

DIVERSITÄT UND KLONALITÄT MULTIRESISTENTER
ACINETOBACTER-STÄMME VON PATIENTEN
DEUTSCHER TIERKLINIKEN UND TIERARZTPRAXEN

SABRINA ZORDAN

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.

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

1. Auflage 2011

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 Author or the Publishers.

1st Edition 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

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

Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**DIVERSITÄT UND KLONALITÄT MULTIRESISTENTER
ACINETOBACTER-STÄMME VON PATIENTEN DEUTSCHER
TIERKLINIKEN UND TIERARZTPRAXEN**

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

eingereicht von

SABRINA ZORDAN

Tierärztin aus Düren

Gießen 2011

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

Dekan:

Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Prof. Dr. Ch. Lämmler

Tag der Disputation:

14.06.2011

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

S. Kreder, E. Prenger-Berninghoff and G. Baljer.

Phenotypic characterization of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from veterinary specimens. Abstract in Int. J. Med. Microbiol., 2009. 299S1: p. 78.

S. Kreder, E. Prenger-Berninghoff, T. van der Reijden, L. Dijkshoorn and G. Baljer.

Molecular typing of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from veterinary specimens. Abstract in Int. J. Med. Microbiol., 2009. 299S1: p. 71.

S. Zordan, E. Prenger-Berninghoff, R. Weiss, T. van der Reijden, P. van den Broek, G. Baljer and L. Dijkshoorn.

Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* from Animal Specimens in German Veterinary Clinics. Emerg. Infect. Dis., 2011. Accepted for **17**(9).

Diese Arbeit wurde gefördert durch ein Stipendium zur Doktorandenförderung von der **Akademie für Tiergesundheit e. V.**

I Inhalt

I	Inhalt	I
II	Abkürzungsverzeichnis.....	V
III	Einleitung	1
IV	Literaturübersicht.....	3
1	Acinetobactertaxonomie	3
2	Vorkommen beim Mensch	8
2.1	Nosokomiale <i>Acinetobacter</i> -Infektionen	8
2.2	„Community-acquired“- <i>Acinetobacter</i> -Infektionen.....	10
2.3	<i>Acinetobacter</i> -Infektionen nach Naturkatastrophen oder Kriegen.....	10
3	Vorkommen beim Tier	11
4	Phänotypische Eigenschaften von <i>Acinetobacter</i>	12
4.1	Bebrütungstemperatur	13
4.2	Kulturmorphologie.....	13
4.3	Keimmorphologie	13
4.4	Biochemische Eigenschaften	14
4.5	Antibiotikaresistenz	16
4.5.1	Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika	16
4.5.2	Effluxpumpen.....	21
4.5.3	Zusätzliche Resistenzmechanismen	23
5	Genotypische Charakterisierung von <i>Acinetobacter</i>	26
5.1	16S rRNS-Gen-Analyse	26
5.2	S1-Nuclease-Hybridisierungsmethode.....	26
5.3	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	27
5.4	Pulsfeldgelelektrophorese	28
5.5	Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse	29
5.6	Repetitive Extragenic Palindromic-PCR.....	29
5.7	Multilocus Sequence Typing.....	30

V	Material und Methoden	31
1	Materialien	31
1.1	Verbrauchsmaterialien und Puffer	31
1.2	Herkunft der <i>Acinetobacter</i> -Isolate.....	31
2	Methoden	33
2.1	Konservierung der Isolate	33
2.2	Phänotypische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von <i>Acinetobacter</i> -Isolaten.....	33
2.2.1	Kulturelle und mikroskopische Untersuchung	33
2.2.2	Biochemische Untersuchungen	34
2.2.3	Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung	34
2.2.3.1	Agardiffusionstest.....	35
2.2.3.2	Mikrobouillondilutionsverfahren.....	36
2.3	Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von <i>Acinetobacter</i> -Isolaten	40
2.3.1	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	40
2.3.1.1	DNS-Extraktion	40
2.3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	40
2.3.1.3	Agarosegelelektrophorese 1.....	41
2.3.1.4	Restriktion des 16S rRNS Gens.....	42
2.3.1.5	Agarosegelelektrophorese 2.....	42
2.3.1.6	Auswertung.....	43
2.3.2	Pulsfeldgelelektrophorese	43
2.3.2.1	Präparation der Isolate	43
2.3.2.2	Bakterienlyse	44
2.3.2.3	Restriktion	45
2.3.2.4	Gelelektrophorese	45
2.3.2.5	Auswertung.....	47
2.3.3	Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse	47
2.3.3.1	Kriterien zur Auswahl der <i>Acinetobacter</i> -Isolate	47
2.3.3.2	DNS-Isolation.....	47
2.3.3.3	Restriktion und Ligation	48
2.3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	49
2.3.3.5	Express-Gel	50
2.3.3.6	Auswertung.....	51
2.4	Untersuchungen zur klinischen Relevanz von <i>A. baumannii</i> -Isolaten bei Tieren.....	51

VI	Ergebnisse	52
1	Phänotypische Charakterisierung	52
1.1	Morphologie und kulturelle Eigenschaften	52
1.2	Biochemische Eigenschaften	52
1.3	Antibiotikaempfindlichkeit	52
1.3.1	Agardiffusionstest	52
1.3.2	Mikrobouillondilutionsverfahren	54
1.3.3	Vergleich der beiden Resistenzanalysen	55
2	Molekulargenetische Charakterisierung.....	57
2.1	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis	57
2.1.1	Nachweis der <i>Acinetobacter</i> -spezifischen 16S rRNS-Gene	57
2.1.2	Restriktionsanalyse	59
2.2	Typisierungsergebnisse mittels PFGE	61
2.3	Ergebnisse der Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse.....	71
2.3.1	Bestätigung der Spezieszuordnung	71
2.3.2	Stammidentifikation	73
2.3.3	Nachweis der Europäischen Klone I-III.....	73
2.4	Vergleich der PFGE- und AFLP-Ergebnisse	73
3	Gegenüberstellung von Phänotyp und Genotyp.....	75
4	Untersuchungen zur klinischen Relevanz von <i>A. baumannii</i>-Isolaten bei Tieren	78
4.1	Hunde.....	78
4.2	Katzen	81
VII	Diskussion	83
VIII	Zusammenfassung.....	97
IX	Summary	99
X	Literaturverzeichnis.....	101
XI	Anhang	118
1	Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	118
2	Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	124
2.1	Puffer und Lösungen für die Resistenzbestimmung.....	124

I Inhalt

2.2	Puffer und Lösungen für ARDRA	124
2.3	Puffer und Lösungen für PFGE.....	125
2.4	Puffer und Lösungen für AFLP-Analyse	126
2.5	Kulturmedien für die Bakterienanzucht	127
2.6	Medien zur phänotypischen Differenzierung	128
2.7	Medien zur Resistenzbestimmung	128
XII Abbildungsverzeichnis		131
1	Abbildungen	131
2	Tabellen.....	132
Danksagung.....		134

II Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad <u>C</u> elsius
µg	Mikro <u>g</u> ramm
µl	Mikro <u>l</u> iter
µm	Mikro <u>m</u> eter
µM	mikro <u>M</u> olar
A.	<u>A</u> cinetobacter
A/C	<u>A</u> moxicillin/ <u>C</u> lavulansäure
A. dest.	<u>A</u> qua <u>d</u> estillata
A-Stelle	<u>A</u> minoacyl- <u>S</u> telle
Acb-Komplex	<u>A. calcoaceticus</u> - <u>A. baumannii</u> -Komplex
ad	bis zu (auffüllen auf)
AFLP	<u>A</u> mplified <u>F</u> ragment <u>L</u> ength <u>P</u> olymorphism
AGVK	Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der JLU Gießen
AMC	<u>A</u> moxicillin/ <u>C</u> lavulansäure
AMG	<u>A</u> rzneimittelgesetz
AMI/Ami	<u>A</u> mikacin
AMP	<u>A</u> mpicillin
ARDRA	<u>A</u> mplified <u>R</u> ibosomal <u>D</u> NA <u>R</u> estriction <u>A</u> nalysis
ATCC	<u>A</u> merican <u>T</u> ype <u>C</u> ulture <u>C</u> ollection
auT	außeruniversitäre <u>T</u> ierklinik/private Tierarztpraxis
bp	<u>B</u> asenpaare
BJ	<u>B</u> ouvet und <u>J</u> eanjean
BJM	<u>B</u> ush, <u>J</u> acoby und <u>M</u> edeiros
bzgl.	be <u>z</u> üglich
bzw.	be <u>z</u> iehungsweise
CA	<u>c</u> lavulanic <u>a</u> cid, Clavulansäure
C.ase	<u>C</u> ephalosporinase
CLN	<u>C</u> ephalexin
CTM	<u>C</u> eftazidim
CZN	<u>C</u> ephazolin
CHEF	<u>C</u> ontour- <u>C</u> lamped <u>H</u> omogeneous <u>E</u> lectric <u>F</u> ield
ChO	<u>C</u> arbapenem- <u>h</u> ydrolysierende <u>O</u> xacillinase
CLSI	<u>C</u> linical and <u>L</u> aboratory <u>S</u> tandards <u>I</u> nstitute
CLN	<u>C</u> ephalexin
cm	Zentimeter
COL	<u>C</u> OL 20820, externer Referenzstandard
CTM	<u>C</u> eftazidim
CVK	Klinik für Kleintiere, Chirurgie, der JLU Gießen
CVN	<u>C</u> efovecin
CX.ase	<u>C</u> efuroximase
CZN	<u>C</u> ephazolin
Dib	<u>D</u> ibekacin
DIN	<u>D</u> eutsches <u>I</u> nstitut für <u>N</u> ormung
DNA	<u>D</u> eoxyribonucleic <u>A</u> cid
DNS	<u>D</u> esoxyribonukleinsäure
dNTP	<u>D</u> esoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	<u>D</u> eutsche <u>S</u> ammlung von <u>M</u> ikroorganismen und <u>Z</u> ellkulturen GmbH
DST-Agar	<u>D</u> iagnostic <u>S</u> ensitivity <u>T</u> est-Agar
DVG	<u>D</u> eutsche <u>V</u> eterinärmedizinische <u>G</u> esellschaft

II Abkürzungsverzeichnis

EDTA	<u>E</u> thylendiamin- <u>T</u> etraazetat-Natriumsalz
EKH	<u>E</u> uropäisch <u>K</u> urzhaar
ENR	<u>E</u> nrofloxacin
ESBL	<u>E</u> xtended- <u>S</u> pectrum- <u>B</u> eta- <u>L</u> actamase
ESI-MS	<u>E</u> lektrospray- <u>I</u> onisation- <u>M</u> assenspektrometrie
EU-Klon	<u>E</u> uropäischer <u>K</u> lon
Fa.	<u>F</u> irma
FLUDT	<u>F</u> eline <u>L</u> ower <u>U</u> rinary <u>T</u> ract <u>D</u> isease
g	<u>G</u> ramm
g	Erdbeschleunigung
Genomosp.	<u>G</u> enomospesies
Gent	<u>G</u> entamicin
h	Stunde(n)
i. d. R.	in der <u>R</u> egel
IfVP	<u>I</u> nstitut für <u>V</u> eterinär- <u>P</u> athologie
JLU	<u>J</u> ustus- <u>L</u> iebig- <u>U</u> niversität
k. A.	keine <u>A</u> ngaben
kb	<u>K</u> ilobasenpaare
KbE	<u>K</u> olonie bildende <u>E</u> inheit
kDa	<u>K</u> ilodalton
Liv	<u>L</u> ividomycin
LMBG	<u>L</u> ebensmittel- und <u>B</u> edarsgegenständegesetz
LMD	<u>L</u> MD Culture Collection, Netherlands
LUH	<u>L</u> eiden <u>U</u> niversity <u>H</u> ospital
m	<u>m</u> ännlich
mk	<u>m</u> ännlich- <u>k</u> astriert
MAF	<u>M</u> arbofloxacin
MATE	<u>M</u> ultidrug <u>A</u> nd <u>T</u> oxic <u>C</u> ompound <u>E</u> xtrusion
MBL	<u>M</u> etallo- <u>β</u> - <u>L</u> actamase
MF	<u>M</u> ajor <u>F</u> acilitator
MFP	<u>M</u> embran <u>f</u> usionsprotein
MHK	<u>M</u> inimale <u>H</u> emmstoff <u>k</u> onzentration
Mg	<u>M</u> agnesium
mg	<u>M</u> illigramm
MgCl ₂	<u>M</u> agnesiumch <u>l</u> orid
MI	<u>M</u> itsuhashi und <u>I</u> noe
MIC	<u>M</u> inimal <u>I</u> nhibitory <u>C</u> oncentration
min	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
MLST	<u>M</u> ultilocus <u>S</u> equencing <u>T</u> yping
MRSA	<u>M</u> ethicillin-resistenter <u>S</u> taphylococcus <u>a</u> ureus
mM	<u>m</u> illimolar
MM	<u>M</u> olekularmassenstandard
mm	<u>M</u> illimeter
MNZ	<u>M</u> etronidazol
mRNS	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibonucleinsäure
MVK	Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, der JLU Gießen
NaCl	<u>N</u> atriumch <u>l</u> orid
NaOH	<u>N</u> atriumhydroxid
NBI	Standard I-Nährmedium
neg.	<u>n</u> egativ
Net	<u>N</u> etilmicin

n.g.	<u>n</u> icht <u>g</u> etestet
NL	<u>N</u> iederlande
Nr.	<u>N</u> ummer
n.t.	<u>n</u> icht <u>t</u> ypisierbar
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
OF-Medium	<u>O</u> xidation/ <u>F</u> ermentation- <u>M</u> edium
OMP	<u>O</u> uter <u>M</u> embrane <u>P</u> rotein
Paro	<u>P</u> aromycin
P.ase	<u>P</u> enicillin <u>a</u> se
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction, <u>P</u> olymerase- <u>K</u> etten <u>r</u> eaktion
PFGE	<u>P</u> ulsfeldgele <u>e</u> lektrophorese
pos.	<u>p</u> ositiv
Pra	<u>P</u> ramycin
REP-PCR	<u>R</u> epeated <u>E</u> xtragenic <u>P</u> alindromic- <u>P</u> olymerase- <u>K</u> etten <u>r</u> eaktion
RFLP	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment <u>l</u> ängenpolymorphismus
RND	<u>R</u> esistance <u>N</u> odulation- <u>C</u> ell <u>D</u> ivision
rSPs	<u>r</u> ibosomale <u>S</u> chutz <u>p</u> roteine
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
RUH	<u>R</u> otterdam <u>U</u> niversity <u>H</u> ospital
sek	<u>S</u> ekunde
Sis	<u>S</u> isomicin
sog.	<u>s</u> ogenannte(r)
sp.	<u>s</u> pecies
Spec	<u>S</u> pectinomycin
spp.	<u>s</u> pecies <u>p</u> luralis
Strep	<u>S</u> treptomycin
T	<u>t</u> ype <u>s</u> train
T	einzelner PFGE- <u>T</u> yp
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> acetat- <u>E</u> DTA
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA
TE	<u>T</u> ris <u>E</u> DTA
Tob	<u>T</u> obramycin
Tris	<u>T</u> ris-Hydroxymethyl-Aminomethan
T/S	<u>T</u> rimethoprim/ <u>S</u> ulfamethoxazol
TU	<u>T</u> jernberg und <u>U</u> rsing
U	<u>u</u> nit, Einheit
u. a.	<u>u</u> nter <u>a</u> nderem
UK	<u>u</u> n <u>k</u> lassifiziert
UV	<u>u</u> ltraviolett
V	<u>V</u> olt
v. a.	<u>v</u> or <u>a</u> llem
var.	<u>v</u> arietas
w	<u>w</u> eiblich
wk	<u>w</u> eiblich- <u>k</u> astriert
WHWT	<u>W</u> est <u>H</u> ighland <u>W</u> hite <u>T</u> errier
z. B.	zum <u>B</u> eispiel
ZVK	<u>Z</u> entraler <u>V</u> enen <u>k</u> atheter
z.T.	zum <u>T</u> eil

III Einleitung

Bakterien des Genus *Acinetobacter* (A.) stellen sich als strikt aerobe, gramnegative, kokkobazilläre Stäbchenbakterien dar, die sich durch eine hohe metabolische Diversität bei der Verwertung von Kohlenstoff- und Energiequellen auszeichnen [10, 64, 110]. Mit Ausnahme der Spezies *A. baumannii* und der Genomospezies (Genomosp.) 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]), können die Vertreter dieser Gattung u. a. aus Böden, Trinkwasser, Oberflächengewässern aber auch aus verschiedenen Nahrungsmitteln isoliert werden. Bei 25 % der Bevölkerung sind *Acinetobacter*-Spezies (spp.) Bestandteil der Hautflora, insbesondere im Bereich der Achselhöhlen, der Inguinalregion und im Interdigitalbereich der Füße [41, 203].

Zu aktueller Bedeutung gelangten *Acinetobacter* spp., als sich in der Humanmedizin Fälle von nosokomialen Infektionen verbunden mit dem Auftreten zunehmend resistenter Stämme häuften [64]. Die Spezies *A. baumannii* besitzt von allen Arten das größte pathogene Potential, wobei das Wissen über mögliche Pathogenitätsmechanismen noch relativ gering ist. Auch das natürliche Reservoir dieses fakultativ pathogenen Erregers ist bislang noch nicht auffindig gemacht worden [203].

In Krankenhäusern treten *A. baumannii*-Infektionen v. a. in Intensivstationen auf. Besonders empfänglich sind Patienten nach der Intubation, bei denen sich meist *Acinetobacter* bedingte Pneumonien entwickeln. Des Weiteren werden bei Patienten Zystitis, Urethritis, Peritonitis, Endocarditis, Meningitis, Osteomyelitis, Arthritis und Entzündungen der Kornea im Zusammenhang mit *A. baumannii*-Isolierungen beschrieben [110]. Zu den Risiken, die eine *A. baumannii*-Infektion begünstigen, zählen neben fortgeschrittenem Alter und einem geschwächten Immunsystem v. a. längere Krankenhausaufenthalte sowie langwierige Antibiotika-Therapien nach vorangegangenen chirurgischen Eingriffen [23, 182].

Die Krankheiten entstehen entweder endogen oder exogen primär nach dem Kontakt mit bereits infizierten Patienten oder Mitarbeitern des Krankenhauses. Neben den Händen spielen kontaminierte medizinische Geräte eine wichtige Rolle bei der Übertragung [201].

Auf Grund stetig zunehmender Berichte über *A. baumannii*-Ausbrüche in Krankenhäusern gilt der Keim neben den Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen gegenwärtig als einer der alarmierendsten nosokomialen Erreger [9, 83], da Therapieoptionen wegen multipler Resistenzen begrenzt sind und der Einsatz von Reserveantibiotika häufig unumgänglich ist [224].

Nach ersten Berichten über *A. baumannii*-Erkrankungen in der Humanmedizin, folgten Fallberichte über die Isolierung dieser Bakterien in schweizerischen und holländischen Tierkliniken [14, 78, 231].

Seit 1998 stieg auch in der institutseigenen Diagnostik die Nachweisrate multiresistenter *Acinetobacter*-Isolate aus deutschen Kleintierkliniken und Tierarztpraxen an. *A. baumannii*-Stämme werden vor allem aus Proben des Urogenital- und Respirationstrakts sowie aus Kot und Abklatschproben der Behandlungsräume und Zwinger isoliert.

Auf Grund der hohen Nachweisraten in einzelnen Kliniken und Praxen stellte sich die Frage, ob es sich auch in deutschen Tierkliniken und -praxen um ein Hospitalismogeschehen handelt und ob es eine Verwandtschaft zwischen den animalen und eventuell zu humanen *Acinetobacter*-Isolaten gibt.

Zur Beantwortung der Fragen wurden in der vorliegenden Arbeit *Acinetobacter*-Keime aus Patientenproben einer universitären Kleintierklinik und von anderen Tierkliniken isoliert und folgenden Untersuchungen unterzogen:

- 1) Phänotypische Charakterisierung und Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung,
- 2) Genotypische Speziesdifferenzierung und Ermittlung klonaler Verwandtschaftsgrade,
- 3) Analyse des klonalen Verwandtschaftsgrads zwischen Veterinär- und Humanisolaten.

Außerdem erfolgte eine Datenrecherche bei den betroffenen Patienten in den Tierkliniken, um festzustellen, welche klinische Bedeutung der Erreger bei Tieren hat.

IV Literaturübersicht

1 Acinetobactertaxonomie

Die Taxonomie des Genus *Acinetobacter* basiert auf einer komplexen Historie. In Anlehnung an die stetig zunehmende Bedeutung einiger Vertreter dieser Gattung als nosokomiale Erreger entwickelte sich auch die Taxonomie v. a. in den letzten drei Jahrzehnten weiter. Diese Entwicklung wurde zum einen durch die hohe Anzahl eng verwandter Spezies, die phänotypisch nicht zu unterscheiden sind, erschwert. Zum anderen wurden identischen Arten auf Grund von zeitgleich durchgeführten Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen jeweils unterschiedliche Namen zugeteilt. [215].

Innerhalb der γ -Proteobakterien gehört die Gattung *Acinetobacter* zur Ordnung der Pseudomonadales und zur Familie der *Moraxellaceae* [73, 189]. Der Name *Acinetobacter* stammt aus dem Griechischen ($\alpha\kappa\iota\nu\epsilon\tau\omicron\sigma$ = unbeweglich) und wurde erstmals von BRISOU und PRÉVÔT (1954) beschrieben [9, 24]. Diese Benennung wurde von JUNI und JANIK [115] übernommen und 1984 im „Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology“ etabliert. Zu diesem Zeitpunkt beinhaltete das Genus *Acinetobacter* lediglich eine Spezies (*A. calcoaceticus*), die in die beiden Varietäten (var.) *anitratu*s (ehemals *Herella vaginicola*) und (var.) *lwoffii* (ehemals *Mima polymorpha*) unterteilt war [9].

Als Beginn der modernen Taxonomie gilt eine Studie von BOUVET und GRIMONT (1986), denen es mittels DNS-Hybridisierung gelang, erstmalig zwölf verschiedene Hybridisierungsgruppen zu unterscheiden. Von diesen wurden sechs benannt (*A. calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii* und *A. lwoffii*) und sechs als sog. Genomospezies (3, 6, 9, 10, 11 und 12) beschrieben. Hintergrund für die Bildung von Genomosp. ist das Fehlen phänotypischer Identifizierungsmethoden und/oder eine zu geringe Anzahl an Stämmen innerhalb der jeweiligen Gruppe [18]. Um eine phänotypische Unterscheidung der zwölf Spezies zu ermöglichen, etablierten BOUVET und GRIMONT 1987 ein System zur Biotypisierung von *Acinetobacter*-Stämmen. Dieses System umfasste 16 Tests basierend auf der Säureproduktion aus Glucose, der Hydrolyse von Gelatine sowie der Verwertung von 14 Carbonsäuren. Darüber hinaus wurde die Wachstumsfähigkeit der Isolate bei 37 °C, 41 °C und 44 °C ausgewertet [19].

Kurze Zeit später (1988) berichteten NISHIMURA *et al.* von einer neuen aus Baumwolle isolierten Spezies, *A. radioresistens*, die allerdings ein Jahr später von TJERNBERG und URSING als die bereits 1986 beschriebene Genomosp. 12 identifiziert werden konnte [160,

215]. Außerdem wurde eine sehr hohe Sequenzhomologie zwischen den Referenzstämmen von *A. lwoffii* (DNS-Gruppe 8) und der Genomosp. 9 festgestellt. Daraus resultierend wurde letztere als eigenständige Genomosp. gestrichen [215]. JANSSEN *et al.* (1997) bestätigten die enge Verwandtschaft dieser beiden Spezies mittels „Amplified Fragment Length Polymorphism“ (AFLP)-Analyse [113].

Im Jahr 1989 kam es zu zwei unabhängig voneinander durchgeführten Hybridisierungsstudien. TJERNBERG und URSING etablierten drei neue Genomosp. (13, 14 und 15), BOUVET und JEANJEAN sogar fünf (13, 14, 15, 16 und 17). Infolge der überlappenden Nummerierung einiger dieser Spezies, erfolgte die Identifizierung derselben mit Hilfe der Endsilben „BJ“ bzw. „TU“ [20, 215, 233]. VANEECHOUTTE *et al.* gelang es darüber hinaus zu beweisen, dass die Genomosp. 13BJ und die Genomosp. 14TU identisch sind. Aus diesem Grund erfolgte die Bezeichnung als Genomosp. 13BJ/14TU [233].

