3), S. 827–832.
- Lautrop, H.** (1962): *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature* (11), S. 107–108.
- Laxminarayan, R.; Matsoso, P.; Pant, S.; Brower, C.; Røttingen, J.-A.; Klugman, K.; Davies, S.** (2016): Access to effective antimicrobials. A worldwide challenge. *Lancet (London, England)* 387 (10014), S. 168–175.
- Leclercq, S. O.; Wang, C.; Sui, Z.; Wu, H.; Zhu, B.; Deng, Y.; Feng, J.** (2016): A multiplayer game: Species of *Clostridium*, *Acinetobacter*, and *Pseudomonas* are responsible for the persistence of antibiotic resistance genes in manure-treated soils. *Environmental Microbiology* 18 (10), S. 3494–3508.
- Lessel, E. F.** (1971): International committee on nomenclature of bacteria: subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. Minutes of the meeting, 11 August 1970. *International Journal of Systematic Bacteriology* 21 (2), S. 213–214.
- Li, F.-J.; Starrs, L.; Burgio, G.** (2019): Tug-of-war between *Acinetobacter baumannii* and host immune responses. *Pathogens and Disease* 76 (9), ftz004.
- Li, X.; Tang, Y.; Lu, X.** (2018): Insight into identification of *Acinetobacter* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in the clinical laboratory. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 29 (7), S. 1546–1553.
- Lima, W. G.; Alves, M. C.; Cruz, W. S.; Paiva, M. C.** (2018): Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 37 (6), S. 1009–1019.
- Lin, Z.; Mukhtar, N.; Shabbir, M. Z.; Rivera, I.; Ivanov, Y. V.; Tahir, Z. et al.** (2018): Virulent epidemic pneumonia in sheep caused by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology* 9, S. 2616.
- Liu, D.; Liu, Z.-S.; Hu, P.; Cai, L.; Fu, B.-Q.; Li, Y.-S. et al.** (2016a): Characterization of surface antigen protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. *Veterinary Microbiology* 186, S. 126–138.
- Liu, D.; Liu, Z.-S.; Hu, P.; Hui, Q.; Fu, B.-Q.; Lu, S.-Y. et al.** (2016b): Characterization of a highly virulent and antimicrobial-resistant *Acinetobacter baumannii* strain isolated from diseased chicks in China. *Microbiology and Immunology* 60 (8), S. 533–539.
- Loehfelm, T. W.; Luke, N. R.; Campagnari, A. A.** (2008): Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. *Journal of Bacteriology* 190 (3), S. 1036–1044.
- Longo, F.; Vuotto, C.; Donelli, G.** (2014): Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *The New Microbiologica* 37 (2), S. 119–127.
- Lubbers, Brian V.** (2018): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4th edition, VET08.

- Lupo, A.; Vogt, D.; Seiffert, S. N.; Endimiani, A.; Perreten, V.** (2014): Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *Journal of Food Protection* 77 (11), S. 1976–1981.
- Luterbacher, J.; Maraun, D.; Schindler, A.; Lange, T.** (2014): Abschlussbericht des Projekts: "Klimawandel und Extremwetter in Hessen – Analyse von Beobachtungsdaten des 20.", S. 1–51.
- Ma, F.; Shen, C.; Zheng, X.; Liu, Y.; Chen, H.; Zhong, L. et al.** (2019): Identification of a novel plasmid carries *mcr-4.3* in *Acinetobacter baumannii* from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63 (6), e00133-19.
- Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R. B.; Carmeli, Y.; Falagas, M. E.; Giske, C. G. et al.** (2012): Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (3), S. 268–281.
- Magnet, S.; Courvalin, P.; Lambert, T.** (2001): Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45 (12), S. 3375–3380.
- Maiden, M. C. J.; van Jansen Rensburg, M. J.; Bray, J. E.; Earle, S. G.; Ford, S. A.; Jolley, K. A.; McCarthy, N. D.** (2013): MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature reviews. Microbiology* 11 (10), S. 728–736.
- Malhotra, J.; Anand, S.; Jindal, S.; Rajagopal, R.; Lal, R.** (2012): *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (Pt 12), S. 2883–2890.
- Martinez, T.; Martinez, I.; Vazquez, G. J.; Aquino, E. E.; Robledo, I. E.** (2016): Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* 65 (8), S. 784–792.
- Martinez-Medina, M.; Naves, P.; Blanco, J.; Aldeguez, X.; Blanco, J. E.; Blanco, M. et al.** (2009): Biofilm formation as a novel phenotypic feature of adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC). *BMC Microbiology* 9, S. 202.
- Martins, N.; Picão, R. C.; Cerqueira-Alves, M.; Uehara, A.; Barbosa, L. C.; Riley, L. W.; Moreira, B. M.** (2016): A new trilocus sequence-based multiplex-PCR to detect major *Acinetobacter baumannii* clones. *Infection, Genetics and Evolution* 42, S. 41–45.
- Mathewson, J. J.; Simpson, R. B.** (1982): Glucose-nonfermenting gram-negative bacilli associated with clinical veterinary specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 15 (6), S. 1016–1018.
- Mattick, J. S.** (2002): Type IV pili and twitching motility. *Annual Review of Microbiology* 56 (1), S. 289–314.
- Matuschek, E.; Åhman, J.; Webster, C.; Kahlmeter, G.** (2018): Antimicrobial susceptibility testing of colistin - evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clinical Microbiology and Infection* 24 (8), S. 865–870.
- McConnell, M. J.; Actis, L.; Pachón, J.** (2013): *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiology Reviews* 37, S. 130–157.
- McLellan, J. E.; Pitcher, J. I.; Ballard, S. A.; Grabsch, E. A.; Bell, J. M.; Barton, M.; Grayson, M. L.** (2018): Superbugs in the supermarket? Assessing the rate of contamination with third-generation cephalosporin-resistant gram-negative bacteria in fresh Australian pork and chicken. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 7, S. 30.

- Mellmann, A.; Harmsen, D.; Cummings, C. A.; Zentz, E. B.; Leopold, S. R.; Rico, A. 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.
- Mentzer, A. von; Connor, T. R.; Wieler, L. H.; Semmler, T.; Iguchi, A.; Thomson, N. R. et al.** (2014): Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. *Nature genetics* 46 (12), S. 1321–1326.
- Merkier, A. K.; Centrón, D.** (2006): *bla*_{OXA-51}-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28 (2), S. 110–113.
- Misic, D.; Asanin, J.; Spargser, J.; Szostak, M.; Loncaric, I.** (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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (7), e00219-18.
- Mitchell, J. M.; Clasman, J. R.; June, C. M.; Kaitany, K.-C. J.; LaFleur, J. R.; Taracila, M. A. et al.** (2015): Structural basis of activity against aztreonam and extended spectrum cephalosporins for two carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Biochemistry* 54 (10), S. 1976–1987.
- Moffatt, J. H.; Harper, M.; Harrison, P.; Hale, J. D. F.; Vinogradov, E.; Seemann, T. et al.** (2010): Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (12), S. 4971–4977.
- Mohri, T.; Takashima, K.; Yamane, T.; Sato, H.; Yamane, Y.** (2009): Purulent pericarditis in a dog administered immune-suppressing drugs. *Journal of Veterinary Medical Science* 71 (5), S. 669–672.
- Molter, G.; Seifert, H.; Mandraka, F.; Kasper, G.; Weidmann, B.; Hornei, B. et al.** (2016): Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in the intensive care unit. A multi-level strategic management approach. *The Journal of Hospital Infection* 92 (2), S. 194–198.
- Moore, C. P.; Collins, B. K.; Fales, W. H.** (1995): Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses. 63 cases (1986-1994). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 207 (7), S. 928–933.
- Moore, C. P.; Fales, W. H.; Whittington, P.; Bauer, L.** (1983): Bacterial and fungal isolates from Equidae with ulcerative keratitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 182 (6), S. 600–603.
- Moore, C. P.; Heller, N.; Majors, L. J.; Whitley, R. D.; Burgess, E. C.; Weber, J.** (1988): Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *American Journal of Veterinary Research* 49 (6), S. 773–777.
- Moriel, D. G.; Beatson, S. A.; Wurfel, D.; Lipman, J.; Nimmo, G. R.; Paterson, D. L. et al.** (2013): Identification of novel vaccine candidates against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* 8 (10), e77631.
- Mugnier, P. D.; Poirel, L.; Naas, T.; Nordmann, P.** (2010): Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases* 16 (1), S. 35–40.
- Mukherjee, K.; Altincicek, B.; Hain, T.; Domann, E.; Vilcinskas, A.; Chakraborty, T.** (2009): *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (1), S. 310–317.

- Müller, S.; Janssen, T.; Wieler, L. H.** (2014): Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary medicine-emergence of an underestimated pathogen? *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 127 (11-12), S. 435–446.
- Naas, T.; Oueslati, S.; Bonnin, R. A.; Dabos, M. L.; Zavala, A.; Dortet, L. et al.** (2017): Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32 (1), S. 917–919.
- Nam, H. M.; Lim, S. K.; Kang, H. M.; Kim, J. M.; Moon, J. S.; Jang, K. C. et al.** (2009): Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria isolated from bovine mastitis between 2003 and 2008 in Korea. *Journal of Dairy Science* 92 (5), S. 2020–2026.
- Narciso, A. C.; Martins, W. M. B. S.; Cayô, R.; Matos, A. P.; Santos, S. V.; Ramos, P. L. et al.** (2017): Detection of OXA-58-producing *Acinetobacter seifertii* recovered from black-necked swan at a Zoo Lake. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61 (12), e01360-17.
- Nemec, A.; Krizova, L.; Maixnerova, M.; Sedo, O.; Brisse, S.; Higgins, P. G.** (2015): *Acinetobacter seifertii* sp. nov., a member of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex isolated from human clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65 (Pt 3), S. 934–942.
- Nemec, A.; Krizova, L.; Maixnerova, M.; van der Reijden, T. J. K.; Deschaght, P.; Passet, V. 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). *Research in Microbiology* 162 (4), S. 393–404.
- Nemec, A.; Musílek, M.; Maixnerová, M.; Baere, T.; van der Reijden, T. J. K.; Vanechoutte, M.; Dijkshoorn, L.** (2009): *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59 (Pt 1), S. 118–124.
- Nemec, A.; Radolfova-Krizova, L.** (2017): *Acinetobacter guangdongensis* Feng et al. 2014 is a junior heterotypic synonym of *Acinetobacter indicus* Malhotra et al. 2012. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Newton, J. R.; Wood, J. L. N.; Chanter, N.** (2003): A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK thoroughbred racehorses. *Preventive Veterinary Medicine* 60 (1), S. 107–132.
- Nigro, S. J.; Hall, R. M.** (2011): *Glsul2*, a genomic island carrying the *sul2* sulphonamide resistance gene and the small mobile element CR2 found in the *Enterobacter cloacae* subspecies *cloacae* type strain ATCC 13047 from 1890, *Shigella flexneri* ATCC 700930 from 1954 and *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 from 1951. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (9), S. 2175–2176.
- Nigro, S. J.; Hall, R. M.** (2016): Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *oxa23* carbapenemase gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 71 (5), S. 1135–1147.
- Nigro, S. J.; Holt, K. E.; Pickard, D.; Hall, R. M.** (2014): Carbapenem and amikacin resistance on a large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70 (4), S. 1259–1261.
- Nigro, S. J.; Post, V.; Hall, R. M.** (2011): Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66 (7), S. 1504–1509.
- Niu, C.; Gilbert, E. S.** (2004): Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (12), S. 6951–6956.

- Öncül, O.; Keskin, Ö.; Acar, H. V.; Küçükardalı, Y.; Evrenkaya, R.; Atasoyu, E. M. et al.** (2002): Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *Journal of Hospital Infection* 51 (1), S. 47–51.
- Pagano, M.; Martins, A. F.; Barth, A. L.** (2016): Mobile genetic elements related to carbapenem-resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Brazilian Journal of Microbiology* 47 (4), S. 785–792.
- Pailhoriès, H.; Belmonte, O.; Kempf, M.; Lemarié, C.; Cuziat, J.; Quinqueneau, C. et al.** (2015): Diversity of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island. An exploratory study. *International Journal of Infectious Diseases* 37, S. 64–69.
- Pailhoriès, H.; Kempf, M.; Belmonte, O.; Joly-Guillou, M.-L.; Eveillard, M.** (2016): First case of OXA-24-producing *Acinetobacter baumannii* in cattle from Reunion Island, France. *International Journal of Antimicrobial Agents* 48 (6), S. 763–764.
- Patel, R.** (2015): MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry* 61 (1), S. 100–111.
- Paton, R.; Miles, R. S.; Hood, J.; Amyes, S.G.B.** (1993): ARI 1: β -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2 (2), S. 81–87.
- Peleg, A. Y.; Jara, S.; Monga, D.; Eliopoulos, G. M.; Moellering, R. C.; Mylonakis, E.** (2009): *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53 (6), S. 2605–2609.
- Peleg, A. Y.; Seifert, H.; Paterson, D. L.** (2008): *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21 (3), S. 538–582.
- Poirel, L.; Berçot, B.; Milleman, Y.; Bonnin, R.; Pannaux, G.; Nordmann, P.** (2012): Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. *Emerging Infectious Diseases* 18 (3), S. 523–525.
- Poirel, L.; Bonnin, R. A.; Nordmann, P.** (2011): Genetic basis of antibiotic resistance in pathogenic *Acinetobacter* species. *IUBMB Life* 63 (12), S. 1061–1067.
- Poirel, L.; Figueiredo, S.; Cattoir, V.; Carattoli, A.; Nordmann, P.** (2008): *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem-resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52 (4), S. 1252–1256.
- Poirel, L.; Marqué, S.; Héritier, C.; Segonds, C.; Chabanon, G.; Nordmann, P.** (2005): OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (1), S. 202–208.
- Poirel, L.; Nordmann, P.** (2006a): Carbapenem-resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* 12 (9), S. 826–836.
- Poirel, L.; Nordmann, P.** (2006b): Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50 (4), S. 1442–1448.
- Pomba, C.; Endimiani, A.; Rossano, A.; Saial, D.; Couto, N.; Perreten, V.** (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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (2), S. 1267–1268.
- Pomba, C.; Rantala, M.; Greko, C.; Baptiste, K. E.; Catry, B.; van Duijkeren, E. et al.** (2017): Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (4), S. 957–968.

- Poppel, M. T.; Skiebe, E.; Laue, M.; Bergmann, H.; Ebersberger, I.; Garn, T. et al. (2016): *Acinetobacter equi* sp. nov., isolated from horse faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (2), S. 881–888.
- Pournaras, S.; Gogou, V.; Giannouli, M.; Dimitroulia, E.; Dafopoulou, K.; Tsakris, A.; Zarrilli, R. (2014): Single-locus-sequence-based typing of *bla*_{OXA-51}-like genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *Journal of Clinical Microbiology* 52 (5), S. 1653–1657.
- Rafei, R.; Hamze, M.; Pailhoriès, H.; Eveillard, M.; Marsollier, L.; Joly-Guillou, M.-L. et al. (2015): Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (7), S. 2359–2367.
- Rahman, H.; Baxi, K. K. (1985): Isolation of *Acinetobacter calcoaceticus* from a cow with mastitis. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 32 (1), S. 71–72.
- Rajasekhar, M.; Muniyappa, L.; Murthy, B. S. (1978): Chronic haematuria caused by *Acinetobacter calcoaceticus* in a race horse. *The Veterinary Record* 102 (25), S. 557.
- Repizo, G. D.; Gagne, S.; Foucault-Grunenwald, M.-L.; Borges, V.; Charpentier, X.; Limansky, A. S. et al. (2015): Differential role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* virulence. *PLoS ONE* 10 (9), e0138265.
- Ribera, A.; Roca, I.; Ruiz, J.; Gibert, I.; Vila, J. (2003a): Partial characterization of a transposon containing the *tet*(A) determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52 (3), S. 477–480.
- Ribera, A.; Ruiz, J.; Vila, J. (2003b): Presence of the *Tet* M determinant in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (7), S. 2310–2312.
- Rice, L. B. (2008): Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens. No ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases* 197 (8), S. 1079–1081.
- Richmond, G. E.; Evans, L. P.; Anderson, M. J.; Wand, M. E.; Bonney, L. C.; Ivens, A. 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.
- Rose, M.; Landman, D.; Quale, J. (2014): Are community environmental surfaces near hospitals reservoirs for gram-negative nosocomial pathogens? *American Journal of Infection Control* 42 (4), S. 346–348.
- Rumbo, C.; Fernández-Moreira, E.; Merino, M.; Poza, M.; Mendez, J. A.; Soares, N. C. et al. (2011): Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles. A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (7), S. 3084–3090.
- Russo, T. A.; Luke, N. R.; Beanan, J. M.; Olson, R.; Sauberman, S. L.; MacDonald, U. et al. (2010): The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infection and Immunity* 78 (9), S. 3993–4000.
- Saphir, D. A.; Carter, G. R. (1976): Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. *Journal of Clinical Microbiology* 3 (3), S. 344–349.
- Schwartz, D. C.; Cantor, C. R. (1984): Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37 (1), S. 67–75.
- Schweppe, D. K.; Harding, C.; Chavez, J. D.; Wu, X.; Ramage, E.; Singh, P. K. et al. (2015): Host-microbe protein interactions during bacterial infection. *Chemistry and Biology* 22 (11), S. 1521–1530.

- Scott, P.; Deye, G.; Srinivasan, A.; Murray, C.; Moran, K.; Hulten, E. et al.** (2007): An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases* 44 (12), S. 1577–1584.
- Seifert, H.; Dijkshoorn, L.; Gerner-Smidt, P.; Pelzer, N.; Tjernberg, I.; Vaneechoutte, M.** (1997): Distribution of *Acinetobacter* species on human skin. Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology* 35 (11), S. 2819–2825.
- Seifert, H.; Gerner-Smidt, P.** (1995): Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *Journal of Clinical Microbiology* (33(5)), S. 1402–1407.
- Selbitz, Hans-Joachim; Truyen, Uwe; Valentin-Weigand, Peter** (2013): Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 9. Aufl. s.l.: Enke.
- Serota, D. P.; Sexton, M. E.; Kraft, C. S.; Palacio, F.** (2018): Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii* in North America. *Open Forum Infectious Diseases* 5 (3), ofy044.
- Seward, R. J.; Lambert, T.; Towner, K. J.** (1998): Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. *Journal of Medical Microbiology* 47 (5), S. 455–462.
- Sherratt, D. J.** (1974): Bacterial plasmids. *Cell* 3 (3), S. 189–195.
- Smani, Y.; Dominguez-Herrera, J.; Pachón, J.** (2013): Association of the outer membrane protein Omp33 with fitness and virulence of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Infectious Diseases* 208 (10), S. 1561–1570.
- Smani, Y.; López-Rojas, R.; Domínguez-Herrera, J.; Docobo-Pérez, F.; Martí, S.; Vila, J.; Pachón, J.** (2012): *In vitro* and *in vivo* reduced fitness and virulence in ciprofloxacin-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (1), E1-4.
- Smet, A.; Boyen, F.; Pasmans, F.; Butaye, P.; Martens, A.; Nemec, A. et al.** (2012): OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67 (12), S. 3009–3010.
- Smet, A.; Cools, P.; Krizova, L.; Maixnerova, M.; Sedo, O.; Haesebrouck, F. et al.** (2014): *Acinetobacter gandensis* sp. nov. isolated from horse and cattle. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64 (Pt 12), S. 4007–4015.
- Smith, M. G.; Gianoulis, T. A.; Pukatzki, S.; Mekalanos, J. J.; Ornston, L. N.; Gerstein, M.; Snyder, M.** (2007): New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development* 21 (5), S. 601–614.
- Stahl, J.; Bergmann, H.; Gottig, S.; Ebersberger, I.; Averhoff, B.** (2015): *Acinetobacter baumannii* virulence is mediated by the concerted action of three Phospholipases D. *PLoS ONE* 10 (9), e0138360.
- Su, X.-Z.; Chen, J.; Mizushima, T.; Kuroda, T.; Tsuchiya, T.** (2005): AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (10), S. 4362–4364.
- Sugawara, E.; Nikaido, H.** (2012): OmpA is the principal nonspecific slow porin of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* 194 (15), S. 4089–4096.
- Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D. L. et al.** (2018): Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet* 18 (3), S. 318–327.
- Tilley, D.; Law, R.; Warren, S.; Samis, J. A.; Kumar, A.** (2014): CpaA a novel protease from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates deregulates blood coagulation. *FEMS Microbiology Letters* 356 (1), S. 53–61.

- Tipton, K. A.; Farokhyfar, M.; Rather, P. N.** (2017): Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075. *MicrobiologyOpen* 6 (2), e00418.
- Tipton, K. A.; Rather, P. N.** (2016): An ompR/envZ two-component system ortholog regulates phase variation, osmotic tolerance, motility, and virulence in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *Journal of Bacteriology* 199 (3), e00705-16.
- Tjernberg, I.; Ursing, J. A. N.** (1989): Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 97 (7-12), S. 595–605.
- Tomaras, A. P.; Dorsey, C. W.; Edelmann, R. E.; Actis, L. A.** (2003): Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149 (Pt 12), S. 3473–3484.
- Tomaschek, F.; Higgins, P. G.; Stefanik, D.; Wisplinghoff, H.; Seifert, H.** (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.
- Touchon, M.; Cury, J.; Yoon, E.-J.; Krizova, L.; Cerqueira, G. C.; Murphy, C. et al.** (2014): The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biology and Evolution* 6 (10), S. 2866–2882.
- Toutain, P.-L.; Bousquet-Mélou, A.; Damborg, P.; Ferran, A. A.; Mevius, D.; Pelligand, L. et al.** (2017): En route towards european clinical breakpoints for veterinary antimicrobial susceptibility testing: a position paper explaining the VetCAST approach. *Frontiers in Microbiology* 8, S. 2344.
- Towner, K. J.** (2009): *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection* 73 (4), S. 355–363.
- Towner, K. J.; Evans, B.; Villa, L.; Levi, K.; Hamouda, A.; Amyes, S. G. B.; Carattoli, A.** (2011): Distribution of intrinsic plasmid replicase genes and their association with carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase genes in european clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (5), S. 2154–2159.
- Turton, J. F.; Gabriel, S. N.; Valderrey, C.; Kaufmann, M. E.; Pitt, T. L.** (2007): Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 13 (8), S. 807–815.
- Turton, J. F.; Ward, M. E.; Woodford, N.; Kaufmann, M. E.; Pike, R.; Livermore, D. M.; Pitt, T. L.** (2006a): The role of ISAb_a1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters* 258 (1), S. 72–77.
- Turton, J. F.; Woodford, N.; Glover, J.; Yarde, S.; Kaufmann, M. E.; Pitt, T. L.** (2006b): Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the bla_{OXA-51}-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *Journal of Clinical Microbiology* 44 (8), S. 2974–2976.
- van Dessel, H.; Dijkshoorn, L.; van der Reijden, Tanny; Bakker, N.; Paauw, A.; van den Broek, Peterhans et al.** (2004): Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from european hospitals. *Research in Microbiology* 155 (2), S. 105–112.
- van Spijk, J. N.; Schmitt, S.; Fürst, A. E.; Schoster, A.** (2016): A retrospective analysis of antimicrobial resistance in bacterial pathogens in an equine hospital (2012-2015). *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 158 (6), S. 433–442.
- Vaneeschoutte, M.; Devriese, L. A.; Dijkshoorn, L.; Lamote, B.; Deprez, P.; Verschraegen, G.; Haesebrouck, F.** (2000): *Acinetobacter baumannii* infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic. *Journal of Clinical Microbiology* 38 (11), S. 4280–4281.