Zwei der benannten Spezies, *A. baumannii* und *A. calcoaceticus*, sowie *A. genomsp.* 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) und 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]) können auf Grund ihrer DNS-Sequenzhomologie von ca. 70 % phänotypisch nicht unterschieden werden. Sie werden im sog. *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*-Komplex (*Acb*-Komplex) zusammengefasst [64, 84, 92]. Erschwerend kommt hinzu, dass 1993 zwei weitere Genomospezies anerkannt wurden, die schon durch ihre Benennung als Genomosp. „between 1 and 3“ und Genomosp. „close to 13TU“ die Verwandtschaft zu *A. calcoaceticus* und Genomospezies 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) bzw. Genomospezies 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]) nahelegen [85].

Aufbauend auf mehreren genotypischen Charakterisierungsmethoden wie z. B. „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ (ARDRA), AFLP-Analyse, *rpoB*-Sequenzierung und 16S rDNS-Sequenzierung, gelang es zu Beginn dieses Jahrzehnts fünf weitere *Acinetobacter*-Spezies zu identifizieren (*A. ursingii*, *A. schindleri*, *A. parvus*, *A. beijerinckii* und *A. gyllenbergii*) [151, 152, 158].

CARR *et al.* beschrieben 2003 im Rahmen von Milieuuntersuchungen sieben neue Spezies (*A. baylyi*, *A. bouvetii*, *A. grimontii*, *A. tjernbergiae*, *A. townneri*, *A. tandoii* und *A. gernerii*) aus Aktivschlamm. Für deren Identifizierung wurde ein genetischer Fingerabdruck der 16S-23S rDNA „intergenic spacer regions“ erstellt [34].

VANEECHOUTTE *et al.* führten 2008 verschiedene molekulare Klassifizierungsmethoden mit den beiden *A. grimontii*-Stämmen CCM 7198^T und DSMZ 14968^T sowie mehreren *A. junii*-Stämmen durch. Dabei wiesen sie einen hohen genetischen Verwandtschaftsgrad dieser Stämme nach. Trotz dieser Ähnlichkeit auf Genebene wurde die Spezies *A. grimontii*

als eigenständige Spezies beibehalten und wird derzeit als sogenannte heterologe „Junior-Spezies“ von *A. junii* angesehen [230].

2008 erfolgte die Beschreibung einer weiteren Spezies, *A. soli*, durch KIM *et al.*. Der als B1(T) deklarierte Typstamm wurde aus einer Waldboden-Probe der Volksrepublik Korea isoliert [116].

Die Spezies *A. venetianus* erwies sich als identisch mit dem biochemisch detailliert analysierten *Acinetobacter*-Stamm RAG1, welcher auf Grund der Produktion des Bioemulgators „emulsan“ von industrieller Bedeutung ist [61, 62, 235].

Parallel zur Entwicklung der Taxonomie und den vorgenommenen Modifikationen wurden fortlaufend neue Charakterisierungsmethoden etabliert und beschrieben, die es ermöglichen sollten, *Acinetobacter*-Stämme den verschiedenen Spezies zuzuordnen, da die bis dato kommerziell erwerblichen Testsysteme (API 20 NE) keine zuverlässige Unterscheidung der Spezies anhand ihres Phänotyps ermöglichen [64, 110].

Das Missverhältnis zwischen zunehmender klinischer Relevanz des Erregers und bislang nicht zufriedenstellender, diagnostischer Identifizierungsmethoden macht die Notwendigkeit zur Entwicklung ergänzender genotypischer Untersuchungen deutlich.

Tabelle 1: Zusammenstellung der bekannten *Acinetobacter*-Arten und -Genomospezies.

Gattung	Spezies	Genomosp.	Synonym	Literaturquelle
<i>Acinetobacter</i>	<i>calcoaceticus</i>	1		[18]
	<i>baumannii</i>	2		[18]
	<i>haemolyticus</i>	4		[18]
	<i>junii</i>	5		[18]
	<i>grimontii</i>	5		[34]
	<i>johnsonii</i>	7		[18]
	<i>lwoffii</i>	8, 9		[24]
	<i>bereziniae</i>	10		[159]
	<i>guillouiae</i>	11		[159]
	<i>radioresistens</i>	12		[160]
	<i>ursingii</i>		„ <i>A. septicus</i> “	[151]
	<i>schindleri</i>			[151]
	<i>parvus</i>			[152]
	<i>beijerinckii</i>			[158]
	<i>gyllenbergii</i>			[158]
	<i>baylyi</i>		BD413	[34]
	<i>bouvetii</i>			[34]
	<i>towneri</i>			[34]
	<i>tandoii</i>			[34]
	<i>tjernbergiae</i>			[34]
<i>generi</i>			[34]	
<i>venetianus</i>		RAG-1	[234]	
<i>solii</i>			[116]	

Fortsetzung der **Tabelle** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle

Gattung	Spezies	Genomosp.	Literaturquelle
<i>Acinetobacter</i>	<u>nicht benannt</u>	3 (<i>A. pittii</i> sp. nov.)	[18, 157, 215]
		6	[18, 215]
		13BJ/14TU	[20, 215]
		14BJ	[20]
		15BJ	[20]
		16	[20]
		17	[20]
		13TU (<i>A. nosocomialis</i> sp. nov.)	[157, 215]
		15TU	[215]
		„between 1 and 3“	[85]
		„close to 13TU“	[85]

Erläuterung: **BJ** = Bouvet und Jeanjean; **TU** = Tjernberg und Ursing

2 Vorkommen beim Mensch

Acinetobacter spp. sind in der Umwelt ubiquitär verbreitet. Sie können in Boden- und Süßwasserproben ebenso wie in diversen Lebensmitteln nachgewiesen werden [8, 11, 64, 92].

Bei ca. 40 % der nicht-hospitalisierten Menschen stellen v. a. *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. radioresistens*, *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157]) und *A. genomsp. 15BJ* einen Bestandteil der normalen Hautflora dar, wobei sie bevorzugt feuchte Areale, wie z. B. die Achselhöhlen, die Inguinalregion und Interdigitalbereiche in niedriger Keimdichte besiedeln [79, 199, 203]. Bei hospitalisierten Menschen jedoch liegen die Nachweisraten bei bis zu 75 % [199].

In den Sommermonaten kommt es auf Grund höherer Luftfeuchtigkeit und Temperaturen zu einer verstärkten Kolonisation sowohl von nicht-hospitalisierten Menschen als auch von Patienten und medizinischem Personal in Krankenhäusern [138].

Die klinisch relevanten Spezies *A. baumannii* und *A. genomsp. 13TU* (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]) werden nur äußerst selten auf der Haut gesunder Menschen oder in Umweltproben gefunden [9, 11, 64, 199]. Das natürliche Reservoir dieser Spezies konnte bis dato nicht eindeutig identifiziert werden [9, 64]. Speziell *A. baumannii* ist in der Lage, über einen längeren Zeitraum auf unbelebten Gegenständen zu überleben. In Krankenhäusern kommt somit jegliche medizinische Ausrüstung als Infektionsquelle für den Menschen in Frage, was zu der Hypothese führte, dass das Krankenhausgebäude selbst mit allen Einrichtungen das Reservoir für *A. baumannii* ist [257]. Die hohe Keimbelastung und die zusätzliche Fähigkeit dieses Bakteriums, sich unterschiedliche Antibiotikaresistenzmechanismen anzueignen, führen zu gehäuften Infektionen bei hospitalisierten Patienten. Von diesen sogenannten nosokomialen (im Krankenhaus erworbenen) Infektionen sind die „community-acquired“-Infektionen abzugrenzen, welche nicht im Zusammenhang mit einer Hospitalisierung stehen [9, 64].

2.1 Nosokomiale *Acinetobacter*-Infektionen

Pneumonien

Bei der klinisch apparenten *Acinetobacter*-Infektion ist am häufigsten der Respirationstrakt betroffen. In den Jahren 1976 bis 1990 erhöhte sich die Inzidenz nosokomial erworbener *Acinetobacter*-Pneumonien von ca. 1 % auf 6 % [9, 138]. Unterschiedliche Risikofaktoren

wie z. B. hohes Alter, andere Infektionen sowie Kolonisierung mit *Acinetobacter* spp. fördern das Entstehen von *Acinetobacter* bedingten Erkrankungen des Respirationstrakts [9, 110]. Im Krankenhaus kommen als Faktoren, die das Risiko einer Exposition mit dem Organismus begünstigen, noch die Länge des Krankenhausaufenthalts, der Kontakt mit kontaminierter Ausrüstung, invasive Behandlungsmethoden, mechanische Beatmung, Katheterisierung sowie eine vorausgegangene Antibiotikatherapie hinzu [81, 253]. Neben kontaminierten medizinischen Geräten stellen der Kontakt mit bereits infizierten Patienten oder Krankenhauspersonal sowie die Übertragung über die Luft, insbesondere über spezielle Belüftungssysteme, eine wichtige Infektionsquelle dar [64, 110]. Kontaminierte Beatmungssysteme nehmen bei Infektionen von schwerkranken Patienten mit *Acinetobacter* spp. eine zentrale Stellung ein. Angaben für die Mortalitätsraten bei diesen Patienten schwanken zwischen 30 % und 75 % [9, 81].

Sepsis

Ausgehend von lokalen Infektionsherden, wie z. B. Pneumonien oder Abszessen nach permanenten Gefäßzugängen oder Wunden [253], entstehen Septikämien am häufigsten bei immunsupprimierten Patienten [81]. Je nach Vorliegen von Risikofaktoren zeigen sich unterschiedliche Verläufe, von der gutartigen transitorischen Septikämie bis zum septischen Schock. Eine besondere Risikogruppe sind Neugeborene auf neonatologischen Intensivstationen, bei denen sowohl in Japan wie auch in Israel Septikämien beschrieben wurden [110]. In einer von der „Health protection agency“ in London durchgeführten Studie waren die betroffenen Patienten älter als 50 Jahre und vorwiegend männlichen Geschlechts. Häufig konnten im Rahmen von *Acinetobacter*-Septikämien zusätzlich andere Bakterien nachgewiesen werden, so dass den Septikämien auch Mischinfektionen zu Grunde liegen könnten [9, 79].

Erkrankungen des Urogenitaltrakts

Die in früheren Studien beschriebene hohe Inzidenz an Harnwegsinfektionen hat in den letzten Jahren vermutlich auf Grund einer verbesserten Hygiene im Umgang mit Urinkathetern abgenommen [241]. Diese Infektionen äußern sich i. d. R. in Form von Zystitiden oder Pyelonephritiden in Folge der Dauerkatheterisierung oder einer Nephrolithiasis. Sie kommen vor allem häufig in Nachsorgeeinrichtungen vor [64, 110]. Patienten männlichen Geschlechts, die im Rahmen von Prostataerkrankungen katheterisiert werden müssen, sind besonders betroffen [10].

Meningitiden

Bei neurochirurgischen Eingriffen wird über ein Auftreten von *Acinetobacter* spp. bedingten Meningitiden berichtet [43]. Spezielle Risikofaktoren sind dabei eine andauernde Verbindungen zwischen den Ventrikeln und der Außenwelt, Ventrikulostomie, Ventrikulografien, Carotis-Sinus cavernosus-Fisteln sowie ventrikuläre Dauerkatheter [9, 139]. Das klinische Bild der Erkrankung variiert von Fieberschüben ohne schwere Symptomatik bis hin zu Verbrauchskoagulopathien (Waterhouse-Friderichsen-Syndrom) mit Todesfolge [110].

Endokarditiden

Endokarditiden, die durch *A. baumannii*-Stämme verursacht werden, sind selten und treten hauptsächlich bei bereits bestehenden Herzerkrankungen auf, wobei sie mit einer hohen Mortalität einhergehen [225]. Als Ursachen von prothetischer Klappen-Endokarditis werden *A. baumannii* und *A. lwoffii* beschrieben [163].

2.2 „Community-acquired“-*Acinetobacter*-Infektionen

Neben den nosokomialen Infektionen spielt *A. baumannii* auch mit steigender Tendenz bei Pneumonien nicht hospitalisierter Patienten eine Rolle [64]. Meist sind bei diesen Patienten zusätzliche Risikofaktoren wie Alkoholabusus, Rauchen, Diabetes, Krebs und/oder eine bronchopulmonäre Grunderkrankung vorhanden. Der Krankheitsverlauf ist fulminant, in 30 % der Fälle entwickelt sich ein septischer Schock und die Mortalitätsrate liegt zwischen 40 % und 64 % [9, 64]. Multiresistente Stämme sowie andere klinische Manifestationen (Urogenitaltraktinfektionen, Meningitiden, Endokarditiden, Wundinfektionen) wurden nur selten beschrieben [42, 64]. Über „community-acquired“-*Acinetobacter*-Infektionen wurde hauptsächlich in tropischen Regionen, wie z. B. Südostasien oder Nord-Australien v. a. in warmen und trockenen Monaten berichtet [4, 42, 138, 248]. Der Nachweis von *Acinetobacter* spp. bei Läusen, Flöhen und Zecken führte zu der Annahme, dass diese als Vektoren in Frage kommen [120].

2.3 *Acinetobacter*-Infektionen nach Naturkatastrophen oder Kriegen

Das Marmara-Erdbeben von 1999 im Nordwesten der Türkei forderte mehr als 20000 Verletzte, viele davon mit multiplen Traumata. Bei 31,2 % der Verletzten konnten

nosokomial erworbene *A. baumannii*-Stämme isoliert werden. Zwei dieser Isolate erwiesen sich als resistent gegenüber allen Antibiotika, einschließlich der Carbapeneme [164]. Nach dem Tsunami in Südostasien 2004 wurden neben anderen bekannten Erregern (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*-Spezies) auch multiresistente *Acinetobacter*-Stämme sowohl aus infizierten Wunden als auch aus dem Respirationstrakt von Verunglückten isoliert [133].

Während des Vietnam-, Irak- und Golfkrieges ließ sich bei verletzten Soldaten eine erhöhte *Acinetobacter*-Infektionsrate nachweisen [141, 217]. Die Isolate waren i. d. R. multiresistent. Als Ursache kommt vermutlich die Erhöhung der Patientendichte in den Krankenhäusern bzw. den lokalen Erstversorgungszentren und die damit verbundene Vernachlässigung von Hygienemaßnahmen in Frage [59, 197].

3 Vorkommen beim Tier

Über das Vorkommen von *Acinetobacter* spp. bei Tieren gibt es bis dato nur wenige Berichte [14, 21, 48, 78, 119, 120, 194, 231]. 1976 gelang der Nachweis von *A. calcoaceticus*-Stämmen (var. *anitratius* und *lwoffii*) aus gingivalen Tupferproben von gesunden Hunden eines US-amerikanischen Versuchslabors. Die Prävalenz *Acinetobacter*-positiver Hunde lag bei 10 % [194]. Anfang der achtziger Jahre berichteten KROGH und KRISTENSEN über die Isolierung von *Acinetobacter*-Keimen von Hautproben gesunder Hunde aus Dänemark. Darüber hinaus konnten *Acinetobacter* spp. neben anderen gramnegativen Organismen auch in ekzematösen und pyodermatischen Hautarealen nachgewiesen werden. Die Autoren mutmaßten, dass es bei Pyodermie-Patienten im Bereich der Läsionen zu einem Zusammenbruch der lokalen Abwehrbarrieren kommt. Infolgedessen nimmt die Anzahl gramnegativer Keime zu. Wahrscheinlich handelt es sich deshalb bei *Acinetobacter*-Keimen um opportunistische Erreger [119].

Acinetobacter spp. sind ferner Bestandteile der Mikrofloren des Genitaltrakts bei gesunden Katzen. Im Falle einer Immunsuppression können sie aber auch bei Katzen zu Erkrankungen der Reproduktionsorgane führen [48].

Hinweise auf eine mögliche Bedeutung als Krankheitserreger bei Tieren ergaben sich durch den Nachweis multiresistenter *A. baumannii*-Stämme aus Jugularvenenkathetern von sieben Pferden in der Universitätsklinik Ghent im Jahr 2000. Die Virulenz der Isolate wurde aber als gering eingestuft, da nur drei der betroffenen Pferde Anzeichen einer lokalen Infektionskrankheit aufwiesen [231].

Als nosokomialer Erreger wurde *A. baumannii* im selben Jahr in einer retrospektiven Studie in der Klinik für kleine Haustiere der Universität Bern beschrieben [78]. Dort gelang der Nachweis multiresistenter *A. baumannii*-Stämme bei 17 Hunden und zwei Katzen. Bei den Tieren wurde der Erreger hauptsächlich aus Wunden, Proben des Urogenital- und Respirationstrakts sowie vereinzelt aus dem Blut isoliert. Bei sieben der betroffenen Hunde handelte es sich um eine systemische Infektion. Dabei wurde *A. baumannii* entweder aus einer Blutkultur oder aus Proben verschiedener Lokalisationen nachgewiesen. Die restlichen zwölf Tiere wiesen eine lokale Infektion auf. Die Diagnose einer lokalen Urogenitaltraktinfektion wurde durch die mikroskopische Untersuchung des Urinsediments sowie eine *A. baumannii*-positive Urinkultur gestellt. Die systemische Infektion führte bei allen betroffenen Tieren entweder zum Tod oder machte eine Euthanasie erforderlich. Im Gegensatz dazu starben nur zwei Tiere mit einer lokalen Infektion. Sowohl die Ergebnisse der Antibiogramme als auch die anschließende Ribotypisierung wiesen darauf hin, dass unterschiedliche *A. baumannii*-Stämme in der betroffenen Intensivstation vorhanden waren. Die Autoren der Studie zogen für die Einschleppung des Erregers *A. baumannii*-positive Tiere in Betracht. Innerhalb der Intensivstation wurde *A. baumannii* indirekt durch kontaminierte Gegenstände, über das Pflegepersonal und/oder Tierärzte sowie direkt von Patient zu Patient übertragen [78].

Zusätzlich wurde in der Kleintierklinik der Universität Bern erstmalig das Auftreten einer nekrotisierenden Faszitis mit anschließendem letalen septischen Schock nach *A. baumannii*-Infektion bei einer stationär aufgenommenen Katze beschrieben [21]. Kutane Läsionen entstanden hauptsächlich im Bereich des intravenösen Katheters, welcher vermutlich die Quelle der Infektion war. Sowohl aus den Hautveränderungen als auch aus Leber, Milz und Niere gelang *post mortem* die Isolation eines multiresistenten *A. baumannii*-Stamms [21].

Insgesamt gesehen gibt es somit einige Hinweise auf die klinische Bedeutung von *A. baumannii*-Infektionen beim Tier, eine endgültige Beurteilung der Pathogenität dieser Erreger steht jedoch noch aus [231].

4 Phänotypische Eigenschaften von *Acinetobacter*

In einer grundlegenden Studie, die bis heute als Standard für die phänotypische Charakterisierung gilt, beschrieben BOUVET und GRIMONT 1986 zwölf genomische Spezies, die anhand von 28 Methoden identifiziert wurden [9, 18]. Das beschriebene System wurde ein Jahr später soweit vereinfacht, dass eine Unterscheidung anhand der Beurteilung des Wachstums bei verschiedenen Temperaturen, der Säureproduktion aus Glucose, der

Gelatinhydrolyse sowie der Assimilation von 14 Carbonsäuren möglich war [19]. Allerdings ist dieses System immer noch sehr aufwendig und für die Routinediagnostik nicht geeignet. Nach wie vor sind weder dieses Schema noch die bis dato entwickelten kommerziellen Identifizierungssysteme (z. B. API 20NE, VITEK 2) in der Lage, alle 34 beschriebenen *Acinetobacter*-Spezies eindeutig zu differenzieren [9].

4.1 Bebrütungstemperatur

Die Beurteilung des Wachstums bei unterschiedlichen Bebrütungstemperaturen stellt ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal für die Identifizierung von *Acinetobacter*-Spezies dar. Alle Spezies wachsen bei 20-37 °C, mit einem Optimum bei 33-35 °C [9, 18]. Nur *A. baumannii*- und *A. genomsp.* 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157])-Stämme sind in der Lage auch bei 44 °C zu wachsen [18, 215].

4.2 Kulturmorphologie

Auf bluthaltigen Nährböden zeigen *Acinetobacter*-Isolate nach 24 h Bebrütung bei 37 °C ein glattes, teilweise schleimiges Wachstum [9]. Spezies des *Acb*-Komplexes wachsen als opake Kolonien mit einem Durchmesser von 1,5-3 mm, wohingegen die meisten anderen Arten kleinere durchscheinende Kolonien ausbilden [9, 110].

A. beijerinckii, *A. gyllenbergii*, *A. haemolyticus*, *A. genomsp.* 6, 13BJ/14TU, 14BJ, 15BJ, 16 und 17 zeigen eine Hämolysezone auf schafblut- oder pferdebluthaltigen Nährböden [18, 83, 158].

4.3 Keimmorphologie

Bakterien des Genus *Acinetobacter* stellen sich mikroskopisch als kleine, unbewegliche kokkoide Stäbchenbakterien mit einer Größe von 1-1,5 µm auf 1,5-2,5 µm dar [110, 203].

In der Gramfärbung erweisen sich *Acinetobacter*-Isolate als gramnegativ oder auch häufig als gramlabil [10, 11, 182].

4.4 Biochemische Eigenschaften

Bei *Acinetobacter*-Isolaten kann das Enzym Cytochromoxidase nicht nachgewiesen werden [110, 242]. Bakterien der Gattung *Acinetobacter* bilden das eisenhaltige Enzym Katalase [242], welches Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spaltet [128]. *Acinetobacter*-Isolate zeigen ausschließlich eine oxidative Glucoseverstoffwechslung [110]. Dieser Zucker dient den Bakterien neben weiteren Kohlenhydraten zur Energiegewinnung. Keime des *Acb*-Komplexes, mit Ausnahme der meisten *A. genomsp.* 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157])-Stämme, sind nicht in der Lage Gelatine, ein geschmacksneutrales Eiweiß, zu hydrolysieren, da ihnen das Enzym Gelatinase fehlt [18, 215].

Tabelle 2: Phänotypische Eigenschaften von Vertretern des *Acb*-Komplexes [18, 157, 215, 218].

Charakteristikum	<i>Acinetobacter</i>					
	<i>bau-mannii</i>	<i>calcoa-ceticus</i>	genomo-sp. 3	genomo-sp. 13TU	genomosp. „between 1 and 3“	genomosp. „close to 13TU“
Wachstum bei 37 °C	+	+	+	+	+	+
Wachstum bei 41 °C	+	-	+	+	+	+
Wachstum bei 44 °C	+	-	-	50	-	-
Gelatinhydrolyse	-	-	-	- (+)	-	-
Hämolyse	-	-	-	-	-	-
Glutamyltransferase	99	+	+	k. A.	k. A.	k. A.
Citrat	+ ¹	+	+	+	+	+
Glucoseabbau	95	+	+	+	+	+
β-Xylosidase	95	-	+	k. A.	k. A.	k. A.
<u>Verstoffwechslung von:</u>						
DL-Lactat	+	+	+	+	+	+
Glutarat	+	+	+	95	+	+
L-Phenylalanin	87	+	+	85	+	+
Phenylacetat	87	+	66	85	+	+
Malonat	98	+	87	20	+	+
L-Histidin	98	+	94	+	+	+
Azelat	90	+	+	95	+	50
D-Malat	98	-	+	+	+	+
L-Aspartat	+	+	+	+	+	+
L-Leucin	97	38	94	95	+	50
Histamin	-	-	-	-	-	-
L-Tyrosin	+	+	+	k. A.	k. A.	k. A.
β-Alanin	95	+	94	85	+	50
Ethanol	+ ¹	+	+	+	+	+
2, 3-Butanediol	+	+	+	90	+	+
<i>Trans</i> -Aconitat	99	+	+	60	+	+
L-Arginin	98	+	+	+	+	+
L-Ornithin	93	+	+	95	+	50
DL-4-Aminobutyrat	+	+	+	+	+	+

Erläuterung: +, alle Stämme positiv; -, alle Stämme negativ; die Zahlen entsprechen dem Prozentsatz positiver Stämme

¹ alle Stämme positiv mit Ausnahme von zwei auxotrophen Stämmen

k. A. = keine Angaben

4.5 Antibiotikaresistenz

Die stetige Weiterentwicklung der Taxonomie lief parallel zu der Entwicklung verschiedener Resistenzmechanismen bei einigen Vertretern des Genus *Acinetobacter*. Waren *Acinetobacter*-Stämme vor zwanzig Jahren noch gegenüber vielen Breitspektrumantibiotika empfänglich, können sie heute i. d. R. nur noch mit Reserveantibiotika bekämpft werden. Besonders der zunehmende Wirkverlust von Carbapenemen schränkt mögliche Erfolge bei der Therapie von *Acinetobacter*-Infektionen ein [110, 180].