- Venditti, C.; Vulcano, A.; D'Arezzo, S.; Gruber, C. E. M.; Selleri, M.; Antonini, M. et al.** (2018): Epidemiological investigation of an *Acinetobacter baumannii* outbreak using core genome multilocus sequence typing. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 17, S. 245–249.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J. R.** (1991): Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19 (24), S. 6823–6831.
- Vila, J.; Marti, S.; Sanchez-Cespedes, J.** (2007): Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59 (6), S. 1210–1215.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Goñi, P.; Jimenez de Anta, T.** (1997): Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV *parC* gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39 (6), S. 757–762.
- Vila, J.; Ruiz, J.; Goñi, P.; Marcos, A.; Jimenez de Anta, T.** (1995): Mutation in the *gyrA* gene of quinolone-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39 (5), S. 1201–1203.
- Villegas, M. V.; Hartstein, A. I.** (2003): *Acinetobacter* outbreaks, 1977–2000. *Infection control and hospital epidemiology* 24 (4), S. 284–295.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; van de Lee, T.; Hornes, M. et al.** (1995): AFLP. A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21), S. 4407–4414.
- Walther, B.; Klein, K.-S.; Barton, A.-K.; Semmler, T.; Huber, C.; Wolf, S. A. 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.
- Wand, M. E.; Bock, L. J.; Turton, J. F.; Nugent, P. G.; Sutton, J. M.** (2012): *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. *Journal of Medical Microbiology* 61 (Pt_4), S. 470–477.
- Wang, J.; Ruan, Z.; Feng, Y.; Fu, Y.; Jiang, Y.; Wang, H.; Yu, Y.** (2014): Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. *PLoS ONE* 9 (8), e104882.
- Wang, Y.; Wu, C.; Zhang, Q.; Qi, J.; Liu, H.; Wang, Y. et al.** (2012): Identification of new delhi metallo- β -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS ONE* 7 (5), e37152.
- Webb, H. E.; Bugarel, M.; den Bakker, H. C.; Nightingale, K. K.; Granier, S. A.; Scott, H. M.; Loneragan, G. H.** (2016): Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. *PLoS ONE* 11 (1), e0147363.
- Weidensdorfer, M.; Chae, J. I.; Makobe, C.; Stahl, J.; Averhoff, B.; Müller, V. et al.** (2015): Analysis of endothelial adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* using a dynamic human *ex vivo* infection model. *Infection and Immunity* 84 (3), S. 711–722.
- Wendt, C.; Baum, H. von; Kaase, M.; Meyer, E.; Suger-Wiedeck, H.; Ruscher, C.** (2012): Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gram-negativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Kranken-haushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI). *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 55 (10), S. 1311–1354.
- Wilharm, G.; Piesker, J.; Laue, M.; Skiebe, E.** (2013): DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *Journal of Bacteriology* 195 (18), S. 4146–4153.

- Wilharm, G.; Skiebe, E.; Higgins, P. G.; Poppel, M. T.; Blaschke, U.; Leser, S. et al.** (2017): Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environmental Microbiology* 19 (10), S. 4349–4364.
- Wisplinghoff, H.; Edmond, M. B.; Pfaller, M. A.; Jones, R. N.; Wenzel, R. P.; Seifert, H.** (2000): Nosocomial bloodstream infections caused by *Acinetobacter* species in united states hospitals: clinical features, molecular epidemiology, and antimicrobial susceptibility. *Clinical Infectious Diseases* 31 (3), S. 690–697.
- Wong, D.; Nielsen, T. B.; Bonomo, R. A.; Pantapalangkoor, P.; Luna, B.; Spellberg, B.** (2017): Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clinical Microbiology Reviews* 30 (1), S. 409–447.
- Yoon, E.-J.; Balloy, V.; Fiette, L.; Chignard, M.; Courvalin, P.; Grillot-Courvalin, C.** (2016): Contribution of the Ade resistance-nodulation-cell division-type efflux pumps to fitness and pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 7 (3), e00697-16.
- Yoon, E.-J.; Chabane, Y. N.; Goussard, S.; Snesrud, E.; Courvalin, P.; Dé, E.; Grillot-Courvalin, C.** (2015): Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *MBio* 6 (2), e00309-15.
- Zarrilli, R.; Pournaras, S.; Giannouli, M.; Tsakris, A.** (2013): Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *International Journal of Antimicrobial Agents* 41 (1), S. 11–19.
- Zhang, W.-J.; Lu, Z.; Schwarz, S.; Zhang, R.-M.; Wang, X.-M.; Si, W. et al.** (2013): Complete sequence of the *bla*_{NDM-1}-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (7), S. 1681–1682.
- Zordan, S.; Prenger-Berninghoff, E.; Weiss, R.; van der Reijden, T.; van den Broek, P.; Baljer, G.; Dijkshoorn, L.** (2011): Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 17 (9), S. 1751–1754.

10 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Christa Ewers für die Überlassung des Themas und die herausragende fachliche Unterstützung bedanken. Vielen Dank an Sandra Scheufen für die großartige Unterstützung zu Beginn meines Projektes. Schade, dass wir nicht länger gemeinsam die Geheimnisse boviner *Acinetobacter* aufdecken konnten. Des Weiteren einen herzlichen Dank an alle Mitarbeiter am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank an Uschi, Anja, Katharina und Jörg. Lieber Werner, dir vielen Dank für den kreativen Austausch von Ideen, die guten Unterhaltungen während der Studenten-Praktika und die Motivation. Ich danke aus ganzem Herzen auch den helfenden Händen in der Spülküche, der Nährbodenküche, dem Sekretariat und der Diagnostikabteilung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank an die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der JLU für die Nutzung des Microplate Readers. Für die finanzielle Unterstützung danke ich den Freunden und Förderern der Veterinärmedizin in Gießen, der Stiftung der Eheleute Dr. med. vet. Hans-Joachim und Gertrud Engemann sowie der H. Wilhelm Schaumann Stiftung.

Der Crew vom Junior-Scientist Meeting der Nationalen Zoonosenplattform, allen voran Nils, Shari und Jan, danke ich für großartige Tagungen und bereichernden Erfahrungsaustausch über Doktorarbeit, Wissenschaft und allem was dazu gehört. Liebe Mit-Doktoranden am IHIT, ich danke euch für die gemeinsame Zeit; Inka, Franzi, Lisa, Franzi, Maria, Sophie und Sandra, schön dass ihr Freude und Leid, Spaß und Frust mit mir geteilt habt.

Ich bin dankbar, dass ich während meiner Promotion die Gelegenheit hatte, mit einer Reihe an außergewöhnlichen Wissenschaftlern zu kooperieren und sie teils kennenzulernen. Vielen Dank an Yvonne Pfeifer vom RKI Wernigerode für die intensive Betreuung meiner Lab-Rotation, die kompetenten Antworten bei fachlichen Fragen sowie die Zusendung von Kontrollstämmen. Für letzteres bedanke ich mich außerdem herzlich bei Alexandr Nemec aus Prag und Lenie Dijkshoorn aus Leiden. Vielen Dank an Stephan Göttig aus Frankfurt für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und an Tobias Eisenberg vom LHL für die Unterstützung bei der Wachsmottenzucht. Bei Gottfried Wilharm bedanke ich mich für die angenehmen Begegnungen und anregenden Gedankenaustausche zu Gewölle von Störchen und vielen weiteren hochinteressanten Themen der *Acinetobacter*-Welt. Herrn Failing von der AG Biomathematik danke ich für die netten Gespräche, auch über die Welt der Zahlen hinaus. Vielen Dank an alle Co-Autoren für die produktive Zusammenarbeit bei der Erstellung der Publikationen. Special thanks to Paul Higgins, I learned more about *Acinetobacter* and dedicated science from you than from anyone else.

Ich möchte meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Frau für ihre liebevolle Unterstützung in all den Jahren danken, für den Halt, die Kraft und die Zuversicht die ihr mir schenkt. Danke.

11 Selbstständigkeitserklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig 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.

Freiburg, 17.06.2019

Peter Klotz

12 Eigenanteil in den Publikationen

Der Eigenanteil ist den Publikationen direkt zu entnehmen.

13 Anhang

13.1 Übersicht verwendeter Stämme

Tabelle 11: Auflistung der Stämme, die im *Galleria mellonella*-Modell verwendet wurden

IHIT Nr. ¹	Spezies	ST ^{Past}	Isolations- zeitraum	Probe	Herkunft ²	Wirt	Kategorie
29017	<i>A. baumannii</i>	620	02/2015	Sammelkot	36304	Rind	Feld
29314	<i>A. baumannii</i>	946	05/2015	Nase	35638	Rind	Feld
31648	<i>A. baumannii</i>	912	06/2015	Nase	35288	Rind	Feld
31652	<i>A. baumannii</i>	1013	07/2015	Nase	34286	Rind	Feld
31666	<i>A. baumannii</i>	1054	09/2015	Rektum	34549	Rind	Feld
31937	<i>A. baumannii</i>	155	09/2015	Nase	35285	Rind	Feld
31939	<i>A. baumannii</i>	915	09/2015	Nase	34508	Rind	Feld
31945	<i>A. baumannii</i>	916	10/2015	Nase	61239	Rind	Feld
31969	<i>A. baumannii</i>	918	11/2015	Sammelkot	36369	Rind	Feld
31971	<i>A. baumannii</i>	1073	12/2015	Sammelkot	63688	Rind	Feld
31978	<i>A. baumannii</i>	933	02/2016	Nase	35321	Rind	Feld
18245	<i>A. baumannii</i>	621	09/2011	Nase	unbekannt	Rind	Klinisch
18305	<i>A. baumannii</i>	1152	10/2011	Organe	unbekannt	Rind	Klinisch
27644	<i>A. baumannii</i>	n.t.	09/2012	Anlieferungsmilch	unbekannt	Rind	Klinisch
31714	<i>A. baumannii</i>	2	06/2016	Lunge	unbekannt	Rind	Klinisch
34223	<i>A. baumannii</i>	2	03/2017	Lunge	unbekannt	Rind	Klinisch
34203	<i>A. baumannii</i>	2	unbekannt	unbekannt	Deutschland	Mensch	Klinisch
29010	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2015	Sammelkot	63679	Rind	Feld
29013	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2015	Sammelkot	63607	Rind	Feld
29018	<i>A. indicus</i>	n.t.	02/2015	Sammelkot	34626	Rind	Feld
29023	<i>A. indicus</i>	n.t.	03/2015	Sammelkot	36163	Rind	Feld
29025	<i>A. indicus</i>	n.t.	03/2015	Sammelkot	34471	Rind	Feld
31215	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	34508	Rind	Feld
31216	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	34639	Rind	Feld
31217	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	63607	Rind	Feld

Fortsetzung Tabelle 11: Auflistung der Stämme, die im *Galleria mellonella*-Modell verwendet wurden

IHIT Nr. ¹	Spezies	ST ^{Past}	Isolations- zeitraum	Probe	Herkunft ²	Wirt	Kategorie
31218	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Nase	36142	Rind	Feld
31219	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	35327	Rind	Feld
31220	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	34537	Rind	Feld
31221	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	35423	Rind	Feld
31222	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	35327	Rind	Feld
31223	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	63688	Rind	Feld
31224	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	64686	Rind	Feld
31225	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Nase	34260	Rind	Feld
31226	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	34320	Rind	Feld
31227	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Nase	34302	Rind	Feld
31228	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2016	Nase	34474	Rind	Feld
31229	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2016	Rektum	34633	Rind	Feld
31230	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2016	Sammelkot	34295	Rind	Feld
31231	<i>A. indicus</i>	n.t.	02/2016	Sammelkot	68519	Rind	Feld
31232	<i>A. indicus</i>	n.t.	02/2016	Nase	34466	Rind	Feld
31669	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	34508	Rind	Feld
32428	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2015	Nase	unbekannt	Rind	Feld
32429	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2015	Sammelkot	64850	Rind	Feld
32430	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2015	Sammelkot	unbekannt	Rind	Feld
32858	<i>A. indicus</i>	n.t.	08/2015	Nase	unbekannt	Rind	Feld
32859	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	34549	Rind	Feld
32860	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Rektum	35110	Rind	Feld
32861	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Nase	69483	Rind	Feld
32862	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	64658	Rind	Feld
32863	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Rektum	unbekannt	Rind	Feld
33295	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	35282	Rind	Feld

Fortsetzung Tabelle 11: Auflistung der Stämme, die im *Galleria mellonella*-Modell verwendet wurden

IHIT Nr. ¹	Spezies	ST ^{Past}	Isolations- zeitraum	Probe	Herkunft ²	Wirt	Kategorie
33298	<i>A. indicus</i>	n.t.	02/2016	Sammelkot	34369	Rind	Feld
33301	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	65594	Rind	Feld
27220	<i>A. indicus</i>	n.t.	2014	Milch	unbekannt	Rind	Klinisch
27599	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2014	Nase	unbekannt	Rind	Klinisch
27630	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2014	Nase	unbekannt	Rind	Klinisch
30075	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Karpalgelenk	unbekannt	Rind	Klinisch
30091	<i>A. indicus</i>	n.t.	08/2015	Kot	unbekannt	Rind	Klinisch
30235	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2015	Gelenk	unbekannt	Rind	Klinisch
34292 (LUH5041)	<i>A. indicus</i>	n.t.	1998	Brust	Niederlande	Mensch	Klinisch
34293 (CIP53.82)	<i>A. indicus</i>	n.t.	1953	Meningitis post-OP	Frankreich	Mensch	Klinisch
34294 (A648T)	<i>A. indicus</i>	n.t.	<2010	Müllkippe	Indien	Umwelt	Umwelt
34295 (KCTC42012)	<i>A. indicus</i>	n.t.	ca. 2014	Blei-Zink Mine	China	Umwelt	Umwelt

1: Originalbezeichnung in Klammern, 2: Postleitzahl in Deutschland oder Land, n.t.: nicht getestet (*A. indicus* kein MLST Schema vorhanden, *A. baumannii* IHIT27644 *gta* Allel nicht vergeben)

Tabelle 12: Auflistung der Stämme, die im Biofilm-Assay verwendet wurden

IHIT Nr. ¹	Spezies	ST ^{Past}	Isolations- zeitraum	Probe	Herkunft ²	Wirt	Kategorie
29017	<i>A. baumannii</i>	620	02/2015	Sammelkot	36304	Rind	Feld
29314	<i>A. baumannii</i>	946	05/2015	Nase	35638	Rind	Feld
31648	<i>A. baumannii</i>	912	06/2015	Nase	35288	Rind	Feld
31652	<i>A. baumannii</i>	1013	07/2015	Nase	34286	Rind	Feld
31937	<i>A. baumannii</i>	155	09/2015	Nase	35285	Rind	Feld
31939	<i>A. baumannii</i>	915	09/2015	Nase	34508	Rind	Feld
31945	<i>A. baumannii</i>	916	10/2015	Nase	61239	Rind	Feld
31969	<i>A. baumannii</i>	918	11/2015	Sammelkot	36369	Rind	Feld
31971	<i>A. baumannii</i>	1073	12/2015	Sammelkot	63688	Rind	Feld
31978	<i>A. baumannii</i>	933	02/2016	Nase	35321	Rind	Feld
18245	<i>A. baumannii</i>	621	09/2011	Nase	unbekannt	Rind	klinisch
18305	<i>A. baumannii</i>	1152	10/2011	Organe	unbekannt	Rind	klinisch
20987	<i>A. baumannii</i>	689	10/2012	Katheter	unbekannt	Rind	klinisch
27697	<i>A. baumannii</i>	309	10/2014	Nabel	unbekannt	Rind	klinisch
31714	<i>A. baumannii</i>	2	06/2016	Lunge	unbekannt	Rind	klinisch
34223	<i>A. baumannii</i>	2	03/2017	Lunge	unbekannt	Rind	klinisch
34203	<i>A. baumannii</i>	2	unbekannt	unbekannt	Deutschland	Mensch	Klinisch
31215	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	34508	Rind	Feld
31216	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	34639	Rind	Feld
31218	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Nase	36142	Rind	Feld
31220	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	34537	Rind	Feld
31223	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	63688	Rind	Feld
31224	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Sammelkot	64686	Rind	Feld
31225	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Nase	34260	Rind	Feld
31227	<i>A. indicus</i>	n.t.	12/2015	Nase	34302	Rind	Feld

Fortsetzung Tabelle 12: Auflistung der Stämme, die im Biofilm-Assay verwendet wurden

IHIT Nr. ¹	Spezies	ST ^{Past}	Isolations- zeitraum	Probe	Herkunft ²	Wirt	Kategorie
31228	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2016	Nase	34474	Rind	Feld
31230	<i>A. indicus</i>	n.t.	01/2016	Sammelkot	34295	Rind	Feld
31669	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	34508	Rind	Feld
32861	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Nase	69483	Rind	Feld
32862	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Sammelkot	64658	Rind	Feld
33295	<i>A. indicus</i>	n.t.	11/2015	Sammelkot	35282	Rind	Feld
27220	<i>A. indicus</i>	n.t.	2014	Milch	unbekannt	Rind	klinisch
27599	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2014	Nase	65611	Rind	klinisch
27630	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2014	Nase	35325	Rind	klinisch
30075	<i>A. indicus</i>	n.t.	09/2015	Karpalgelenk	unbekannt	Rind	klinisch
30091	<i>A. indicus</i>	n.t.	08/2015	Kot	unbekannt	Rind	klinisch
30235	<i>A. indicus</i>	n.t.	10/2015	Gelenk	unbekannt	Rind	klinisch
34292 (LUH5041)	<i>A. indicus</i>	n.t.	1998	Brust	Niederlande	Mensch	klinisch
34293 (CIP53.82)	<i>A. indicus</i>	n.t.	1953	Meningitis post-OP	Frankreich	Mensch	klinisch
34294 (A648T)	<i>A. indicus</i>	n.t.	<2010	Müllkippe	Indien	Umwelt	Umwelt
34295 (KCTC42012)	<i>A. indicus</i>	n.t.	ca. 2014	Blei-Zink Mine	China	Umwelt	Umwelt

1: Originalbezeichnung in Klammern, 2: Postleitzahl in Deutschland oder Land, n.t.: nicht getestet (*A. indicus* kein MLST Schema vorhanden)

13.2 Volltexte Publikation 1 und Publikation 2

RESEARCH ARTICLE

Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates

Peter Klotz^{1☯}, Stephan Göttig^{2☯}, Ursula Leidner¹, Torsten Semmler³, Sandra Scheufen¹, Christa Ewers^{1*}

1 Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus-Liebig-University Giessen, Giessen, Germany, **2** Institute for Medical Microbiology and Infection Control, Hospital of the Johann Wolfgang von Goethe-University, Frankfurt am Main, Germany, **3** Robert Koch Institute, Berlin, Germany

☯ These authors contributed equally to this work.

* christa.ewers@vetmed.uni-giessen.de



Abstract

The objective of this study was to characterize *bla*_{OXA-23} harbouring *Acinetobacter indicus*-like strains from cattle including genomic and phylogenetic analyses, antimicrobial susceptibility testing and evaluation of pathogenicity *in vitro* and *in vivo*. Nasal and rectal swabs (n = 45) from cattle in Germany were screened for carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. Thereby, two carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. from the nasal cavities of two calves could be isolated. MALDI-TOF mass spectrometry and 16S rDNA sequencing identified these isolates as *A. indicus*-like. A phylogenetic tree based on partial *rpoB* sequences indicated closest relation of the two bovine isolates to the *A. indicus* type strain A648^T and human clinical *A. indicus* isolates, while whole genome comparison revealed considerable intraspecies diversity. High minimum inhibitory concentrations were observed for carbapenems and other antibiotics including fluoroquinolones and gentamicin. Whole genome sequencing and PCR mapping revealed that both isolates harboured *bla*_{OXA-23} localized on the chromosome and surrounded by interrupted *Tn2008* transposon structures. Since the pathogenic potential of *A. indicus* is unknown, pathogenicity was assessed employing the *Galleria* (*G.*) *mellonella* infection model and an *in vitro* cytotoxicity assay using A549 human lung epithelial cells. Pathogenicity *in vivo* (*G. mellonella* killing assay) and *in vitro* (cytotoxicity assay) of the two *A. indicus*-like isolates was lower compared to *A. baumannii* ATCC 17978 and similar to *A. lwoffii* ATCC 15309. The reduced pathogenicity of *A. indicus* compared to *A. baumannii* correlated with the absence of important virulence genes encoding like phospholipase C1+C2, acinetobactin outer membrane protein BauA, RND-type efflux system proteins AdeRS and AdeAB or the trimeric autotransporter adhesin Ata. The emergence of carbapenem-resistant *A. indicus*-like strains from cattle carrying *bla*_{OXA-23} on transposable elements and revealing genetic relatedness to isolates from human clinical sources requires further investigations regarding the pathogenic potential, genomic characteristics, zoonotic risk and putative additional sources of this new *Acinetobacter* species.

OPEN ACCESS

Citation: Klotz P, Göttig S, Leidner U, Semmler T, Scheufen S, Ewers C (2017) Carbapenem-resistance and pathogenicity of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates. PLoS ONE 12(2): e0171986. doi:10.1371/journal.pone.0171986

Editor: Feng Gao, Tianjin University, CHINA

Received: September 20, 2016

Accepted: January 30, 2017

Published: February 16, 2017

Copyright: © 2017 Klotz et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files. Accession numbers of whole genome sequences are as follows: IHIT27599: MRUS000000000; IHIT27630: MRUT000000000. Accession numbers of *rpoB* sequences: IHIT27599: KU507500; IHIT27630: KU507501. Accession numbers of *bla*-OXA-23-surrounding genetic region: IHIT27599: KU833218; IHIT27630: KU833219.

Funding: This work was supported by the Engemann Family Foundation providing a grant to

P.K. and by the German Research Foundation (DFG FOR 2251 "Adaption and Persistence of the Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*" to S.G. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen frequently involved in a wide range of nosocomial infections [1]. For more than a decade now, carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. strains, particularly *A. baumannii*, represent a growing public health concern, since they often confer resistance to other critically important antimicrobials, including aminoglycosides, fluoroquinolones or even polymyxins [2, 3]. Carbapenem resistance in *Acinetobacter* spp. is most often mediated by oxacillinases (OXA) which belong to the group of carbapenem-hydrolysing class D β -lactamases (CHDLs). The most prevalent OXA carbapenemases found in *Acinetobacter* are acquired OXA-23 and OXA-58 which can be either plasmid or chromosome encoded. OXA carbapenemases exhibit only weak hydrolysis of carbapenems *in vitro* but are often associated with insertion sequences that provide additional promoter elements leading to overexpression of CHDLs and finally to carbapenem resistance in clinical isolates [1–3]. Although reports about carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. strains in animals are still infrequent, they have been increasing in the last few years. OXA-23 was identified in *A. variabilis* from cattle in France [4], in *A. gandensis* strains from horses in the Netherlands [5], and in *A. baumannii* from cats in Portugal and Germany [6–8]. Different carbapenemases were further recovered in *A. baumannii* from livestock animals in Lebanon [9], and from swine in China [10]. In 2012, a novel species, termed *A. indicus*, has been identified from a cyclohexane-containing dumpsite [11]. Two years later Bonnin *et al.* reported OXA-23 mediated carbapenem resistance in a human clinical isolate identified to be closely related to this species and, thus, was termed *A. indicus*-like [12].

In the present study, two carbapenem-resistant, OXA-23 carrying *Acinetobacter indicus*-like isolates were recovered from nasal swabs of two calves. We characterized the genetic environment of *bla*_{OXA-23} and performed genomic and phylogenetic analyses in order to get insights into acquisition and dissemination. Since the clinical relevance of *A. indicus* is unknown, we evaluated pathogenicity *in vitro* and *in vivo* in comparison to reference strains of *A. baumannii* and the closely related *A. lwoffii*.

Materials and methods

Bacterial strains, species identification and assignment to international clones

From September 2014 to March 2015 nasal and rectal swabs as well as composite fecal samples from the corresponding stables (n = 45) were taken from cattle (*Bos taurus*) in Hesse (coordinates 50°39'58"N 8°35'28"E), Germany. Cattle breeds included Holstein-Frisian, Angus, Hereford, Swiss-Brown, Pinzgauer and Vogelsberger Rotes Höhenvieh. The samples were cultured on blood agar (blood agar base by Merck Chemicals, Darmstadt, supplemented with 5% sheep blood) and on Gassner agar (Oxoid, Wesel, Germany). Screening for carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. was done by using Mueller-Hinton agar plates (Oxoid, Wesel, Germany) containing 2 mg/L and 4 mg/L meropenem (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), respectively. Colonies with suspected reduced susceptibility to carbapenems were initially identified at the species level using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Species identification was verified by multiplex PCR targeting different portions of the *gyrB* gene and by 16S rRNA gene sequence analysis [13].

Whole genome sequencing and phylogenetic analysis and screening for virulence-related genes

For whole genome sequencing of two bovine *A. indicus* strains, DNA was extracted with the “Master Pure” DNA Purification Kit” (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Germany). Genome sequencing was done using an Illumina MiSeq sequencer with multiplexing of 30 samples per flow cell using 300 bp paired-end reads and a minimum of 50-fold coverage. Sequence data were assembled de novo using SPAdes Genome Assembler V. 3.8 [14]. Phylogenetic analysis was initially performed by using the partial *rpoB* sequence of *A. indicus*-like strains and comparing them with publicly available *rpoB* sequences of type or reference strains of known species of the genus *Acinetobacter*. Similarity calculations and cluster analysis were carried out for a 823 bp region spanning nucleotide positions 2944–3766 of the *rpoB* coding region of *A. baumannii* CIP70.34^T. MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) alignment was performed to cluster partial *rpoB* sequences [15]. A PhyML (Phylogenetic software based on the Maximum-Likelihood principle) tree was created using the HKY85 substitution model and bootstrap values were determined after 1000 simulations using the Genious 8.1.3 software (Biomatter Ltd., Auckland, New Zealand) [16].

Phylogenetic relationships were further determined on the basis of the Maximum Common Genome (MCG) [17], which represents the set of orthologous genes that are present in all genomes under study. In a first comparison, we included 32 publicly available representatives of the different *Acinetobacter* spp. (S1 Fig). Secondly, we compared the genomes of six *A. indicus* strains (including three genome sequences of strain A648^T, which were submitted under different labels), namely IHIT27599 (accession number MRUS000000000), IHIT27630 (MRUT000000000), KM7 (JZRF01000070), CIP 110367 (= A648^T; ACET000000000.1), ANC 4215 (= A648^T; ATGH000000000.1), and DSM 25388 (= A648^T; BBSF000000000.1). A prediction of genes was performed by using the Prokaryotic Dynamic Programming Gene-finding Algorithm For Microbial Genomes (Prodigal) [18]. The coding sequences were subsequently clustered using USEARCH v7 [19] based on a threshold of 70% similarity on nucleotide level and 90% coverage to determine the set of orthologous genes of all genomes included in the respective comparison. Using these sets as a reference, we extracted the corresponding allelic variants of the MCG genes from the genomes (32 and 6, respectively) using PLAST v2.3.1 [20], aligned them with MUSCLE v3.8.31 [21] and finally concatenated them. The resulting alignment was used to infer a maximum likelihood phylogeny using RAXML version 8.1.14 with a General Time Reversible model and gamma correction for among site rate variation [22].

Antimicrobial susceptibility and resistance genes

Antimicrobial susceptibility was determined by antibiotic gradient tests (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). Minimum inhibitory concentrations (MICs) were interpreted according to breakpoints defined for human *Acinetobacter* spp. by either EUCAST or CLSI [23, 24]. MICs of tigecycline and chloramphenicol were interpreted according to breakpoints for Enterobacteriaceae set by EUCAST [23]. Whole genome sequences were used to identify resistance genes by using the online tool ResFinder 2.1, provided by the Center for Genomic Epidemiology (CGE) (<http://www.genomicepidemiology.org/>). PCR mapping of the genetic environment of *bla*_{OXA-23} was performed to determine the correct order of contigs and sequence assemblies using primers listed in S1 Table. The genetic location of the *bla*_{OXA-23} gene was evaluated by performing I-CeuI digestion of whole-cell DNAs followed by Southern blot hybridization using 16S rRNA and *bla*_{OXA-23} probes as previously reported [25, 26].

Analysis of pathogenicity in the *Galleria mellonella* infection model

Pathogenicity of *Acinetobacter* spp. strains was analysed employing last-instar larvae of the greater wax moth (*Galleria mellonella*) [27]. A 1:50 dilution of an overnight bacterial culture in lysogeny broth (LB) was prepared and grown to an OD₆₀₀ of 1.0 at 37°C. A phosphate-buffered saline (PBS) solution containing serial dilutions of this culture representing colony forming units of 5x10² to 5x10⁶ was injected into the last left proleg of the larvae using a Hamilton precision syringe. PBS solution alone served as negative control. Upon infection, larvae were incubated in petri dishes at 37°C for 72 h and scored for survival by two independent observers daily. For determination of the median lethal dose (LD₅₀), a series of 10-fold serial dilutions were injected and LD₅₀ were calculated after 24 h by nonlinear regression analysis using GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, USA) as described [28, 29].

Cell viability assay

A549 human lung epithelial cells (ATCC[®] CCL-185) were grown in six well plates in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Biochrom GmbH, Berlin, Germany) with 10% foetal calf serum (FCS; Biochrom GmbH, Berlin, Germany) at 37°C until almost confluent. Different *Acinetobacter* spp. were used at a multiplicity of infection (MOI) of 100 and incubated for 20 h. Thereafter, the supernatant was filtered (0.45 µm) and lactate dehydrogenase (LDH) activities were determined by spectrophotometry at a wavelength of 340 nm using the IFCC method as described by Schuman *et al.* [30]. The detergent Triton X-100 (0.1% in PBS) and DMEM were used as positive and negative controls, respectively. Mean LDH values of medium-treated A549 cells versus infected cells were analysed by an unpaired two-tailed Student's *t* test (Graph Pad Prism 5.0). A *p* value of ≤0.05 was considered statistically significant, and a *p* value of ≤0.001 was considered highly significant.

Screening for virulence-related genes

Screening for virulence-related genes was performed by using the online tool MyDbFinder 1.1, provided by the Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>). Only genes that have previously been associated with one of the phenotypes investigated later, i.e. killing of *G. mellonella* larvae and cytotoxicity to human lung epithelial cells, were included. Using the Geneious 8.1.3 software a MAFFT alignment was performed to cluster nucleotide/ amino acid sequences and to calculate sequence identity to a given reference sequence.

Results

Susceptibility of bovine *Acinetobacter* spp. isolates to carbapenems

During screening of cattle for carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. two isolates showed growth on the meropenem-containing screening agar. Strain IHIT27630 was isolated in September 2014 from the nasal cavity of a calf which was hospitalized in a veterinary clinic due to dermatophytosis, wasting syndrome, diarrhoea and bronchopneumonia. The second strain, IHIT27599, was isolated one month later from the nasal cavity of a calf which was suffering from bronchopneumonia and omphalophlebitis. This calf was sampled on a farm 35 miles away from the veterinary clinic and nearly 60 miles apart from the farm where the first calf originated from, making an epidemiologic link and a transmission highly unlikely. Using MALDI-TOF MS analysis, both isolates were presumably suggested as *A. calcoaceticus* but with low reliability (score values of 1.57 and 1.56 using the IVD MALDI Biotyper library). 16S rDNA sequence analysis enabled a more precise identification and indicated a high homology (>99%) to published sequences of *A. indicus* and *A. indicus*-like strains, including strain RAB1

and the type strain A648^T. RAB1 originates from a human rectal swab and was isolated in France in 2011, whereas A648^T was obtained from a cyclohexane dumping site in India some-time before 2010 [12, 31].

Phylogenetic analysis and genome comparison

A phylogenetic tree was compiled based on the alignment of partial 823-bp *rpoB* sequences from the two bovine *A. indicus*-like isolates, 34 distinct *Acinetobacter* spp. with validly published names, seven *Acinetobacter* spp. with effectively published names awaiting validation (www.bacterio.net), and six *A. genomospecies* strains. The analysis indicated closest relation between IHIT27630 and IHIT27599 and the *A. indicus* type strain A648^T with 97.69% nucleotide sequence similarity of partial *rpoB* sequence (Fig 1). The next closest related strains were *A. guangdongensis* strain 1 NM-4^T (92.22%), *A. variabilis* ANC 4750 (87.97%), *A. genomosp.* 15TU (now *A. variabilis*) NIPH 546 (86.76%), and *A. lwoffii* CIP 61.10^T (86.39%), while *A. qingfengensis* strain 2BJ1^T revealed the least closely related *rpoB* sequence (76.01%). When generating a phylogenetic tree employing all published *rpoB* sequences from *A. indicus*-like strains (accessed at 29th December 2016), our bovine isolates clustered with human clinical *A. indicus*-like strain LUH10523 (99.88% nucleotide sequence identity) that was obtained from the blood culture of a patient in The Netherlands in 2005 (Fig 2) [12]. Next closely related was *A. indicus*-like strain CIP 53.82 that was obtained from a human patient with postoperative meningitis in 1953 in France [32, 33]. Overall, the *rpoB* regions showed intraspecies similarity values for the 11 strains, ranging between 96.36% and 100%. There was no evidence for a separation of environmental (strains KM7 and A648^T), animal (isolates from the present study and strains LUH08556 + LUH8511 from cow faeces) and human strains (LUH05836, RAB1, LUH05041 and LUH10523) or of strains with or without carbapenemases [12]. Apart from our study isolates, only *A. indicus*-like strain RAB1 expressed the OXA-23 carbapenemase [12]. In addition, *in silico* analysis of the genome sequence of *A. indicus*-like strain CIP 53.82 (acc. no. APRK00000000.1) revealed the presence of the *bla*_{OXA-58} gene, which is flanked by two incomplete IS*Aba3* insertion elements [32, 33].

For a higher phylogenetic resolution, we further compared 32 isolates of different *Acinetobacter* spp. based on genome sequences (S1A Fig). As whole genomes of several species included in the *rpoB*-based tree (Fig 1) were not available, a direct comparison of both tree phylogenies was not possible. The MCG of the 32 selected *Acinetobacter* spp. isolates revealed 42 orthologous genes and the alignment of the genes consisted of 26,161 sites from which 8,026 were informative SNP sites. Pairwise distance varied between 0 and 4,049 sites. Similar to what has been observed for the *rpoB*-based tree, the *A. indicus* strains clustered together and strains of the species *A. townieri*, *A. tandonii* were placed in closer vicinity as for example those of *A. baumannii* and *A. pittii*, as shown in S1A Fig and verified by pairwise distance values (S2 Table).

A separate calculation of the MCG for the *A. indicus* strains revealed 2,145 orthologous genes and the alignment of these genes consisted of 2,027,793 sites from which 109,137 were phylogenetically informative SNP sites. Based on this analysis, the genome sequences submitted under three different labels and accession numbers for *A. indicus* type strain A648^T differed by 313 (ANC 4215 versus CIP 110367) to 1917 (CIP 110367 versus DSM 25388) SNPs, which may be due to different sequencing strategies or strain material. Apart from this, hardly any similarity-based clustering could be observed, suggesting a considerable diversity between the genomes of strains A648^T, KM7, IHIT27599 and IHIT27630. This was also evident in the pairwise distance which varied between 64,841 and 86,573 SNPs to the type strain (S2B Table). Even the two bovine IHIT strains differed by 35,396 from each other, clearly indicating two different strains.

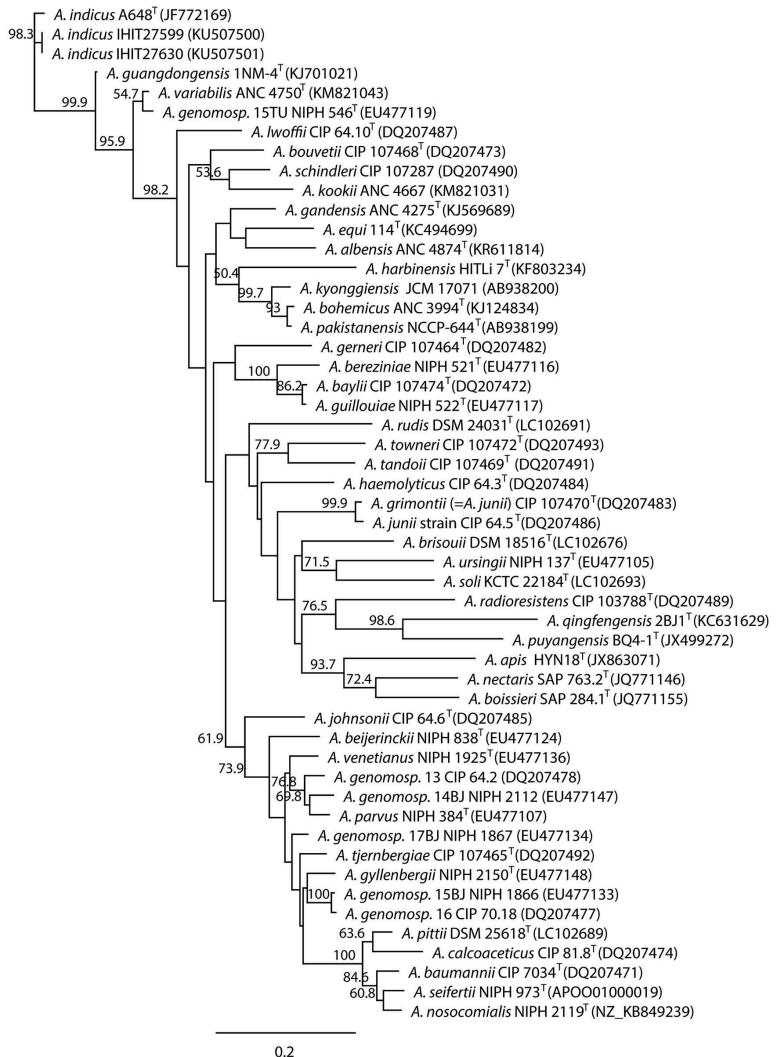


Fig 1. Neighbour-joining phylogenetic tree based on partial nucleotide sequences of the *rpoB* (823 bp) genes of *Acinetobacter indicus*-like strains IHIT27630 and IHIT27599 and 47 type or reference strains of known *Acinetobacter* species. The tree was constructed using the maximum likelihood method. Bootstrap values (> 50%) after 1,000 simulations are shown at branch nodes. GenBank accession nos. are given in parentheses. Bar, 0.2 nucleotide substitutions per site.

doi:10.1371/journal.pone.0171986.g001

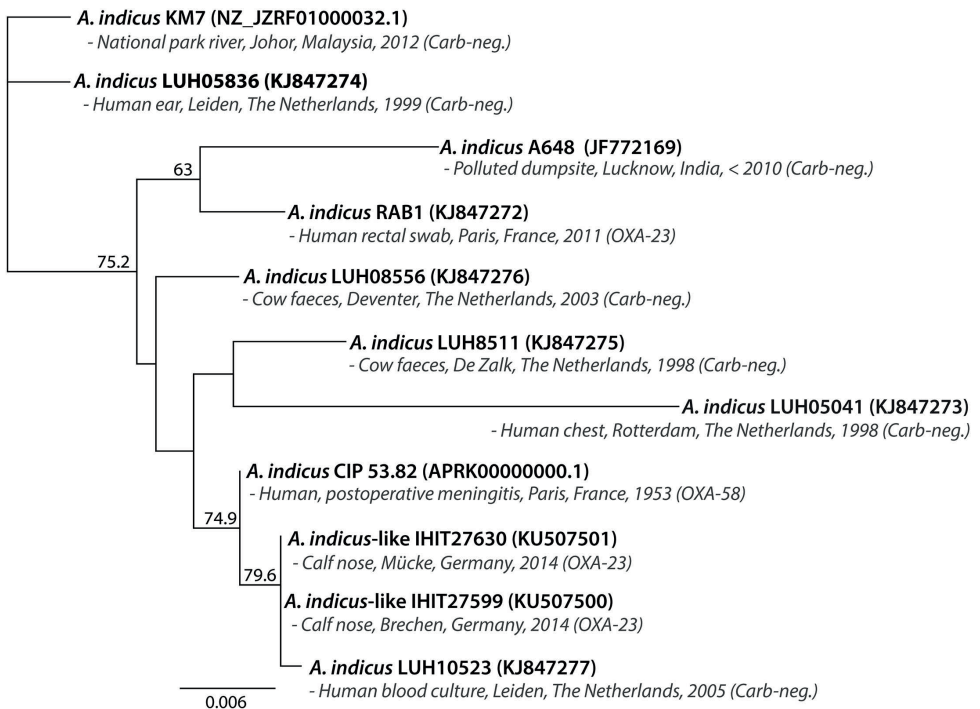


Fig 2. Neighbour-joining phylogenetic tree based on partial nucleotide sequences of the *rpoB* (823 bp) genes of *Acinetobacter indicus*-like strains IHIT27630 and IHIT27599 and nine published *A. indicus* strains, including relevant information about original host, geographical background, year of isolation and possession of carbapenemases. The tree was constructed using the maximum likelihood method. Bootstrap values (> 50%) after 1,000 simulations are shown at branch nodes. GenBank accession nos. are given in parentheses. Bar, 0.006 nucleotide substitutions per site. Carb-neg., carbapenemase negative.

doi:10.1371/journal.pone.0171986.g002

Antimicrobial susceptibility and resistance genes

The two bovine *A. indicus*-like isolates showed high MICs to imipenem, meropenem and doripenem (Table 1) and represent the first known carbapenem-resistant *A. indicus*-like isolates of animal origin. While the isolates remained susceptible to third and fourth generation cephalosporins, non-susceptibility was observed for a number of other antimicrobial substances, including piperacillin-tazobactam, fluoroquinolones, gentamicin, and doxycycline (Table 1). The two isolates differed slightly in their antimicrobial resistance profile with IHIT27599 being additionally resistant to tobramycin and co-trimoxazole. Sanger sequencing confirmed that both isolates harboured the β -lactamase OXA-23 which is widespread in *A. baumannii* [34]. Subsequent whole genome sequencing revealed the presence of aminoglycoside resistance genes *aac(3)-IIa*, *strA/B* and *aph(3')-Ic*, sulfonamide resistance gene *sul2*, phenicol resistance gene *floR*, and tetracycline resistance genes *tet(A)* and *tet(Y)* in isolate IHIT27630. The

Table 1. Antimicrobial susceptibility of bovine *Acinetobacter indicus*-like isolates.

Drug class	Antimicrobial agent	IHIT27630		IHIT27599	
		MIC (mg/L)	Suscep-tibility ^a	MIC (mg/L)	Suscep-tibility ^a
Penicillins + inhibitors	Piperacillin	>256	R	64	I
	Ampicillin/sulbactam ^b	2	S	8	S
	Piperacillin/tazobactam ^b	>256	R ^H	64	I
	Ticarcillin/clavulanic acid	>256	R ^H	>256	R
Cephalosporins	Cefotaxime	4	S	2	S
	Ceftriaxone	4	S	2	S
	Ceftazidime	2	S	4	S
	Ceftiofur	4	I	4	I
	Cefepime	4	S	2	S
Carbapenems	Imipenem	>32	R ^H	32	R
	Meropenem	>32	R ^H	32	R
	Doripenem	8	R ^H	16	R
Fluoroquinolones	Ciprofloxacin	>32	R ^H	4	R
	Levofloxacin	>32	R ^H	4	R
Aminoglycosides	Gentamicin	16	R	8	R
	Amikacin	0.5	S	1	S
	Tobramycin	2	S	8	R
	Netilmicin	4	S	1	S
Tetracyclines	Tetracycline	32	R	128	R
	Doxycycline	16	R	16	R
	Minocycline	1	S	0.5	S
Chloramphenicol	Chloramphenicol	64	R	128	R
Glycylcycline	Tigecycline	0.5	S	0.125	S
Folate pathway inhibitors	Trimethoprim/sulfamethoxazole	1	S	>32	R
Polymyxins	Polymyxin B	1	S	1	S
	Colistin	1	S	1	S

S, susceptible; I, intermediate susceptible; R, resistant; H, heteroresistance.

^aMICs were interpreted according to breakpoints for *Acinetobacter* spp. set by EUCAST and CLSI. MICs for tigecycline and chloramphenicol were interpreted according to breakpoints for Enterobacteriaceae set by EUCAST. MICs for Ceftiofur were interpreted according to breakpoints of 3rd-generation cephalosporines set by the CLSI for *Acinetobacter* spp.

^bBeta-lactamase inhibitors sulbactam and tazobactam were used with a fixed concentration of 4 mg/L as recommended by EUCAST.

doi:10.1371/journal.pone.0171986.t001

second isolate (IHIT27599) possessed aminoglycoside resistance genes *aadA1*, *aadB*, *strA/B* and *aph(3')-Ic*, sulfonamide resistance genes *sul1* and *sul2*, phenicol resistance gene *floR*, and tetracycline resistance genes *tet(X)* and *tet(Y)*, which is in line with the phenotypic results.

Localization and genetic environment of *bla*_{OXA-23}

I-*CeuI* digestion of whole-cell DNAs and Southern blot hybridization using 16S rRNA and *bla*_{OXA-23} probes demonstrated that both *A. indicus*-like isolates harboured *bla*_{OXA-23} on the chromosome. Genome sequencing and PCR mapping of assembled contigs identified a differently interrupted and incomplete *Tn2008* transposon structure surrounding the OXA genes (Fig 3). In both isolates the same genetic structure is present downstream of *bla*_{OXA-23}, including a putative AAA *ATPase* gene disrupted by a partial insertion sequence *ISAcra1* of 564 bp in length and the transcriptional regulator gene *merR*. We identified a 105-bp long *ISAbal1*-remnant which was either truncated by a full version of insertion sequence *ISAcsp2* in isolate

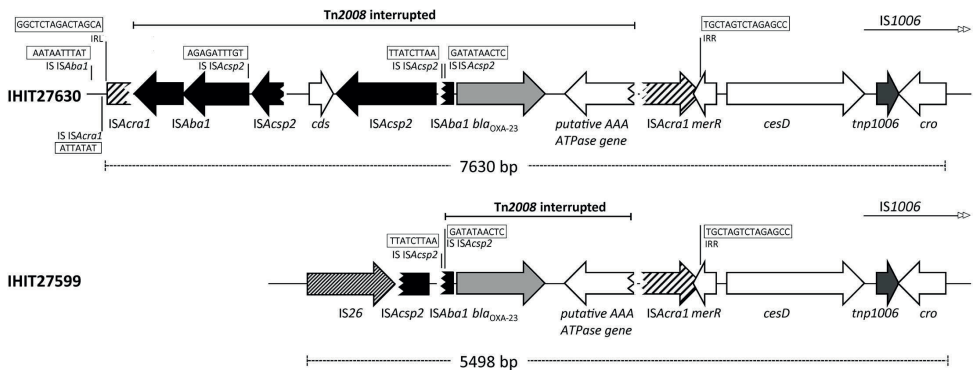


Fig 3. Schematic maps of the genetic environment of *bla*_{OXA-23} in bovine *A. indicus* strains. The interrupted Tn2008 is indicated with a solid line. Target site duplications are likely missing due to other insertion events, such as ISAcsp2 at the left border and ISAcra1 at the right border of Tn2008. IS, insertion site; IRL, inverted repeat left; IRR, inverted repeat right; ATPase (truncated), gene encoding the putative AAA ATPase; merR, gene encoding the transcriptional regulator MerR; cesD, gene encoding the cobalt-zinc-cadmium resistance protein CesD; cro, gene encoding the Cro-like protein; cds, encoding a hypothetical protein. The figure is not to scale. GenBank accession nos. KU833218 (IHIT27599) and KU833219 (IHIT27630).

doi:10.1371/journal.pone.0171986.g003

IHIT27630 or by a partial ISAcsp2 sequence which was preceded by IS26 in isolate IHIT27599. In case of IHIT27630, a second disrupted copy of ISAcsp2 was preceded by a full-length copy of a Tn2008-related ISAbal1 transposase gene and the remaining 168-bp sequence of the aforementioned truncated ISAcra1. ISAcra1 is a novel insertion element that has previously been described in an *A. radioresistens* strain where it was flanked by a typical 7-bp direct repeat (DR) / insertion site (ATTATAT) as well as a 15-bp inverted repeat left (IRL; GGCTCTAGAC TAGCA) and inverted repeat right (IRR; TGCTAGTCTAGAGCC) [35]. In isolate IHIT27630, the disrupted ISAcra1 element lacked the downstream DR, whereas the characteristic upstream DR and the two IR regions were identical to those described recently [35]. In both isolates, 27 nucleotides are present between insertion sequence ISAbal1 and the start codon of *bla*_{OXA-23}, which is typical of Tn2008 in contrast to the previously described Tn2008b [36].

Different genetic structures associated with the *bla*_{OXA-23} genes in the two *A. indicus* isolates supports previous reports about the high variability of this flanking region in *A. baumannii*. In addition, the finding of ISAcra1, although disrupted, may be a hint towards *A. radioresistens* as original source of the *bla*_{OXA-23} gene not only in *A. baumannii* but also in *A. indicus* [37].