4.5.1 Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika

A. baumannii-Stämme besitzen natürlicherweise eine AmpC-Cephalosporinase. Diese wird auf einem basalen Level exprimiert, so dass keine Wirkminderung von Breitspektrum-Cephalosporinen zu erwarten ist [16]. Kommt es jedoch vor dem *bla*_{AmpC}-Gen zur Insertion eines spezifischen Insertionselements (IS) der IS4-Familie, IS*Aba1*, wird die Expression der AmpC-Cephalosporinase mit Hilfe zusätzlicher Promotorsequenzen gefördert. Daraus resultierend erhöht sich die Resistenz gegenüber Ceftazidim. Es läßt sich jedoch nur ein geringer Einfluss der Cephalosporinase auf die Wirkung von Carbapenemen nachweisen [16, 56, 101].

Des Weiteren wird von mehreren Schmalspektrum- β -Lactamasen in *A. baumannii*-Stämmen berichtet, die im Laufe der Zeit erworben wurden. Die Penicillinasen TEM-1, TEM-2, CARB-5 sowie die Oxacillinasen OXA-20 und OXA-21 lassen sich dabei durch den β -Lactamaseinhibitor Clavulansäure hemmen. Die plasmidkodierte Penicillinase TEM-1 wurde erstmals 1963 aus einem *E. coli*-Stamm isoliert. TEM-2 unterscheidet sich von dem Ausgangsenzym TEM-1 in einigen Aminosäurepositionen, es besteht jedoch keine verbesserte katalytische Effektivität des Enzyms [251]. Die Penicillinase SCO-1 ist trotz des Hemmstoffs Clavulansäure in der Lage Penicilline, und in geringem Maße Cephalotin, Ceftazidim und Cefepim, zu hydrolysieren [174, 180]. Die Produktion dieses Enzyms konnte bisher bei *A. baumannii*, *A. junii*, *A. baylyi* und *A. johnsonii* nachgewiesen werden [174].

Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen (ESBLs) kommen nicht nur bei Enterobakterien und in *Pseudomonas aeruginosa*-Stämmen, sondern auch bei *A. baumannii*-Isolaten vor. Bei diesen wurde als erste ESBL PER-1 beschrieben [146, 147, 161, 211, 255]. Eine türkische Multicenter-Studie konnte in 46 % der *A. baumannii*-Stämme PER-1-Enzyme nachweisen [251]. In einer Untersuchung mit multiresistenten *A. baumannii*-Stämmen von Kriegspatienten konnten 3 % der Isolate als PER-1-Produzenten identifiziert werden. Die

Sequenzanalyse des *bla*_{PER-1}-Gens sowie seiner Umgebung führte zu der Annahme, dass es sich bei dem Gen ursprünglich um den Bereich eines Tn1213 Transposons gehandelt hat [173].

Eine weitere ESBL, PER-2, ist nur gering verwandt mit PER-1 und konnte bisher ausschließlich in *A. baumannii*-Stämmen aus Südamerika nachgewiesen werden [171]. Eine Studie in vier bolivianischen Krankenhäusern zeigte, dass 9 % der isolierten *A. baumannii*-Stämme PER-2-Produzenten sind [38].

Die dritte und bedeutendste ESBL von *A. baumannii* ist VEB-1. Sie wurde zunächst nur bei einem einzelnen Isolat in einem französischen Krankenhaus nachgewiesen. Allerdings zeigten Folgeuntersuchungen, dass sich VEB-1 auch in Isolaten aus Nordfrankreich sowie aus dem Süden Belgiens nachweisen läßt [145, 146, 179]. Das *bla*_{VEB-1}-Gen konnte als eine Integron-Klasse-1 assoziierte Genkassette identifiziert werden [145, 146].

A. baumannii besitzt zudem ESBLs, die bekanntermaßen von Bakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae* produziert werden. CTX-M-2, eine „Cefotaximase“, wurde erstmals in Japan nachgewiesen [150, 251]. Ein Interspeziestransfer des *bla*_{CTX-M-2}-Gens von *Proteus mirabilis* zu *A. baumannii* wurde von den Autoren angenommen [150]. Darüber hinaus wurde von CELENZA *et al.* (2006) die ESBL CTX-M-43 nachgewiesen [38]. Die bei den *Enterobacteriaceae* bekannten β -Lactamasen des TEM- und SHV-Typs wurden bislang bei *A. baumannii* nur in Einzelfällen identifiziert. Einige Autoren berichten von *bla*_{SHV}- und *bla*_{TEM}-Genen, die entweder chromosomal- (SHV-5) oder plasmidkodiert (SHV-12, TEM-116, TEM-92) sind [72, 149, 176, 205].

Nachteilig für therapeutische Maßnahmen wirkt sich v. a. die Entwicklung von Resistenzen gegenüber der Gruppe der Carbapeneme aus. Diese Resistenzen entstehen durch die Produktion von natürlich vorkommenden β -Lactamasen vom Oxacillinase-Typ (OXA-51-ähnliche Varianten), die eine schwache Carbapenemase-Aktivität aufweisen [27, 28, 97]. TURTON *et al.* (2006) mutmaßten, dass das in der Promotorregion lokalisierte Insertionselement IS*Aba1* verschiedene OXA-Gene reguliert und für die Carbapenemresistenz verantwortlich ist [222].

Neben diesen natürlich vorkommenden Enzymen konnten des Weiteren mehrere erworbene β -Lactamasen der Klasse B (Metallo- β -Lactamasen) sowie Klasse D (Oxacillinasen) nachgewiesen werden. Letztere kommen typischerweise bei *Acinetobacter* spp. vor und bilden eine sehr heterogene β -Lactamase-Gruppe mit Aminosäurehomologien von 20 % bis 30 % [251]. *In vitro* hydrolysieren sie Carbapeneme sehr langsam. Die teilweise sehr hohen MIC (Minimal Inhibitory Concentration)-Werte bei Isolaten von erkrankten Personen weisen

auf sekundäre Resistenzmechanismen, wie z. B. eine erhöhte Expression von Effluxpumpen, hin [96, 180].

Die erste Carbapenem-hydrolysierende Oxacillinase (ChO) OXA-23 (=ARI-1) gilt zusammen mit OXA-27 und OXA-49 als Repräsentant für ChOs der ersten Generation [68]. Beide Enzyme sind in der Lage, in geringem Umfang Imipenem, ein humanmedizinisches Reserveantibiotikum, zu hydrolysieren [251]. Mit ihrer Verbreitung in Rumänien, Brasilien, Südkorea, China, Russland und Frankreich stellen OXA-23-ähnliche Enzyme heutzutage die weltweit am häufigsten vorkommenden ChOs dar [2, 28, 57, 114, 148]. Die *bla*_{OXA-23}-Gene konnten als Bestandteile von Transposonstrukturen identifiziert werden [51]. *A. radioresistens* scheint als natürlicher Produzent ein Reservoir für diese Gene zu sein [175]. Eine weitere Gruppe ChOs (OXA-25, OXA-26 und OXA-40) konnte in *A. baumannii* erstmals in Spanien (OXA-25 und OXA-40) bzw. Belgien (OXA-26) nachgewiesen werden. Sie weist eine Homologie von 60 % zu OXA-23/27 auf [17, 28, 56, 98, 251]. Alle drei Enzyme können sowohl chromosomal- als auch plasmidkodiert vorkommen [56, 129, 131].

Die dritte Gruppe bildet die ChO OXA-58. Die für dieses Enzym kodierenden *bla*_{OXA-58}-Gene wurden u. a. in Carbapenem-resistenten *A. baumannii*-Isolaten aus einem französischen Universitätskrankenhaus mittels PCR und anschließender Gensequenzierung nachgewiesen. Die Autoren dieser Studie konnten auch zeigen, dass die sieben Carbapenem-resistenten Isolate gemäß den Tenover-Kriterien zu zwei unterschiedlichen Stämmen gehörten. Obwohl die Isolate sich in ihrem Genotyp voneinander unterschieden, wurde bei allen das gleiche *bla*_{OXA-58}-tragende Plasmid nachgewiesen [97, 178]. Eine weitere Oxacillinase, OXA-97, wurde 2008 von POIREL *et al.* in multiresistenten *A. baumannii*-Isolaten aus Tunesien nachgewiesen. OXA-97 unterscheidet sich von OXA-58 lediglich durch den Austausch einer Aminosäure. Das Resistenzprofil hinsichtlich der in dieser Studie getesteten β -Lactam-Antibiotika war identisch. Auf Grund dieser Ähnlichkeit bilden OXA-58 und OXA-97 zusammen eine Gruppe innerhalb der Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen [177]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die für diese beiden Enzyme kodierenden Gene auf Plasmiden lokalisiert sind. Die Expression von *bla*_{OXA-58} korreliert mit dem Vorhandensein von Insertionssequenzen wie *IS18*, *ISAbal*, *ISAb2* und *ISAb3*-ähnlichen Elementen [181].

Metallo- β -Lactamasen (MBLs) wird laut Literatur eine starke Carbapenemase-Aktivität zugeschrieben. Gegenüber den β -Lactamase-Inhibitoren Clavulansäure, Tazobactam und Sulbactam sind sie unempfindlich. In *A. baumannii* können drei Gruppen unterschieden werden: IMP-ähnliche, VIM-ähnliche und SIM-ähnliche Enzyme [33, 180]. Innerhalb der IMP-ähnlichen Enzyme differenziert man sechs Varianten, die drei verschiedenen

phylogenetischen Gruppen zugeordnet werden. 1988 wurde IMP-1 in Japan als übertragbare Metallo-Carbapenemase mit einem breiten hydrolytischen Spektrum nachgewiesen [251]. IMP-2 fand man in Italien und Japan, IMP-4 in Hong Kong und Australien, IMP-5 in Portugal, IMP-6 in Brasilien und IMP-11 in Japan [46, 50, 56, 80, 123, 126, 186, 195, 246, 256]. Demgegenüber beschränken sich die Nachweise von VIM-Enzymen (VIM-1, VIM-4) aus *A. baumannii*-Isolaten auf Griechenland [76, 220] sowie VIM-2 auf Stämme aus Südkorea [123].

SIM-1 Enzyme wurden ausnahmslos bei *A. baumannii*-Stämmen in Südkorea nachgewiesen, wo diese Determinante weit verbreitet zu sein scheint. Genetische Analysen bzgl. der MBL-kodierenden Gene zeigten, dass *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} und *bla*_{SIM} Bestandteile von Klasse-1-Integronen sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Resistenz gegenüber Carbapenemen verschiedene Mechanismen zu Grunde liegen. Zu diesen zählen neben der Bildung von β -Lactamasen z. B. der Rückgang von Porinen und/oder die Modifikation Penicillin-bindender Proteine [52, 82]. Auch die Veränderungen des 29-kD CarO „Outer Membrane Proteins“ (OMP) sind für die Resistenzentwicklung von Bedeutung. Dieses Protein ist u. a. essentiell für die Aufnahme von L-Ornithin in die Bakterienzelle. Bei Stämmen, die dieses äußere Membranprotein nicht mehr besitzen, konnte neben einer reduzierten L-Ornithin-Aufnahme auch eine verminderte Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber Carbapenemen beobachtet werden [143, 144, 206].

Tabelle 3: Klassifizierung und Eigenschaften der β -Lactamasen von *Acinetobacter* spp..

BJM	Klassifizierung nach		Genetische Lokalisation	Hemmung durch CA	Beispiele	Literaturquelle
	Ambler	MI				
1	C	C.ase	Chromosom, (Plasmid)	-	Nicht induzierbare AmpC- Cephalosporinase	[16, 56, 101, 213, 214, 251]
2a	A	P.aseV	Plasmid	+	¹⁾	[213, 214, 251]
2b	A	P.aseI	Plasmid, (Chromosom)	+	TEM-1, TEM-2	[180, 213, 214, 251]
2be	A	CX.ase	Plasmid, (Chromosom)	+	TEM-92, TEM- 116, SHV-5, SHV- 12, PER-1, PER-2, CTX-M-2, CTX- M-43, VEB-1	[38, 72, 145-147, 149, 161, 171, 176, 205, 211, 213, 214, 251, 255]
2br	A	-	Plasmid	(+)	¹⁾	[213, 214, 251]
2c	A	P.aseIV	Plasmid, (Chromosom)	+	CARB-5, SCO-1	[169, 174, 213, 214, 251]
2d	D	P.aseII/P.aseIII	Plasmid	±	OXA-51-ähnliche Varianten OXA-20, OXA-21, OXA-23 (ARI-1), OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-27, OXA-40, OXA-49, OXA-58, OXA-97	[2, 17, 27-29, 51, 57, 68, 97-100, 114, 129, 131, 148, 175, 177, 178, 181, 213, 214, 222, 251]
2e	A	CX.ase	Chromosom	+	¹⁾	[213, 214, 251]
2f	A	-	Chromosom, (Plasmid)	±	¹⁾	[213, 214, 251]
3a, b, c	B	Metallo- enzyme	Chromosom, (Plasmid)	-	IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-11, VIM-1, VIM-2, VIM-4, SIM-1	[33, 46, 50, 56, 76, 80, 123, 126, 127, 180, 186, 195, 213, 214, 220, 246, 251, 256]
4	D	-	Chromosom, (Plasmid)	-	¹⁾	[213, 214, 251]

Erläuterung: **BJM** = Bush, Jacoby und Medeiros; **CA** = Clavulansäure; **C.ase** = Cephalosporinase; **CX.ase** = Cefuroximase; **MI** = Mitsuhashi und Inoue; **P.ase** = Penicillinase
¹⁾ kein Nachweis in *Acinetobacter* spp.

4.5.2 Effluxpumpen

Die Hochregulation der Expression von Effluxpumpen gehört zu den Antibiotika-unspezifischen Abwehrmechanismen [9, 187]. Die dafür zuständigen Gene befinden sich entweder bereits im Chromosom oder wurden durch horizontalen Gentransfer erworben [170]. Basierend auf Sequenzhomologien werden die Transporter in verschiedene Familien eingeteilt: „ATP Binding Cassette Superfamily“, „Small Multidrug Resistance Family“, „Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE) Superfamily“, „Major Facilitator (MF) Superfamily“ und die „Resistance Nodulation-Cell Division (RND) Superfamily“. In *A. baumannii* wurden bisher Transporter der RND-, MATE- und MF-Superfamilie nachgewiesen [134, 135]. Innerhalb der RND-Superfamilie kommt den Effluxpumpen AdeABC (**Abbildung 1**), AdeDE und AdeXY besondere Bedeutung zu [9, 134]. Eine Überexpression einer AdeABC-Pumpe konnte in mehreren Studien mit multiresistenten *A. baumannii*-Isolaten in Verbindung gebracht werden [104, 166, 191]. Erstmals identifiziert aus dem *A. baumannii*-Stamm BM4454, wird dieser Effluxpumpe eine Beteiligung an der Aminoglykosidresistenz zugeschrieben. Der dreiteilige Aufbau der Effluxpumpe ist für die Funktion essentiell [130]. AdeB verfügt über zwölf transmembranäre Segmente, AdeA ist homolog zum Membranfusionsprotein AcrA von *Escherichia coli* und AdeC ist zu 69 % identisch mit dem OMP OprM von *Pseudomonas aeruginosa* [134]. Die Kontrolle der AdeABC-Pumpe erfolgt mittels eines AdeRS-Zweikomponenten-Regulationssystems, dessen Transkription von den *adeABC*-Genen ausgeht, wobei das Umschreiben von *adeC* unabhängig von der Transkription von *adeAB* erfolgt [135].

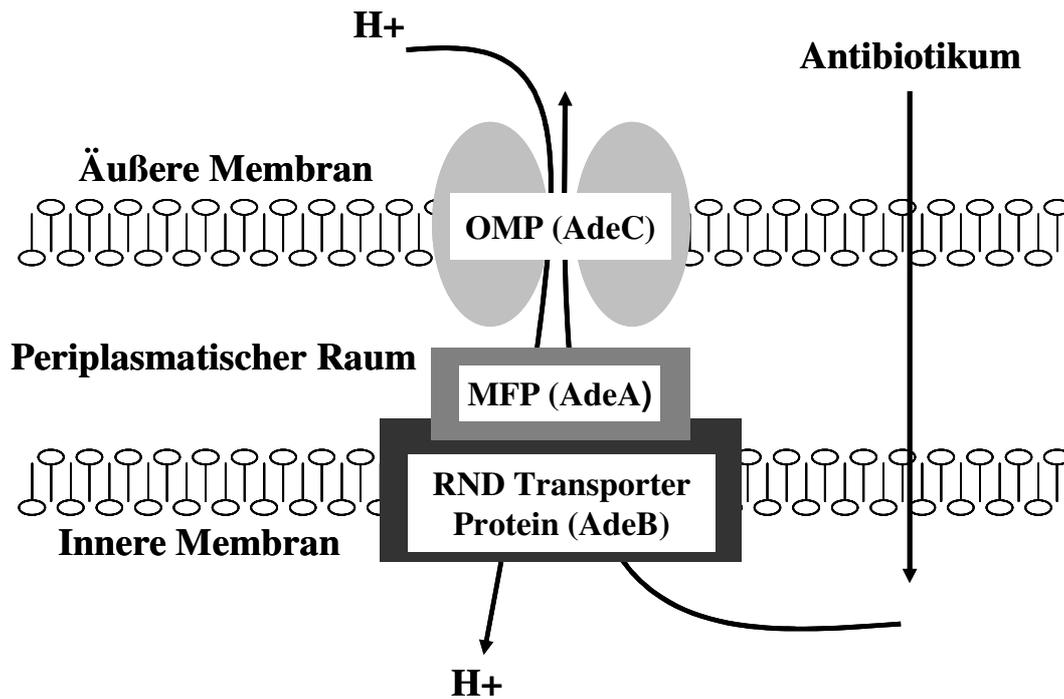


Abbildung 1: Aufbau einer RND-Effluxpumpe (AdeABC-Pumpe), aus [9].

MFP = Membranfusionsprotein

OMP = „Outer Membrane Protein“

RND = „Resistance Nodulation-Cell Division“

Im Falle einer Inaktivierung des *adeB*-Gens geht der multiresistente Phänotyp verloren. Im Gegensatz dazu führt derselbe Vorgang bei *adeC*-Genen nicht zum Verschwinden des multiresistenten Phänotyps [135]. Dem Isolat *A. baumannii* ATCC 17978 fehlt das *adeC*-Gen, so dass dieser Stamm vermutlich alternative OMPs benutzen muss, um die Funktionalität der Pumpe aufrechtzuerhalten [9].

Generell lassen sich zwei Typen von Effluxsystemen definieren: Zum einen Systeme, die zur Resistenz gegenüber einem einzelnen antibiotischen Wirkstoff führen und zum anderen solche, die mit einer Multiresistenz einhergehen [9, 31].

Ein Beispiel für erstere sind Effluxpumpen, die zu einer Chloramphenicol- bzw. Tetracyclinresistenz führen. Sie gehören zur MF-Superfamilie und schleusen den Tetracyclin-Kationen-Komplex im Austausch mit einem Proton aus der Bakterienzelle hinaus [188]. Die dafür verantwortlichen Gene sind auf transferierbaren Plasmiden und/oder Transposons lokalisiert und kodieren für membranassoziierte Effluxpumpen [9, 184]. Im Falle einer Expression führen *tet* (A)-Gene zu einer Resistenz gegenüber Tetracyclinen und *tet* (B)-Gene inhibieren die Empfindlichkeit gegenüber Tetracyclinen und Minocyclinen. Im Rahmen einer Prävalenzstudie konnte gezeigt werden, dass keiner der untersuchten *A. baumannii*-Stämme

beide Gene gleichzeitig aufwies. Das *tet* (B)-Gen zeigte eine Prävalenz von 66 %, wohingegen beim *tet* (A)-Gen die Prävalenz nur 13,6 % betrug [9, 136].

Die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen wird nicht nur durch Mutationen im *gyrA*- und *gyrB*-Gen hervorgerufen, sondern zusätzlich auch durch eine reduzierte Akkumulation dieser Wirkstoffe in der Bakterienzelle. Ursache hierfür ist zum einen eine Abnahme der Permeabilität, zum anderen kommt einer Überexpression der beiden Effluxpumpen AdeABC und AbeM eine entscheidende Bedeutung bzgl. der ansteigenden Resistenz klinischer *A. baumannii*-Isolate gegenüber Fluorchinolonen sowie erhöhten MIC-Werten zu [9, 104, 134].

Auch im Zusammenhang mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Chloramphenicol werden Effluxsysteme beschrieben. Dabei wurde das *cmlA*-Gen in einer 86 kb großen Resistenzinsel lokalisiert [9, 77]. Der ursprünglich bei Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae* nachgewiesene Transporter Mdfa führte neben einem Verlust der Wirksamkeit von Chloramphenicol darüber hinaus zu einer Resistenz gegenüber Ciprofloxacin [9].

4.5.3 Zusätzliche Resistenzmechanismen

Aminoglykosidresistenzen können durch mehrere unterschiedliche Mechanismen entstehen. Neben Alterationen des ribosomalen Zielproteins, einem ineffektiven Transport des Antibiotikums in das Innere des Bakteriums und der Überexpression von Effluxpumpen (z. B. AdeABC-Effluxpumpe) ist die Modifikation des antibiotischen Wirkstoffes durch Aminoglykosid-inaktivierende Enzyme von größter Bedeutung. Das Vorkommen von drei unterschiedlichen Enzymtypen (Acetyl-, Nukleotidyl- und Phosphotransferasen, **Tabelle 4**) wurde bei klinischen *A. baumannii*-Isolaten beschrieben. Oft konnten bei einem Isolat mindestens zwei Enzymtypen gleichzeitig nachgewiesen werden [9, 155].

Die häufigste Phosphotransferase von *Acinetobacter* spp. ist APH(3')VI, welche Amikacin inaktiviert. Die für dieses Enzym kodierenden Gene sind vermutlich auf einem Transposon lokalisiert, wodurch deren Ausbreitung gefördert wird. Das Auftreten von Resistenzen gegenüber Amikacin korreliert mit der Häufigkeit der Anwendung dieses antibiotischen Wirkstoffes [9, 30].

Tabelle 4: Aminoglycosid-modifizierende Enzyme in *A. baumannii*, aus [9].

Enzym	Substrat
<u>Acetyltransferasen</u>	
AAC(2')I	Gent, Dib, Net, Tob
AAC(3)I	Gent, Sis
AAC(3)II	Gent, Dib, Net, Sis, Tob
AAC(3)IV	Pra, Gent, Dib, Net, Sis, Tob
AAC(6')I	Ami, Dib, Net, Sis, Tob
<u>Nukleotidyltransferasen</u>	
ANT(3'')I	Strep, Spec
ANT(3'')(9)	Strep, Spec
ANT(2'')I	Gent, Dip, Kan, Sis, Tob
<u>Phosphotransferase</u>	
APH(3')I	Kan, Liv, Neo, Paro
APH(3')II	But, Kan, Neo, Paro
APH(3')III	Ami, But, Kan, Liv, Neo, Paro
APH(3')VI	Ami, But, Kan, Neo, Paro
Erläuterung:	Ami = Amikacin; Dib = Dibekacin; Gent = Gentamicin; Liv = Lividomycin; Net = Netilmicin; Paro = Paromycin; Pra = Pramycin; Sis = Sisomicin; Spec = Spectinomycin; Strep = Streptomycin; Tob = Tobramycin

Resistenzen gegenüber Tetracyclinen basieren ebenfalls auf mehreren Mechanismen [9]. Neben den bereits beschriebenen Effluxpumpen, nehmen verschiedene ribosomale Schutzproteine (rSPs) entscheidenden Einfluss auf die Empfindlichkeit von *Acinetobacter*-Stämmen gegenüber Tetracyclinen. Diese wirken bakteriostatisch, indem sie die Akkomodierung der Aminoacyl-tRNS an die A (Aminoacyl)-Stelle des Ribosoms und somit das Entstehen einer neuen Peptidkette inhibieren. Das Antibiotikum zeigt dabei eine hohe Affinität zu verschiedenen Stellen der ribosomalen 30S-Untereinheit [49]. BRODERSEN *et al.* (2000) berichteten von zwei Bindungsstellen, einer sog. Haupt- und einer Nebenstelle (primary and secondary site) [26, 49], wohingegen PIOLETTI *et al.* (2001) sechs unterschiedliche Stellen differenzieren konnten (Tet-1 bis Tet-6) [49, 172]. Auf Grund der Vielzahl möglicher Ansatzstellen für das Antibiotikum, konnte bis dato nicht eindeutig geklärt werden, welche der acht Stellen biologische Relevanz im Bezug auf die Hemmung der Proteinbiosynthese besitzt. Hauptsächlich von Bedeutung ist vermutlich die Haupt- bzw. Tet-1-Stelle, da diese in unmittelbarer Nachbarschaft der A-Stelle liegt, wo Tetracycline an die Eindrechung der Helix 34 sowie die Schleife der Helix 31 der 16S rRNS binden. Alternativ müssen jedoch auch die Nebenstelle bzw. die Tet-5-Stelle in Betracht gezogen werden, die beide mit der sog. Sprunghelix der 16S rRNS assoziiert sind [49].

Die Bedeutung und Funktionalität der rSPs Tet(O) und Tet(M) im Bezug auf die Tetracyclinresistenz wurde 2003 von CONNELL *et al.* erläutert. Tet(O) konnte erstmalig aus

dem transferierbaren Plasmid pUA466 eines *Campylobacter jejuni*-Isolats geklont werden [49]. Man geht davon aus, dass Tet(O), wie auch die meisten anderen rSPs, ursprünglich von dem natürlichen Oxytetracyclin-Produzenten *Streptomyces rimosus* stammt [49, 121]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass rSPs eine hohe Sequenzhomologie zu den ribosomalen Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu aufweisen und demzufolge in die Translationsfaktor-Superfamilie der GTPasen eingruppiert werden [125, 193]. Diese Ähnlichkeit führte zu der Annahme, dass die rSPs evolutionär von den Elongationsfaktoren abstammen und im Laufe der Zeit zu Tetracyclin-resistenten Proteinen modifiziert wurden [193]. Durch diese Anpassung sind rSPs in der Lage, Tetracycline in Gegenwart von GTP von deren ribosomaler Bindungsstelle zu entfernen [32, 49, 219].

Resistenzen gegenüber Fluorchinolonen in *Acinetobacter* spp. nehmen stetig zu. Zielproteine der Fluorchinolone sind die Topoisomerasen II und IV, deren Modifikation für die Chinolonresistenz verantwortlich ist. Die Gene *gyrA* und *gyrB* kodieren für die DNS-Gyrase, die aus den beiden Untereinheiten A und B besteht. Dementsprechend kodieren *parC* und *parE* für die Topoisomerase IV. Mutationen im *gyrA*- und *parC*-Gen haben eine entscheidende Bedeutung für die Ausprägung von Resistenzen [9, 240]. Die Mutationen führen zu Modifikationen im Aminosäure-Kodon Ser-83, Ser-80 und/oder Glu-84. Im Gegensatz dazu sind Mutationen im *gyrB*- und *parE*-Gen von klinischen *E. coli*-Isolaten nicht immer mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen assoziiert [9].

Innerhalb der *A. baumannii*-Population gibt es Stämme, die eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol aufweisen. DEVAUD *et al.* (1982) stellten die Hypothese auf, dass dieser Eigenschaft die Produktion einer Chloramphenicol-spezifischen Acetyltransferase zu Grunde liegt [9, 60]. ELISHA und STEIN (1991) lokalisierten das dazugehörige Gen sowohl auf dem Chromosom als auch auf einem Plasmid eines klinischen *A. baumannii*-Isolats. Diese Tatsache legte die Vermutung nahe, dass es sich um ein Transposon handelt [9]. Im Gegensatz dazu konnte in einer späteren Studie in keinem der 54 untersuchten *A. baumannii*-Stämme das Gen für eine Chloramphenicol-spezifische Acetyltransferase nachgewiesen werden [9, 239].

5 Genotypische Charakterisierung von *Acinetobacter*

5.1 16S rRNS-Gen-Analyse

Das 16S rRNS-Gen dient der Identifizierung und phylogenetischen Klassifizierung von Bakterien. Es kodiert für die 16S rRNS, die in Verbindung mit 21 bakteriellen Proteinen (S1-S21) die ribosomale 30S-Untereinheit bildet. Dieser Komplex ist für die mRNA-Erkennung verantwortlich und formiert zusammen mit der 50S-Untereinheit das prokaryontische Ribosom [117]. Eine Sequenzierung des 16S rRNS-Gens erwies sich auch im Rahmen von *Acinetobacter*-Taxonomiestudien als nützlich [237]. Allerdings wiesen DNS-DNS-Hybridisierungsstudien z. T. abweichende Ergebnisse auf [83]. Die sechs Spezies des *Acb*-Komplexes wurden beispielsweise auf Grund niedriger 16S rRNS-Gen-Verwandtschaft in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt, eine beinhaltete *A. baumannii* und *A. genomosp.* 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]), die andere *A. calcoaceticus*, *A. genomosp.* 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]), *A. genomosp.* „close to 13TU“ und *A. genomosp.* „between 1 and 3“. Die Standardmethode zur *Acinetobacter*-Spezies-identifizierung, die DNS-DNS-Hybridisierung, wies dagegen einen hohen Verwandtschaftsgrad aller sechs Spezies von 65 % bis 70 % nach [18, 215]. Um eine stringente Speziesidentifikation zu ermöglichen, wurde festgelegt, dass eine 16S rRNS-Sequenzierung mindestens 1300 bp des Gens umfassen muss. Entscheidend für die Zugehörigkeit zu einer Spezies ist eine Übereinstimmung der Sequenzen von mindestens 99,7 %, gleichbedeutend mit einer Abweichung von höchstens 4 bp. Unterscheiden sich die 16S rRNS-Gene von zwei *Acinetobacter*-Stämmen in mehr als 4 bp, wird zusätzlich die Klassifizierung mittels DNS-DNS-Hybridisierung empfohlen [83].

5.2 S1-Nuclease-Hybridisierungsmethode

Die S1-Nuclease ist ein einzelstrangspezifisches Enzym aus dem Schimmelpilz *Aspergillus oryzae*. Unter geeigneten Bedingungen baut sie einzelsträngige DNS- und RNS-Polynukleotide ab [53]. Die S1-Hybridisierung wird genutzt, um die Menge einer spezifischen mRNA zu quantifizieren, die Startstelle der Transkription zu bestimmen, Integrongrenzen festzulegen oder um DNS-Homologien zu bestimmen [53, 209].

BOUVET und GRIMONT (1986) legten mit der Identifizierung von zwölf *Acinetobacter*-Spezies mittels der S1-Hybridisierungsmethode den Grundstein für die heutige Taxonomie. Die Analyse des Verwandtschaftsgrades erfolgte zunächst durch die Bestimmung der Hitzestabilität (T_M) der hybridisierten DNS. T_M ist definiert als die Temperatur, bei der 50 %

der reassozierten DNS für die S1-Nuclease hydrolysierbar werden [18, 53, 91]. Die Temperaturdifferenz (ΔT_M) zwischen der T_M homologer DNS und der T_M heterologer DNS wird gleichgesetzt mit der Basenpaar-Divergenz zwischen zwei DNS-Strängen [18]. Liegt der Wert unter 5°C ΔT_M und beträgt die DNS-DNS-Reassoziationsrate mindestens 70 %, geht man davon aus, dass es sich bei zwei Stämmen um dieselbe Spezies handelt [250].

5.3 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

Die ARDRA gehört in die Gruppe der PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP)-Analysen, die dem Nachweis von Sequenzunterschieden dienen [9]. Zunächst erfolgt eine Amplifikation der 16S rDNS mit nachfolgender Verdauung durch fünf (sieben) Restriktionsenzyme: *CfoI*, *AluI*, *MboI*, *MspI* und *RsaI* (*BfaI*, *BsmAI*) [9, 39, 65]. Die Restriktionsfragmente werden in einem Agarosegel separiert und anschließend visualisiert. Die so erhaltenen Fragmentmuster können mit bereits veröffentlichten Profilen von Referenz- und Feldstämmen verglichen werden und ermöglichen somit eine Spezies-einteilung von *Acinetobacter*-Isolaten [65, 232, 233]. *Acinetobacter*-Spezies besitzen zwischen fünf und zehn Kopien des 16S rRNS-Gens in ihrem Genom [67, 84]. Abweichungen bzgl. der Länge sowie Sequenz dieses DNS-Abschnitts bei Vertretern einer Art führten dazu, dass für die Spezies *A. baumannii* bis dato fünf verschiedene Restriktionsprofile beschrieben wurden [65]. Eine erweiterte Restriktion mit *BfaI* erlaubt die Abgrenzung der DNS-Gruppe 7 von den DNS-Gruppen 4 und 13BJ/14TU. Ebenso können durch Einsatz dieses Enzyms die DNS-Gruppen 5 und 17 differenziert werden. *BsmAI* erlaubt eine Unterscheidung der DNS-Gruppen 10 und 11. Lediglich die Spezies *A. haemolyticus* und die DNS-Gruppe 13BJ/14TU können anhand dieser Methode nicht differenziert werden [65]. Zahlreiche Untersuchungen mittels ARDRA zeigten, dass zum einen innerhalb einer *Acinetobacter*-Spezies mehrere Profile auftreten können, zum anderen, dass ein spezifisches Profil bei unterschiedlichen Spezies vorkommen kann [83]. Um Isolate auf Speziesebene exakt differenzieren zu können, sind somit ergänzende phäno- oder genotypische Tests notwendig [103, 153]. In Bezug auf die eng verwandten Arten des *Acb*-Komplexes ist jedoch allein die Untersuchung mittels ARDRA für eine Unterscheidung ausreichend [65].

5.4 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Makrorestriktionsanalyse bakterieller Genome mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) gilt als Goldstandard für die Typisierung von Bakterien [200]. Im Rahmen dieser Methode wird genomische DNS mit selten schneidenden Restriktionsenzymen hydrolysiert. Die daraufhin entstehenden relativ großen Fragmente (bis über 1000 kb) werden in einem alternierenden elektrischen Feld aufgetrennt [3, 9, 44, 45, 162, 196, 252]. Von den verschiedenen existierenden Techniken wird die sog. „Contour-clamped homogeneous electric field“ (CHEF)-Methode am häufigsten angewendet. Die multiplen Elektroden sind hier hexagonal um das Gel angeordnet und die beiden sich jeweils gegenüberliegenden Seiten des Sechsecks werden abwechselnd aktiviert. Der Reorientierungswinkel beträgt 120 °C, so dass die DNS-Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe in einem Zick-Zack-Kurs durch das Gel wandern [9, 83]. Um eine Zerstörung der DNS durch Scherkräfte zu verhindern, werden die Bakterienzellen vor der weiteren Behandlung in Agaroseblöckchen gegossen. Im Anschluss an die Zelllyse erfolgt bei *A. baumannii*-Stämmen die Restriktion mit *ApaI* (*SmaI*). Die resultierenden ca. 20-30 (20-40) Fragmente weisen eine Größe zwischen 10 und 300 (5-300) kb auf [90, 212]. Für die Analyse der Restriktionsmuster und die nachfolgende Kategorisierung der typisierten Isolate in vier Gruppen, dienen die Thesen von TENOVER *et al.* (1995) als Grundlage. Dabei wird zunächst der Stamm definiert, der für den jeweiligen Ausbruch verantwortlich ist („outbreak strain“). Anhand von stattgefundenen Punktmutationen, Insertionen und/oder Deletionen kann dann die epidemiologische Verwandtschaft der übrigen Isolate bestimmt werden [212].

BOERLIN *et al.* (2001) gelang die Typisierung von *Acinetobacter*-Isolaten aus einer Kleintierklinik in Bern. Die erhaltenen Restriktionsmuster ließen den Schluss zu, dass es sich um zwei unterschiedliche Ausbrüche innerhalb einer Klinik gehandelt hat. Einer der multiresistenten *A. baumannii*-Stämme aus der Kleintierklinik konnte zusätzlich bei einem Patienten der nahe gelegenen Pferdeklinik nachgewiesen werden. Obwohl der Ursprung der *A. baumannii*-Stämme nicht exakt festgelegt werden konnte, war es dennoch möglich, die Verbreitung und den Verwandtschaftsgrad der einzelnen Isolate zu eruieren [14].

SEIFERT *et al.* (2005) etablierten in einer Studie ein PFGE-Standardprotokoll für die Untersuchung von *Acinetobacter*-Isolaten, mit einer laborinternen Reproduzierbarkeit von 95 % sowie einer laborübergreifenden Wiederholbarkeit von 87 %. Die Ergebnisse eröffneten die Möglichkeit zur Errichtung einer elektronischen Datenbank für das Monitoring epidemischer Stämme [200].

5.5 Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse

Die hoch sensitive AFLP-Methode basiert auf der Analyse des gesamten bakteriellen Genoms [64] und wurde 1990 speziell für die Charakterisierung von *Acinetobacter*-Spezies in den Niederlanden und Belgien entwickelt [9, 63, 112, 113, 118, 151]. Für die Analyse wird zelluläre DNS mit zwei Enzymen geschnitten. Anschließend erfolgt eine Ligation der Restriktionsfragmente mit kurzen Doppelstrang-DNS-Sequenzen (Adapter). Die ligierten Fragmente werden nur dann mittels selektiver Primer amplifiziert, wenn die Nukleotide der Primer komplementär zu denen des Zielmoleküls sind. Einer der beiden Primer wird zudem markiert, was eine automatische Fragmentseparation sowie eine Detektion mit Hilfe eines Sequenzierungsgeräts ermöglicht [9, 112, 113, 118]. Diese Form des genomischen Fingerprintings erwies sich als verlässliche und relativ robuste Methode für die Differenzierung von *Acinetobacter*-Isolaten bis auf Subspezies-Ebene sowie für den Nachweis epidemiologischer Zusammenhänge [9, 66, 112, 228, 254]. Durch den Einsatz eines vereinfachten Protokolls der Universität Leiden unter Verwendung der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *MseI* gelang erstmalig die Beschreibung der sog. Europäischen (EU) Klone I-III [9, 154, 155, 228]. Bei diesen handelt es sich um multiresistente und genetisch stabile Stämme. Darüber hinaus zeichnen sich diese Stämme durch eine hohe Tenazität aus. Bis dato konnte jedoch nicht abschließend geklärt werden, ob bestimmte Virulenzeigenschaften oder eine erhöhte Fähigkeit zur Kolonisation immungeschwächter Patienten als Ursache für das beobachtete gehäufte Auftreten in Frage kommen [64]. Die Ausbreitung der Europäischen Klone I und II schien zunächst auf den Nordwesten Europas beschränkt zu sein, allerdings findet man seit einigen Jahren auch Stämme in Südeuropa sowie Afrika. Demnach muss von einer weltweiten Verbreitung der ersten beiden Klone ausgegangen werden [25, 156, 167, 168]. Der EU-Klon III erwies sich in den bislang durchgeführten Studien homogener als die anderen beiden Klone. Klon III konnte jedoch auch bereits in Spanien, Frankreich und den Niederlanden nachgewiesen werden [63, 64, 154, 228].

Obwohl die AFLP-Analyse eine Trennung von mehr als 50 Banden zulässt und somit zu den hochauflösenden Typisierungsverfahren zählt, hat sie den Nachteil, dass die Ergebnisse unterschiedlicher Laboratorien nicht miteinander verglichen werden können [63, 64].

5.6 Repetitive Extragenic Palindromic-PCR

Die „Repetitive Extragenic Palindromic (REP)“-PCR zählt neben der „Randomly amplified polymorphic DNA“-Analyse und der „Enterobacterial repetitive intergenic consensus“-

Analyse zu den PCR basierten Fingerprinting-Methoden [9]. Die aus 35 bp bestehende REP-Sequenz konnte erstmals bei *E. coli* und *Salmonella* Typhimurium nachgewiesen werden. Ihr Anteil am Gesamtgenom kann bis zu 1 % betragen, da sie in mehreren Kopien (500-1000) vorkommt [86, 207]. Die REP-Sequenz ist im Reich der Eubakterien weit verbreitet, die Konsensussequenzen der einzelnen Bakterien können sich jedoch voneinander unterscheiden. Sie sind vorzugsweise in extragenischen, nicht kodierenden Regionen lokalisiert [207]. LUPSKI *et al.* (1992) beschrieben ihre Beteiligung an der Genregulation sowie der Strukturierung und Umgestaltung von Chromosomen [132]. Die REP-Sequenzen sind zwar hochkonserviert, ihre Verteilung innerhalb des Genoms ist allerdings stammspezifisch und führt daher bei geeigneter Primerauswahl zu einer stammabhängigen Anzahl und Länge von PCR-Amplifikaten [238].

Mittels REP-PCR können *A. baumannii*-Isolate den in Europa vorkommenden Klonen I-III zugeordnet werden, so dass sie als schnelle und kostengünstige Alternative zur AFLP-Analyse Verwendung finden könnte [35, 108].

5.7 Multilocus Sequence Typing

Die MLST-Analyse ist eine relativ neue Methode der vergleichenden Sequenzanalyse von sieben „Housekeeping“-Genen zur Analyse von Populationsstrukturen [9, 74, 83]. Dabei werden unterschiedlichen Gensequenzen bestimmte Allele zugewiesen. Die sieben Sequenz-Allele eines Isolats ergeben dann das sog. Allel-Profil bzw. den Sequenztyp. Die Vorteile dieses Systems bestehen darin, dass die Daten zwischen verschiedenen Laboratorien vergleichbar sind und dass eine internationale Datenbank zur Verfügung steht (<http://www.mlst.net/>) [9]. Auch für die Spezies *A. baumannii* wurde ein MLST-System (<http://pubmlst.org/abaumannii/>) etabliert [7, 9]. Dieses basiert auf der Sequenzvielfalt von 305 bis 513 bp großen konservierten Regionen der Gene *gltA*, *gyrB*, *gdhB*, *recA*, *cpn60*, *gpi* und *rpoD*. Die Ergebnisse der Sequenzierung von 40 klinischen *A. baumannii*-Isolaten sowie Referenzstämmen korrelierten dabei mit denen der PFGE. Allerdings wurde bis dato lediglich eine begrenzte Anzahl an Stämmen mit Hilfe dieser Methode typisiert [7, 9]. Auch stellt sich die Frage, warum die Diskriminierung von *A. baumannii*- und *A. genomosp.* 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157])-Stämmen mittels MLST deutlich stärker ausgeprägt ist als bei anderen Organismen. Es ist deshalb verfrüht, die Sequenzierung mehrerer Gen-Loci für eine Populationsanalyse von *Acinetobacter*-Isolaten zu empfehlen [9].

V Material und Methoden

1 Materialien

1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien, Puffer und Medien sind im Anhang aufgelistet.

1.2 Herkunft der *Acinetobacter*-Isolate

Für die Durchführung der retrospektiven Studie wurden im Labor über einen Zeitraum von acht Jahren (2000-2008) 137 *Acinetobacter*-Isolate isoliert und konserviert. Von diesen Isolaten wurden für die vorliegende Arbeit 56 ausgewählt, die aus Probenmaterialien mit einem möglichst hohen *Acinetobacter*-Keimgehalt sowie einer geringgradigen Begleitflora stammten. Darüber hinaus wurde darauf geachtet, dass es sich nicht nur um Isolate aus verschiedenen Jahren sondern auch aus unterschiedlichen Lokalisationen handelte.

Tabelle 5: Überblick über die *Acinetobacter*-Feldisolate.

Isolat-Nr.	Tagebuch-Nr.	Isolierungsdatum	Patient	Probenmaterial	Herkunft
1	5880	22.11.2000	Hund	Kot	MVK1
2	5877	22.11.2000	Katze	Urin	MVK1
3	5966	24.11.2000	Katze	Urin	CVK
4	6020	28.11.2000	Katze	Urin	MVK1
5	6377	13.12.2000	Katze	Urin	CVK
6	132	09.01.2001	Hund	Pericardpunktat	MVK1
7	1237	12.03.2001	Hund	Urin	CVK
8	1765	05.04.2001	Katze	Urin	CVK
9	2740	31.05.2001	Katze	Urin	CVK
10	3906	16.08.2001	Hund	Urin	CVK
11	4255	28.08.2001	Hund	Abszess	CVK
12	5074	03.10.2001	Hund	Wunde	MVK1
13	3204	01.02.2002	Pferd	Sehnenscheidentupfer	CVK
14	P1697	07.03.2002	Pferd	Uterus	auT
15	1508	02.04.2002	Katze	Urin	AGVK
16	1626	09.04.2002	Katze	Urin	CVK
17	1782	16.04.2002	Katze	Urin	CVK
18	1778	16.04.2002	Katze	Urin	CVK
19	P3385	30.04.2002	Hund	Bronchialtupfer	auT
20	2258	14.05.2002	Katze	Urin	CVK

Fortsetzung der **Tabelle** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle**

Isolat-Nr.	Tagebuch-Nr.	Isolierungsdatum	Patient	Probenmaterial	Herkunft
21	2274	15.05.2002	Katze	Urin	CVK
22	2378	17.05.2002	Hund	Unterhautpunktat	CVK
23	2881	12.06.2002	Katze	Urin	CVK
24	2954	14.06.2002	Katze	Urin	CVK
25	3081	24.06.2002	Katze	Urin	CVK
26	3240	03.07.2002	Hund	Kot	MVK1
27	3349	10.07.2002	Hund	Duodenumtupfer	MVK1
28	3472	18.07.2002	Hund	Vaginaltupfer	AGVK
29	P5930	18.08.2002	Hund	Serumtupfer	auT
30	P81	08.01.2003	Hund	Nasentupfer	auT
31	172	14.01.2003	Hund	Urin	CVK
32	P872	08.02.2003	Hund	Nasentupfer	auT
33	848	26.02.2003	Hund	Bronchiallavage	MVK1
34	2130	19.03.2003	Katze	Urin	IfVP
35	P1959	20.03.2003	Katze	Thoraxerguss	auT
36	2677	26.05.2003	Hund	Urin	MVK1
37	4297	15.12.2005	Hund	Wunde	CVK
38	196-1	19.01.2006	Katze	Urin	MVK1
39	196-2	19.01.2006	Katze	Urin	MVK1
40	437	31.01.2006	Katze	Ohr	CVK
41	462	01.02.2006	-	Inventar	MVK1
42	P698	04.02.2006	Katze	Urin	auT
43	580	09.02.2006	Hund	Nase	CVK
44	1231a	24.03.2006	Katze	Urin	MVK1
45	1316	03.04.2006	Katze	Urin	CVK
46	P869	01.02.2008	Stute	Cervixtupfer	auT
47	760	02.02.2008	Hund	Blutkultur	MVK
48	1173	13.02.2008	Hund	Wunde	CVK
49	1227	18.02.2008	Hund	Vagina	AGVK
50	1356	21.02.2008	Hund	Fistel	CVK
51	P2134-1	20.03.2008	Wellensittich	Rachenabstrich	auT
52	P2347	29.03.2008	Meerschweinchen	Lippentupfer	auT
53	1936	29.03.2008	Hund	ZVK-Spülprobe	MVK1
54	2006	03.04.2008	Hund	ZVK-Spülprobe	MVK1
55	3061	12.06.2008	Rind	Eutertuch	AGVK
56	4199	15.08.2008	Hund	Vaginaltupfer	CVK

Erläuterung: **AGVK** = Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, JLU Gießen; **CVK** = Klinik für Kleintiere, Chirurgie, JLU Gießen; **IfVP** = Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen; **MVK** = Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, JLU Gießen; **auT** = außeruniversitäre Tierklinik/private Tierarztpraxis; **ZVK** = Zentraler Venenkatheter

Des Weiteren wurden die in **Tabelle 6** aufgelisteten Referenzstämme in allen phäno- und genotypischen Untersuchungen als Kontrollstämme eingesetzt. Der Referenzstamm COL 20820 wurde als externer Referenzstandard für die Normalisierung der Gele im Rahmen der Pulsfeldgelelektrophorese verwendet und zu diesem Zweck vom „Institute for Infectious Diseases, Leiden University Medical Center“, Niederlande (NL) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6: Überblick über die *Acinetobacter*-Referenzstämme.