Virulence properties of *A. indicus*-like strains

Clinically relevant biological features of *A. indicus* remain totally elusive. In order to evaluate the virulence of IHIT27599 and IHIT27630, the *Galleria mellonella* *in vivo* infection model was employed. *G. mellonella* larvae were infected with different infection doses of the two bovine *A. indicus*-like isolates and reference strains of *A. baumannii* (ATCC 17978) and *A. lwoffii* (ATCC 15309), which were included for comparative analysis. Infection of larvae with the different *Acinetobacter* spp. caused a time- and dose-dependent killing of larvae (Fig 4). Whereas almost no mortality was observed when 5×10^4 cfu of *A. indicus*-like species were injected, almost 100% of *G. mellonella* larvae died 72 h post infection with 5×10^6 cfu (Fig 4C and 4D). Injection of the highest dose of 5×10^6 *A. lwoffii* ATCC 15309, which was selected due to its close phylogenetic relatedness to *A. indicus* (Fig 1), resulted in death of approximately 40% of

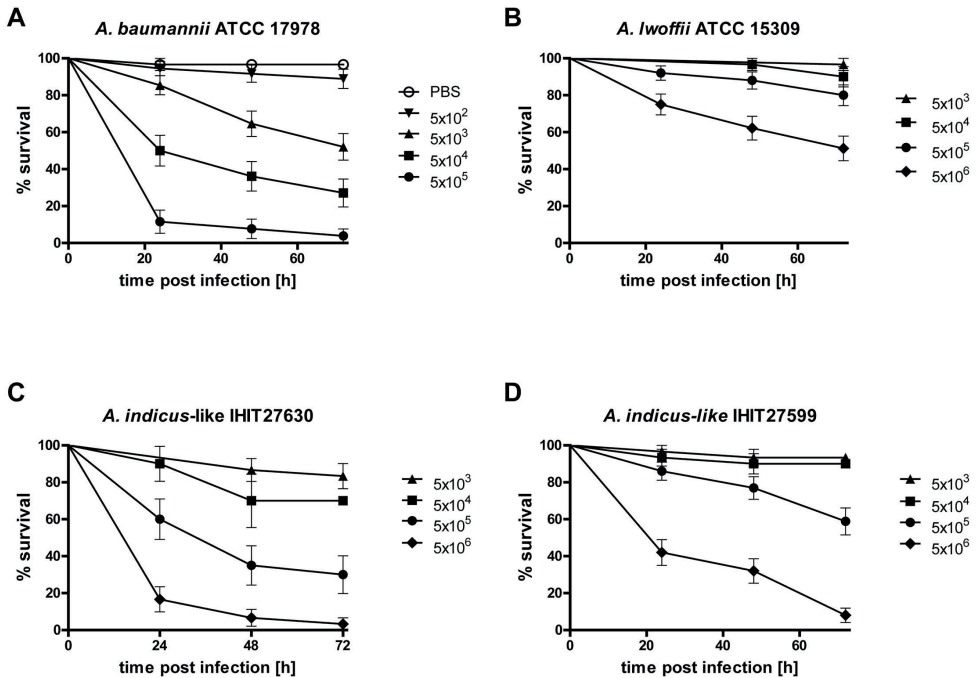


Fig 4. Dose-dependent lethality of *Galleria mellonella* infected with *Acinetobacter* spp. strains. Larvae were injected with different cfu (5×10^2 to 5×10^6) and survival was monitored over 72 h after infection. Mean values from at least four experiments are shown. Error bars show standard error of the mean.

doi:10.1371/journal.pone.0171986.g004

larvae after 72 h. In contrast, injection of only 5×10^4 *A. baumannii* ATCC 17978 resulted in the death of 50% of larvae 24 h post infection. We determined median lethal doses (LD_{50}) to compare virulence across the *Acinetobacter* strains (S3 Table). *A. indicus*-like strains IHIT27630 and IHIT27599 displayed LD_{50} values of 5.67 [95% CI 5.51–5.82] and 6.20 [95% CI 5.91–6.50] and, thus, were more virulent than *A. Iwoffii* ATCC 15309 with an LD_{50} of 6.84 [95% CI 6.65–7.04]. *A. baumannii* ATCC 17978 displayed the lowest LD_{50} of 4.72 [95% CI 4.42–5.01] and was therefore the most virulent of all tested strains in the *Galleria in vivo* infection model.

To investigate the capability to disrupt membrane integrity of human cells, A549 lung epithelial cells were infected with the same *Acinetobacter* strains used in the *Galleria* assay (Fig 5). Infection with *A. baumannii* ATCC 17978 resulted in a LDH release of 100 U/L. In contrast, infection with *A. Iwoffii* ATCC 15309 or the two *A. indicus*-like strains induced a LDH release of approximately only 25 U/L (range 22.2–27.9 U/L) compared to the medium control (DMEM) (16.3 U/L) ($p = 0.0026$ for *A. Iwoffii*; $p = 0.0709$ for IHIT27599; $p = 0.20$ for IHIT27630). This indicates that cytotoxicity towards A549 human lung epithelial cells of

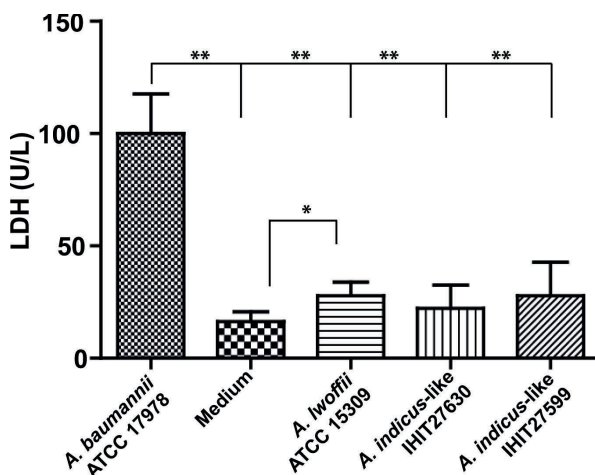


Fig 5. *Acinetobacter* spp. mediated cytotoxicity towards A549 human lung epithelial cells. Confluent A549 monolayers were infected for 20 h with an MOI of 100 with the indicated bacteria. Supernatants were harvested and LDH activities determined. Mean value for Triton X-100 (positive control) was 924.0 ± 93.7 U/L. Medium (DMEM) was used as a negative control. Shown are mean values $\pm$ standard deviations from $n = 3$ –4 experiments. Asterisks indicate a significant difference between the control group (medium) and strains, respectively (* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0171986.g005

the three *Acinetobacter* non-*baumannii* strains was comparable to each other but much lower compared to *A. baumannii* ATCC 17978 (3.6 to 4.5-fold lower LDH activities; $p < 0.001$).

Presence of virulence genes related to *in vivo* virulence and *in vitro* cytotoxicity

We screened the genomes of the strains *A. baumannii* ATCC 17978, *A. lwoffii* ATCC 15309, *A. indicus* IHIT27599 and *A. indicus* IHIT27630, all of which were included in phenotypical assays, for virulence genes that have previously been linked with killing of *G. mellonella* larvae and cytotoxicity to human epithelial cells. *A. baumannii* ATCC 17978 harboured most of the virulence determinants linked with the above mentioned phenotypes and only lacked the phospholipase D1 gene *pld1* and DNA uptake protein genes *comEC* (Table 2). In contrast, *A. lwoffii* strain ATCC 15309 and the two *A. indicus* strains IHIT27599 and IHIT27630 harboured only some of the tested virulence-associated determinants but lacked for example phospholipase genes *plc1* and *plc2*, acinetobactin outer membrane receptor protein gene *bauA*, efflux pump system protein genes *adeRS* and *adeAB*, and the trimeric autotransporter adhesion gene *ata*. In case orthologous proteins could be identified in the *A. indicus* strains, they revealed amino acid sequence identity to the *A. baumannii* reference genomes ranging from 47.6% for SurA1, 54.4% for PLD1, and 62.6% for Omp33 to a maximum of 91.4% for SodB (Table 2).

Table 2. Presence and absence of virulence gene/protein orthologs in four *Acinetobacter* species strains used for virulence assays.

Virulence determinant	Gene	Gene size in reference sequence (bp)	Gene position in reference sequence *	Nucleotide/amino acid sequence similarity to reference sequence* (%)			
				<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>A. lwoffii</i> ATCC 15309	<i>A. indicus</i> IHIT27599	<i>A. indicus</i> IHIT27630
Phospholipase C1	<i>plc1</i>	2229	1575962..1578190	100/100	-	-	-
Phospholipase C2	<i>plc2</i>	2169	3794856..3792688	100/100	-	-	-
Phospholipase D1	<i>pld1</i>	1527	140863..142389	-	57.1/50.3	58.6/54.4	58.6/54.4
Phospholipase D2	<i>pld2</i>	1626	524407..522783	100/100	64.2/70.4	65.9/67.1	65.9/67.1
Phospholipase D3	<i>pld3</i>	1464	628527..627064	100/100	67.4/69.4	67.3/68.4	67.2/68.2
Acinetobactin outer membrane receptor protein	<i>bauA</i>	2190	160673..158484	100/100	-	-	-
Type VI secretion system protein	<i>tssM</i>	3825	2445726..2441902	100/100	66.0/66.1	71.3/77.8	71.5/77.7
Autotransporter adhesin	<i>ata</i>	5622	2775454..2781075	100/100	-	-	-
Surface antigen protein 1	<i>surA1</i>	318	2349708..2350025	100/100	-	58.2/48.6	58.2/47.6
Efflux pump system protein	<i>adeRS</i>	1861	1929381..1931241	100/100	-	-	-
Efflux pump system protein	<i>adeAB</i>	4298	1931387..1935684	100/100	-	-	-
Efflux pump system protein	<i>arpA</i>	1101	40488..41588	100/100	66.5/70.6	66.9/71.4	67.2/71.7
Efflux pump system protein	<i>arpB</i>	3126	41591..44716	100/100	73.1/83.2	73.4/84.3	73.4/84.2
Superoxide dismutase B	<i>sod2343</i>	627	1256650..1256024	100/100	83.9/89.9	84.1/91.4	84.4/91.4
DNA uptake channel proteins	<i>comEC</i>	4198	4695..8892	-	-	-	-
Outer membrane protein A	<i>ompA</i>	1071	680965..682035	100/100	81.6/84.3	82.6/87.4	82.6/87.4
Outer membrane protein 33	<i>omp33</i>	900	212171..211272	100/100	66.1/58.8	68.8/62.6	68.8/62.6

*Refers to *A. baumannii* ATCC 17978 (Acc-No. CP012004.1) except for genes *pld1* (*A. baumannii* ATCC 19606; Acc. No. ACQB01000015.1) and *comEC* (*Acinetobacter* species BD413; AF027189.3); minus (-) denotes that the gene/protein is not present in the data source.

doi:10.1371/journal.pone.0171986.t002

Discussion

Since its first description as a novel environmental *Acinetobacter* species in 2012, very few studies reported about the isolation of *A. indicus*-like strains from different sources [12, 33, 38]. Difficulties in discriminating this novel species, together with its unknown clinical relevance might be reasons for that. Based on MALDI-TOF MS analysis, which has been shown to be a useful tool for identification of *Acinetobacter* spp. [32], our bovine isolates were initially misclassified as *A. calcoaceticus*, albeit with unreliable score values. Having similar problems with the species designation based on biochemical properties, Bonnin *et al.* (2014) established MALDI-TOF MS reference spectra for reliable identification of *A. indicus*-like isolates. Using these new spectra, two animal and three human *A. indicus*-like isolates from the Netherlands and Belgium, which were identified by *rpoB* sequencing and 16S rRNA analysis, grouped together but were clearly distinct from the type strain A648^T [12]. This was also evident from a genome-based comparison, where the two bovine *A. indicus*-like strains from the present study clustered together, but were clearly separated from the two environmental *A. indicus* strains A648^T and KM7. Future genomic studies, including a broader set of *A. indicus*-like

isolates from different sources should help to elucidate the phylogenetic relatedness among members of this novel species more precisely, probably leading to the identification of different genotypic lineages.

Prior to our study, the first and still only published case of carbapenem resistance in an *A. indicus*-like strain was reported in 2014 by Bonnin *et al.* [12]. Here, the presence of OXA-23 in a rectal swab isolate (RAB1) from a French patient previously hospitalized in Algeria after a road traffic accident in August 2011 could be demonstrated [12]. In addition, we could identify the carbapenemase gene *bla*_{OXA-58} in the genome sequence of the human clinical *A. indicus*-like isolate CIP 53.82. Despite the presence of *bla*_{OXA-58} it is unclear, whether this strain was also phenotypically resistant to carbapenems. When evaluating antimicrobial susceptibilities for human isolate RAB1 and our bovine *A. indicus*-like isolates, carbapenem MICs ranged from 8 to >32 mg/L, indicating a high level resistance in both cases. Indeed, a strong promoter with distinct -10 and -35 motifs located within the *ISAbal* sequence was present in our bovine isolates and most likely conferred clinically relevant resistance to carbapenems [39, 40]. Four other previously published *A. indicus*-like isolates, obtained from cow faeces and from human clinical samples between 1998 and 2003 in the Netherlands did not harbour a carbapenemase gene, nor were they resistant to carbapenems [12].

In contrast to the study of Bonnin *et al.*, where *bla*_{OXA-23} of human *A. indicus*-like strain RAB1 was located on a conjugative plasmid, the bovine isolates from our study harboured the gene on the chromosome [12]. However, as the genomes of *A. indicus* strains IHIT27599 and IHIT27630 revealed plasmid sequences in the genetic surrounding of *bla*_{OXA-23}, it may be assumed that the resistance gene was once acquired by horizontal plasmid transfer and subsequent loss of the plasmid, which warrants further investigations. While strain RAB1 possessed *ISAbal* upstream of the *bla*_{OXA-23} gene, which corresponds to transposon Tn2007 [36], the bovine isolates revealed an interrupted Tn2008 with a single *ISAbal* located upstream of the *bla*_{OXA-23} gene, as recently described for other isolates as well [12, 32]. Transposon Tn2008, which is a major vector for spreading of *bla*_{OXA-23} in *A. baumannii* [41], was recently also identified in one out of nine OXA-23 positive *A. variabilis* isolates from cows [4]. In several of these nine isolates, including those with the highest MICs to carbapenems, the *ISAbal* element of Tn2008 was truncated by a novel insertion sequence termed *ISAcsp2* [4]. In our bovine strain IHIT27630 we identified a full copy of *ISAcsp2*, preceded by an open reading frame encoding a protein of unknown function and a second truncated *ISAcsp2*. In case of IHIT27599, the truncated *ISAbal* was directly preceded by a truncated *ISAcsp2*, indicating, that the genetic context of the *bla*_{OXA-23} gene is not unique and probably undergoes evolutionary changes.

We further detected an interrupted version of the recently described 732-bp insertion sequence element *ISAcra1* of *A. radioresistens* in strain IHIT27630 (Fig 3). *ISAcra1* has been associated with overexpression of the intrinsic *bla*_{OXA-23} in *A. baumannii* and *A. radioresistens* strains resulting in phenotypic carbapenem resistance [35]. This novel insertion sequence element has also been associated with the spread of *bla*_{OXA-23} in strains of the species *A. radioresistens*, which is the likely source of this gene [37], and this might be the case for *A. indicus* isolates as well.

Due to its novelty, barely anything is known about the pathogenicity of members of the species *A. indicus*. In order to assess pathogenicity of *A. indicus* *in vivo*, *Galleria mellonella* larvae were employed. *G. mellonella* has recently been described as a non-vertebrate infection model for studying human pathogens, including *A. baumannii* with regard to pathogenetic and therapeutic aspects [27]. In our study, both *A. indicus*-like strains were slightly more virulent compared to *A. lwoffii* ATCC 15309 since lower LD₅₀ values were obtained and more larvae died when injecting same colony forming units. In contrast, *A. baumannii* ATCC 17978 was clearly more virulent than all other species in concordance with the LDH assay.

We further employed the LDH assay to monitor cytotoxicity towards human lung epithelial cells *in vitro*. Here, the two bovine *A. indicus*-like isolates and *A. lwoffii* displayed an abrogated phenotype in the cell toxicity assays compared to ATCC 17978 since LDH values were only slightly higher than the negative control DMEM. As anticipated, cytotoxicity of *A. baumannii* ATCC 17978 was approximately four times higher compared to the other *Acinetobacter* species ($p < 0.001$). These results suggest that *A. indicus*-like strains are not cytotoxic which is mainly caused by secreted toxins or virulence factors of the outer membrane. By using knock-out mutants or regulating gene expression previous studies could identify various factors of *Acinetobacter* species to be involved in either virulence to *G. mellonella* larvae or cytotoxicity to epithelial cells or both. These factors include the phospholipases C (PLC) [42], phospholipases D (PLD) [43], trimeric autotransporter adhesin Ata [44], acinetobactin outer membrane receptor protein BauA [45], type VI secretion system protein TssM/VasK [46], surface antigen protein 1 (SurA1) [47], RND-type efflux system proteins AdeAB, AdeRS and ArpAB [48, 49], a superoxide dismutase (SodB) [50], and the putative DNA uptake channel protein ComEC [51]. The presence of most of the genes in the genome of *A. baumannii* strain ATCC 17978 corresponds well with its phenotype *in vitro* and *in vivo*, namely high cytotoxicity to epithelial cells and high ability to kill *G. mellonella* larvae. The absence of several factors, including PLC1 and PLC2, BauA, Ata, AdeRS, and AdeAB in *A. lwoffii* strain ATCC 15309 and the two *A. indicus* strains might—at least partially—explain the abrogated pathogenicity phenotype in both assays. Although our *A. indicus* strains and the *A. lwoffii* strain ATCC 15309 strain harboured orthologous genes/proteins of some of these factors, including PLD1-3, TSSM, ArpAB, OmpA, and Omp33, they may have lost their suggested function due to sequence alterations. Complementation of *A. indicus* strains with virulence factors from *A. baumannii* and comparative analysis of pathogenicity *in vitro* and *in vivo* with the isogenic ancestor will help to identify crucial virulence determinants in future studies.

Taken together, the two *A. indicus*-like strains IHIT27630 and IHIT27599 showed a comparable pathogenicity with *A. lwoffii* ATCC 15309 which is considered to be a rather low to moderate pathogen. Thus, *A. indicus* might be considered to be less pathogenic to animals and humans. However, this remains yet unknown for *A. indicus*-isolates from other sources and should be part of future genomic and functional studies, particularly as this novel species has already been associated with human infection. The fact that cattle are colonized with carbapenem-resistant strains harbouring *bla*_{OXA-23} on transposable elements requires further investigations regarding the zoonotic risk of this new *Acinetobacter* species. One animal which carried the OXA-23 producing *A. indicus*-like isolate was treated with benzyl-penicillin before, while nothing is known about antibiotic treatment of the other calf. As OXA-23 confers high-level resistance to penicillins and penicillin- β -lactamase inhibitor combinations it can be assumed, that the use of penicillins has created a selective pressure.

Even if the suggested pathogenicity of the isolates is rather low, the potential to contribute to the dissemination of the *bla*_{OXA-23} gene requires careful consideration. Studies are needed to further explore the cattle population as putative source of carbapenem resistant *Acinetobacter* spp. strains and of carbapenem resistance determinants to understand spreading of both resistance genes and carbapenem-resistant *Acinetobacter* species.

Supporting information

S1 Table. Primers and their positions used for mapping of the *bla*_{OXA-23} genetic region in bovine *A. indicus*-like isolates IHIT27599 and IHIT27630. (DOCX)

S2 Table. SNP matrix referring to S1(A) Fig. Colour shading indicates SNP values (low number of SNPs [dark green] to high number of SNPs [white]).
(XLSX)

S3 Table. Median lethal doses (LD50) of *Acinetobacter* spp. injected into *G. mellonella* larvae at 24 hours post infection. CI, confidence interval.
(DOCX)

S4 Table. LDH statistics.
(XLSX)

S1 Fig. Neighbour-joining phylogenetic tree based on (A) the maximum common genome (MCG) of publicly available whole genomes of 32 representative isolates of different *Acinetobacter* species and (B) the MCG of whole genomes of *A. indicus* isolates provided publicly and generated in this study. As for the *A. indicus* type strain A648 three genome sequences under different strain labels (ANC 4215, CIP 110367 and DSM 25388) and accession numbers were available in the database, they were all included in the analysis. The tree was constructed using the maximum likelihood method. Bootstrap values (> 50%) after 1,000 simulations are shown at branch nodes. GenBank accession nos. are given in parenthesis. Bar, 0.05 (A) / 0.01 (B) nucleotide substitutions per site. Results of pairwise distance calculation are provided in [S2 Table](#).
(EPS)

Acknowledgments

We thank Lisa Dürr, Florian Heß and Sönke Allrich for facilitating the sample collection and providing clinical background information of the strains. We also would like to thank the participating farmers.

Author Contributions

Conceptualization: CE PK SS SG.

Data curation: CE PK TS SG.

Formal analysis: CE SG TS PK.

Funding acquisition: PK SG.

Investigation: PK UL SS SG CE.

Methodology: CE PK SG TS.

Project administration: CE.

Resources: CE SG TS.

Software: CE TS SG PK.

Supervision: CE SS.

Validation: CE PK SG TS.

Visualization: CE SG.

Writing – original draft: CE.

Writing – review & editing: CE SG PK TS SS.