Spezies	Probenmaterial	Stamm-Nr.	Herkunft
<i>A. baumannii</i>	Urin	19606 ^T	ATCC
<i>A. baumannii</i>	Blut	COL 20820	Köln
<i>A. calcoaceticus</i>	Boden	23055	ATCC
<i>A. calcoaceticus</i>	Cetananreicherung	1139	DSMZ
<i>A. genomsp. 3</i>	Cerebrospinale Flüssigkeit	19004	ATCC
<i>A. genomsp. 3</i>	Endotrachealaspirat	9308	DSMZ
<i>A. genomsp. 13TU</i>	k. A.	17903	ATCC

Erläuterung: ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland; DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; T = type strain; k. A. = keine Angaben

2 Methoden

2.1 Konservierung der Isolate

Alle Isolate wurden zur Aufbewahrung mit einem sterilen Tupfer von Blutagarplatten abgenommen, in ein steriles Kryoröhrchen mit 2 ml Rinderserum und 6 % Glucose überführt und bis zur Verwendung bei - 70 °C gelagert. Parallel dazu wurden die Kulturen lyophilisiert und bei + 4 °C aufbewahrt.

2.2 Phänotypische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von *Acinetobacter*-Isolaten

2.2.1 Kulturelle und mikroskopische Untersuchung

Zur Beurteilung der Koloniemorphologie erfolgte die Anzucht der Isolate auf Blutagarplatten. Die Bebrütungstemperatur betrug 37 °C, 41 °C und 44 °C über einen Zeitraum von 18-24 h. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die *Acinetobacter*-verdächtigen Isolate nach GRAM gefärbt.

2.2.2 Biochemische Untersuchungen

Zur Überprüfung, ob die untersuchten Isolate das Enzym Katalase besitzen, wurden auf einem Objektträger 4-5 Kolonien des jeweiligen *Acinetobacter*-Isolats in 50 µl einer 3 %igen H₂O₂-Lösung verrieben. Die Reaktion wurde als positiv bewertet, wenn nach einigen Sekunden eine Gasbildung sichtbar wurde.

Zum Nachweis des Enzyms Cytochromoxidase wurde Filterpapier mit Oxidasereagenz benetzt. Eine unmittelbar nach dem Verreiben von 2-3 Bakterienkolonien auf dem Papier einsetzende Blaufärbung wurde als positive Reaktion interpretiert.

Zur Prüfung des oxidativen und fermentativen Glucoseabbaus wurden die Isolate im Parallelansatz in zwei Kulturröhrchen mit halbfestem OF-Medium überimpft. Der Einstich erfolgte bis zum Boden. Eines der beiden Röhrchen wurde mit Paraffin überschichtet. Nach einer Bebrütung bei 37 °C für mindestens 24 h wurde ein Farbumschlag nach Gelb (infolge der Säurebildung) als positiv bewertet.

Der Nachweis der Citratverstoffwechslung erfolgte durch Beimpfen eines Citrat-Schrägagars. Dieser enthält als einzige Kohlenstoffquelle Citrat, so dass nur Citrat-verstoffwechselnden Bakterien ein Wachstum ermöglicht wird. Ein Farbumschlag nach Tiefblau zeigte eine positive Reaktion an.

Zur Überprüfung der Gelatinolyse wurde ein Röhrchen mit Gelatine mit den zu untersuchenden Isolaten beimpft. Nach einer 24-stündigen Bebrütung bei 37 °C wurde eine Verflüssigung des Eiweißes als positiv gewertet.

2.2.3 Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung

Zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterienisolaten gegenüber ausgewählten Antibiotika wurden der Agardiffusions- sowie Mikrobouillondilutionstest gemäß den „Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusions- und Dilutionstest von Bakterien tierischer Herkunft“ der CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), Dokumente M31-A2 sowie M31-S1, 2. Ausgabe 2002, angewendet. Diese Vorschriften wurden den Methoden aus dem „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ - Dokument M2- Durchführungsvorschriften für antimikrobielle Agardiffusions- und Dilutionsempfindlichkeitsprüfungen - angepasst.

2.2.3.1 Agardiffusionstest

Nach Anzucht der Isolate auf Blutagar erfolgte die Beimpfung von 1 ml Standard I-Nährmedium (NBI) mit zwei Bakterienkolonien. Die Trübung entsprach dabei einem McFarland-Trübungsstandard von 0,5. Im Anschluss wurden 45 µl der Bakteriensuspension auf DST-Agarplatten ausgespatelt und die ausgewählten Antibiotika in Form von Testplättchen auf die Agarplatten aufgelegt.

Die Empfindlichkeitsbeurteilung erfolgte durch Messung der durch Unterdrückung des Bakterienwachstums im Bereich der Testplättchen entstandenen Hemmhöfe. Eine Einteilung der *Acinetobacter*-Isolate in sensibel, intermediär oder resistent wurde in Anlehnung an die Vorgaben aus Tabelle 2 der CLSI-Interpretationskriterien für MHK und Hemmhofgröße (M31-A2, M100-S16) vorgenommen. Die Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika, für die das Institut keine Angaben bereithält, wurde anhand der Standards aus der DIN-Norm 58940 bzw. mit Hilfe der Herstellerangaben zu einem bestimmten Wirkstoff ermittelt.

Tabelle 7: Standards zur Interpretation der Hemmhofdurchmesser.

Antibiotikum	Menge der Wirksubstanz pro Plättchen	Interpretation (Hemmhofdurchmesser in mm)		
		sensibel	intermediär	resistent
Amikacin ¹	30 µg	≥ 17	15-16	≤ 14
Amoxicillin ²	10 µg	≥ 23	16-22	≤ 15
Amoxicillin/Clavulansäure ¹	20/10 µg	≥ 18	14-17	≤ 13
Cefovecin ³	30 µg	≥ 24	21-23	≤ 20
Cephalexin ⁴	30 µg	≥ 21	19-20	≤ 18
Chloramphenicol ¹	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12
Clindamycin ⁴	15 µg	≥ 26		≤ 19
Colistin ⁴	50 µg	≥ 15		≤ 14
Doxycyclin ¹	30 µg	≥ 16	13-15	≤ 12
Enrofloxacin ¹	5 µg	≥ 23	17-22	≤ 16
Fusidinsäure ⁴	10 µg	≥ 22	16-21	≤ 15
Gentamicin ¹	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Oxacillin ²	5 µg	≥ 16		≤ 15
Lincomycin ⁴	2 µg	≥ 21	15-20	≤ 14
Marbofloxacin ¹	5 µg	≥ 20	15-19	≤ 14
Penicillin G ²	10 Units	≥ 24	13-23	≤ 12

Fortsetzung der **Tabelle** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der **Tabelle**

Antibiotikum	Menge der Wirksubstanz pro Plättchen	Interpretation (Hemmhofdurchmesser in mm)		
		sensibel	intermediär	resistent
Polymyxin B ⁴	300 µg	≥ 12	9-11	≤ 8
Rifampicin ¹	5 µg	≥ 20	17-19	≤ 16
Sulfamethoxazol/Trimethoprim ¹	23,75/1,25 µg	≥ 16	11-15	≤ 10
Tetracyclin ¹	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14

Erläuterung:
1 nach CLSI
2 nach DIN 58940-3, Beiblatt 1
3 nach Pfizer Animal Health
4 nach Mast Diagnostica

2.2.3.2 Mikrobouillondilutionsverfahren

Die Durchführung der Mikrobouillondilutionsmethode erfolgte mit Hilfe sog. Micronaut-S-Kleintiertitrationsplatten, die speziell für die Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien im veterinärmedizinischen Bereich hergestellt wurden. Die Platten sind bereits mit 17 Antibiotika aus neun verschiedenen Antibiotikaklassen beschichtet. Um die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) der Keime gegenüber den Antibiotika zu ermitteln, wurden die Wirkstoffe in den dafür notwendigen Konzentrationen aufgetragen. Zudem weisen die Titrationsplatten drei Kavitäten für die Wachstumskontrollen des zu untersuchenden Bakterienisolats auf.

Um das Spektrum getesteter Antibiotika sowie -klassen zu erweitern, wurden zudem drei weitere Antibiotika mittels der beschriebenen Methode auf ihre *in vitro*-Aktivität getestet, die nicht in den Micronaut-S-Kleintiertitrationsplatten enthalten waren. Dafür wurden 96-well Mikrotitrationsplatten jeweils mit Imipenem, Colistin und Amikacin in verschiedenen Konzentrationen beschichtet.

Tabelle 8: Überblick über die im Mikrobouillondilutionstest verwendeten Antibiotika und ihre Konzentrationsbereiche.

Klasse	Antibiotikum	Konzentrationsbereich [µg/ml]
<u>β-Lactame</u>	Amoxicillin/Clavulansäure	0,5/0,25-32/16
	Ampicillin	0,125-32
	Oxacillin	0,25-4
	Penicillin G	0,125-16
<u>Cephalosporine</u>	Cefovecin	0,25-8
	Cephalotin	4-32
<u>Phenicol</u>	Chloramphenicol	2-16
<u>Lincosamide</u>	Clindamycin	0,25-4
<u>Fluorchinolone</u>	Difloxacin	0,125-2
	Enrofloxacin	0,0625-2
	Marbofloxacin	0,125-2
	Orbifloxacin	0,25-4
<u>Makrolide</u>	Erythromycin	0,0625-2
<u>Aminoglykoside</u>	Gentamicin	1-8
	Kanamycin	8-32
	Amikacin	2-256
<u>Tetracycline</u>	Tetracyclin	1-16
<u>Potenzierte Sulfonamide</u>	Trimethoprim/Sulfamethoxazol	1/19-4/76
<u>Polypeptide</u>	Colistin	0,125-16
<u>Carbapeneme</u>	Imipenem	0,5-64

Die Anzucht der einzelnen *Acinetobacter*-Isolate erfolgte auf Blutagarplatten über einen Zeitraum von 18-24 h bei 35 °C. Für die Herstellung des Inokulums wurden fünf Bakterienkolonien von der Blutagarplatte abgenommen und in 5 ml sterile physiologische NaCl-Lösung überführt. Im Anschluss wurde die Suspension „gevortext“ und auf einen McFarland-Standard von 0,5 eingestellt, so dass eine Dichte von 5×10^5 KBE/ml vorlag. 50 µl dieser Bakterienlösung wurden daraufhin in 11 ml Mueller-Hinton-Bouillon gegeben und auf Empfehlung der Fa. Merlin in einer 1:100 Verdünnung mit Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) supplementiert. Zur Beschickung der Mikrotitrationsplatten wurden jeweils 100 µl des Inokulums in alle

96 Kavitäten pipettiert. Die Kavitäten für die Wachstumskontrollen wurden dabei immer zuerst belegt, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch verschleppte Antibiotika zu verhindern. Jedes Inokulum wurde auf Reinheit und korrekte Keimdichte (5×10^5 KbE/ml) überprüft. Dazu wurden 10 µl des Inokulums auf Blutagar ausgestrichen und außerdem weitere 10 µl in 10 ml sterile physiologische NaCl-Lösung gegeben. Nach Durchmischen dieses Ansatzes wurden 100 µl auf eine frische Blutagarplatte ausgespatelt.

Die Bebrütung der beimpften Testplatten sowie der Einsaat und Wachstumskontrolle erfolgte für 18-24 h bei 35 °C. Um die Bildung von Kondenswasser an der Innen- bzw. Unterseite der Mikrotitrationsplatten zu vermeiden, wurden sie entweder in einer feuchten Kammer bebrütet oder mit Parafilm verschlossen.

Zur Qualitätskontrolle des Testsystems wurden an 30 aufeinanderfolgenden Tagen vier Kontrollstämme mitgeführt. Nach diesem Zeitraum wurde die Häufigkeit der Kontrollen auf eine wöchentliche Wiederholung reduziert.

Tabelle 9: Art und Herkunft der Kontrollstämme.

Spezies	Probenmaterial	ATCC- Bezeichnung	DSMZ- Bezeichnung
<i>Staphylococcus aureus</i>	Wunde	29213	2569
<i>Enterococcus faecalis</i>	Urin	29212	2570
<i>Escherichia coli</i>	k. A.	25922	1103
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Blutkultur	27853	1117

Erläuterung: ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland; DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig; k. A. = keine Angaben

Die minimale Hemmstoffkonzentration wird definiert als die niedrigste Konzentration eines antibiotischen Wirkstoffes, bei der mit bloßem Auge eine Wachstumshemmung der Bakterien erkennbar ist. Nach Ende der Bebrütungsdauer erfolgte die Bestimmung der MHK durch visuelle Auswertung unter Zuhilfenahme eines Mikrotitrationsplatten-Spiegels. Zuerst wurden die getrübbten Kavitäten mit den Wachstumskontrollen ohne Antibiotika-Lösung kontrolliert. Anschließend wurde für jedes Isolat und jedes Antibiotikum die Kavität bestimmt, in der gerade keine Trübung des Wirkstoff-Inokulum-Gemischs mehr erkennbar war. Die Wirkstoffkonzentration dieser Spalte entsprach der MHK des Isolats. Dabei wurde jedes Isolat mit seiner Wachstumskontrolle verglichen.

Die Kontrolle der Einsaat erfolgte durch Zählung der Einzelkolonien. Dabei entsprach eine Anzahl von ca. 50 Kolonien einer gewünschten Inokulationsdichte von 5×10^5 KbE/ml.

Abschließend wurde die Reinheits- und Wachstumskontrolle auf eventuelle Begleitkeime überprüft.

2.3 Molekulargenetische Untersuchungen zur Identifizierung und Differenzierung von *Acinetobacter*-Isolaten

2.3.1 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

2.3.1.1 DNS-Extraktion

Nach Inkubation der *Acinetobacter*-Isolate auf Blutagar unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 37 °C erfolgte die Überführung von 3-5 Einzelkolonien in 300 µl destilliertes Wasser. Die Bakteriensuspension wurde „gevortext“ und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 10 min im Wasserbad gekocht.

2.3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die in der PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von der Fa. Eurofins mwg/operon synthetisiert und auf eine Endkonzentration von 0,2 µM eingestellt.

Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotid-Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Länge des Amplifikats [bp]
SK 16S for	TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGC	1483
SK 16S rev	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	

Zur Herstellung der Reaktionsansätze für $n + 1$ Testansätze wurden folgende Reagenzien verwendet:

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (50 μ l) für die PCR.

Reagenz	Menge/Testansatz	Stammkonzentration	Endkonzentration
<i>A. dest.</i>	36 μ l	-	-
Reaktionspuffer	5 μ l	10 x	1 x
MgCl ₂	1,5 μ l	50 mM	1,5 mM
dNTPs	1,25 μ l	4 mM	100 μ M
Primer	je 0,5 μ l	20 μ M	0,2 μ M
Platinum®Taq DNA Polymerase	0,25 μ l	5 U/ μ l	1,25 U

Die Template-DNS (5 μ l) wurde zuletzt und außerhalb des PCR-Raums zugegeben.

Die Amplifikation des 16S rRNS-Gens erfolgte im Thermocycler 1.

Tabelle 12: Cyclerprogramm für die PCR.

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Extension
1.	95 °C- 5 min	-	-
2.-36.	95 °C- 45 sek	50 °C- 45 sek	72 °C- 60 sek
37.	-	-	72 °C- 7 min

2.3.1.3 Agarosegelelektrophorese 1

Die Auftrennung bzw. Darstellung von PCR-Amplifikaten erfolgte in horizontalen Flachbettgelen mit 1 %iger Agarose mit einer angelegten Spannung von ca. 6 V pro cm Elektrodenabstand über 1,5 h. Als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet. Zur Darstellung der PCR-Produkte wurden die Gele mit 0,1 μ g/ml Ethidiumbromid versetzt. Der Probenauftrag erfolgte nach Mischen von 1 μ l PCR-Ansatz mit 3 μ l 6 x Loading-Puffer und 14 μ l 1 x TAE. Zur Bestimmung der molekularen Masse wurde der Größenstandard λ Hind III/EcoRI mitgeführt.

2.3.1.4 Restriktion des 16S rRNS Gens

Jedes Amplifikat wurde in getrennten Ansätzen mit fünf Restriktionsenzymen verdaut.

Tabelle 13: Für die Restriktion verwendete Restriktionsenzyme.

Enzym	Isoschizomere	Schnittstelle	Puffer
<i>CfoI</i>	<i>Hin6I</i>	5'...GCG↓C...3' 3'...C↑GCG...5'	1 x Tango 100 %
<i>AluI</i>		5'...AG↓CT...3' 3'...TC↑GA...5'	1 x Tango 100 %
<i>MboI</i>		5'...↓GATC...3' 3'...CTAG↑...5'	1 x Tango 100 %
<i>RsaI</i>		5'...GT↓AC...3' 3'...CA↑TG...5'	1 x Tango 100 %
<i>MspI</i>		5'...C↓CGG...3' 3'...GGC↑C...5'	1 x Tango 100 %

Tabelle 14: Zusammensetzung des Testansatzes (20 µl) für die Restriktion.

Reagenz	Menge/Testansatz	Stammkonzentration	Endkonzentration
<i>A. dest.</i>	12,5 µl	-	-
1 x Tango 100 %	2,0 µl	10 x	1 x
Restriktionsenzym	0,5 µl	10U/µl	5 U
PCR-Probe	5 µl		
Volumen/Ansatz	20 µl		

Nachdem die Reagenzien alle in ein 1,5 µl Reaktionsgefäß pipettiert worden waren, wurden sie „gevortext“ und für 18-24 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.3.1.5 Agarosegelelektrophorese 2

In Analogie zu 2.3.1.3 erfolgte die Darstellung der entstandenen Restriktionsfragmente nach Mischen von 10 µl Restriktionsansatz mit 1,5 µl 6 x Loading-Puffer und 6,5 µl 1 x TAE. Für die Separation der Restriktionsfragmente wurde ein 2,5 %iges Agarosegel benutzt. Zur Bestimmung der molekularen Masse wurde der Größenstandard GeneRuler™ 100 bp DNA-ladder mitgeführt. Bei einer angelegten Spannung von ca. 6 V pro cm Elektrodenabstand betrug die Laufzeit 1,75 h.

2.3.1.6 Auswertung

Die Interpretation der Restriktionsprofile und daraus resultierend die Spezieszuordnung erfolgte in Anlehnung an die Ergebnisse von DIJKSHOORN *et al.* 1998 [65].

2.3.2 Pulsfeldgelelektrophorese

Die Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese erfolgte nach der modifizierten Methode von SEIFERT *et al.* (2005) [200].

2.3.2.1 Präparation der Isolate

2.3.2.1.1 Anzucht

Die Anzucht der *Acinetobacter*-Isolate erfolgte auf Iso-Sensitest-Agar unter aeroben Bedingungen für 18-24 h bei 30 ± 1 °C.

2.3.2.1.2 Herstellung der Agaroseblöckchen

Einstellung der optischen Dichte. Zur Einbettung der Bakterienzellen in sog. Agaroseblöckchen wurden zunächst mehrere Einzelkolonien mit einer sterilen Plastiköse vom Nährboden abgenommen und in 2 ml Zellsuspensionspuffer überführt. Die optische Dichte der Keimsuspensionen wurde in einem Photometer bei 540 nm bestimmt. Dazu wurden 0,5 ml der zu bestimmenden Keimsuspension eingesetzt. Um sicher zu stellen, dass in jedem Agaroseblöckchen 10^9 KbE/ml vorliegen, wurde das einzusetzende Volumen nach folgender Formel berechnet:

$$x = 2,6991/OD_{540nm}$$

x = Volumen in ml, das der gewünschten Bakterienmenge entspricht

OD_{540 nm} = mittels Photometer gemessene OD bei 540 nm

2,6991 = mittels Tropfplattenverfahren ermittelte OD_{540 nm} bei 10^9 KbE/ml.

Tropfplattenverfahren. Die Keimzahlbestimmung im Tropfplattenverfahren erfolgt in Anlehnung an die „Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMGB L06.00-18 und -19“. Nach Anzucht der Bakterien auf Blutagar erfolgte die

Überführung von ca. 5 Einzelkolonien in 1 ml sterile, physiologische NaCl-Lösung. Nach Homogenisieren der Bakteriensuspension wurde die OD bei einer Wellenlänge von 540 nm ermittelt. Im Anschluss erfolgte das Anlegen einer log₁₀-Verdünnungsreihe in steriler, physiologischer NaCl-Lösung. Je Verdünnungsstufe wurden zweimal 10 µl auf eine Blutagarplatte aufgetropft und über die Platte verteilt. Die Bebrütung der Platten erfolgte für 18 h bei 37 °C. Anschließend wurden diejenigen Platten ausgewertet, bei denen ca. 10 bis 300 Kolonien gut abgrenzbar waren. Die Keimzahl in der Ausgangsbouillon wurde nach der folgenden Formel errechnet:

$$\text{Keimzahl [KbE/ml]} = (\text{ausgezählte Kolonien} \times 100) \times \text{Verdünnungsstufe}$$

Herstellung eines Zellpellets. Die berechnete Menge x wurde in ein 2 ml Mikrozentrifugenröhrchen überführt und bei 13.000 \times g für 1 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 1 ml Zellsuspensionspuffer resuspendiert. Anschließend wurden 300 µl der eingestellten Zellsuspension in ein 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen pipettiert und im Wasserbad für 10 min bei 55 °C inkubiert.

Proteinase K-Vorverdau. Für den Proteinase K-Vorverdau wurden der Zellsuspension 15 µl Proteinase K (20 mg/ml Stocklösung, 500 µg/ml Endkonzentration) zugesetzt. Das Mischen des Röhrcheninhalts erfolgte durch mehrmaliges Schwenken.

Giessen der Agaroseblöckchen. Zum Giessen der Agaroseblöckchen wurde eine 1 %ige SeaKem Gold Agarose verwendet, welche nach dem Aufkochen bis zur weiteren Verwendung in einem 56 °C warmen Wasserbad flüssig gehalten wurde. 300 µl der Bakteriensuspension und 300 µl der flüssigen Agarose wurden vermengt und je 100 µl der Mischung umgehend in die Giessförmchen (Plug Molds) gefüllt. Die Förmchen wurden zum Abkühlen für 10 min auf Eis gelagert.

2.3.2.2 Bakterienlyse

Die erstarrten Agaroseblöckchen wurden anschließend in ein Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel überführt und mit 1,5 ml Lysepuffer sowie 7,5 ml Proteinase K (20 mg/ml

Stocklösung, 100 µg/ml Endkonzentration) inkubiert. Nach der Inkubation im Schüttelwasserbad für 2 h bei 55 °C, wurde der Puffer vorsichtig abpipettiert.

Die Waschlösungen wurden vor dem Waschen auf ca. 55 °C vorgeheizt. Daraufhin wurden die Blöckchen zweimal mit jeweils 1,5 ml autoklaviertem, deionisiertem Wasser für 10 min bei 55 °C gewaschen. Im Anschluss folgten drei Waschschritte mit jeweils 1,5 ml TE-Puffer für 15 min bei 55 °C. Um die Effizienz dieser Schritte zu erhöhen, wurde ein Schüttelwasserbad verwendet. In frischem TE-Puffer können die Blöckchen mehrere Wochen bei 4 bis 8 °C aufbewahrt werden.

2.3.2.3 Restriktion

Für den Verdau der Zellen wurde die Restriktionsendonuclease *ApaI* verwendet.

Je ein Blöckchen wurde in ein 15 ml PS-Plastikgefäß überführt und zur Äquilibrierung mit 200 µl 1 x *ApaI*-Puffer (inklusive 100 µg/ml Bovines Serumalbumin) für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgenommen und durch Zugabe von 200 µl frischem 1 x *ApaI*-Puffer (inklusive 100 µg/ml Bovines Serumalbumin) + *ApaI* (30 U) ersetzt. Es folgte die Inkubation des Verdaus für 2 h bei 25 °C im Brutschrank.

2.3.2.4 Gelelektrophorese

Die Enzym-Puffer-Lösung wurde vorsichtig abgenommen und die verdauten Blöckchen bis zur Elektrophorese in autoklaviertem TBE-Puffer gelagert.

Zur Durchführung der CHEF-Pulsfeldgelelektrophorese wurden 120 ml einer 1 %igen Agarose (SeaKem Gold Agarose, in 0,5 x TBE-Puffer) hergestellt. 2 ml der noch flüssigen Agarose wurden abgenommen und im Wasserbad bei 50 °C flüssig gehalten. Die restliche Agarose wurde zum Giessen eines horizontalen Gels mit 15 Probenaschen à 1,5 mm Breite verwendet, welches für 60 min bei RT aushärtete.

Die PFGE-Kammer wurde mit 2 Liter 0,5 x TBE-Puffer befüllt und auf 14 °C vorgekühlt.

Das Laden der Proben erfolgte durch Präparation von 3-4 mm langen Blöckchenabschnitten. Diese wurden vorsichtig und ohne Lufteinschlüsse an die Vorderwand der Probenaschen verbracht. Außerdem wurden 1 mm breite Stücke eines Molekülgrößenstandards (Lambda-Ladder-PFG-Marker) in gleicher Weise in die Probenaschen eingesetzt. Anschließend erfolgte das Verschließen aller Probenaschen mit der flüssig gehaltenen Agarose. Nach etwa

15-minütigem Aushärten der Probenaschen konnte das Gel in die vorgekühlte PFGE-Kammer überführt werden. Die Elektrophorese wurde anschließend unter folgenden Laufbedingungen im CHEF-Mapper durchgeführt.

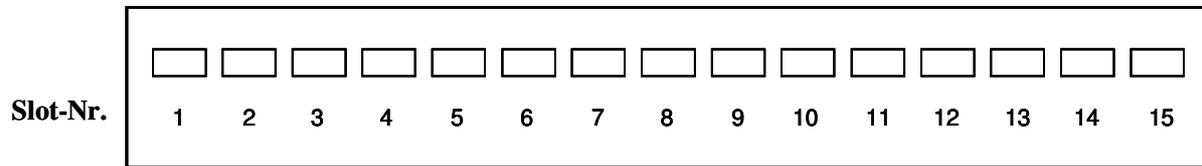


Abbildung 2: Gellayout bei der PFGE.

- | | |
|------------------------------|----------------------------|
| Spur 1: Lambda Ladder | Spur 9: Feldisolat |
| Spur 2: COL 20820 | Spur 10: Feldisolat |
| Spur 3: Feldisolat | Spur 11: COL 20820 |
| Spur 4: Feldisolat | Spur 12: Feldisolat |
| Spur 5: Feldisolat | Spur 13: Feldisolat |
| Spur 6: COL 20820 | Spur 14: Feldisolat |
| Spur 7: Feldisolat | Spur 15: COL 20820 |
| Spur 8: Feldisolat | |

Tabelle 15: Elektrophorese-Parameter für die Auftrennung der *ApaI*-Restriktionsfragmente.

Parameter	Laufbedingung
Laufzeit	19 h
Spannung	6 Volt/cm
Winkel des elektrischen Feldes	120°
Pulszeiten	5 bis 20 sek
Temperatur	14 °C
Laufpuffer	0,5 x TBE-Puffer

Nach Beendigung der Laufzeit wurde das Gel für 20 min in Ethidiumbromid-Lösung (4 mg/Liter) bei RT unter ständigem Wippen gefärbt. Anschließend erfolgte die Entfärbung für dreimal 15 min mit insgesamt 2 Liter autoklaviertem *A. dest.* bei RT auf einer Wippe.

Die Makrorestriktionsmuster der Isolate wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und dokumentiert.

Bei jeder Elektrophorese wurde der Stamm COL 20820 (**Tabelle 6**), von dem je vier DNS-Proben auf jedem Gel angeordnet wurden, als externer Referenzstandard für die Normalisierung der Gele mitgeführt. Die Anzucht dieses Stamms sowie die Aufbereitung der DNS bis zur Elektrophorese erfolgten wie beschrieben.

Konnte auf Grund von Autodigestion der DNS während der Elektrophorese kein Makrorestriktionsmuster des entsprechenden Stamms erstellt werden, wurde die PFGE für die entsprechenden Stämme wiederholt. Alle Schritte wurden wie beschrieben durchgeführt.

2.3.2.5 Auswertung

Die Auswertung der Muster erfolgte mit Hilfe des Programms BioNumerics (Software Package 5.10 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) und wurde im „Institute for Infectious Diseases, Leiden University Medical Center“, NL durchgeführt.

2.3.3 Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse

2.3.3.1 Kriterien zur Auswahl der *Acinetobacter*-Isolate

Die AFLP-Analyse wurde mit 27 (Nr. 2-4, 9, 13-14, 17, 20, 30, 31, 35-36, 38, 40, 41, 43, 44-49, 51-53 und 55-56) der insgesamt 56 *A. baumannii*-Feldisolate durchgeführt. Die Stämme wurden so ausgewählt, dass alle nachgewiesenen PFGE-Typen mindestens einmal vertreten waren. Die nötige Ausrüstung zur Durchführung sowie eine geeignete Software für die Analyse der Ergebnisse befinden sich im „Institute for Infectious Diseases, Leiden University Medical Center“, NL. Die praktische Durchführung der AFLP-Analyse erfolgte in den dortigen Laboratorien.

2.3.3.2 DNS-Isolation

Die Präparation der bakteriellen DNS erfolgte nach BOOM *et al.* (1990) [15].

Am Anfang der DNS-Isolation stand die Herstellung einer frischen Übernachtkultur auf Iso-Sensitest-Agar bei 30 °C. Am darauf folgenden Tag wurde eine sterile Plastiköse mit Bakterienkolonien in 100 µl 1 x TE-Puffer in einem 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen suspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml Lysepuffer sowie 40 µl Kieselgur. Damit die Nukleinsäuren an die Trägermoleküle binden können, wurden die Reagenzien für ca. 1 min vorsichtig gemischt. Durch die nachfolgende Zentrifugation bei 14.000 x g für 20 sek bei Raumtemperatur kommt es zur Sedimentation der Komplexe, so dass der Überstand vorsichtig abgenommen werden konnte. Um die Entstehung von Cyanidgasen zu vermeiden, wurde der Überstand unverzüglich in einen Behälter mit 5 N NaOH überführt. Das Waschen des Pellets erfolgte zweimal mit jeweils 900 µl Waschpuffer, zweimal mit 900 µl 70 %igem unvergälltem Ethanol und einmal mit 900 µl Aceton, wobei das Pellet bei jedem Schritt vollständig homogenisiert wurde. Zwischen den einzelnen Waschschrritten erfolgte eine Zentrifugation bei 14.000 x g für 20 sek bei Raumtemperatur. Der

abgenommene Überstand wurde nach der Behandlung mit Waschpuffer ebenfalls in den 5 N NaOH-Lösung enthaltenden Behälter entsorgt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet für ca. 10 min bei 56 °C getrocknet, bis der Acetongeruch vollständig verschwunden war. Als Rehydratationspuffer für das Pellet dienten 100 µl 1 x TE-Puffer. Nach Homogenisierung verweilten die Mikrozentrifugenröhrchen für 10 min bei 56 °C in einem Schüttelwasserbad. Durch nachfolgende Zentrifugation bei 14.000 x g für 5 min bei Raumtemperatur konnte der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Abschließend wurden 25 µl RNase (0,25 mg/ml) zum Überstand pipettiert und für 15 min bei 37 °C inkubiert, so dass im Anschluss die Menge aufgereinigter DNS ermittelt werden konnte.

2.3.3.3 Restriktion und Ligation

Die in der PCR verwendeten *MseI*- und *EcoRI*-Adapter wurden von der Fa. Isogen Life Science, NL synthetisiert. Die Endsequenzen der Adapter entsprechen nicht exakt der jeweiligen Restriktionsschnittstelle, sondern sind in einer Base verändert. Auf Grund dessen können die Restriktion sowie die Ligation simultan erfolgen, ohne dass die ligierten Adapter durch die Restriktionsenzyme wieder entfernt werden.

Tabelle 16: Überblick über die Restriktionsenzyme.

Enzym	Schnittstelle	Puffer
<i>EcoRI</i>	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	Buffer H 100 %
<i>MseI</i>	5'...T↓TAA...3' 3'...AAT↑T...5'	1 x NEBuffer 100 %

Tabelle 17: Verwendete Adaptersequenzen.

Adapter	Sequenz (5'-3')
<i>EcoRI</i> -Adapter 1	CTCGTAGACTGCGTACC
<i>EcoRI</i> -Adapter 2	AATTGGTACGCAGTCTAC
<i>MseI</i> -Adapter 1	GACGATGAGTCCTGAG
<i>MseI</i> -Adapter 2	TACTCAGGACTCATC

Zur Herstellung eines Reaktionsansatzes für $n + 1$ Testansätze wurden folgende Reagenzien verwendet:

Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (10 μ l) für die Restriktion/Ligation.

Reagenz	Menge/Testansatz	Stammkonzentration	Endkonzentration
T4-Ligasepuffer	1 μ l	10 x	1 x
NaCl	0,5 μ l	1 M	50 mM
BSA	0,5 μ l	1 mg/ml	50 μ g/ml
<i>Eco</i> RI	0,083 μ l	12 U/ μ l	1 U/Reaktion
<i>Mse</i> I	0,1 μ l	10 U/ μ l	1 U/Reaktion
T4-Ligase	0,4 μ l	10 U/ μ l	4 U/Reaktion
<i>Eco</i> RI-Adapter 1/2	0,4 μ l	5 pmol/ μ l	2 pmol/ μ l
<i>Mse</i> I-Adapter 1/2	0,4 μ l	50 pmol/ μ l	20 pmol/ μ l
<i>A. dest.</i>	1,617 μ l	-	-

Die Template-DNS (5 μ l) wurde zuletzt zum Testansatz gegeben.

Die Restriktion der aufgereinigten DNS sowie die Ligation erfolgten für 3 h bei 37 °C. Um eine Kondensation am Deckel des Reaktionsgefäßes zu verhindern, wurde der Mastermix im Abstand von 60 sek zentrifugiert. Nach Beendigung der Inkubation erfolgte eine Verdünnung des Reaktionsansatzes mit 0,1 M TE-Puffer im Verhältnis 1:20. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Templates bei - 20 °C gelagert.

2.3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

Der in der PCR verwendete *Mse*I+C-Oligonukleotid-Primer wurde von der Fa. Isogen Life Science, NL synthetisiert. Der Cy5-fluoreszenzmarkierte *Eco*RI+A-Primer stammt von der Fa. Eurogentec, Maastricht, NL.

Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotid-Primer.

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')
<i>Mse</i> I+C-Primer ¹	GATGAGTCCTGAGTAAc
Cy5- <i>Eco</i> RI+A-Primer ²	Cy5-GACTGCGTACCAATTCa

Erläuterungen: ¹enthält als selektive Base Cytosin
²enthält als selektive Base Adenin, Cy5-markiert

Zur Herstellung eines Reaktionsansatzes für n + 1 Testansätze wurden folgende Reagenzien verwendet:

Tabelle 20: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (10 µl) für die PCR.

Reagenz	Menge/Testansatz	Stammkonzentration	Endkonzentration
PCR-Puffer	1 µl	10 x	1 x
MgCl ₂	0,6 µl	25 mM	1,5 mM
<i>Eco</i> RI-A-Primer	0,4 µl	50 ng/µl	2 ng/µl
<i>Mse</i> I+C-Primer	1,2 µl	50 ng/µl	6 ng/µl
dNTPs	0,1 µl	20 mM	0,2 mM
Goldstar® Taq DNA Polymerase	0,2 µl	5 U/µl	1 U/Reaktion
<i>A. dest.</i>	1,5 µl	-	-

Abschließend wurden dem PCR-Ansatz 5 µl des verdünnten Templates hinzugefügt.

Tabelle 21: Cyclerprogramm für die PCR.

Zyklus	Denaturierung	Annealing	Extension
1.	72 °C- 2 min	-	-
2.	94 °C- 2 min	-	-
3.-15.	94 °C- 30 sek	65-0,7 °C- 30 sek	72 °C- 60 sek
16.-38.	94 °C- 30 sek	56 °C- 30 sek	72 °C- 60 sek
39.			72 °C- 10 min

2.3.3.5 Express-Gel

Zur Bedienung des ALFexpress II DNA Analyse Systems diente das ALFexpress Benutzerhandbuch, Kapitel 5.

Vor der Beladung des Polyacrylamidgels wurden 10 µl der jeweiligen PCR-Produkte mit 3 µl Ladepuffer gemischt und für 5 min bei 94 °C denaturiert. Nach Entnahme der Proben aus dem Thermocycler, wurden sie bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die Beladung des AFLP-Gels erfolgte mit 2,5 µl einer jeden Probe in den Spuren 1-40 sowie einer entsprechenden Anzahl Kontrollen zur späteren Normalisierung der Gele mittels geeigneter Software. Zudem wurden in den Spuren 0 und 41 Negativkontrollen (Ladepuffer) mitgeführt.

Als Laufpuffer dienten 2 Liter 0,5 x TBE-Puffer.

Tabelle 22: Parameter und Laufbedingungen für die Auftrennung der *EcoRI/MseI*-Restriktionsfragmente.

Parameter	Laufbedingung
Laufzeit	500 min
Temperatur	50 °C
Leistung	30 Watt
Pulszeiten	2 sek
Laufpuffer	0,5 x TBE-Puffer

2.3.3.6 Auswertung

Die Auswertung der Muster erfolgte mit Hilfe des Programms BioNumerics (Software Package 5.10 Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien) und wurde im „Institute for Infectious Diseases, Leiden University Medical Center“, NL durchgeführt.

2.4 Untersuchungen zur klinischen Relevanz von *A. baumannii*-Isolaten bei Tieren

Zunächst wurde die Anzahl der Patienten ermittelt, bei denen in den Jahren 2007 und 2008 *A. baumannii* nachgewiesen werden konnte. Zu diesem Zweck wurden Proben berücksichtigt, die von Patienten der Kleintier- und Pferdeklinik, der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, der Klinik für Wiederkäuer und Schweine sowie von Sektionsmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen gewonnen wurden.

In einem zweiten Schritt wurden nur die Proben der Kleintierklinik der JLU Gießen weiter berücksichtigt, in denen *A. baumannii* entweder als Reinkultur oder Mischkultur mit einer Begleitflora isoliert werden konnte.

VI Ergebnisse

1 Phänotypische Charakterisierung

1.1 Morphologie und kulturelle Eigenschaften

Die primäre Anzucht von 56 verdächtigen Bakterienisolaten gelang nach 18-24-stündiger aerober Bebrütung bei 37 °C. Die Isolate wuchsen auf Blutagarplatten zu kleinen bis mittelgroßen, runden, glatten, teils schleimigen, opaken, nicht hämolysierenden Kolonien heran. Bei 44 °C wiesen die Isolate Nr. 30 und 51 ein eingeschränktes Wachstum auf, für die Isolate Nr. 43 und 52 war kein Wachstum nachweisbar. Die übrigen 52 Isolate zeigten bei 44 °C ein Wachstum auf Blutagar.

Alle 56 kultivierten *Acinetobacter*-Isolate erwiesen sich in den nach GRAM gefärbten Präparaten mikromorphologisch als gramnegative bis gramlabile kokkoide Stäbchenbakterien.

1.2 Biochemische Eigenschaften

Für alle Isolate konnte eine Katalaseaktivität ermittelt werden. Der Nachweis der Enzyme Cytochromoxidase und Gelatinase verlief in allen Fällen negativ. Alle Isolate bauten Glucose oxidativ ab und verstoffwechselten Citrat.

Anhand der phänotypischen Merkmale konnten 52 der 56 Feldisolate als *A. baumannii* identifiziert werden. Vier Stämme erwiesen sich auf Grund des eingeschränkten bzw. fehlenden Wachstums bei 44 °C als non-*A. baumannii*-Spezies.

1.3 Antibiotikaempfindlichkeit

1.3.1 Agardiffusionstest

Insgesamt wurde die Empfindlichkeit der *Acinetobacter*-Feldisolate sowie die in dieser Studie mitgeführten Referenzstämme gegenüber 20 in der Tiermedizin verwendete Antibiotika getestet. Alle 56 getesteten *Acinetobacter*-Isolate waren gegenüber Cephalexin, Clindamycin, Fusidinsäure, Lincomycin, Oxacillin, Penicillin G und Rifampicin resistent. Mit Ausnahme von jeweils einem bzw. zwei Isolaten erwiesen sich zudem alle gegenüber Cefovecin (außer Nr. 52), Chloramphenicol (außer Nr. 22) und Colistin (außer Nr. 21 und 38) resistent.

Unempfindlichkeiten gegenüber Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Doxycyclin, Enrofloxacin, Gentamicin, Marbofloxacin, Tetracyclin sowie Trimethoprim/Sulfamethoxazol konnten bei 64 % bis 93 % der Isolate nachgewiesen werden. Am geringsten ausgeprägt waren die Resistenzen gegenüber Amikacin und Polymyxin B. Polymyxin B zeigte eine *in vitro*-Aktivität bei 54 der Isolate, nur die beiden Feldisolate Nr. 50 und Nr. 10 zeichneten sich durch eine intermediäre Empfindlichkeit bzw. Resistenz gegenüber dem Wirkstoff aus. Sechs Isolate (Nr. 1, 2, 32, 39, 46 und 50) erwiesen sich als resistent gegenüber Amikacin, die restlichen zeigten eine intermediäre (n = 16) bzw. eine vollständige (n = 34) Empfindlichkeit. In **Tabelle 23** sind die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusionstest der 56 Feldisolate sowie der Referenzstämmen zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 23: Antibiotikaempfindlichkeit der 56 *Acinetobacter*-Feldisolate sowie der 6 Referenzstämmen gegen 20 verschiedene Antibiotika (Agardiffusion).

Antibiotikum	Feldisolate (n = 56)			Referenzstämmen (n = 6)		
	Empfindlichkeit [%]			Empfindlichkeit [%]		
	resistent	intermediär	sensibel	resistent	intermediär	sensibel
Amikacin	11	29	61	0	17	83
Amoxicillin	93	7	0	33	50	17
Amoxicillin/Clavulansäure	68	20	13	0	0	100
Cefovecin	98	2	0	66	17	17
Cephalexin	100	0	0	83	0	17
Chloramphenicol	98	2	0	50	17	33
Clindamycin	100	0	0	83	17	0
Colistin	96	0	4	17	0	83
Doxycyclin	79	4	18	83	17	0
Enrofloxacin	84	4	13	0	0	100
Fusidinsäure	100	0	0	83	17	0
Gentamicin	66	4	30	0	17	83
Lincomycin	100	0	0	83	17	0
Marbofloxacin	84	0	16	0	0	100
Oxacillin	100	0	0	83	0	17
Penicillin G	100	0	0	83	0	17
Polymyxin B	2	2	96	0	0	100
Rifampicin	100	0	0	67	0	33
Tetracyclin	88	9	4	0	17	83
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	64	0	36	17	0	83

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung für die einzelnen *Acinetobacter*-Feldisolate sind im Anhang (**Tabelle 33**) aufgelistet.

1.3.2 Mikrobouillondilutionsverfahren

Mittels Mikrobouillondilution wurde die Empfindlichkeit der Feldisolate sowie der Referenzstämme gegenüber 20 Antibiotika evaluiert. Alle Isolate zeigten eine Resistenz gegenüber Cephalotin, Chloramphenicol, Clindamycin, Erythromycin, Oxacillin und Penicillin G. Resistenzraten im Bereich von 66 % bis 95 % ergaben sich gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin, Cefovecin, Colistin, Difloxacin, Enrofloxacin, Gentamicin, Kanamycin, Marbofloxacin, Orbifloxacin, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Nur jeweils ein Isolat war resistent gegenüber Amikacin (Nr. 46) und Imipenem (Nr. 4).

In **Tabelle 24** sind die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung mittels Mikrobouillondilutionsverfahren der 56 Feldisolate sowie der Referenzstämme zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 24: Antibiotikaempfindlichkeit der 56 *Acinetobacter*-Feldisolate sowie der 6 Referenzstämme gegen 20 verschiedene Antibiotika (Mikrobouillondilution).

Antibiotikum	Feldisolate (n = 56)			Referenzstämme (n = 6)		
	Empfindlichkeit [%]			Empfindlichkeit [%]		
	resistent	intermediär	sensibel	resistent	intermediär	sensibel
Amikacin	2	0	98	0	0	100
Amoxicillin/Clavulansäure	73	16	11	17	50	33
Ampicillin	79	14	7	50	17	33
Cefovecin	89	11	0	33	50	17
Cephalotin	100	0	0	100	0	0
Chloramphenicol	100	0	0	67	33	0
Clindamycin	100	0	0	100	0	0
Colistin	95	0	5	33	0	67
Difloxacin	84	0	16	0	0	100
Enrofloxacin	84	0	16	0	17	83
Erythromycin	100	0	0	83	0	17
Gentamicin	66	0	34	33	17	50
Imipenem	2	0	98	0	0	100
Kanamycin	75	2	23	0	0	100
Marbofloxacin	82	2	16	0	0	100
Orbifloxacin	82	2	16	0	0	100
Oxacillin	100	0	0	100	0	0
Penicillin G	100	0	0	100	0	0
Tetracyclin	79	7	14	0	0	100
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	68	0	32	33	0	67

Die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung für die einzelnen *Acinetobacter*-Feldisolate sind im Anhang (**Tabelle 33**) aufgelistet.

1.3.3 Vergleich der beiden Resistenzanalysen

Die Empfindlichkeit der *Acinetobacter*-Feldisolate gegenüber 13 der insgesamt 27 getesteten Antibiotika wurde sowohl mittels Agardiffusion als auch Mikrobouillondilution ermittelt (**Abbildung 3**). Bei den Antibiotika Cefovecin, Chloramphenicol, Clindamycin, Oxacillin und Penicillin G ergaben sich übereinstimmende Ergebnisse. Beide Tests detektierten eine intermediäre Empfindlichkeit bzw. eine Resistenz gegenüber den genannten fünf Wirkstoffen bei allen Isolaten. Des Weiteren konnte ein einheitliches Ergebnis für die Antibiotika Enrofloxacin und Marbofloxacin nachgewiesen werden. In beiden Verfahren wiesen die beiden Fluorchinolone eine *in vitro*-Aktivität gegenüber 16 % der *Acinetobacter*-Isolate auf. Für die Antibiotika Amoxicillin/Clavulansäure, Colistin, Gentamicin, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol ergaben sich hinsichtlich der Anzahl empfindlicher Isolate Abweichungen im Bereich von 1 % bis 10 %. Die größte Diskrepanz konnte für das Antibiotikum Amikacin aufgezeigt werden. Während mittels Mikrobouillondilution 98 % der Feldisolate eine Empfindlichkeit aufwiesen, waren es im Agardiffusionstest nur 59 %.

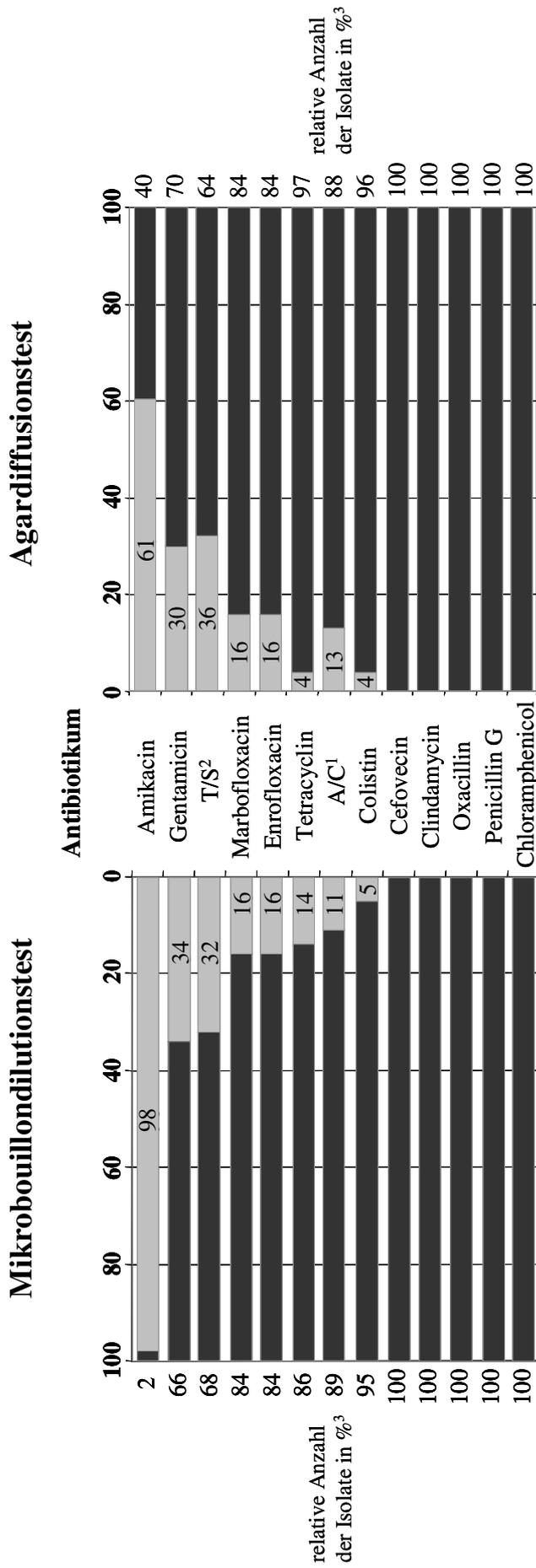


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus beiden Resistenzanalysen mit dem Agardiffusions- und dem Mikrobouillonddilutionstest bei 56 *Acinetobacter*-Isolaten.