References

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. Clinical microbiology reviews. 2008; 21(3):538–82. doi: [10.1128/CMR.00058-07](https://doi.org/10.1128/CMR.00058-07) PMID: [18625687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18625687/)
2. Goettig S, Gruber TM, Higgins PG, Wachsmuth M, Seifert H, Kempf VA. Detection of pan drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in Germany. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014; 69(9):2578–9. doi: [10.1093/jac/dku170](https://doi.org/10.1093/jac/dku170) PMID: [24833751](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24833751/)
3. Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. International journal of antimicrobial agents. 2015; 45(6):568–85. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001) PMID: [25857949](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25857949/)
4. Poirel L, Bercot B, Millemann Y, Bonnin RA, Pannaux G, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. in Cattle, France. Emerging infectious diseases. 2012; 18(3):523–5. doi: [10.3201/eid1803.111330](https://doi.org/10.3201/eid1803.111330) PMID: [22377480](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22377480/)
5. Smet A, Boyen F, Pasmans F, Butaye P, Martens A, Nemec A, et al. OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2012; 67(12):3009–10. doi: [10.1093/jac/dks311](https://doi.org/10.1093/jac/dks311) PMID: [22872446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22872446/)
6. 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. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2014; 58(2):1267–8. doi: [10.1128/AAC.02527-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02527-13) PMID: [24295971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24295971/)
7. 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 pathogens. 2016; 8:37. doi: [10.1186/s13099-016-0119-z](https://doi.org/10.1186/s13099-016-0119-z) PMID: [27471549](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27471549/)
8. Ewers C, Klotz P, Leidner U, Stamm I, Prenger-Berninghoff E, Gottig S, et al. OXA-23 and ISAb_a-1-OXA-66 class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. International journal of antimicrobial agents. 2017; 49(1):37–44. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2016.09.033](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.033) PMID: [27890443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27890443/)
9. Al Bayssari C, Dabboussi F, Hamze M, Rolain JM. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2015; 70(3):950–1. doi: [10.1093/jac/dku469](https://doi.org/10.1093/jac/dku469) PMID: [25406297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25406297/)
10. Zhang WJ, Lu Z, Schwarz S, Zhang RM, Wang XM, Si W, et al. Complete sequence of the bla(NDM-1)-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2013; 68(7):1681–2. doi: [10.1093/jac/dkt066](https://doi.org/10.1093/jac/dkt066) PMID: [23449827](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23449827/)
11. Malhotra J, Anand S, Jindal S, Rajagopal R, Lal R. *Acinetobacter indicus* sp. nov., isolated from a hexachlorocyclohexane dump site. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2012; 62(Pt 12):2883–90. doi: [10.1099/ijs.0.037721-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.037721-0) PMID: [22247213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22247213/)
12. Bonnin RA, Poirel L, van der Reijden TJ, Dijkshoorn L, Lescat M, Nordmann P. Carbapenem resistance in a human clinical isolate identified to be closely related to *Acinetobacter indicus*. International journal of antimicrobial agents. 2014; 44(4):345–50. doi: [10.1016/j.ijantimicag.2014.05.022](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.022) PMID: [25245212](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25245212/)
13. Higgins PG, Lehmann M, Wisplinghoff H, Seifert H. gyrB multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* genomic species 3. Journal of clinical microbiology. 2010; 48(12):4592–4. doi: [10.1128/JCM.01765-10](https://doi.org/10.1128/JCM.01765-10) PMID: [20881170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20881170/)
14. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology. 2012; 19(5):455–77.
15. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic acids research. 2002; 30(14):3059–66. PMID: [12136088](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12136088/)
16. Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic biology. 2010; 59(3):307–21. doi: [10.1093/sysbio/syq010](https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010) PMID: [20525638](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20525638/)
17. von Mentzer A, Connor TR, Wieler LH, Semmler T, Iguchi A, Thomson NR, et al. Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) clades with long-term global distribution. Nature genetics. 2014; 46(12):1321–6. doi: [10.1038/ng.3145](https://doi.org/10.1038/ng.3145) PMID: [25383970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25383970/)
18. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC bioinformatics. 2010; 11:119. doi: [10.1186/1471-2105-11-119](https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-119) PMID: [20211023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20211023/)
19. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics. 2010; 26(12):2460–1. doi: [10.1093/bioinformatics/btq461](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461) PMID: [20709691](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20709691/)
20. Nguyen VH, Lavenier D. PLAST: parallel local alignment search tool for database comparison. BMC bioinformatics. 2009; 10:329. doi: [10.1186/1471-2105-10-329](https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-329) PMID: [19821978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19821978/)

21. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*. 2004; 32(5):1792–7. doi: [10.1093/nar/gkh340](https://doi.org/10.1093/nar/gkh340) PMID: [15034147](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15034147/)
22. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30(9):1312–3. doi: [10.1093/bioinformatics/btu033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033) PMID: [24451623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24451623/)
23. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://eucast.org>
24. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26th ed. CLSI Supplement, M100S. Wayne, PA, USA, 2016.
25. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993; 90(14):6874–8. PMID: [8341713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8341713/)
26. Grobner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, et al. Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of medical microbiology*. 2009; 58(Pt 7):912–22. doi: [10.1099/jmm.0.005850-0](https://doi.org/10.1099/jmm.0.005850-0) PMID: [19502377](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19502377/)
27. Peleg AY, Jara S, Monga D, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr., Mylonakis E. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009; 53(6):2605–9. doi: [10.1128/AAC.01533-08](https://doi.org/10.1128/AAC.01533-08) PMID: [19332683](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19332683/)
28. Marra A, Lamb L, Medina I, George D, Gibson G, Hardink J, et al. Effect of linezolid on the 50% lethal dose and 50% protective dose in treatment of infections by Gram-negative pathogens in naive and immunosuppressed mice and on the efficacy of ciprofloxacin in an acute murine model of septicemia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012; 56(9):4671–5. doi: [10.1128/AAC.00276-12](https://doi.org/10.1128/AAC.00276-12) PMID: [22710118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22710118/)
29. Gruber TM, Gottig S, Mark L, Christ S, Kempf VA, Wichelhaus TA, et al. Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring *bla*_{NDM-1}. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015; 70(4):1026–30. doi: [10.1093/jac/dku482](https://doi.org/10.1093/jac/dku482) PMID: [25468904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25468904/)
30. Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Ferard G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2002; 40(6):643–8. doi: [10.1515/CCLM.2002.111](https://doi.org/10.1515/CCLM.2002.111) PMID: [12211663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12211663/)
31. Malhotra J, Dua A, Saxena A, Sangwan N, Mukherjee U, Pandey N, et al. Genome sequence of *Acinetobacter* sp. strain HA, isolated from the gut of the polyphagous insect pest *Helicoverpa armigera*. *Journal of bacteriology*. 2012; 194(18):5156. doi: [10.1128/JB.01194-12](https://doi.org/10.1128/JB.01194-12) PMID: [22933775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22933775/)
32. Adams-Haduch JM, Paterson DL, Sidjabat HE, Pasculle AW, Potoski BA, Muto CA, et al. Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52(11):3837–43. doi: [10.1128/AAC.00570-08](https://doi.org/10.1128/AAC.00570-08) PMID: [18725452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18725452/)
33. Krizova L, Maixnerova M, Sedo O, Nemecek A. *Acinetobacter albensis* sp. nov., isolated from natural soil and water ecosystems. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2015.
34. Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging infectious diseases*. 2010; 16(1):35–40. doi: [10.3201/eid1601.090852](https://doi.org/10.3201/eid1601.090852) PMID: [20031040](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20031040/)
35. Higgins PG, Zander E, Seifert H. Identification of a novel insertion sequence element associated with carbapenem resistance and the development of fluoroquinolone resistance in *Acinetobacter radioresistens*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013; 68(3):720–2. doi: [10.1093/jac/dks446](https://doi.org/10.1093/jac/dks446) PMID: [23139290](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23139290/)
36. Nigro SJ, Hall RM. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the *oxa23* carbapenemase gene. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016.
37. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008; 52(4):1252–6. doi: [10.1128/AAC.01304-07](https://doi.org/10.1128/AAC.01304-07) PMID: [18195058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18195058/)
38. Touchon M, Cury J, Yoon EJ, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, et al. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome biology and evolution*. 2014; 6(10):2866–82. doi: [10.1093/gbe/evu225](https://doi.org/10.1093/gbe/evu225) PMID: [25313016](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25313016/)
39. Hamidian M, Hall RM. *ISAba1* targets a specific position upstream of the intrinsic *ampC* gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013; 68(11):2682–3. doi: [10.1093/jac/dkt233](https://doi.org/10.1093/jac/dkt233) PMID: [23788477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23788477/)

40. Segal H, Jacobson RK, Garny S, Bamford CM, Elisha BG. Extended -10 promoter in IS_{Aba-1} upstream of *bla*_{OXA-23} from *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007; 51(8):3040–1. doi: [10.1128/AAC.00594-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00594-07) PMID: [17548500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17548500/)
41. Wang X, Zong Z, Lu X. Tn2008 is a major vehicle carrying *bla*(OXA-23) in *Acinetobacter baumannii* from China. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2011; 69(2):218–22. doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.018](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.10.018) PMID: [21251570](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251570/)
42. Fiester SE, Arivett BA, Schmidt RE, Beckett AC, Ticak T, Carrier MV, et al. Iron-Regulated Phospholipase C Activity Contributes to the Cytolytic Activity and Virulence of *Acinetobacter baumannii*. PLoS one. 2016; 11(11):e0167068. doi: [10.1371/journal.pone.0167068](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167068) PMID: [27875572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27875572/)
43. Stahl J, Bergmann H, Gottig S, Ebersberger I, Averhoff B. *Acinetobacter baumannii* Virulence Is Mediated by the Concerted Action of Three Phospholipases D. PLoS one. 2015; 10(9):e0138360. doi: [10.1371/journal.pone.0138360](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138360) PMID: [26379240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26379240/)
44. Weidensdorfer M, Chae JI, Makobe C, Stahl J, Averhoff B, Muller V, et al. Analysis of Endothelial Adherence of *Bartonella henselae* and *Acinetobacter baumannii* Using a Dynamic Human *Ex Vivo* Infection Model. Infection and immunity. 2015; 84(3):711–22. doi: [10.1128/IAI.01502-15](https://doi.org/10.1128/IAI.01502-15) PMID: [26712205](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26712205/)
45. Gaddy JA, Arivett BA, McConnell MJ, Lopez-Rojas R, Pachon J, Actis LA. Role of acinetobactin-mediated iron acquisition functions in the interaction of *Acinetobacter baumannii* strain ATCC 19606T with human lung epithelial cells, *Galleria mellonella* caterpillars, and mice. Infection and immunity. 2012; 80(3):1015–24. doi: [10.1128/IAI.06279-11](https://doi.org/10.1128/IAI.06279-11) PMID: [22232188](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22232188/)
46. Repizo GD, Gagne S, Foucault-Grunenwald ML, Borges V, Charpentier X, Limansky AS, et al. Differential Role of the T6SS in *Acinetobacter baumannii* Virulence. PLoS one. 2015; 10(9):e0138265. doi: [10.1371/journal.pone.0138265](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138265) PMID: [26401654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26401654/)
47. Liu D, Liu ZS, Hu P, Cai L, Fu BQ, Li YS, et al. Characterization of surface antigen protein 1 (SurA1) from *Acinetobacter baumannii* and its role in virulence and fitness. Veterinary microbiology. 2016; 186:126–38. doi: [10.1016/j.vetmic.2016.02.018](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.02.018) PMID: [27016767](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27016767/)
48. Richmond GE, Evans LP, Anderson MJ, Wand ME, Bonney LC, Ivens A, et al. The *Acinetobacter baumannii* Two-Component System AdeRS Regulates Genes Required for Multidrug Efflux, Biofilm Formation, and Virulence in a Strain-Specific Manner. mBio. 2016; 7(2):e00430–16. doi: [10.1128/mBio.00430-16](https://doi.org/10.1128/mBio.00430-16) PMID: [27094331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27094331/)
49. Tipton KA, Farokhyfar M, Rather PN. Multiple roles for a novel RND-type efflux system in *Acinetobacter baumannii* AB5075. MicrobiologyOpen. 2016.
50. Heindorf M, Kadari M, Heider C, Skiebe E, Wilharm G. Impact of *Acinetobacter baumannii* superoxide dismutase on motility, virulence, oxidative stress resistance and susceptibility to antibiotics. PLoS one. 2014; 9(7):e101033. doi: [10.1371/journal.pone.0101033](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101033) PMID: [25000585](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25000585/)
51. Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. Journal of bacteriology. 2013; 195(18):4146–53. doi: [10.1128/JB.00754-13](https://doi.org/10.1128/JB.00754-13) PMID: [23852865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23852865/)

S1 Table: Primers and their positions used for mapping of the *bla*_{OXA-23} genetic region in bovine *A. indicus*-like isolates IHIT27599 and IHIT27630.

PCR	Primer name	Primer name Fig. 3	Primer sequence (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon size (bp)		Position in reference sequence	Primer reference
					IHIT27599	IHIT27630		
1	TnpA-LEFT	1A	TGTGTTGATATTCCTGCTTCC	55.9	no	1404	KU833219.1 (3173-3193)	This study
	TnpA-RP	1B	CAACTCTGTCATCAGATGA	55.5	amplicon		KU833219.1 (4576-4557)	This study
2	TnpA-FP2	2A	AGCTTGGTCTTTCATCAGCG	58.6	no	649	CP015364.1 (405154-405173)	This study
	OXA-23-ctg69-RP	2B	TGTCCTTGAAACAAATCTGACTC	55.5	amplicon		KM977710.1 (32329-32349)	This study
3	OXA-23-FWD	3A	AACCCCGAGTCAGATTGTC	57.5	1184	1184	HQ700358.2 (10566-10547)	Groebner <i>et al.</i> ¹
	ATPase-univ-R	3B	GCAACCGTCGACATCTGTA	58.3			HQ700358.2 (9383-9402)	This study
4	ATPase-internl	4A	TCAGGAAGATCGGACAGATC	56.2	770	770	HQ700358.2 (9227-9208)	This study
	ISAcra1-MerR-Rev	4B	CGCCTTTACGATGTAGGCTA	57.2			AJ486856.1 (9420-9439)	This study
5	IS26-FP	5A	ACTGTTGCAAAATAGTCGGTGG	58.8	1359	no	LT594095.1 (2686368-2686348)	This study
	OXA-23-ctg69-RP	2B	TGTCCTTGAAACAAATCTGACTC	55.5		amplicon	KM977710.1 (32329-32349)	This study

Reference

1. Groebner S, Linke D, Schutz W *et al.* 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**: 912-22.

Continuation S2 Table: (A) Table: SNP matrix referring to S1 (A) Fig

Strains (see S1 Fig for accession numbers)	<i>A. baumannii</i> AB 030	3148	2920	2918	1233	2911	2686	2911	3242	2308	2963	2911	108
	<i>A. bohemicus</i>	2459	2634	2908	2615	2895	2856	2615	3576	2799	2998	2615	2918
	<i>A. parvus</i>	3139	2954	2962	2962	3207	3575	1796	3207	2962	2546	3139	2546
	<i>A. gurneyi</i>	3032	2923	2723	2901	2679	3498	2853	3008	2853	2901	3032	2697
	<i>A. schindleri</i>	2216	2343	3105	2327	3037	3834	3237	3834	3008	3237	3053	3168
	<i>A. soil</i>	2472	3011	2994	2566	2981	3448	2709	3142	2981	2629	3168	2833
	<i>A. townneri</i>	3203	2223	2235	2878	2222	3516	2736	3012	2222	2833	2472	2673
	<i>A. ursingii</i>	2683	3025	2639	3022	2658	3517	2692	3081	3022	2673	3203	2683
	<i>A. bouvetii</i>	3016	2803	2810	3337	2778	4049	3243	3423	2778	3331	2683	3016
	<i>A. radioresistens</i>	3120	3019	3005	2993	3001	3737	3130	3313	3001	3016	3120	3016
	<i>A. bereziniae</i>	2768	2792	2781	2780	2769	3452	2766	2784	2769	2813	2768	2813
	<i>A. bellerophonkii</i>	3177	3051	3045	2379	3056	3417	3061	3061	3056	2423	3177	2423
	<i>A. tandonii</i>	2632	2403	2394	2756	2381	2814	2656	2925	2381	2778	2632	2778
	<i>A. lwofii</i>	3143	2408	2411	3146	2398	3827	2972	3240	2398	3143	2632	2778
	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	3143	2908	2904	1230	2898	3226	2322	2963	2898	3143	2632	2778
	<i>A. indicus</i> ATCC 4215	2398	210	184	0	2888	3766	2860	3134	2888	2398	2398	2398
	<i>A. rudis</i> CIP 110305	3240	3156	3138	2990	3134	3567	3007	3134	2963	3240	3240	3240
	<i>A. glykenbergii</i>	2972	2856	2858	2261	2860	3407	3007	2860	2322	2972	2972	2972
	<i>A. nectaris</i> CIP 110549	3827	3768	3757	3258	3766	3766	3407	3567	3007	3827	3827	3827
	<i>A. indicus</i> CIP 110387	2938	210	184	0	2888	3766	2860	3134	2963	2938	2938	2938
	<i>A. brisouli</i> CIP 110357	2943	2943	2940	2251	2817	2965	3325	1414	3004	2965	2965	2965
	<i>A. baumannii</i> AYE	2876	2959	2837	2237	2902	2692	2902	3231	2309	2967	2902	2902
	<i>A. indicus</i> DSM 25388	2676	2959	2888	2965	2902	2692	2902	3231	2309	2967	2902	2902
	<i>A. pitii</i> BBST01.1	2969	2959	2837	2237	2902	2692	2902	3231	2309	2967	2902	2902
	<i>A. indicus</i> IHT27599	2969	2959	2837	2237	2902	2692	2902	3231	2309	2967	2902	2902
	<i>A. indicus</i> IHT27630	2969	2959	2837	2237	2902	2692	2902	3231	2309	2967	2902	2902
	<i>A. equi</i> strain 114	2969	2959	2837	2237	2902	2692	2902	3231	2309	2967	2902	2902

Continuation S2 Table: (A) Table: SNP matrix referring to S1 (A) Fig

Strains (see S1 Fig for accession numbers)	<i>A. baumannii</i> AB 030	<i>A. baumannii</i> <i>bohemicus</i>	<i>A. parvus</i> CIP 108168	<i>A. gernerii</i> CIP 107464	<i>A. schindleri</i> CIP 107287	<i>A. soli</i> NIPH 2899	<i>A. townneri</i> CIP 107472	<i>A. ursingii</i> CIP 107286	<i>A. bouvetii</i> CIP 107468	<i>A. radiorensisten</i> CIP 7012	<i>A. bereziniae</i> CIP 107469	<i>A. bellerophonii</i> CIP 107469	<i>A. tendoi</i> CIP 107469	<i>A. lwoffi</i> ATCC 15309	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	<i>A. indicus</i> ANC 4215	<i>A. rudis</i> CIP 110305	<i>A. glykenbergii</i> CIP 110549	<i>A. nectans</i> CIP 110549	<i>A. indicus</i> CIP 110367	<i>A. brisouli</i> CIP 110357	<i>A. baumannii</i> AYE	<i>A. indicus</i> DSM 25388	<i>A. pituiti</i> BB5101.1	<i>A. indicus</i> IHT27599	<i>A. indicus</i> IHT27630	<i>A. harbinensis</i> KM7	<i>A. baumannii</i> MDR-TJ	<i>A. venetianus</i> XBB1	<i>A. equi</i> strain 114	
<i>A. harbinensis</i> HT L17	3294	2019	3378	3162	3112	3387	2851	3311	3132	3405	2957	3229	2899	2808	3269	2988	3313	3152	3788	2988	3205	3258	2988	3271	2990	2985	3044	2994	3275	2688	3044
<i>A. indicus</i> KM7	80	2918	2531	2695	3057	2987	2820	3019	2784	2964	2791	3056	2411	2407	2901	293	3131	2882	3738	293	2924	2887	293	2950	301	329	2994	2903	2903	2405	2684
<i>A. baumannii</i> MDR-TJ	267	2918	2531	2695	3057	2987	2820	3019	2784	2964	2791	3056	2411	2407	2901	293	3131	2882	3738	293	2924	2887	293	2950	301	329	2994	2903	2903	2405	2684
<i>A. venetianus</i> VEC3	267	2214	1825	2808	3096	2792	2790	2755	3376	3171	2824	2419	2690	3114	2271	2965	3004	1414	3325	2965	2692	2251	104	1227	2952	2966	3275	2970	2766	2766	2534
<i>A. johnsonii</i> XBB1	267	2214	2913	2744	2357	3145	2310	3066	2463	3171	2474	2840	2147	2356	2855	2388	3049	2659	3575	2388	2908	2840	2388	2837	2417	2410	2688	2405	2852	2534	2534
<i>A. equi</i> strain 114	2977	2860	2267	2808	2357	3145	2310	3066	2463	3171	2474	2840	2147	2356	2855	2388	3049	2659	3575	2388	2908	2840	2388	2837	2417	2410	2688	2405	2852	2534	2534

Colour shading indicates SNP values (low number of SNPs [dark] to high number of SNPs [white])

S2 Table: (B) Table: SNP matrix referring to S1 (B) Fig

Strains (see S1 Fig for accession numbers)	<i>A. indicus</i> ANC 4215	<i>A. indicus</i> CIP 110367	<i>A. indicus</i> DSM 25388	<i>A. indicus</i> IHIT27599	<i>A. indicus</i> IHIT27630	<i>A. indicus</i> KM7
<i>A. indicus</i> ANC 4215		313	1618	65952	68658	83046
<i>A. indicus</i> CIP 110367	313		1917	66012	68544	82736
<i>A. indicus</i> DSM 25388	1618	1917		64841	67605	81906
<i>A. indicus</i> IHIT27599	65952	66012	64841		35396	83474
<i>A. indicus</i> IHIT27630	68658	68544	67605	35396		86573
<i>A. indicus</i> KM7	83046	82736	81906	83474	86573	

Colour shading indicates SNP values (low number of SNPs [dark] to high number of SNPs [white])

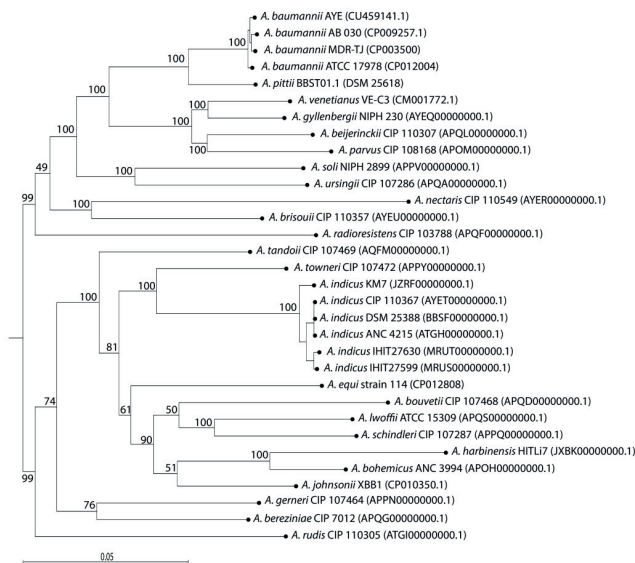
S3 Table. Median lethal doses (LD50) of *Acinetobacter* spp. injected into *G. mellonella* larvae at 24 hours post infection.

<i>Acinetobacter</i> strain	log LD ₅₀	95% CI
<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	4.72	4.42 - 5.01
<i>A. lwoffii</i> ATCC 15309	5.67	5.51 - 5.82
<i>A. indicus</i> -like IHIT27630	6.20	5.91 - 6.50
<i>A. indicus</i> -like IHIT27599	6.84	6.65 - 7.04

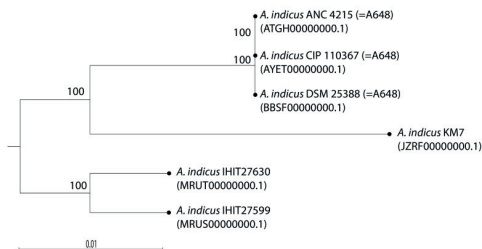
CI, confidence interval

S4 Table: LDH Assay Statistics

LDH values/ tests	<i>A. baumannii</i> ATCC 17978	medium	<i>A. lwoffii</i> ATCC 15309	<i>A. indicus</i> -like IHIT27630	<i>A. indicus</i> -like IHIT27599
1	106,5	9	33	12	22
2	111	21	27	16	20
3	79,5	15	22,5	34,5	50
4	126	22	37,5	36	40
5	85,5	14	22,5	15	14
6	91,5	18	24	19,5	11
7	x	15	x	x	38
MW	100	16	28	22	28
Medium vs			ACBA vs		
ACBA		0,000	15309		0,000
15309		0,003	IHIT27630		0,000
IHIT27630		0,200	IHIT27599		0,000
IHIT27599		0,071			



A



B

S1 Fig. Neighbour-joining phylogenetic tree based on (A) the maximum common genome (MCG) of publicly available whole genomes of 32 representative isolates of different *Acinetobacter* species and (B) the MCG of whole genomes of *A. indicus* isolates provided publicly and generated in this study. As for the *A. indicus* type strain A648 three genome sequences under different strain labels (ANC 4215, CIP 110367 and DSM 25388) and accession numbers (see Fig) were available in the database, they were all included in the analysis. The tree was constructed using the maximum likelihood method. Bootstrap values (> 50%) after 1,000 simulations are shown at branch nodes. GenBank accession nos. are given in parenthesis. Bar, 0.05 (A) / 0.01 (B) nucleotide substitutions per site. Results of pairwise distance calculation are provided in S2 Table.



Seasonal Occurrence and Carbapenem Susceptibility of Bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany

Peter Klotz^{1*}, Paul G. Higgins^{2,3}, Andreas R. Schaubmar⁴, Klaus Failing⁴, Ursula Leidner¹, Harald Seifert^{2,3}, Sandra Scheufen^{1,5}, Torsten Semmler⁶ and Christa Ewers¹

¹ Institute of Hygiene and Infectious Diseases of Animals, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ² Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany, ³ German Center for Infection Research (DZIF), Partner Site Bonn-Cologne, Cologne, Germany, ⁴ Unit for Biomathematics and Data Processing, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany, ⁵ Institute for Hygiene and Microbiology, University of Würzburg, Würzburg, Germany, ⁶ NG1 Microbial Genomics, Robert Koch Institute, Berlin, Germany

Acinetobacter baumannii is one of the leading causes of nosocomial infections in humans. To investigate its prevalence, distribution of sequence types (STs), and antimicrobial resistance in cattle, we sampled 422 cattle, including 280 dairy cows, 59 beef cattle, and 83 calves over a 14-month period. Metadata, such as the previous use of antimicrobial agents and feeding, were collected to identify putative determining factors. Bacterial isolates were identified via MALDI-TOF/MS and PCR, antimicrobial susceptibility was evaluated via VITEK2 and antibiotic gradient tests, resistance genes were identified by PCR. Overall, 15.6% of the cattle harbored *A. baumannii*, predominantly in the nose (60.3% of the *A. baumannii* isolates). It was more frequent in dairy cows (21.1%) than in beef cattle (6.8%) and calves (2.4%). A seasonal occurrence was shown with a peak between May and August. The rate of occurrence of *A. baumannii* was correlated with a history of use of 3rd generation cephalosporins in the last 6 months prior to sampling Multilocus sequence typing (Pasteur scheme) revealed 83 STs among 126 unique isolates. Nine of the bovine STs have previously been implicated in human infections. Besides known intrinsic resistance of the species, the isolates did not show additional resistance to the antimicrobial substances tested, including carbapenems. Our data suggest that cattle are not a reservoir for nosocomial *A. baumannii* but carry a highly diverse population of this species. Nevertheless, some STs seem to be able to colonize both cattle and humans.

Keywords: ESKAPE, *Acinetobacter baumannii*, antimicrobial susceptibility, MLST, cattle, epidemiology

OPEN ACCESS

Edited by:

Ziad Daoud,
University of Balamand, Lebanon

Reviewed by:

Nabil Karah,
Umeå University, Sweden
Zhi Ruan,
Zhejiang University, China

*Correspondence:

Peter Klotz
peter.klotz@vetmed.uni-giessen.de

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 06 December 2018

Accepted: 01 February 2019

Published: 22 February 2019

Citation:

Klotz P, Higgins PG, Schaubmar AR, Failing K, Leidner U, Seifert H, Scheufen S, Semmler T and Ewers C (2019) Seasonal Occurrence and Carbapenem Susceptibility of Bovine *Acinetobacter baumannii* in Germany. *Front. Microbiol.* 10:272. doi: 10.3389/fmicb.2019.00272

INTRODUCTION

Acinetobacter is widespread in the microbiota of animals, plants and the environment (Doughari et al., 2011). Several species are able to cause opportunistic, mainly hospital-acquired infections. In contrast to many other *Acinetobacter* species, *Acinetobacter baumannii* is mainly associated with clinical environments and hospital outbreaks (Towner, 2009). Nevertheless, the bacterium

Abbreviations: FS, pen-floor fecal sample; NS, nasal swab; RS, rectal swab.

is sporadically found in samples of cattle (Hamouda et al., 2008, 2011; Nam et al., 2009, 2010; Al Bayssari et al., 2015; Rafei et al., 2015; Fernando et al., 2016) and even carbapenem-resistant strains have been reported (Al Bayssari et al., 2015; Pailhoriès et al., 2016; Webb et al., 2016). The increase of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates implicated in human infections causes a serious limitation of treatment options and has been associated with high mortality rates (Falagas and Rafailidis, 2007; Perez et al., 2007). In *Acinetobacter* spp., carbapenem-resistance is mostly mediated by acquired class D beta-lactamases, so called oxacillinases (mainly OXA-23, OXA-40, and OXA-58). A further mechanism is the insertion of a genetic element (e.g., *ISAbal1*) upstream of intrinsic resistance genes, such as the β -lactamase gene *bla_{OXA-51-like}* which results in its overexpression (Turton et al., 2006). *A. baumannii* strains involved in nosocomial infections frequently belong to certain clonal groups. Eight different so called international clones (ICs) have been identified worldwide, among which the most important groups are IC1 and IC2 corresponding to the multilocus sequence types ST1 and ST2 of the Pasteur scheme (Higgins et al., 2010a). In addition to these major clones important further groups are responsible for mostly regionally distributed outbreaks, e.g., IC7 (corresponding to ST25). Some clonal complexes have not yet been linked to certain ICs although they are also responsible for nosocomial infections and outbreaks, e.g., CC32 which does not belong to IC1-8 (Da Silva et al., 2014; Sahl et al., 2015). *A. baumannii* has also been associated with infections in hospitalized cats, dogs and horses (Endimiani et al., 2011; Zordan, 2011; Smet et al., 2012; Belmonte et al., 2014; Pomba et al., 2014; Ewers et al., 2017) and recent studies have even described the emergence of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates belonging to ST1 and ST2 in companion animals (Pomba et al., 2014; Ewers et al., 2016, 2017). According to the few recent reports, mostly novel STs have been identified among bovine *A. baumannii* isolates, while strains of the dominant clonal lineages were only rarely identified (Lupo et al., 2014; Al Bayssari et al., 2015; Rafei et al., 2015). In order to elucidate the occurrence of *A. baumannii* in livestock, we performed an explorative representative study in the federal state of Hesse, Germany, including the collection of metadata concerning the animals and farms. By that we were able to determine the prevalence of *A. baumannii* in cattle in Hesse and could provide an insight into the phylogenetic diversity of the isolates and the antimicrobial resistance features of bovine *A. baumannii* in German cattle. The analysis of metadata allowed us to identify factors influencing the prevalence of *A. baumannii* and provides important insights for future investigations concerning the prevalence and origin of *A. baumannii*.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

We designed our study population based on the total number of 467,787 animals obligatory registered in the national database for

cattle¹ in Hesse in October 2014. The cattle population in Hesse consists of various breeds, whereof a minority is usually held extensively (Salers, White Park, Scottish Highland, Welsh-Black, Galloway, Belted Galloway, Luing, Small Zebu, White Galloway, Longhorn, Brahman, Heck cattle, Beefalo, Water Buffalo, Bison, European Bison, other crossbreds, and other taurine cattle). Due to a high level of time and effort for sampling these animals, we excluded them from our study. To determine a representative sample size for the Hessian cattle population, the 383,870 animals of usually non-extensively held breeds were then defined as the sampling population. We did not define further exclusion criteria. Taking into account retrospective data from the microbiological diagnostics unit of our institute (P. Klotz, E. Prenger-Berninghoff, S. Scheufen, and C. Ewers, unpublished data), we estimated a response distribution for the occurrence of *A. baumannii* of 1%. Accordingly, a sample size of 380 animals was calculated (confidence level: 95%, margin of error: 1%). Stratification of the sample was done by using the categories “dairy” (female individuals of dairy breeds >7 months), “beef” (male individuals of beef cattle breeds >7 months) and “calf” (male and female individuals <8 months). Furthermore, stratification of the random sample was done according to the number of registered animals in the respective 22 districts (**Supplementary Table S1**). All animals of the study population were listed by their stratification criteria, and random numbers were assigned to each individual. By sorting the animals according to their random numbers, the animals and their corresponding farms were selected, beginning with the smallest random individual number. Due to matters of time and availability, the individual animals were then conveniently selected by the sampler at the farm. The number of animals on each farm was dependent on the original random list.

Bacterial Strains, Species Identification

From January 2015 to February 2016 NS and RS from cattle ($n = 422$) as well as FS from the corresponding stables ($n = 353$) were collected in Hesse, Germany (**Supplementary Table S4**). The FSs were collected at five locations in the stable to increase the chance of finding isolates. The number of 422 animals includes 42 additional samples (28 dairy cows, 9 beef cattle, and 10 calves) to the determined sample size ($n = 380$) due to variable sampling conditions on different farms. The samples were cultured on blood agar (blood agar base by Merck Chemicals, GmbH, Darmstadt, supplemented with 5% sheep blood), Water-blue Metachrome-yellow Lactose Agar (Oxoid, Wesel, Germany), and MacConkey Agar (Oxoid, Wesel, Germany) containing 1 mg/L cefotaxime (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany). Colonies morphologically similar to *A. baumannii* were identified using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany, Database V4.0.0.1). Score values >2,000 were accepted for species identification. The MALDI-TOF/MS results were verified by multiplex PCR targeting different portions of the *gyrB* gene (Higgins et al., 2010b).

¹www.hi-tier.de

Metadata and Statistical Methods

Metadata concerning the animals and farms were collected and assessed via a questionnaire (Supplementary Table S2). Among other things, questions addressed animal age, sex and breed, farm size, animal feeding, use of sewage sludge as fertilizer, and use of antimicrobials previous to the sampling of animals. For statistical analyses, putative determining factors were identified (Supplementary Table S3). To assess the association of these factors and the prevalence of *A. baumannii* (animals positive either in nasal or RS), a logistic regression model analysis using the generalized linear model (glm) family was performed in two steps. First, due to the high number of variables, the putative determining factors were included separately in the model (single-factor analysis) to evaluate raw associations with the prevalence of *A. baumannii*. Secondly, variables with more than 380 observations (90% of 422 possible observations) and statistical relevant values in the single-factor model ($p \leq 0.05$) were included in a multiple logistic regression model together. Factors closely associated to the variable category were excluded from the multiple model. As the prevalence of *A. baumannii* was significantly higher in dairy cows, we also performed single-factor and multiple logistic regression analysis exclusively on this group. Criteria for inclusion of variables into the multiple model were a minimum of 252 observations (90% of 280 possible observations) and statistical relevant values ($p \leq 0.05$) in the single-factor regression analysis. In the same manner we analyzed the occurrence of *A. baumannii* in FSs. Here, variables with more than 318 observations (90% of 353 possible observations) were included to the multiple model. Comparison of the prevalence of *A. baumannii* in different sample locations was conducted via frequency tables and Pearson's chi-squared test or the fisher's exact test for count data. The statistical analyses were done by means of the statistical program package R (Free Software Foundation's GNU project, official homepage²).

Screening for Carbapenem Non-susceptible Strains, Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs)

Screening for carbapenem non-susceptible *A. baumannii* was done by streaking the isolates on Mueller-Hinton agar plates (Oxoid, Wesel, Germany) containing meropenem (Sigma-Aldrich/Merck, Darmstadt, Germany) at different concentrations (2 mg/L and 4 mg/L). Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by using the VITEK2 system and antimicrobial susceptibility testing card AST-GN38 (bioMérieux, Nürtingen, Germany). Imipenem MICs for *A. baumannii* isolates that showed growth on Mueller-Hinton agar containing meropenem were additionally evaluated by using antibiotic gradient agar diffusion method (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy). MICs were interpreted according to CLSI breakpoints defined for human *Acinetobacter* spp. (CLSI, 2014) with exception of nitrofurantoin (breakpoints for Enterobacteriaceae, CLSI), cefpodoxime and ceftiofur

(breakpoints for ceftazidime, CLSI), ceftiofur (breakpoints for cefepime, CLSI), enrofloxacin and marbofloxacin (breakpoints for ciprofloxacin, CLSI). Intrinsic resistance was assumed according to the definitions described in the EUCAST and CLSI guidelines (CLSI, 2014; EUCAST, 2018).

Analysis of Antimicrobial Resistance Genes

All isolates were screened for carbapenemase genes *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-58} via PCR (Gröbner et al., 2009). PCRs targeting the *IS*_{Abal} region upstream of intrinsic *bla*_{OXA-51}-like genes (Turton et al., 2006) and *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} (Gröbner et al., 2009), *bla*_{OXA-48} (Poirel et al., 2004), *bla*_{NDM} (Pfeifer et al., 2011), *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM} (Mendes et al., 2007), and *bla*_{GES}

TABLE 1A | Difference and dependency of the prevalence of *Acinetobacter baumannii* in nose swabs vs. rectal swabs.

	Negative NS	Positive NS	Sum
Negative RS	357 (84.6%)	60 (14.2%)	417 (98.8%)
Positive RS	1 (0.2%)	4 (0.9%)	5 (1.2%)
Sum	358 (84.8%)	64 (15.2%)	422 (100%)

χ^2 -squared = 11.8252, df = 1, p-value = 0.00058.
Fisher's Exact Test for Count Data: p-value = 0.00216.
McNemar's chi-squared = 55.1475, df = 1, p-value = 0.0001.
NS, nasal swabs (n = 422); RS, rectal swabs (n = 422); FS, Pen-floor fecal sample (n = 353).
Only one FS was taken per farm so in some cases several NS and RS confer to the same FS.

TABLE 1B | Difference and dependency of the prevalence of *A. baumannii* in nose swabs vs. pen-floor fecal samples.

	Negative NS	Positive NS	Sum
Negative FS	341 (80.8%)	42 (10%)	383 (90.8%)
Positive FS	17 (4%)	22 (5.2%)	39 (9.2%)
Sum	358 (84.8%)	64 (15.2%)	422 (100%)

χ^2 -squared = 53.3386, df = 1, p-value = 0.0001.
McNemar's chi-squared = 9.7627, df = 1, p-value = 0.00178.
NS, nasal swabs (n = 422); RS, rectal swabs (n = 422); FS, Pen-floor fecal sample (n = 353).
Only one FS was taken per farm so in some cases several NS and RS confer to the same FS.

TABLE 1C | Difference and dependency of the prevalence of *A. baumannii* in rectal swabs vs. pen-floor fecal samples.

	Negative RS	Positive RS	Sum
Negative FS	381 (90.3%)	2 (0.5%)	383 (90.8%)
Positive FS	36 (8.5%)	3 (0.7%)	39 (9.2%)
Sum	417 (98.8%)	5 (1.2%)	422 (100%)

χ^2 -squared = 10.0217, df = 1, p-value = 0.00155.
Fisher's Exact Test for Count Data: p-value = 0.00643.
McNemar's chi-squared = 28.6579, df = 1, p-value = 0.0001.
NS, nasal swabs (n = 422); RS, rectal swabs (n = 422); FS, pen-floor fecal sample (n = 353).
Only one FS was taken per farm so in some cases several NS and RS confer to the same FS.

²<http://www.r-project.org>

(Rieber et al., 2017) were performed on isolates which showed growth on Mueller-Hinton agar containing meropenem, which was used to screen for putative carbapenem-resistant strains.

Clonal Analysis, Assignment of International Clones and Multilocus Sequence Typing

To identify copy strains among isolates originating from the same farm, the same animal or the same sample location, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *Apa*I-restricted whole genomic DNA was performed (Seifert et al., 2005). International clones I-III were identified via PCR (Turton et al., 2007). Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to the Pasteur scheme (Diancourt et al., 2010). A minimum spanning tree based on MLST allele profiles was created with Bionumerics version 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). eBurst v3 was used to assess clonal groups based on allele sequence profiles of 1161 currently available STs³ (date of accession: 12-05-2018).

RESULTS

Prevalence of *A. baumannii* in 422 Cattle

From 1197 samples (844 animal samples and 353 FSs), we obtained 144 *A. baumannii* isolates. As PFGE analysis identified 18 of these isolates as copy strains (identical PFGE pattern – a maximum of three strains per animal), further analysis was performed with 126 “unique” strains. The overall prevalence of *A. baumannii* in 422 cattle was 15.6% (CI: 95%, 12.3–19.5%). The rate of false positive *A. baumannii* identification with MALDI-TOF was 2.3% (two *A. nosocomialis*, one *A. calcoaceticus*). We identified considerable differences in the prevalence of *A. baumannii* with respect to the sample location (*p*-values of <0.0001 to 0.0010, **Table 1**). The highest prevalence was determined for NS (15.2%), followed by FSs (FS: 9.2%) and RSs (RS 1.2%). The occurrence in each sample location was dependent on the occurrence in all other sample locations (*p*-values of <0.0001 to 0.0064, **Table 1**). The frequency of *A. baumannii* was highest in the category “dairy cows” followed by “beef cattle” and “calves” (21.1, 6.8, and 2.4%, *p*-value: <0.0001). The three animal categories also differed in further aspects, e.g., the systemic use of 3rd generation cephalosporins in a 6 months period prior to sampling on the farm (23% in dairy cattle, 4% in beef cattle, and 21% in calves) and naturally, the age of animals (means of 58 months in dairy cattle, 19 months in beef cattle and 2 months in calves). The prevalence also differed depending on the season of sampling but not for the different geographical regions. The prevalence was highest in the 2nd trimester of the year (May–August, 44.3%), followed by the 3rd trimester (September–December, 15.3%) and the 1st trimester (January–April, 5.1%, **Figure 1**). At the farm level, 45 of 353 farms were positive for *A. baumannii* in the FS (12.8%), again with the highest prevalence in the 2nd trimester

(26.2%) followed by the 3rd and the 1st trimester (12.3 and 2.5%, respectively).

Analysis of Putative Determining Factors Prevalence in Cattle (All Categories Included)

The single-factor logistic regression analysis revealed nine factors that may have an influence on the occurrence of *A. baumannii* in the animals (**Table 2**). However, for only three of these factors significant values remained in the multiple logistic regression model (*n* = 387), namely systemic use of 3rd generation cephalosporins in a 6 months period prior to sampling on farm level (*p*-value: 0.0069, OR = 2.6), sampling trimester (May–August: *p*-value: <0.0001, OR = 18; September–December: *p*-value: 0.0168, OR = 2.9), and the category (calf: *p*-value: 0.0012, OR = 0.08).

Occurrence in Dairy Cows

In dairy cows, the single-factor logistic regression analysis revealed five putative determining factors (**Table 2**). Out of these factors the season of sampling (May–August: *p*-value < 0.0001, OR = 22; September–December: *p*-value: 0.0130, OR = 3.7) and the use of 3rd generation cephalosporins in a 6 months period prior to sampling (*p*-value: 0.0071, OR = 2.8) were consistently significant in the multiple model (*n* = 245).

Occurrence in Pen-Floor Fecal Sample

The single-factor logistic regression analysis revealed four factors that may have an influence on the occurrence of *A. baumannii* in the FSs (**Table 2**). In the multiple model (*n* = 306) only the trimester of sampling was significant (2nd Trimester May–August; *p*-value: 0.0013; OR = 7.2).

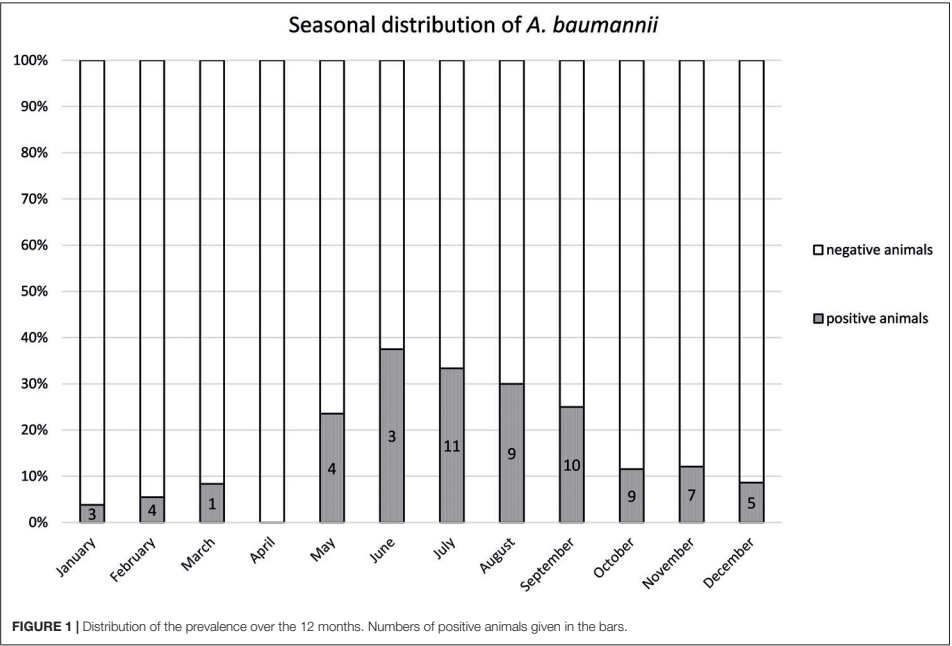
Antimicrobial Susceptibility and Resistance Genes

All 126 *A. baumannii* isolates showed resistance against ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, cefalexin, ceftiofur, nitrofurantoin and chloramphenicol. Intermediate resistance was determined for piperacillin (6%) and rifampicin (25%). All isolates were susceptible to aminoglycosides, fluoroquinolones, polymyxin B and carbapenems (**Supplementary Table S5**). According to PCR analysis, neither an acquired carbapenemase gene nor insertion sequences upstream of *bla*_{OXA-51} were present among the isolates.

Phylogenetic Analysis

According to PCR analyses, 19 *A. baumannii* isolates (15%) belonged to IC2 and 16 isolates (13%) to IC3. The remaining 91 isolates were non-IC1-3 strains. The isolates did not cluster in any clonal complex (CC) that has previously been associated with IC1 to IC8 according to MLST analysis. We identified 83 different STs whereof 67 were newly described, like the most frequently identified ST1027 which forms a new CC together with its single locus variants (SLVs) ST1026, ST1033, and ST1070 (all newly described). Nine STs, including ST155, ST80, ST504, and ST690 have been previously described for human clinical *A. baumannii* strains and these STs are indicated in red in **Figure 2**. According to eBurst analysis, the majority

³<http://pubmlst.org>



of the bovine *A. baumannii* strains did not form CCs, but mostly appeared as singletons (**Supplementary Figure S1**). However, some bovine STs grouped together with STs recently determined for strains isolated from human specimen. For example, IHIT31974 and IHIT32879 (ST690) that were isolated from the nose of two cattle on the same farm are SLVs of ST402, which belongs to IC7 and CC25, a clonal group that has recently been linked with hospital-associated infections in humans (Sahl et al., 2015). The disperse grouping distant from the important clinical STs 1, 2, and 25 is also demonstrated by an alignment of the concatenated sequences of the MLST alleles (**Supplementary Figure S2**).

TABLE 2 | Results of the single-factor logistic regression for the occurrence of *A. baumannii*.

Putative determining factor	All categories		Dairy cows		Pen-floor fecal samples	
	p-value	nObs	p-value	nObs	p-value	nObs
Age of the animal	0.0002	422	n.s.			
Category (dairy/beef/calf)	0.0003	422				
Feeding of corn silage	0.00705	367	0.0270	266		
Feeding of straw	0.0215	105	n.s.			
Local use of 1st CEPH on farm level	n.s.		n.s.		0.0458	330
Sex of the animal	0.0028	422	n.s.			
Systemic use of 3rd CEPH on farm level	0.0010	387	0.0040	255	0.0372	319
Systemic use of florfenicol on farm level	n.s.		0.0500	255	n.s.	
Systemic use of penicillin on farm level	0.0369	387	n.s.		n.s.	
Trimester	<0.0001	422	<0.0001	280	0.0004	353
Use of sewage sludge	<0.0001	263	0.0013	169	0.0173	210

nObs, number of observations; 3rd CEPH, 3rd generation cephalosporins; 1st CEPH, 1st generation cephalosporins; n.s., not significant.

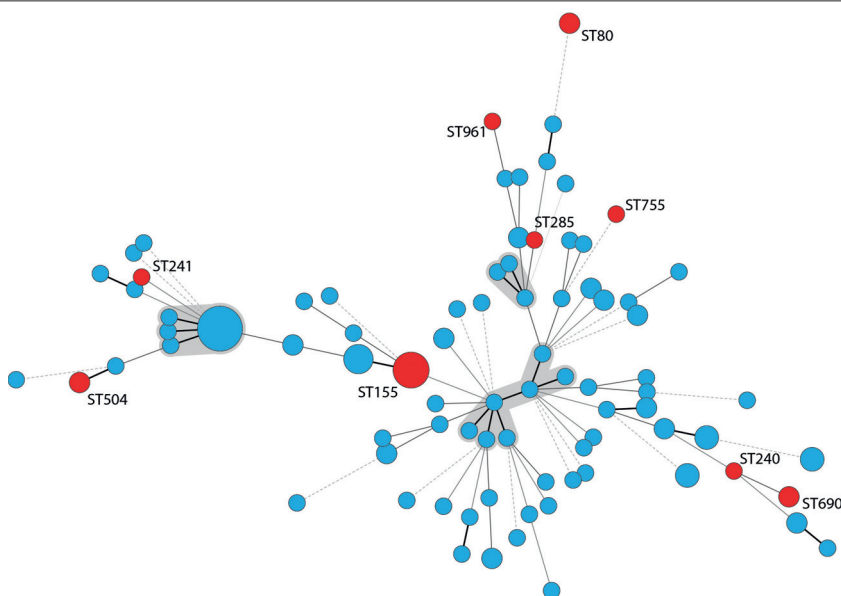


FIGURE 2 | Minimum spanning tree of 126 *A. baumannii* cattle field isolates. STs that have been previously found in human samples are labeled with the ST number and circles indicating the STs are marked in red; clonal complexes are shaded gray; thick lines: single locus variant, thin lines: double locus variant, dashed line: multiple locus variants.

DISCUSSION

Prevalence of *A. baumannii* in Hessian Cattle

The aim of the present study was to assess the prevalence of *A. baumannii* in the German state of Hesse. Only a few studies investigated the prevalence of *A. baumannii* or other *Acinetobacter* spp. in cattle before. These are only to a limited extend comparable to our study. Either sample material was restricted to fecal samples and selective media was used for initial screening, resulting in a very low recovery rate compared to our study of 0.6% (Webb et al., 2016), or information needed to determine the prevalence of *A. baumannii* in the respective species and sample locations is not provided (Hamouda et al., 2011). One study reports a very high isolation rate of 83% in mouth swabs from cattle from the Reunion Islands (Pailhoriès et al., 2016), but it only included six animals on a single farm. Probably this is not representative for a larger population of cattle in this region. A frequency similar to our results (isolation rates up to 44.3% in the second trimester) is reported by Wilharm et al. (2017) in stork samples collected in Poland with an isolation rate of 25% and local rates up to 48%.