¹A/C = Amoxicillin/Clavulansäure

²T/S = Trimethoprim/Sulfamethoxazol

³ Sensible Isolate

³ Intermediäre und resistente Isolate

2 Molekulargenetische Charakterisierung

Eine weiterführende Differenzierung der 56 animalen *Acinetobacter*-Isolate erfolgte anhand molekulargenetischer Untersuchungen der 16S rRNS-Gene sowie der Erstellung genetischer Fingerabdrücke mit Hilfe von zwei verschiedenen Typisierungsmethoden.

2.1 Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

2.1.1 Nachweis der *Acinetobacter*-spezifischen 16S rRNS-Gene

Mittels PCR konnte bei allen 56 *Acinetobacter*-Feldisolaten ein 16S rRNS-Gen mit einer Größe von 1483 bp nachgewiesen werden. In **Abbildung 4** und **Abbildung 5** sind die Amplifikate des Gens von vier Referenzstämmen (ATCC 19606^T, ATCC 23055, ATCC 19004 und ATCC 17903) bzw. zehn Feldisolaten exemplarisch dargestellt.

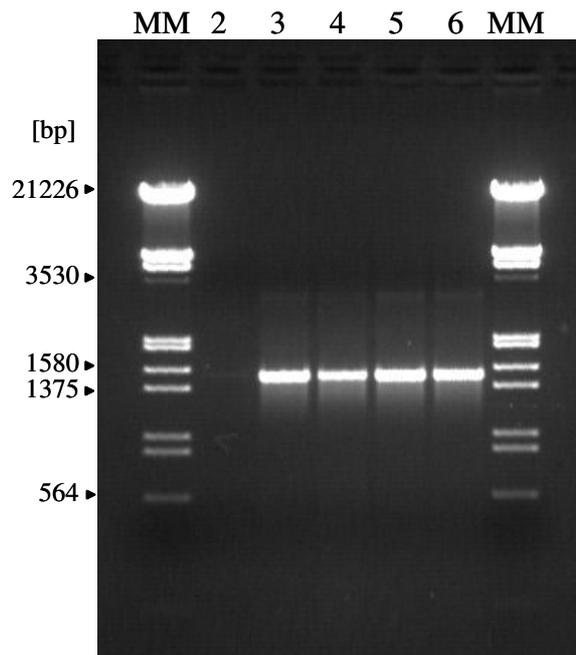


Abbildung 4: PCR-Elektropherogramm (1 %iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung) zum Nachweis des 16S rRNS-Gens bei *Acinetobacter*-Referenzstämmen.

Spur 2: *A. dest.* (Negativkontrolle)

Spur 3: *A. baumannii*-Referenzstamm, ATCC 19606^T

Spur 4: *A. calcoaceticus*-Referenzstamm, ATCC 23055

Spur 5: *A. genomosp. 3*-Referenzstamm, ATCC 19004

Spur 6: *A. genomosp. 13TU*-Referenzstamm, ATCC 17903

MM = Molekularmassenmarker λ Hind III/EcoRI

bp = Basenpaare

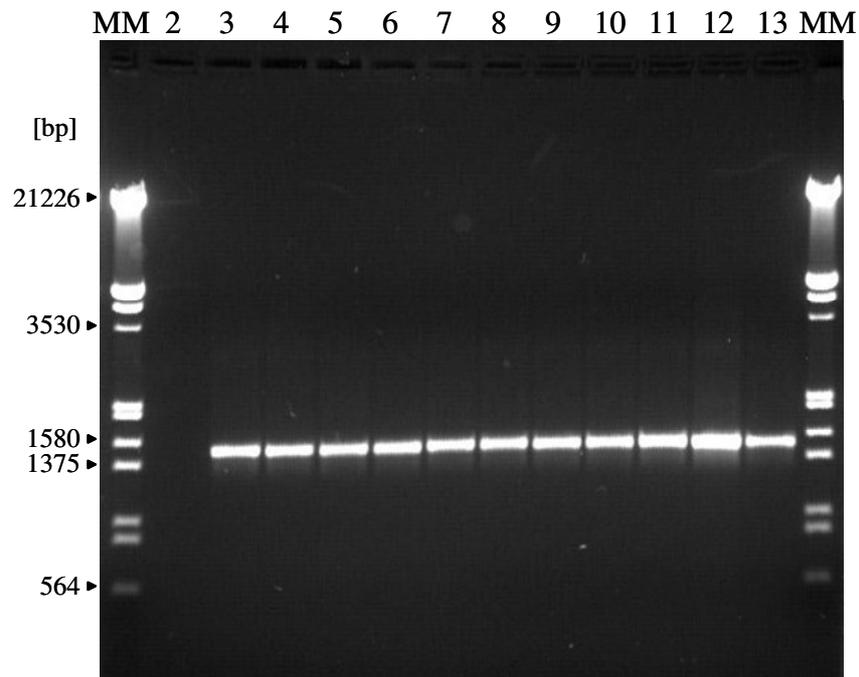


Abbildung 5: PCR-Elektropherogramm (1 %iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung) zum Nachweis des 16S rRNS-Gens bei *Acinetobacter*-Feldisolaten.

Spur 2: *A. dest.* (Negativkontrolle)
Spur 3: *A. baumannii*-Referenzstamm, ATCC 19606^T (Positivkontrolle)
Spur 4: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 1
Spur 5: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 2
Spur 6: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 3
Spur 7: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 4
Spur 8: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 5

Spur 9: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 6
Spur 10: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 7
Spur 11: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 8
Spur 12: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 9
Spur 13: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 10
MM = Molekularmassenmarker
 λ Hind III/EcoRI
bp = Basenpaare

2.1.2 Restriktionsanalyse

Durch die Restriktion des 16S rRNS-Gens mit fünf verschiedenen Restriktionsendonucleasen (*CfoI*, *AluI*, *MboI*, *RsaI* und *MspI*) konnten für die untersuchten *Acinetobacter*-Isolate insgesamt elf unterschiedliche Restriktionsmuster nachgewiesen werden (**Abbildung 6**). Es ergaben sich jeweils zwei Muster für den Verdau mit den Restriktionsenzymen *CfoI*, *AluI*, *MboI* und *RsaI* sowie drei für die Restriktion mit *MspI*. Das *MspI*-Muster 1+3 stellt dabei eine Kombination der Muster 1 und 3 dar [84]. Für die Speziesidentifizierung der *Acinetobacter*-Isolate erfolgte die Nummerierung der einzelnen Restriktionsmuster nach DIJKSHOORN *et al.* 1998 [65].

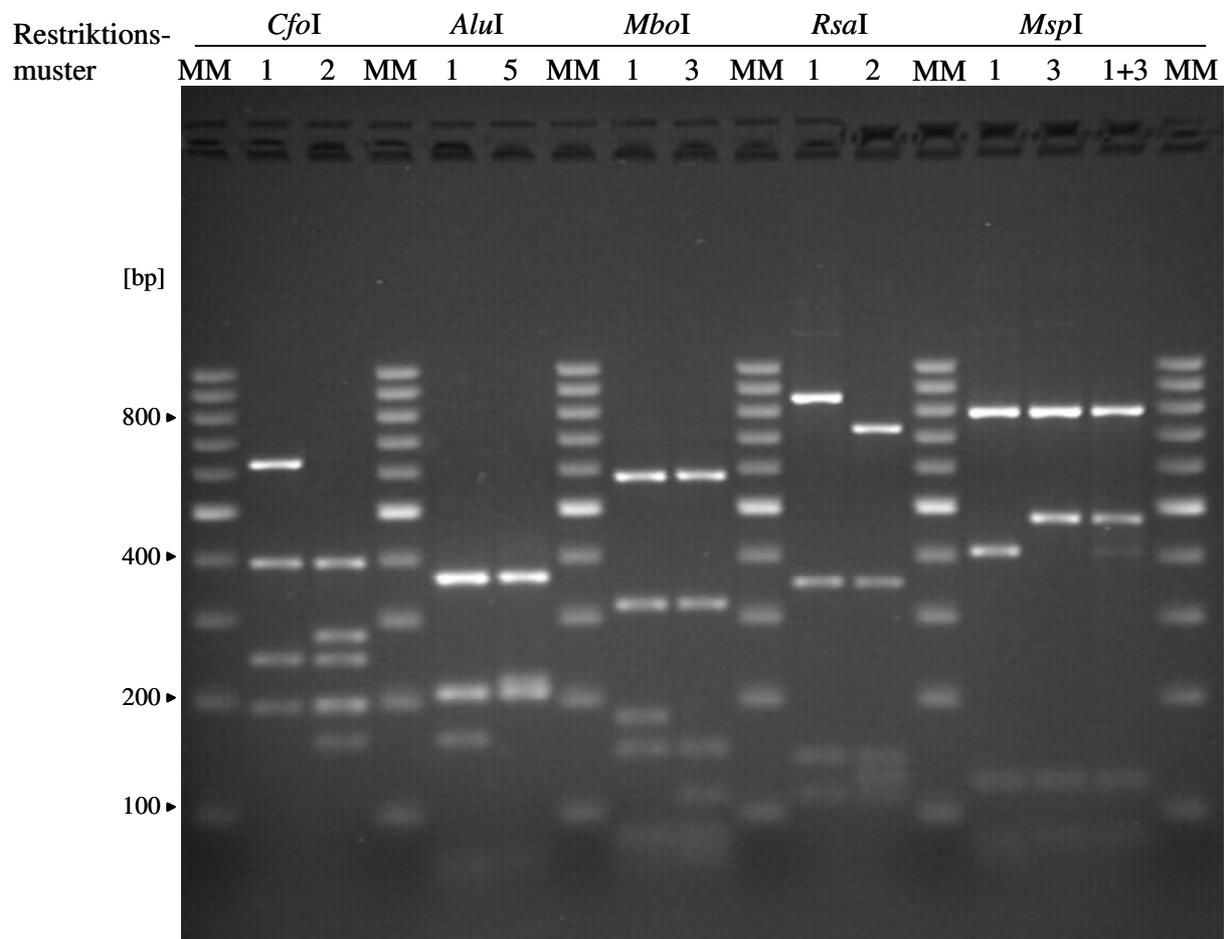


Abbildung 6: Restriktionsmuster der 56 animalen *Acinetobacter*-Feldisolate bei Verwendung von 5 Restriktionsenzymen in 2,5 %igem Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung.

MM = Molekularmassenmarker 100 bp ladder
 bp = Basenpaare

Die Restriktionsanalyse führte zur Identifizierung von fünf unterschiedlichen Restriktionsprofilen. Deren Interpretation erfolgte durch den Vergleich mit bereits beschriebenen Profilen aller bis dato bekannten *Acinetobacter*-Spezies [232].

Die Restriktionsprofile sowie deren Spezieszuordnung sind in **Tabelle 25** aufgeführt.

Tabelle 25: Überblick über das Gesamtergebnis der Restriktionsanalyse von 56 *Acinetobacter*-Feldisolaten.

Anzahl der Isolate pro Restriktionsprofil	Restriktionsmuster mit					Spezies	Identität mit Referenzstamm
	<i>CfoI</i>	<i>AluI</i>	<i>MboI</i>	<i>RsaI</i>	<i>MspI</i>		
11	1	1	1	2	1	<i>A. baumannii</i>	ATCC 19606 ^T
4	1	1	1	2	3	<i>A. baumannii</i>	ATCC 17904
37	1	1	1	2	1+3	<i>A. baumannii</i>	LMD 82,54
3	2	1	3	2	3	<i>A. genomsp. 3</i>	ATCC 19004
1	2	5	1	1	3	unklassifiziert	-

Erläuterung: ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland; LMD = LMD Culture Collection, Netherlands; T = type strain

Insgesamt konnten 52 der 56 *Acinetobacter*-Feldisolate der Spezies *A. baumannii* zugeordnet werden. Innerhalb dieser Spezies zeigten sich allerdings Variationen im *MspI*-Muster. Für elf Isolate konnte das Muster Nr. 1 nachgewiesen werden, vier Isolate zeigten das Muster Nr. 3 und für 37 der untersuchten Isolate konnte eine Kombination der beiden ersten Muster ermittelt werden. Die Speziesidentifikation der Feldisolate Nr. 30, 51 und 52 erfolgte durch den Vergleich der erhaltenen Restriktionsprofile mit dem des *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157])-Referenzstamms (ATCC 19004). Alle drei zeigten ein analoges Profil. Das *Acinetobacter*-Isolat Nr. 43 wies ein Profil auf, das keiner der bislang bekannten Spezies zugeordnet werden konnte.

Alle phänotypisch als *A. baumannii* charakterisierten Isolate konnten mittels PCR-RFLP-Analyse als solche bestätigt werden. Die vier non-*A. baumannii*-Isolate erwiesen sich auf Grund abweichender Restriktionsprofile entweder als *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157]) (Nr. 30, 51 und 52) oder wurden als nicht klassifiziert (Nr. 43) definiert.

2.2 Typisierungsergebnisse mittels PFGE

Um die Klonalität der animalen *Acinetobacter*-Isolate zu bestimmen, wurden sie zunächst einer Makrorestriktionsmuster-Analyse mittels CHEF-PFGE unterzogen. Diese Methode gilt bis heute als Goldstandard für die Typisierung von Bakterien. Für die Restriktion von Vertretern des Genus *Acinetobacter* erwies sich dabei die Restriktionsendonuclease *ApaI*, die 6 bp GC-reiche Sequenzen erkennt, als geeignet. Durch den Verdau des gesamten Genoms konnten zwischen 20 und 30 Restriktionsfragmente mit einer Größe von 10 bis 400 kb dargestellt werden. Die Restriktionsmuster von drei *Acinetobacter*-Feldisolaten (Nr. 14, 43

und 51) konnten auf Grund von Selbstverdau der DNS nicht beurteilt werden. **Abbildung 7** zeigt exemplarisch das Ergebnis für 10 der 56 untersuchten Feldisolate.

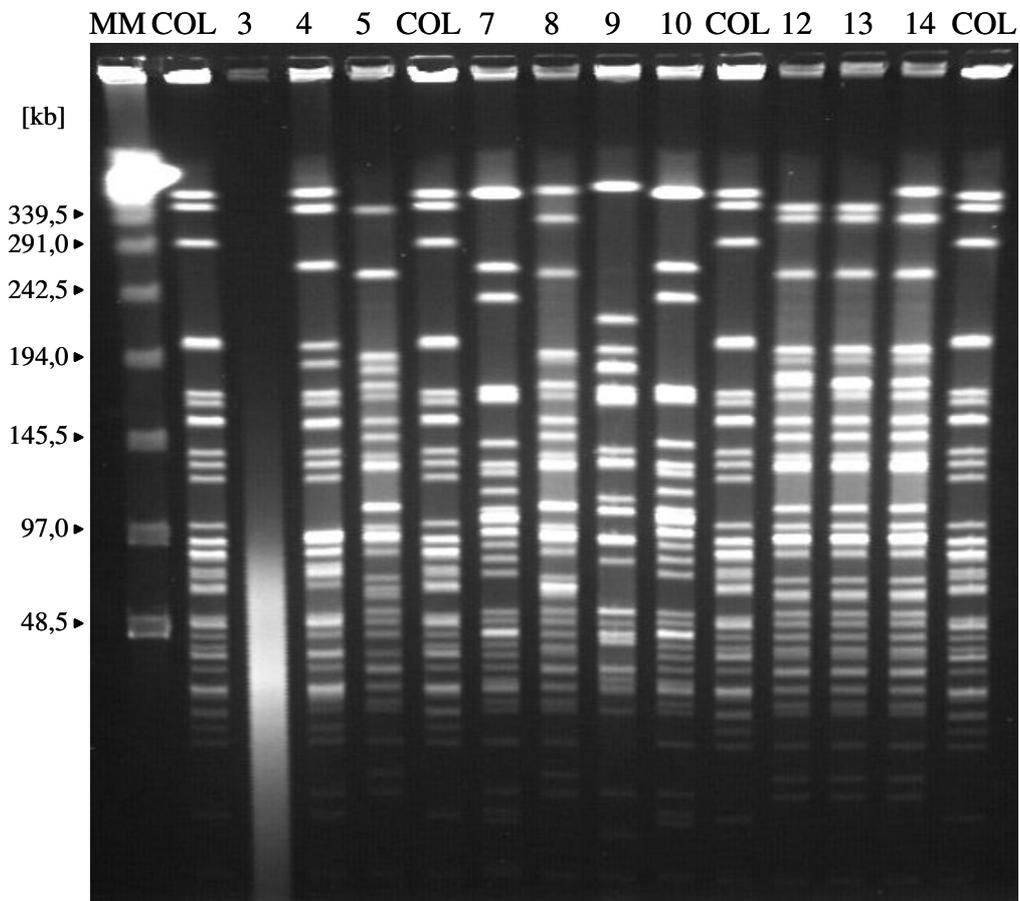


Abbildung 7: Pulsfeldgelelektrophorese von 10 animalen *Acinetobacter*-Isolaten nach Restriktion mit *ApaI* in 1 %igem Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung.

Spur 3: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 43
Spur 4: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 44
Spur 5: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 45
Spur 7: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 46
Spur 8: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 47
Spur 9: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 49
Spur 10: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 50
Spur 12: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 1

Spur 13: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 2
Spur 14: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 3
MM = Molekularmassenmarker
 Lambda Ladder PFG Marker
COL = COL 20820,
 externer Referenzstandard
kb = Kilobasenpaare

Für die vergleichende Untersuchung der Isolate wurde insbesondere das Bandenmuster im Bereich zwischen 45 kb und 400 kb herangezogen mit, je nach Isolat, 14-20 Fragmenten. Als externer Referenzstandard diente der Stamm COL 20820. Dieser wurde mehrfach auf jedem Gel mitgeführt. Unter Verwendung von *ApaI* konnten auf diese Weise 20 verschiedene Restriktionsprofile (A-T) innerhalb der 52 *A. baumannii*-Isolate identifiziert werden sowie zwei (U+V) innerhalb der *A. genomosp.* 3-Isolate (**Abbildung 8**).

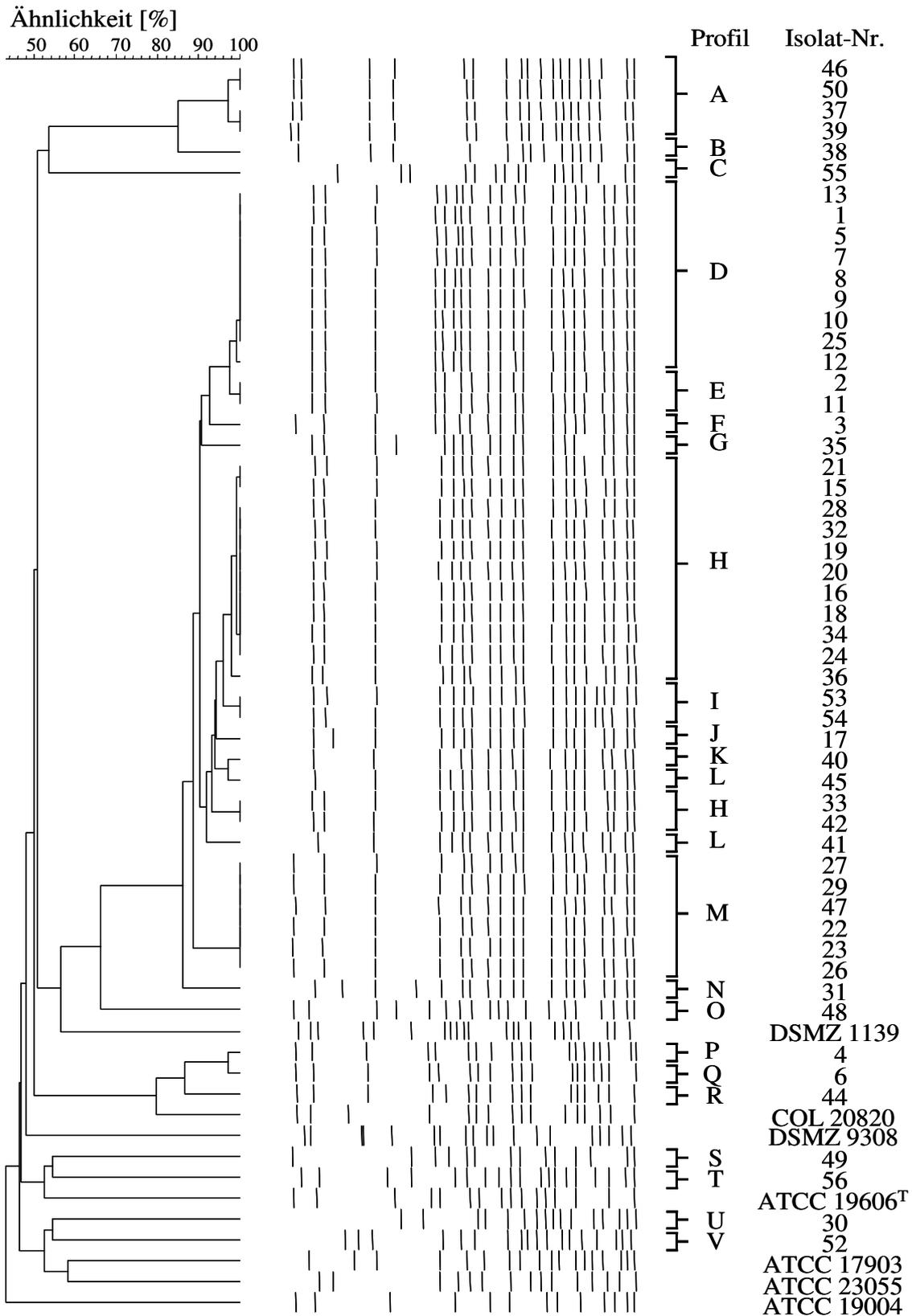


Abbildung 8: Dendrogramm zur Darstellung der Restriktionsprofile von 52 *A. baumannii*- und zwei *A. genomosp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157])-Feldisolaten (Nr. 30 und 52).

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Anlehnung an eine Studie von SEIFERT *et al.* (2005), in der für die Zugehörigkeit der Isolate zu einem (Ausbruchs-) Klon ein Cut-off von 87 % bzgl. der Bandenidentität definiert wurde. Auf dieser Basis konnten drei Cluster mit insgesamt 44 *A. baumannii*-Isolaten sowie neun einzelne PFGE-Typen (Nr. 30-31, 38, 44, 48-49, 52, 55 und 56) nachgewiesen werden (**Abbildung 10**).

Das erste Cluster umfasste dabei vier Isolate (Nr. 37, 39, 46 und 50) mit einer molekularen Ähnlichkeit von 97 %. Innerhalb dieser Gruppe konnten zwei Subcluster (1a und 1b) differenziert werden, deren jeweilige Vertreter einen zu 100 % identischen genetischen Fingerabdruck aufwiesen. Allen vier Isolaten wurde das Restriktionsprofil A zugeordnet. Die Vertreter dieser Gruppe stammten aus den Jahren 2005 (Nr. 37), 2006 (Nr. Nr. 39) sowie 2008 (Nr. 46 und 50) und wurden aus Proben der Kleintierklinik der JLU Gießen bzw. einer außeruniversitären Kleintierklinik isoliert.

Im Cluster 2 gruppierte sich mit einer Ähnlichkeit von 89 % die größte Anzahl an Isolaten (Nr. 1-3, 5, 7-13, 15-29, 32-36, 40-42, 45, 47 und 53-54). Diese 38 Isolate zeigten insgesamt zehn Restriktionsprofile (D-M), wobei die Profile D, H und M mit neun, elf und sechs Vertretern am häufigsten auftraten. Innerhalb des zweiten Clusters konnten zudem sieben Subcluster (2a-2g) differenziert werden. Die Isolate stammten aus den Jahren 2000-2003, 2006 und 2008 aus vier Kliniken und dem Institut für Veterinär-Pathologie der JLU Gießen. Insgesamt stellte sich diese Gruppe sehr heterogen dar.

Die Isolate Nr. 4 und 6 clusterten bei 97 % und bildeten somit das dritte Cluster. Beide Isolate wiesen ein eigenständiges Profil auf (P+Q) und wurden in den Jahren 2000 und 2001 aus Proben der Kleintierklinik, Innere Medizin, der JLU Gießen isoliert.