Prevalence in Different Categories and Different Sample Locations

With dairy cows, beef cattle, and calves, we included three different categories of cattle which differ in relevant aspects, such as feeding, lifetime, and antimicrobial treatment, probably influencing the frequency of *A. baumannii*. The highest prevalence of *A. baumannii* was observed in dairy cows (21.1%). The longer life span of dairy cows compared to beef cattle and calves, combined with a selection pressure due to use of antimicrobials (e.g., 3rd generation cephalosporins) could lead to a higher chance for dairy cows to acquire *A. baumannii* and to establish a stable colonization in the nose or gut. We isolated *A. baumannii* mainly from the nose, which could suggest that the bacterium has a tropism to the nasal mucosa. Consistent with this, *A. baumannii* has been isolated from human nasal samples with rates from 54 to 92% in long term facilities (Liou et al., 2017). However, it has been shown in another study that the colonization of the human digestive tract was also high (41%) in a nosocomial context (Corbella et al., 1996). Few studies investigated the occurrence of the bacterium in skin, nose, and fecal swabs from healthy humans and reported recovery rates of 0–10.4% (Berlau et al., 1999; Patil and Chopade, 2001; Dijkshoorn et al., 2005; Griffith et al., 2006). The high

prevalence of *A. baumannii* in the cattle nose may be due to repeated acquisition of the bacterium probably by uptake or inhaling of feed particles or surrounding air contaminated with *A. baumannii*. Indeed, airborne transmission has been shown for *A. baumannii* in hospitals (Shamsizadeh et al., 2017; Solomon et al., 2017), and contamination of air samples from animal stables with *Acinetobacter* spp. has been reported (Andersson et al., 1999; Zucker et al., 2000). Moreover, *Acinetobacter* spp. have been identified in plants, including the rhizosphere of maize and others (Gulati et al., 2010; Dematheis et al., 2012), maize silage (Li and Nishino, 2011) and soybean diet in fish (Catalán et al., 2017), all of which are used as feed in cattle production.

Identification of Putative Determining Factors

The aim of the multiple logistic regression analysis was to identify putative determining factors that could influence the occurrence of *A. baumannii* in our study population.

Seasonality

The analysis suggested that the season is a significant factor for the occurrence of *A. baumannii*, probably due to prolonged survival and increased growth of the bacterium associated with higher temperature and humidity. This could also explain the high prevalence in the study from the tropical Reunion Islands mentioned above (Pailhoriès et al., 2016). The seasonality of *Acinetobacter* has furthermore been reported in publications from human medicine (Retailliau et al., 1979; Poutanen et al., 1997; Perencevich et al., 2008). According to Perencevich et al. (2008) monthly infection rates for *A. baumannii* can rise by 17% for each 5.6°C increase in temperature. Interestingly, it was demonstrated that non-MDR *A. baumannii* were identified more frequently in warm months, while MDR strains showed less seasonal variation (Fukuta et al., 2012).

Use of 3rd Generation Cephalosporins

The chance of isolating *A. baumannii* in our sample was also higher when 3rd generation cephalosporins were used on the farm during the 6 months prior to sampling. Due to the resistance of the bovine *A. baumannii* against many cephalosporins, including the 3rd gen. cephalosporin ceftiofur, which is widely used in dairy production (24.8% of 387 animals of the sample population), selective antibiotic pressure could be a relevant factor in the maintenance of *A. baumannii* on cattle farms.

Use of Sewage Sludge as Fertilizer

Another interesting determining factor was the use of sewage sludge as a fertilizer on the farm. Due to the reduced number of observations (<90% of the possible observations) it was excluded from the multiple models. Though, this variable showed significant *p*-values in all single-factor analyzes and also if included to the multiple models (data not published). Distribution of *A. baumannii* via sewage sludge on feeding plants via fertilization seems possible as it has been demonstrated that it can be emitted from hospitals into the environment via wastewaters and urban sewage (Seruga Music et al., 2017) and is able to persist through the wastewater treatment process (Hrenovic et al., 2016). Our further analysis of the bovine *A. baumannii* showed that the isolates differ from human clinical isolates concerning antimicrobial resistance and phylogeny. Therefore, further research is needed to clarify (a) the role of the use of sewage sludge fertilization as a putative determining factor for *A. baumannii* in cattle and (b) the phylogeny of human non-clinical isolates.

Antimicrobial Susceptibility

Although 50 isolates showed growth on Mueller–Hinton agar containing 2 mg/L meropenem and 10 isolates showed growth on Mueller–Hinton agar containing 4 mg/L meropenem, we could not detect phenotypic resistance to carbapenems

TABLE 3 | Sequence types of bovine *A. baumannii* isolates with known occurrence in human isolates.

STPast	Number of cattle isolates	Human sample location	Acquired β-lactamase	Year of isolation	Country	Reference
ST80	2	Unknown	OXA-40	1999–2010	Spain	Villalón et al., 2011; Mosqueda et al., 2014
ST155	8	Wound	PER-1	2002, 2009, 2012	United States, China, Italy	http://pubmlst.org/abaumannii/
ST240	1	Unknown	Unknown	2010, 2013	Japan	Higuchi et al., 2014
ST241	1	Blood, sputum, stool	Unknown	Unknown	United States, Brazil	http://pubmlst.org/abaumannii/
ST285	1	Urine, sputum	OXA-40	2010	United States, Lebanon	Rafei et al., 2014
ST504	2	Perirectal	Unknown	Unknown	United States	Gregorio et al., 2015
ST690	2	Wound	Unknown	2002, 2014	Spain, Lebanon	http://pubmlst.org/abaumannii/; Al Atrouni et al., 2016a
ST755	1	n.n.	OXA-40	2009–2012	Vietnam	Schultz et al., 2016
ST961	1	Wound	Unknown	2006	United States	http://pubmlst.org/abaumannii/

in our isolates, as determined by a reference method for susceptibility testing. This is in concordance with other studies investigating the occurrence of *A. baumannii* in cattle without using selective media (Hamouda et al., 2011; Rafei et al., 2015). This situation seems to distinguish the cattle isolates from highly resistant strains found in companion animals and humans in a nosocomial background (Francey, 2000; Ewers et al., 2017). Regarding their antimicrobial resistance and phylogenetic diversity, *A. baumannii* strains from cattle rather resemble environmental strains and isolates from wildlife animals (Pailhoriès et al., 2015; Bardbari et al., 2017; Wilharm et al., 2017).

Phylogenetic Analyses

Multilocus sequence typing analysis underlined the huge diversity of *A. baumannii* strains in the investigated cattle population. Similar results were obtained in studies from Lebanon and France (Al Atrouni et al., 2016b; Pailhoriès et al., 2016). Notably, some of our bovine strains showed phylogenetic proximity to successful clinical STs. For example, IHIT32879 (ST690: 3-3-2-1-7-2-14) is a SLV of the imipenem-susceptible human clinical isolate LUH7841 (ST402: 3-3-2-1-7-2-4), which belongs to the globally distributed clinically relevant CC25 (Sahl et al., 2015). This CC corresponds to IC7 and is frequently found in human isolates (Chagas et al., 2014; Sahl et al., 2015). Several other STs have recently been isolated from humans, including carbapenem resistant isolates. ST155 has been isolated in China, the United States, and Italy from human samples and was in one occasion associated with a PER-1 gene⁴. ST80 has been identified for the first time in 2014 in OXA-40 producing carbapenem-resistant isolates from human patients in Spain (Mosqueda et al., 2014). A study from Spain identified ST80 as an important group in a Spanish hospital besides ST2, ST3, and ST15 (Villalón et al., 2015). The association to OXA-40 has also been shown for ST285 and ST755, isolated from the United States, Lebanon, and Vietnam (Table 3 and Figure 2). IHIT31924 (ST1074) is a SLV of ST135 which is part of the CC499. The other members of CC499 have already been found in human specimens and OXA-23 has been identified in one of its members (ST192). Cattle might thus host carbapenem-susceptible progenitors of clinically relevant human *A. baumannii* strains and putative transmission routes should be part of future investigations. On the other hand, the lack of the dominant human lineages such as ST2 among our bovine field isolates suggests a selection of these strains inside the hospitals rather than a transition from the cattle population. This represents a notable difference to the *A. baumannii* population in hospitalized companion animals. These animals often show the same STs (or at least ICs) and resistance mechanisms as human nosocomial isolates, indicating interspecies transmission (Endimiani et al., 2011; Zordan, 2011; Pomba et al., 2014; Ewers et al., 2016, 2017).

CONCLUSION

Our data show that *A. baumannii* is a frequent *Acinetobacter* species in cattle. In contrast to human and small veterinary medicine where primarily carbapenem-resistant isolates belonging to IC1, IC2, and IC7 cause epidemic and endemic outbreaks, the population of bovine *A. baumannii* is highly diverse and still susceptible to many antibiotics which is similar to those found in avian sources (Wilharm et al., 2017). Nevertheless, a minority of strains is phylogenetically connected to clinical isolates, but still lack acquired carbapenemase genes. These strains are a potential threat for public health especially if they enter the clinical environment and acquire resistance genes. Our data strongly suggest that the seasonal occurrence of *A. baumannii* should be taken into account in future study designs. A more detailed, genome-based characterization of bovine isolates in the context of *A. baumannii* strains isolated from humans would be of utmost importance for public health issues. It will help to understand the evolution of *A. baumannii* and might contribute to the identification of factors responsible for the assumed shift from environmental strains toward nosocomial lineages. It remains unclear where the bovine strains originate from and if they colonize the animals transiently or for a longer period. The high prevalence of *A. baumannii* in cattle nose samples, the diversity of strains isolated from individual animals, and their seasonal isolation peaks, point toward a temporarily colonization and a frequent exchange with the environment. The analysis of the meta-data hint toward uptake via the feed possibly enhanced through the fertilization with sewage sludge. This possibly forms a continuous circle of reinfection inside the cattle population.

Limitations

Our study design comprises limitations concerning technical and statistical aspects: for productivity reasons only one colony among similar morphologies was chosen for further analysis and selective media for carbapenem-resistant strains were not included. Thus, we accepted possible underestimation of diversity and phenotypic detection of carbapenem resistant strains. Metadata were collected via questionnaires which are inevitable reliant on subjective assessments of the farmers. This resulted in missing values and mandatory exclusion of some variables from the single-factor logistic regression to the multiple models. As we did not distinguish between calves from dairy cows and beef cattle the impact of different management variables in these categories cannot be tested in our model but are met to some extent in our metadata analysis without a significant impact on the prevalence of *A. baumannii*.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council and the German animal welfare law. According to the assessment of the animal welfare

⁴<https://pubmlst.org/abaumannii/>

officer of the Faculty of Veterinary Medicine of Giessen in 2014 the animals did not experience pain, suffering, distress, or lasting harm due to the sampling. An ethical committee statement was therefore not necessary.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

PK, KF, SS, TS, and CE contributed conception and design of the study. PK collected the samples, organized the database, and wrote the first draft of the manuscript. KF wrote sections of the manuscript. PK, KF, and AS performed the statistical analyzes. PK, PH, and HS performed the MLST analyzes. PK and UL performed the PFGE and PCR experiments. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Engemann Family Foundation and the Schaumann Foundation providing a grant to PK.

REFERENCES

- Al Atrouni, A., Hamze, M., Jisr, T., Lemarié, C., Eveillard, M., Joly-Guillou, M.-L., et al. (2016a). Wide spread of OXA-23-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. *Int. J. Infect. Dis.* 52, 29–36. doi: 10.1016/j.ijid.2016.09.017
- Al Atrouni, A., Hamze, M., Rafei, R., Eveillard, M., Joly-Guillou, M.-L., and Kempf, M. (2016b). Diversity of *Acinetobacter* species isolated from different environments in Lebanon: a nationwide study. *Fut. Microbiol.* 11, 1147–1156. doi: 10.2217/fmb-2016-0082
- Al Baysari, C., Dabboussi, F., Hamze, M., and Rolain, J.-M. (2015). Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 950–951. doi: 10.1093/jac/dku469
- Andersson, A. M., Weiss, N., Rainey, F., and Salkinoja-Salonen, M. S. (1999). Dust-borne bacteria in animal sheds, schools and children's day care centres. *J. Appl. Microbiol.* 86, 622–634. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00706.x
- Bardbari, A. M., Arabestani, M. R., Karamie, M., Keramat, F., Bagheri, K. P., and Alikhani, M. Y. (2017). Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. *Microb. Pathog.* 108, 122–128. doi: 10.1016/j.micpath.2017.04.039
- Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M. P., Lemarié, C., Ramont, C., 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, 446–450. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.042
- Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H., and Pitt, T. (1999). Distribution of *Acinetobacter* species on skin of healthy humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 179–183. doi: 10.1007/s100900050254
- Catalán, N., Villasante, A., Wacyk, J., Ramírez, C., and Romero, J. (2017). Fermented soybean meal increases lactic acid bacteria in gut microbiota of atlantic salmon (*Salmo salar*). *Probiotics Antimicrob. Proteins* 10, 566–576. doi: 10.1007/s12602-017-9366-7
- Chagas, T. P. G., Carvalho, K. R., de Oliveira Santos, I. C., Carvalho-Assef, A. P., and Asensi, M. D. (2014). Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008–2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79, 468–472. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.006
- CLSI. (2014). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 26th Edn. Wayne, PA: CLSI.
- Corbella, X., Pujol, M., Ayats, J., Sendra, M., Ardanuy, C., Domínguez, M. A., et al. (1996). Relevance of digestive tract colonization in the epidemiology of nosocomial infections due to multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Infect. Dis.* 23, 329–334. doi: 10.1093/clinids/23.2.329
- Da Silva, G. J., van der Reijden, T., Domingues, S., Mendonça, N., Petersen, K., and Dijkshoorn, L. (2014). Characterization of a novel international clonal complex (CC32) of *Acinetobacter baumannii* with epidemic potential. *Epidemiol. Infect.* 142, 1554–1558. doi: 10.1017/S0950268813002288
- Dematheis, F., Zimmerling, U., Flocco, C., Kurtz, B., Vidal, S., Kropf, S., et al. (2012). Multitrophic interaction in the rhizosphere of maize: root feeding of western corn rootworm larvae alters the microbial community composition. *PLoS One* 7:e37288. doi: 10.1371/journal.pone.0037288
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., and Ahmed, N. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. doi: 10.1371/journal.pone.0010034
- Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T. J. K., Bernards, A. T., Nemec, A., et al. (2005). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* 11, 329–332. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01093.x
- Doughari, H. J., Ndakidemi, P. A., Human, I. S., and Benade, S. (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp. *Microbes Environ.* 26, 101–112. doi: 10.1264/jsm2.ME10179
- Endimiani, A., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., et al. (2011). *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2248–2254. doi: 10.1093/jac/dkr289
- EUCAST. (2018). *Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and zone Diameters. Version 8.0*. Available at: <http://www.eucast.org>
- Ewers, C., Klotz, P., Leidner, U., Stamm, I., Prenger-Berninghoff, E., Gottig, S., 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, 37–44. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.033
- Ewers, C., Klotz, P., Scheufen, S., Leidner, U., Gottig, S., and Semmler, T. (2016). Genome sequence of OXA-23 producing *Acinetobacter baumannii* IHIT7853, a carbapenem-resistant strain from a cat belonging to international clone ICI. *Gut. Pathog.* 8:37. doi: 10.1186/s13099-016-0119-z
- Falagas, M. E., and Rafailidis, P. I. (2007). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: no longer a controversial issue. *Crit. Care* 11:134. doi: 10.1186/cc5911

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

ACKNOWLEDGMENTS

This publication made use of the *Acinetobacter baumannii* MLST website (<https://pubmlst.org/abaumannii/>) sited at the University of Oxford (Jolley and Maiden, 2010). The development of this site has been funded by the Wellcome Trust. We thank the curators of the Institute Pasteur *Acinetobacter* MLST system for curating the data and making it publicly available. We thank Dr. Yvonne Pfeifer for her helpful advices and for providing PCR control strains.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00272/full#supplementary-material>

- Fernando, D. M., Khan, I. U. H., Patidar, R., Lapen, D. R., Talbot, G., Topp, E., et al. (2016). Isolation and characterization of *Acinetobacter baumannii* recovered from *Campylobacter* selective medium. *Front. Microbiol.* 7:1871. doi: 10.3389/fmicb.2016.01871
- Francey, T. (2000). The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *J. Vet. Intern. Med.* 2000, 177–183. doi: 10.1892/0891-6640(2000)014<0177:TROBAA>2.3.CO;2
- Fukuta, Y., Clarke, L. G., Shields, R. K., Wagener, M. M., Pascual, A. W., and Doi, Y. (2012). Lack of seasonality in the occurrence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* complex. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 33, 1051–1052. doi: 10.1086/667741
- Gregorio, E., de Del Franco, M., Martinucci, M., Roscetto, E., Zarrilli, R., and Di Nocera, P. P. (2015). Biofilm-associated proteins: news from *Acinetobacter*. *BMC Genomics* 16:933. doi: 10.1186/s12864-015-2136-6
- Griffith, M. E., Ellis, M. W., and Murray, C. K. (2006). *Acinetobacter* nares colonization of healthy US soldiers. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 27, 787–788. doi: 10.1086/505923
- Gröbner, S., Linke, D., Schutz, W., Fladerer, C., Madlung, J., Autenrieth, I. B., et al. (2009). Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *J. Med. Microbiol.* 58, 912–922. doi: 10.1099/jmm.0.005850-0
- Gulati, A., Sharma, N., Vyas, P., Sood, S., Rahi, P., Pathania, V., et al. (2010). Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Arch. Microbiol.* 192, 975–983. doi: 10.1007/s00203-010-0615-3
- Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., and Amyes, S. G. B. (2011). Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 314–318. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.007
- Hamouda, A., Vali, L., and Amyes, S. G. B. (2008). Gram-negative non-fermenting bacteria from food-producing animals are low risk for hospital-acquired infections. *J. Chemother.* 20, 702–708. doi: 10.1179/joc.2008.20.6.702
- Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., and Seifert, H. (2010a). Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 233–238. doi: 10.1093/jac/dkp428
- Higgins, P. G., Lehmann, M., Wispflinghoff, H., and Seifert, H. (2010b). *GyrB* Multiplex PCR to differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter genomic* species 3. *J. Clin. Microbiol.* 48, 4592–4594. doi: 10.1128/JCM.01765-10
- Higuchi, S., Shikata, M., Chiba, M., Hoshino, K., and Gotoh, N. (2014). Characteristics of antibiotic resistance and sequence type of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Japan and the antibacterial activity of DS-8587. *J. Infect. Chemother.* 20, 256–261. doi: 10.1016/j.jiac.2013.12.001
- Hrenovic, J., Goic-Barisic, I., Kazasic, S., Kovacic, A., Ganjto, M., and Tonkic, M. (2016). Carbapenem-resistant isolates of *Acinetobacter baumannii* in a municipal wastewater treatment plant, Croatia, 2014. *Euro Surveill.* 21, 1–10. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.15.30195
- Jolley, K. A., and Maiden, M. C. J. (2010). BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics* 11:595. doi: 10.1186/1471-2105-11-595
- Li, Y., and Nishino, N. (2011). Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 110, 1561–1570. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05010.x
- Liou, M.-L., Chen, K.-H., Yeh, H.-L., Lai, C.-Y., and Chen, C.-H. (2017). Persistent nasal carriers of *Acinetobacter baumannii* in long-term-care facilities. *Am. J. Infect. Control* 45, 723–727. doi: 10.1016/j.ajic.2017.02.005
- Lupo, A., Vogt, D., Seifert, S. N., Endimiani, A., and Perreten, V. (2014). Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. *J. Food Prot.* 77, 1976–1981. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-073
- Mendes, R. E., Kiyota, K. A., Monteiro, J., Castanheira, M., Andrade, S. S., Gales, A. C., et al. (2007). Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J. Clin. Microbiol.* 45, 544–547. doi: 10.1128/JCM.01728-06
- Mosqueda, N., Gato, E., Roca, L., López, M., Alegria, C. R., de Fernández Cuenca, F., et al. (2014). Characterization of plasmids carrying the blaOXA-24/40 carbapenemase gene and the genes encoding the AbkA/AbkB proteins of a toxin/antitoxin system. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2629–2633. doi: 10.1093/jac/dku179
- Nam, H. M., Lim, S. K., Kang, H. M., Kim, J. M., Moon, J. S., Jang, K. C., 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, 2020–2026. doi: 10.3168/jds.2008-1739
- Nam, H.-M., Lim, S.-K., Kim, J.-M., Joo, Y.-S., Jang, K.-C., and Jung, S.-C. (2010). *In Vitro* activities of antimicrobials against six important species of gram-negative bacteria isolated from raw milk samples in Korea. *Foodborne Pathog. Dis.* 7, 221–224. doi: 10.1089/fpd.2009.0406
- Pailhories, H., Belmonte, O., Kempf, M., Lemarié, C., Cuziat, J., Quinqueneau, C., 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
- Pailhories, H., Kempf, M., Belmonte, O., Joly-Guillou, M.-L., and Eveillard, M. (2016). First case of OXA-24-producing *Acinetobacter baumannii* in cattle from Reunion Island, France. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 763–764. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.005
- Patil, J. R., and Chopade, B. A. (2001). Distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans. *Natl. Med. J. India* 14, 204–208.
- Perencevich, E. N., McGregor, J. C., Shaddell, M., Furuno, J. P., Harris, A. D., Morris, J. G., et al. (2008). Summer peaks in the incidences of gram-negative bacterial infection among hospitalized patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29, 1124–1131. doi: 10.1086/592698
- Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., and Bonomo, R. A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3471–3484. doi: 10.1128/AAC.01464-06
- Pfeifer, Y., Wilharm, G., Zander, E., Wichelhaus, T. A., Göttig, S., Hunfeld, K.-P., et al. (2011). Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1998–2001. doi: 10.1093/jac/dkr256
- Poirer, L., Hérítier, C., Tolün, V., and Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 15–22. doi: 10.1128/AAC.48.1.15-22.2004
- Pomba, C., Endimiani, A., Rossano, A., Saial, D., Couto, N., and Perreten, V. (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, 1267–1268. doi: 10.1128/AAC.02527-13
- Poutanen, S. M., Louie, M., and Simor, A. E. (1997). Risk factors, clinical features and outcome of *Acinetobacter* bacteraemia in adults. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 737–740. doi: 10.1007/BF01709254
- Rafei, R., Dabboussi, F., Hamze, M., Eveillard, M., Lemarié, C., Gaultier, M.-P., et al. (2014). Molecular analysis of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Lebanon using four different typing methods. *PLoS One* 9:e115969. doi: 10.1371/journal.pone.0115969
- Rafei, R., Hamze, M., Pailhories, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.-L., et al. (2015). Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2359–2367. doi: 10.1128/AEM.03824-14
- Retailiau, H. F., Hightower, A. W., Dixon, R. E., and Allen, J. R. (1979). *Acinetobacter calcoaceticus*: a nosocomial pathogen with an unusual seasonal pattern. *J. Infect. Dis.* 139, 371–375. doi: 10.1093/infdis/139.3.371
- Rieber, H., Frontzek, A., and Pfeifer, Y. (2017). Molecular investigation of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Hospitals in North Rhine-Westphalia, Germany. *Microb. Drug Resist.* 23, 25–31. doi: 10.1089/mdr.2016.0035
- Sahl, J. W., Del Franco, M., Pourmaras, S., Colman, R. E., Karah, N., Dijkshoorn, L., 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
- Schultz, M. B., Pham Thanh, D., Tran Do Hoan, N., Wick, R. R., Ingle, D. J., Hawkey, J., et al. (2016). Repeated local emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single hospital ward. *Microb. Genomics* 2:e000050. doi: 10.1099/mgen.0.000050

- Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., et al. (2005). Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 4328–4335. doi: 10.1128/JCM.43.9.4328-4335.2005
- Seruga Music, M., Hrenovic, J., Goic-Barisic, I., Hunjak, B., Skoric, D., and Ivankovic, T. (2017). Emission of extensively-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* from hospital settings to the natural environment. *J. Hosp. Infect.* 96, 323–327. doi: 10.1016/j.jhin.2017.04.005
- Shamsizadeh, Z., Nikaen, M., Nasr Esfahani, B., Mirhoseini, S. H., Hatamzadeh, M., and Hassanzadeh, A. (2017). Detection of antibiotic resistant *Acinetobacter baumannii* in various hospital environments: potential sources for transmission of acinetobacter infections. *Environ. Health Prev. Med.* 22:44. doi: 10.1186/s12199-017-0653-4
- Smet, A., Boyen, F., Pasmans, F., Butaye, P., Martens, A., Nemeč, A., et al. (2012). OXA-23-producing *Acinetobacter* species from horses: a public health hazard? *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 3009–3010. doi: 10.1093/jac/dks311
- Solomon, F. B., Wadilo, F., Tufa, E. G., and Mitiku, M. (2017). Extended spectrum and metallo beta-lactamase producing airborne *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in restricted settings of a referral hospital: a neglected condition. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 6:106. doi: 10.1186/s13756-017-0266-0
- Towner, K. J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* 73, 355–363. doi: 10.1016/j.jhin.2009.03.032
- Turton, J. F., Gabriel, S. N., Valderrey, C., Kaufmann, M. E., and Pitt, T. L. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 807–815. doi: 10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., et al. (2006). The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258, 72–77. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x
- Villalón, P., Valdezate, S., Cabezas, T., Ortega, M., Garrido, N., Vindel, A., et al. (2015). Endemic and epidemic *Acinetobacter baumannii* clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol.* 15:47. doi: 10.1186/s12866-015-0383-y
- Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Rubio, V., Vindel, A., and Saez-Nieto, J. A. (2011). Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 49, 875–882. doi: 10.1128/JCM.01026-10
- Webb, H. E., Bugarel, M., den Bakker, H. C., Nightingale, K. K., Granier, S. A., Scott, H. M., et al. (2016). Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the high plains region of the USA. *PLoS One* 11:e0147363. doi: 10.1371/journal.pone.0147363
- Wilhelm, G., Skiebe, E., Higgins, P. G., Poppel, M. T., Blaschke, U., Leser, S., 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, 4349–4364. doi: 10.1111/1462-2920.13931
- Zordan, S. (2011). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1751–1754. doi: 10.3201/eid1709.101931
- Zucker, B. A., Trojan, S., and Müller, W. (2000). Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 47, 37–46. doi: 10.1046/j.1439-0450.2000.00308.x

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Klotz, Higgins, Schaubmar, Failing, Leidner, Seifert, Scheufen, Semmler and Ewers. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplemental material:

Table S1: Numbers of animals according to the study design showing the stratification

District	Number of animals						
	Total pop.	"Dairy" pop.	sample	"Beef" pop.	sample	"Calf" pop.	sample
Darmstadt	928	569	1	187	0	172	0
Bergstrasse	1,1029	6,408	6	2,116	2	2,505	2
Darmstadt Dieburg	5,920	2,495	2	2,104	3	1,321	2
Gross-Gerau	1,319	550	1	502	0	267	0
Hochtaunuskreis	2,551	1,601	2	414	0	536	1
Main-Kinzig-Kreis	26,105	15,706	16	5,004	6	5,395	5
Main-Taunus-Kreis	863	458	0	213	0	192	1
Odenwaldkreis	17,481	11,484	11	2,393	2	3,604	4
Offenbach	2,016	1,396	1	299	0	321	0
Rheingau-Taunus-Kr.	1,515	681	1	376	0	458	0
Wetteraukreis	15,616	9,498	9	2,901	3	3,217	3
Giessen	10,292	6,911	7	1,356	1	2,025	2
Lahn-Dill-Kreis	8,055	4,510	4	1,242	1	2,303	2
Limburg-Weilburg	14,253	9,439	9	2,154	2	2,660	3
Marburg-Biedenkopf	24,695	15,757	16	4,106	4	4,832	5
Vogelsbergkreis	47,102	32,592	32	5,913	6	8,597	9
Fulda	59,346	39,743	39	7,411	7	12,192	12
Hersfeld-Rotenburg	18,349	11,203	11	3,279	3	3,867	4
Kassel	16,279	10,937	11	2,442	2	2,900	3
Schwalm-Eder-Kreis	28,514	20,112	20	3,178	3	5,224	5
Waldeck-Frankenberg	55,501	41,173	41	4,636	5	9,692	10
Werra-Meißner-Kreis	16,141	11,622	12	1,624	2	2,895	3
Total	383,870	254,845	252	52,226	50	72,280	73
pop. = population							

Table S2: Questionnaire for collection of metadata

Questionnaire sampling of cattle		Number:
Farm: _____		
Individual Number:	Race: ☐ HF ☐ FV ☐ _____	Sex: ☐ Male ☐ Female
Age:	Category: ☐ Dairy ☐ Feedlot ☐ Calf	Pre-existing illness: ☐ None ☐ _____
Pre-treatment: ☐ None ☐ _____	Use of antibiograms:	
Keeping: ☐ Tethering ☐ Pen ☐ Pasture ☐ _____	Size of farm: Animals in total: _____ Cows: _____ Young cattle: _____ Feedlot: _____	Field of use: ☐ Dairy farm ☐ Fattening farm ☐ Suckler cow husbandry ☐ _____
Organic Farming: ☐ conventional ☐ "Demeter" ☐ "Bioland" ☐ "Naturland" ☐ _____	Feeding: ☐ Wastemilk (Calves) ☐ Silage (gras/ corn) ☐ Rap/Soy ☐ _____ ☐ _____	Fertilizer: ☐ Sewage sludge ☐ Biogas plant slurry ☐ neither
Application of antibiotic drying agents: ☐ Every cow ☐ Regularly ☐ Seldom ☐ Never	Locally administred antibiotics used on farm in the last 6 months: _____ _____	Systemically administred antibiotics used on farm in the last 6 months: _____ _____

Continuation Table S2: Questionnaire for collection of metadata, second page

Subjective assessment of the administration of antibiotics: ☐ Once a week ☐ Once a month ☐ Once half a year ☐ Once a year	Contact to other animals: ☐ Dogs ☐ Cats ☐ Birds ☐ wild animals	Pre-treatment of associated animals: ☐ None ☐ _____
Last hospital visit of the owner: ☐ None in the past half a year ☐ during the last month ☐ during the last 3 months ☐ during the last 6 months	Intake of antibiotics - owner: ☐ Less than once a year ☐ Once a week ☐ Once a month ☐ Once half a year ☐ Once a year	Antibiotics used by the owner int the las 6 months: _____ _____ _____ _____

I agree with the sampling and the pseudonymized use of the data for the dissertation of Mr. Peter Klotz. Furthermore, I am aware of the fact, that the participation is voluntary and can be retracted anytime.

Signature

Table S3: Putative determining factors included in logistic regression model

#	Variable Name	Description
1	Monat	Month of sampling
2	PLZ	ZIP-Code
3	LDKR	Rural district
4	RegBZ	Govermental district
5	Rasse	Breed
6	Sex	Sex
7	AlterKat	Age categorized
8	Alter	Age in months
9	Kategorie	Category "dairy", "beef", "calf"
10	Deck	Breeding bull yes/no
11	Vorkrank_ja_nein	Diseases diagnosed in animal prior to sampling
12	Vorerkrank_Kat	Categorisation of prior diseases
13	Vorbehand1	Treatment prior to sampling
14	Vorbehand_Kat	Categorisation of pre-treatment
15	Penicillin	Treatment with penicillin
16	Cephalosporin1	Treatment with cephalosporin 1 st generation
17	Cephalosporin3	Treatment with cephalosporin 3 rd generation
18	Cephalosporin4	Treatment with cephalosporin 4 th generation
19	Aminoglycoside	Treatment with aminoglycosides
20	Tetracycline	Treatment with tetracyclines
21	Sulfonamide	Treatment with sulfonamides
22	Makrolide	Treatment with macrolides
23	Fluorchinolone	Treatment with fluoroquinolones
24	Polymyxine	Treatment with polymyxins
25	Florfenicol	Treatment with florfenicol
26	Antibio1	Use of antibiograms prior to antibiotic treatment
27	Haltung1	Husbandry system
28	Haltung_Boden	Type of floor in husbandry
29	Haltung_Box	Type of box in husbandry
30	BetriebsgrKat	Size off arm categorized
31	BetriebsgrGes	Number of animals in total

Continuation Table S3: Putative determining factors included in logistic regression model

#	Variable Name	Description
32	BetriebsgrK	Number of dairy cows
33	BetriebsgrJ	Number of young cattle
34	BetriebsgrM	Number of beef cattle
35	Nutzung	Direction of use of the farm
36	Bio	Type of ecological guidelines
37	Bio_binär	Application of ecological guidelines indepent of type
38	Gras	Feeding of pasture
39	Grassilage	Feeding of ensilaged pasture
40	Maissilage	Feeding of ensilaged corn
41	Heu	Feeding of hay
42	Stroh	Feeding of straw
43	Raps	Feeding of rapeseed
44	Soja	Feeding of soy
45	Biertreber	Feeding of draff
46	KFzukauf	Feeding of commercial concentrate
47	KFeigen	Feeding of selfmade concentrate
48	Mineralfutter	Feeding of mineral feed
49	Käberfutter1	Feeding of calves with milkpowder or whole milk
50	Sperrmilch	Feeding of waste milk
51	Düngung	Fertilization with sewage sludge and biogags plant slurry
52	TS1_Bestand	Use of antibiotic drying agents
53	TS_Kat_Bestand	Antibiotic class of used drying agent
54	Versiegler	Use of intramammary seal product
55	LokAntibio1	Use of local antibiotics in the last 6 months on the farm
56	Penicillin_Lok	Local use of penicillins on the farm
61	Lincosamide_Lok	Local use of lincosamydes on the farm
62	Tetracycline_Lok	Local use of tetracyclines on the farm
63	Sulfonamide_Lok	Local use of sulfonamides on the farm
64	Fluorchinolone_Lok	Local use of fluoroquinolones on the farm
65	Florfenicol_Lok	Local use of florfenicole on the farm
66	SysAntibio1	Use of systemic antibiotics in the last 6 months on the farm

Continuation Table S3: Putative determining factors included in logistic regression model

#	Variable Name	Description
67	Penicillin_Sys	Systemic use of penicillins on the farm
68	Cephalosporine1_Sys	Systemic use of 1 st generation cephalosporins on the farm
69	Cephalosporine3_Sys	Systemic use of 3 rd generation cephalosporins on the farm
70	Cephalosporine4_Sys	Systemic use of 4 th generation cephalosporins on the farm
71	Aminoglykoside_Sys	Systemic use of aminoglycosides on the farm
72	Tetracycline_Sys	Systemic use of tetracyclines on the farm
73	Sulfonamide_Sys	Systemic use of sulfonamides on the farm
74	Makrolide_Sys	Systemic use of macrolides on the farm
75	Fluorchinolone_Sys	Systemic use of fluoroquinolones on the farm
76	Polymyxine_Sys	Systemic use of polymyxins on the farm
77	Florfenicol_Sys	Systemic use of florfenicoles on the farm
78	AntibioFreq1	Frequency of use of antibiotics (subjective assessment)
79	Tierkont	Contact of cattle to other animals
80	VorbehKont1	Pre-treatment of contact animals
81	KHalter1	Last hospitalization of the farmer
82	AntbioFrequH	Frequency of personal use of antibiotics (subjective assessment)
83	AntbioH1	Personal use of antibiotics in the last six months

Table S4: Number of animals sampled (including the stratification)

District	Number of animals in sample		
	"dairy"	"beef"	"calf"
Darmstadt	0	0	0
Bergstraße	6	2	3
Darmstadt Dieburg	3	3	2
Groß-Gerau	1	0	0
Hochtaunuskreis	2	1	1
Main-Kinzig-kreis	18	6	6
Main-Taunus-Kreis	0	0	1
Odenwaldkreis	13	3	4
Offenbach	1	0	0
Rheingau-Taunus-Kreis	1	0	0
Wetteraukreis	9	3	3
Wiesbaden	1	0	0
Gießen	7	1	2
Lahn-Dill-Kreis	5	1	2
Limburg-Weilburg	9	2	3
Marburg-Biedenkopf	15	3	7
Vogelsbergkreis	35	6	9
Fulda	44	9	12
Hersfeld-Rotenburg	14	2	4
Kassel	12	4	3
Schwalm-Eder-Kreis	23	3	9
Waldeck-Frankenberg	45	7	10
Werra-Meißner-Kreis	16	3	2
Total	280	59	83

Numbers differ from table S1 due to variability of sampling conditions on different farms

Table S5: MIC values of the *A. baumannii* isolates

Isolate	Amp.	Amoxi./Clav	Piperacillin.	Cefalexin.	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Marboflox.	Tetracycline	Nitrofurant.	Chloramph.	Polymyx. B	Rifampicin	Trim./Sulf.
28999	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	0,5	4	<=20
29002	16	8	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29005	16	8	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29007	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29012	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	8	<=20
29014	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	0,5	4	<=20
29015	16	8	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	0,5	4	<=20
29016	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	<=0,25	4	<=20
29017	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29019	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29021	16	8	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	0,5	4	<=20
29022	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29024	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29311	16	8	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29312	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29314	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	<=2	<=20
29315	16	8	8	>64	>8	<=1	<=1	4	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	<=0,25	4	<=20
29316	16	4	8	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	4	<=20
29318	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	16	1	4	<=20
31270	>32	16	16	>64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	16	<=20
31271	16	4	8	>64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	<=0,25	4	<=20
31272	16	8	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	2	4	<=20
31273	16	4	8	>64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>512	>64	1	<=2	<=20

Continuation Table S5: MIC values of the *A. baumannii* isolates

Isolate	Amp.	Amoxi./Clav	Piperacillin.	Cefalexin.	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Marboflox.	Tetracycline	Nitrofurant.	Chloramph.	Polymyx. B	Rifampicin	Trim./Sulf.
31274	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	<=2	<=20
31275	16	4	8	>=64	>=8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31276	16	8	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	16	<=20
31277	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31278	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	<=2	<=20
31279	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31280	16	8	8	>=64	>=8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31281	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31282	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31283	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31284	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31286	16	8	16	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31287	16	8	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31288	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31648	16	4	8	>=64	>=8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31649	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31650	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31651	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31652	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31653	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31654	16	8	16	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31655	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31656	16	16	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20

Continuation Table S5: MIC values of the *A. baumannii* isolates

Isolate	Amp.	Amoxi./Clav	Piperacillin.	Cefalexin.	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Marboflox.	Tetracycline	Nitrofurant.	Chloramph.	Polym.yx. B	Rifampicin	Trim./Sulf.
31657	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31658	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31659	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31660	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	8	<=20
31661	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31662	16	8	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31663	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	<=2	<=20
31664	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31665	16	4	8	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	<=2	<=20
31666	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31667	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31668	16	8	16	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31670	16	4	<=4	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31671	16	4	<=4	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31672	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31677	n.t.	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	256	>=64	1	4	<=20
31678	16	4	16	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31679	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31680	16	4	8	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31681	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	16	<=20
31923	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31924	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31925	16	4	8	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20

Continuation Table S5: MIC values of the *A. baumannii* isolates

Isolate	Amp.	Amoxi./Clav	Piperacillin.	Cefalexin.	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Marboflox.	Tetracycline	Nitrofurant.	Chloramph.	Polymyx. B	Rifampicin	Trim./Sulf.
31926	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31927	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31928	16	8	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	16	<=20
31929	16	8	16	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	16	1	4	<=20
31930	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	16	1	<=2	<=20
31931	16	8	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31932	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	<=2	<=20
31933	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	8	<=20
31934	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31935	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31936	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31937	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31938	16	4	8	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31939	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	16	<=20
31940	16	4	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31941	16	8	8	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	16	1	<=2	<=20
31942	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31943	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31944	16	8	8	>=64	>8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31945	16	8	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31946	16	4	8	>=64	>8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31948	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	<=2	<=20
31949	16	4	8	>=64	>8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20

Continuation Table S5: MIC values of the *A. baumannii* isolates

Isolate	Amp.	Amoxi./Clav	Piperacillin.	Cefalexin.	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Marboflox.	Tetracycline	Nitrofurant.	Chloramph.	Polym.yx. B	Rifampicin	Trim./Sulf.
31950	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31951	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31952	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31953	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31954	16	8	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31955	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31958	16	8	8	>=64	>=8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31959	16	8	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31961	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31962	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31963	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	<=2	<=20
31966	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	16	<=20
31967	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31968	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31969	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	2	4	<=20
31970	16	8	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31971	16	8	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
31972	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	16	<=20
31973	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
31974	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
31975	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31976	16	8	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
31977	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20

Continuation Table S5: MIC values of the *A. baumannii* isolates

Isolate	Amp.	Amoxi./Clav	Piperacillin.	Cefalexin.	Ceftiofur	Cefpirom	Imipenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Marboflox.	Tetracycline	Nitrofurant.	Chloramph.	Polymyx. B	Rifampicin	Trim./Sulf.
31978	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
32427	n.t.	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	8	<=20
32875	16	8	8	>=64	>=8	<=1	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	0,5	4	<=20
32876	16	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
32877	n.t.	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
32879	16	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	<=0,25	4	<=20
33293	n.t.	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
33294	n.t.	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
33296	n.t.	4	8	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
33302	n.t.	4	16	>=64	>=8	4	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20
33304	n.t.	4	8	>=64	>=8	2	<=1	<=2	<=1	<=1	<=0,5	<=1	>=512	>=64	1	4	<=20

Amp. : Ampicillin, **Amoxi./Clav.** : Amoxicillin-Clavulanate, **Marboflox.** : Marbofloxacin, **Nitrofurant.** : Nitrofurantoin, **Chloramph.** : Chloramphenicol, **Polymyx. B:** Polymyxin B, **Trim./Sulf.** : Trimethoprim-Sulfamethoxazole

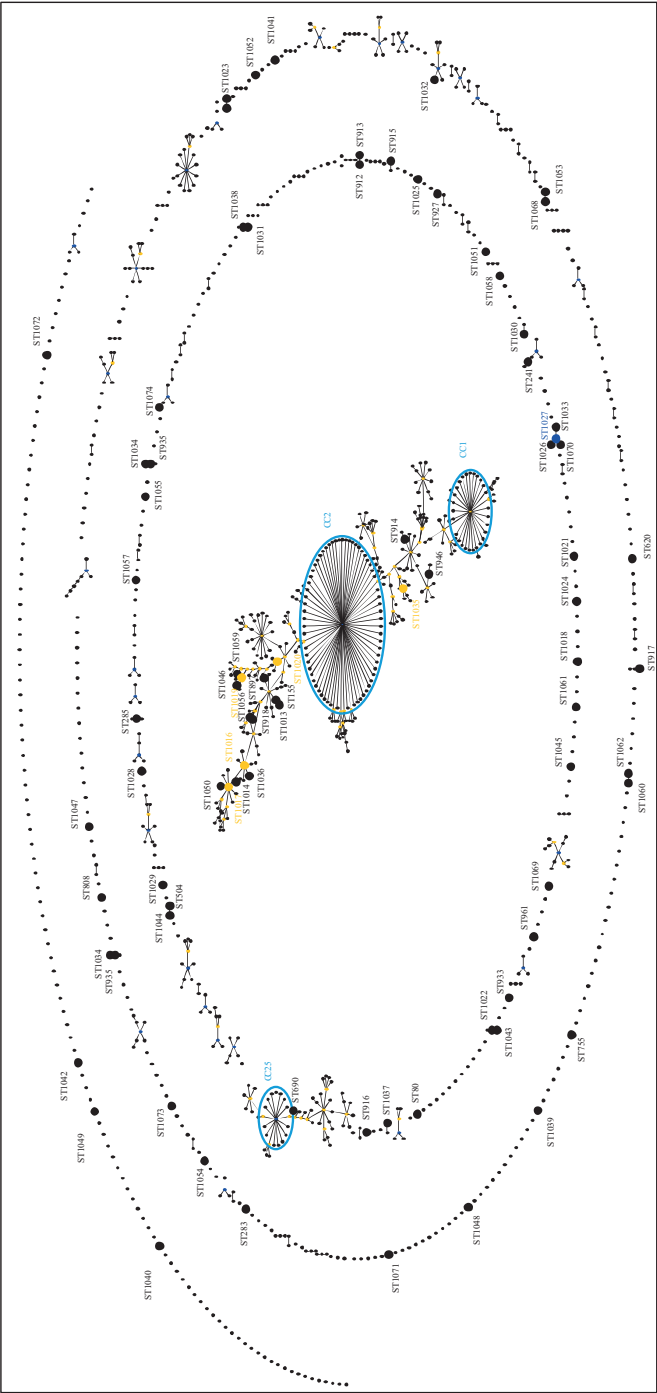


Figure S1: eBurst snapshot of the all sequence types in the PubMLST Database. Dots of STs found in cattle are enlarged, **blue**: possible group founder, **yellow**: possible subgroup founder, **blue circles**: clonal complexes

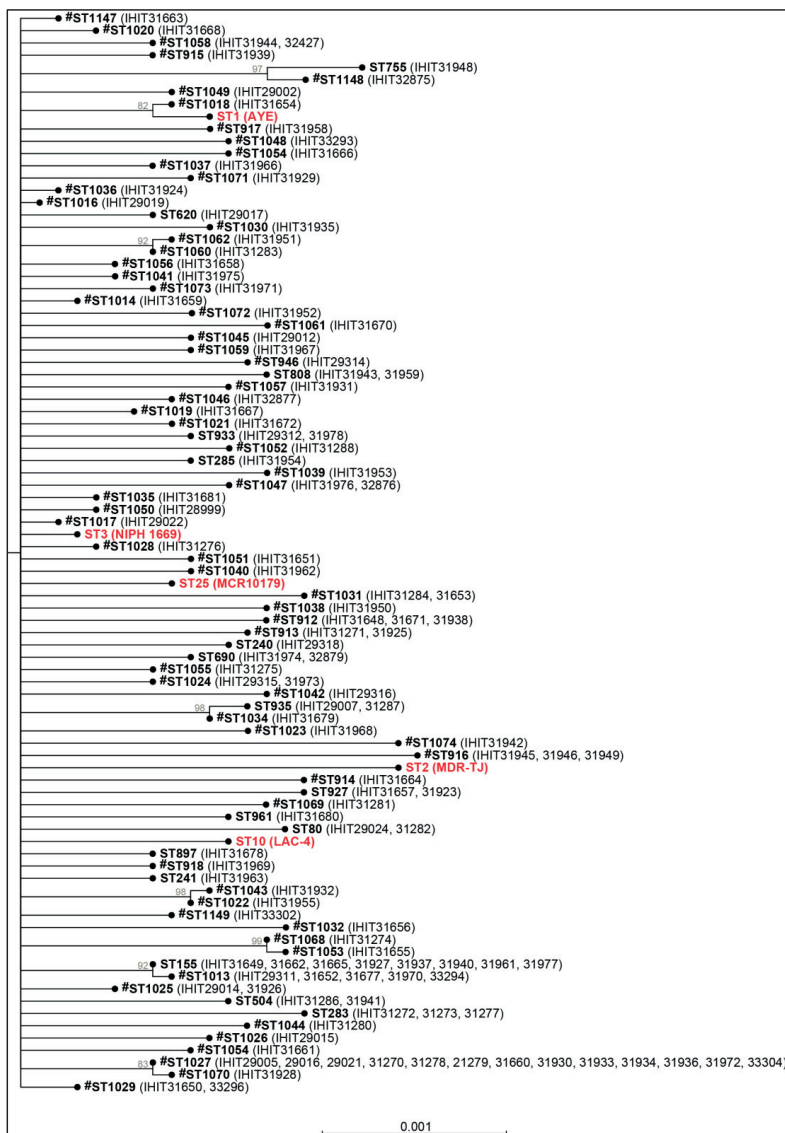
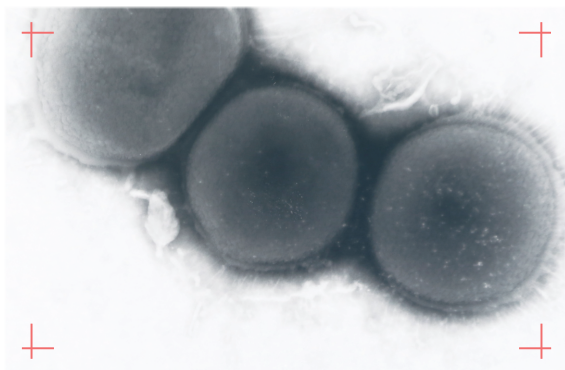


Figure S2: Maximum-likelihood tree created with RAXML and 100 bootstrap analyses based on the concatenated sequences of seven housekeeping genes according to the MLST-Pasteur scheme of 126 bovine *A. baumannii* isolates and representatives of global sequence types ST1, ST2, ST3, ST10, and ST25 (Accession numbers: AYE- GenBank: CU459141.1, NIPH 1669: APOQ00000000.1, MDR-TJ: CP003500.1, LAC-4: JICJ00000000.1, MCR10179: NQXG01). Internal nodes with less than 80% bootstrap support were removed. Novel STs are indicated (#). Reference STs are highlighted in red.



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: 978-3-8359-6844-8



9 17 8 3 8 3 5 19 6 8 4 4 8