Die neun einzelnen PFGE-Typen clusterten weit unterhalb des Cut-offs von 87 % und zeigten daher nur eine geringe genetische Verwandtschaft mit den Isolaten der drei Cluster.

Abbildung 9 zeigt die 13 Profile, die innerhalb der Cluster 1-3 auftraten.

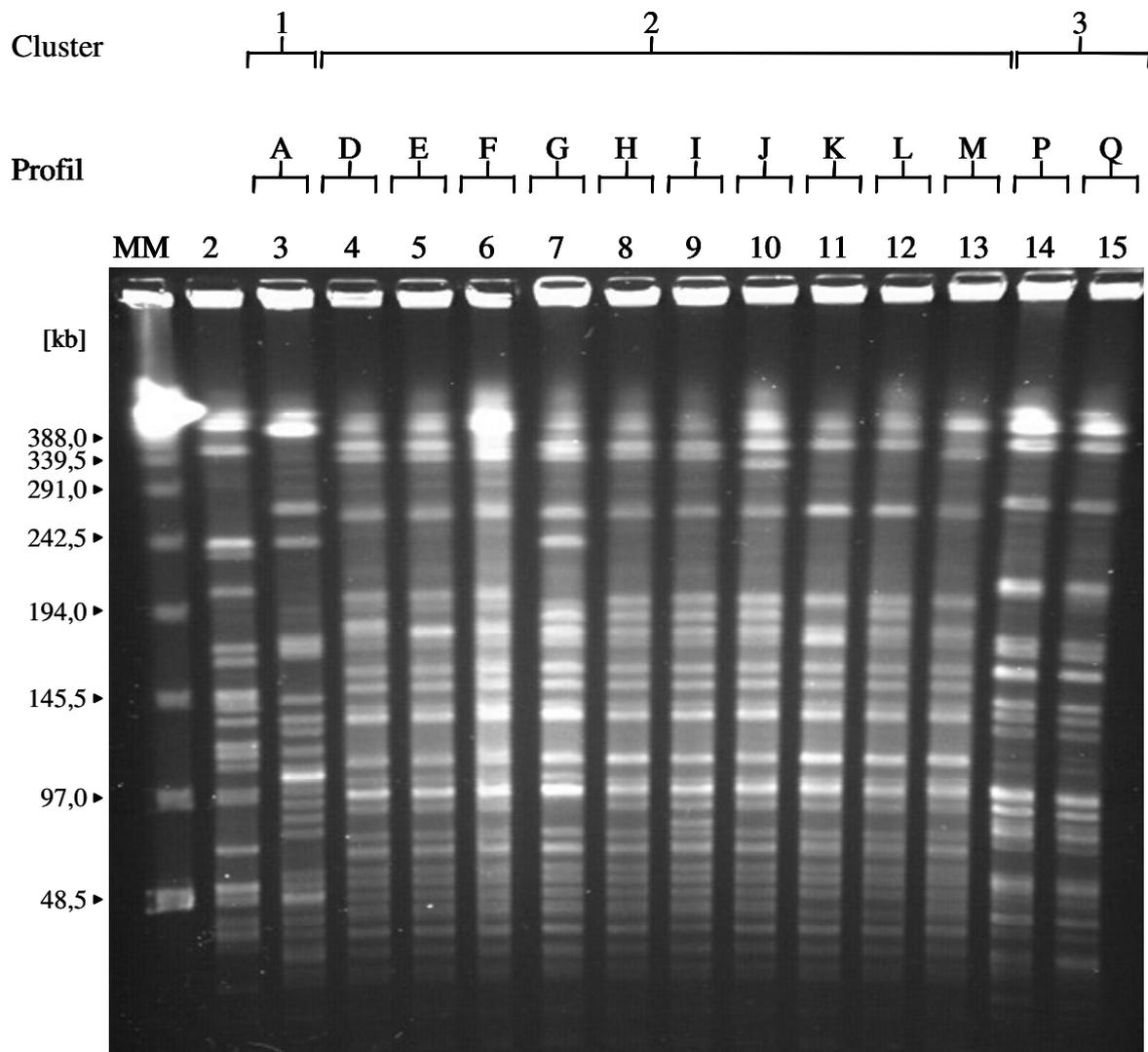


Abbildung 9: Darstellung der 13 Restriktionsprofile innerhalb der drei Cluster nach dem Verdau mit *ApaI* (1 %iges Agarosegel nach Ethidiumbromidfärbung).

Spur 2: *A. baumannii*-Referenzstamm, ATCC 19606^T

Spur 3: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 37

Spur 4: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 13

Spur 5: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 2

Spur 6: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 3

Spur 7: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 35

Spur 8: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 15

Spur 9: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 53

Spur 10: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 17

Spur 11: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 40

Spur 12: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 45

Spur 13: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 27

Spur 14: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 4

Spur 15: *Acinetobacter*-Isolat Nr. 6

MM = Molekularmassenmarker

Lambda Ladder PFG Marker

kb = Kilobasenpaare

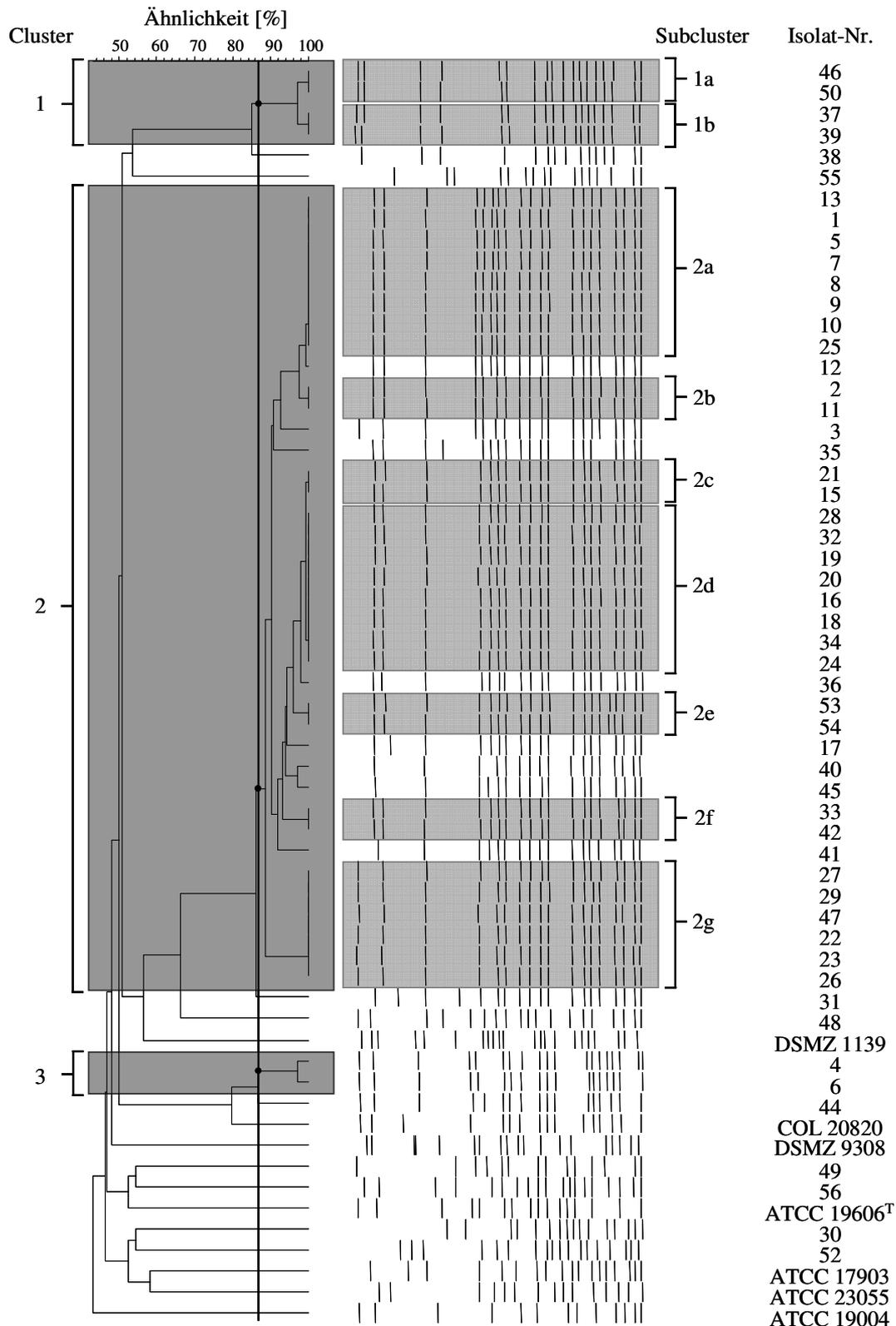


Abbildung 10: Dendrogramm zur Darstellung der Cluster und Subcluster von 52 *A. baumannii*- und zwei *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157])-Feldisolaten (Nr. 30 und 52). Cut-off für Cluster = 87 %; Cut-off für Subcluster = 100 %

Neben einem Schwellenwert von 87 % für die Klonalität von Isolaten bzw. die Zugehörigkeit zu einem bestimmten epidemischen Stamm, konnten SEIFERT *et al.* (2005) [200] im ersten Teil ihrer Studie darüber hinaus zeigen, dass die Reproduzierbarkeit des Typisierungsmusters ein und desselben *A. baumannii*-Stamms bei ≥ 95 % liegt. Daraus resultierend konnten Isolate, die zwischen 95 % und 100 % clustern, als Repräsentanten eines Stamms betrachtet werden. Bezogen auf die 56 untersuchten animalen *Acinetobacter*-Isolate ergaben sich insgesamt 11 unterschiedliche (Ausbruchs-)Stämme innerhalb der drei Cluster sowie neun weitere, die den einzelnen PFGE-Typen entsprachen (**Abbildung 11**). Im Bereich des ersten Clusters zeigte sich, dass alle Isolate einem Stamm angehörten. Cluster 2 umfasste neun verschiedene Stämme, die durch ein bis 13 Isolate repräsentiert wurden. Die beiden Isolate des dritten Clusters wiesen zwar unterschiedliche Restriktionsprofile auf, allerdings konnten sie demselben Stamm zugeordnet werden.

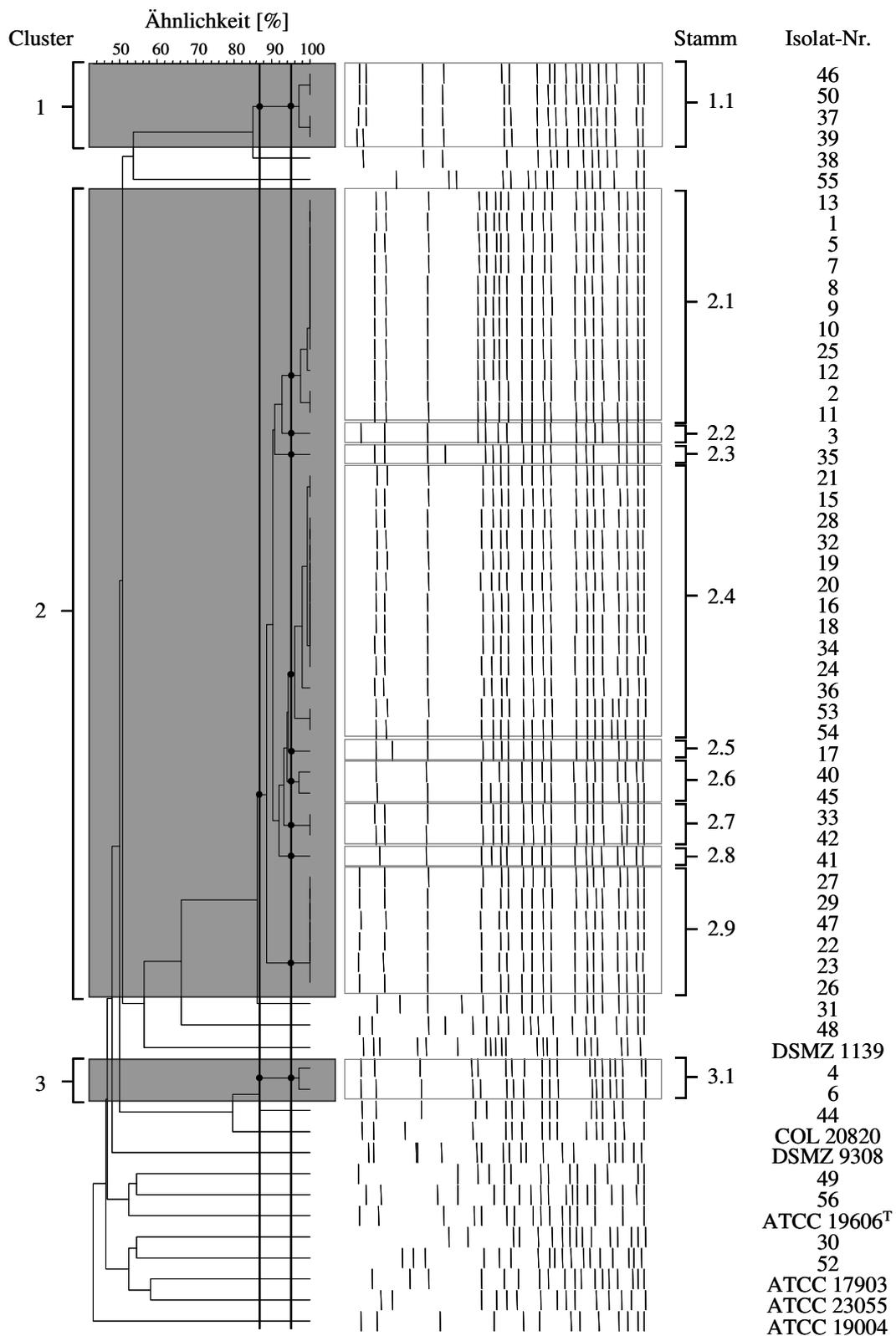


Abbildung 11: Dendrogramm zur Darstellung der Cluster und epidemischen Stämme von 52 *A. baumannii*- und zwei *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157])-Feldisolaten (Nr. 30 und 52). Cut-off für Cluster = 87 %; Cut-off für Stämme = 95 %

In **Tabelle 26** sind die PFGE-Ergebnisse der untersuchten animalen *Acinetobacter*-Isolate dargestellt.

Tabelle 26: Gegenüberstellung der PFGE-Ergebnisse von 56 animalen *Acinetobacter*-Isolaten unterschiedlicher Herkunft.

Isolat-Nr.	Spezies	Cluster	Stamm	Profil	Sub-cluster	Isolierungsdatum	Herkunft
46	<i>A. baumannii</i>	1	1.1	A	1a	2008	auT
50	<i>A. baumannii</i>	1	1.1	A	1a	2008	CVK
37	<i>A. baumannii</i>	1	1.1	A	1b	2005	CVK
39	<i>A. baumannii</i>	1	1.1	A	1b	2006	MVK1
1	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2000	MVK1
5	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2000	CVK
7	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2001	CVK
8	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2001	CVK
9	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2001	CVK
10	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2001	CVK
13	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2002	CVK
25	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D	2a	2002	CVK
2	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	E	2b	2000	MVK1
11	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	E	2b	2001	CVK
15	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2c	2002	AGVK
21	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2c	2002	CVK
16	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2002	CVK
18	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2002	CVK
19	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2002	auT
20	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2002	CVK
24	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2002	CVK
28	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2002	AGVK
32	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2003	auT
34	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H	2d	2003	IfVP
53	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	I	2e	2008	MVK1
54	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	I	2e	2008	MVK1
33	<i>A. baumannii</i>	2	2.7	H	2f	2003	MVK1
42	<i>A. baumannii</i>	2	2.7	H	2f	2006	auT
22	<i>A. baumannii</i>	2	2.9	M	2g	2002	CVK

Fortsetzung der **Tabelle** auf der nächsten Seite

VI Ergebnisse

Fortsetzung der **Tabelle**

Isolat-Nr.	Spezies	Cluster	Stamm	Profil	Sub-cluster	Isolierungsdatum	Herkunft
23	<i>A. baumannii</i>	2	2.9	M	2g	2002	CVK
26	<i>A. baumannii</i>	2	2.9	M	2g	2002	MVK1
27	<i>A. baumannii</i>	2	2.9	M	2g	2002	MVK1
29	<i>A. baumannii</i>	2	2.9	M	2g	2002	auT
47	<i>A. baumannii</i>	2	2.9	M	2g	2008	MVK1
12	<i>A. baumannii</i>	2	2.1	D		2001	MVK1
3	<i>A. baumannii</i>	2	2.2	F		2000	CVK
35	<i>A. baumannii</i>	2	2.3	G		2003	auT
36	<i>A. baumannii</i>	2	2.4	H		2003	MVK1
17	<i>A. baumannii</i>	2	2.5	J		2002	CVK
40	<i>A. baumannii</i>	2	2.6	K		2006	CVK
45	<i>A. baumannii</i>	2	2.6	L		2006	CVK
41	<i>A. baumannii</i>	2	2.8	L		2006	MVK1
4	<i>A. baumannii</i>	3	3.1	P		2000	MVK1
6	<i>A. baumannii</i>	3	3.1	Q		2001	MVK1
31	<i>A. baumannii</i>	T		N		2003	CVK
38	<i>A. baumannii</i>	T		B		2006	MVK1
44	<i>A. baumannii</i>	T		R		2006	MVK1
48	<i>A. baumannii</i>	T		O		2006	CVK
49	<i>A. baumannii</i>	T		S		2008	AGVK
55	<i>A. baumannii</i>	T		C		2008	AGVK
56	<i>A. baumannii</i>	T		T		2008	CVK
30	<i>A. genomosp. 3</i>	T		U		2003	auT
52	<i>A. genomosp. 3</i>	T		V		2008	auT
14	<i>A. baumannii</i>	n.t.				2002	auT
51	<i>A. genomosp. 3</i>	n.t.				2008	auT
43	unklassifiziert	n.t.				2006	CVK

Erläuterung: **AGVK** = Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, JLU Gießen; **CVK** = Klinik für Kleintiere, Chirurgie, JLU Gießen; **IfVP** = Institut für Veterinär-Pathologie, JLU Gießen; **MVK** = Klinik für Kleintiere, Innere Medizin, JLU Gießen; **n.t.** = Isolat nicht typisierbar; **auT** = außeruniversitäre Tierklinik/private Tierarztpraxis; **T** = einzelner PFGE-Typ

2.3 Ergebnisse der Amplified Fragment Length Polymorphism-Analyse

In Abhängigkeit von ihren PFGE-Profilen wurden 27 der 56 *Acinetobacter*-Isolate ausgewählt, um mittels AFLP-Analyse typisiert zu werden. Die Typisierbarkeit dieser zweiten Fingerprinting-Methode lag bei 100 %. Die Restriktionsprofile umfassten dabei durchschnittlich 50 Banden.

2.3.1 Bestätigung der Spezieszuordnung

Nachdem 55 der 56 untersuchten *Acinetobacter*-Isolate bereits mittels ARDRA den Spezies *A. baumannii* bzw. *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157]) zugeordnet worden waren (**Abbildung 6** und **Tabelle 25**), konnten diese Ergebnisse mit Hilfe der AFLP-Analyse bestätigt werden. Ein Cut-off von 50 % Ähnlichkeit mit den Restriktionsprofilen der entsprechenden Referenzstämme diente dabei als Basis für die Identifizierung von Isolaten auf Speziesebene.

Die Typisierung der Feldisolate sowie der sechs Referenzstämme des *Acb*-Komplexes ergab fünf verschiedene Cluster (**Abbildung 12**). Drei Isolate (Nr. 30, 51 und 52) clusterten mit den beiden *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157])-Referenzstämmen bei 51 % und konnten somit eindeutig der *Genomosp. 3* zugeordnet werden. Das größte Cluster wurde aus 23 Isolaten und dem *A. baumannii*-Referenzstamm gebildet. Für die Vertreter dieses Clusters konnte eine Ähnlichkeit von 57 % nachgewiesen werden. Das Isolat Nr. 43, welches bereits in der PCR-RFLP-Analyse als nicht klassifizierbar definiert wurde, konnte in der AFLP-Analyse als einzelner Typ (17) dargestellt werden. Dieses Isolat wies keine Übereinstimmung des Bandenmusters mit denen der restlichen Isolate auf (**Abbildung 13**). Jeweils ein AFLP-Typ bzw. -Cluster wurde durch den Referenzstamm der *Genomosp. 13TU* (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]) sowie durch die beiden *A. calcoaceticus*-Referenzstämme gebildet. Keines der untersuchten Feldisolate zeigte eine Zugehörigkeit zu diesen beiden Spezies des *Acb*-Komplexes.

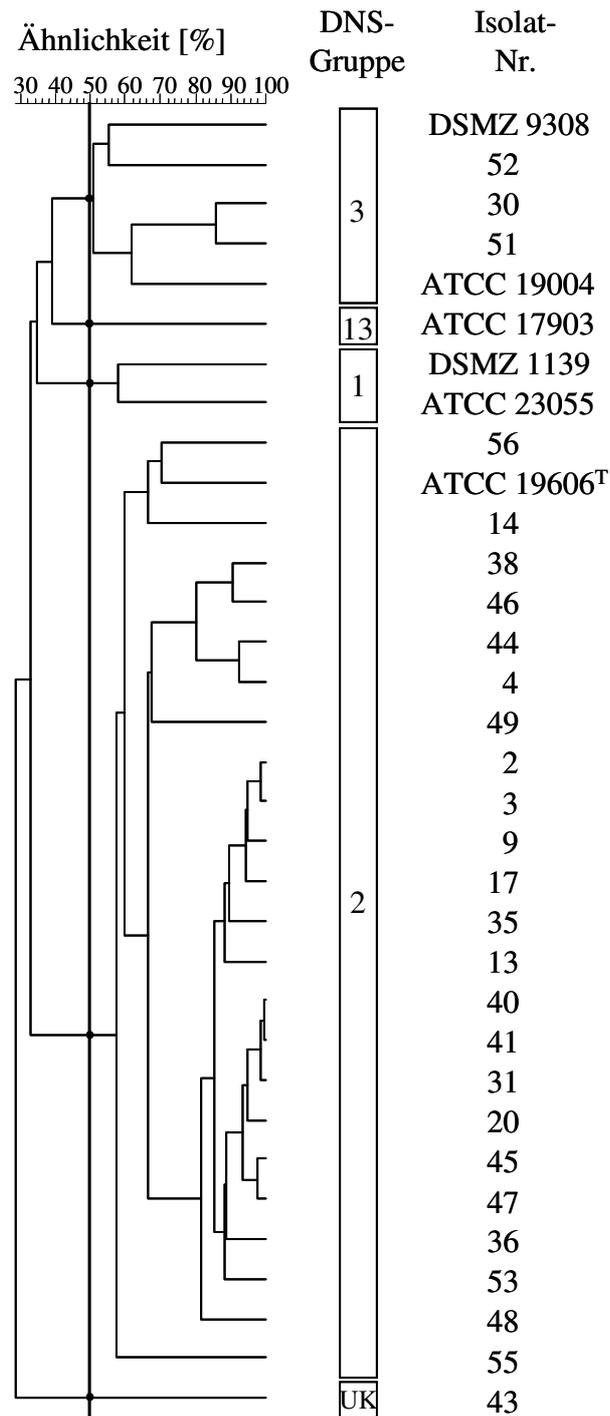


Abbildung 12: Dendrogramm zur Darstellung der Speziesidentifikation mittels AFLP-Analyse.

Cut-off für Spezies = 50 %; DNS-Gruppe 1 = *A. calcoaceticus*;
 DNS-Gruppe 2 = *A. baumannii*; DNS-Gruppe 3 = *A. genomosp.* 3
 (*A. pittii* sp. nov., [157]); DNS-Gruppe 13 = *A. genomosp.* 13TU
 (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]); **UK** = unklassifiziertes Isolat

2.3.2 Stammidentifikation

Auf der Basis eines Schwellenwerts von 90 % für die Stammidentifikation konnten 17 unterschiedliche AFLP-Typen ermittelt werden (**Abbildung 13**). Die *A. genomsp.* 3 (*A. pittii* sp. nov., [157])-Isolate (Nr. 30, 51 und 52) repräsentierten dabei die Stämme 1-3. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die 23 *A. baumannii*-Isolate den Stämmen 4-16 angehörten und dass das nicht klassifizierbare Isolat Nr. 43 den Stamm 17 repräsentierte.

2.3.3 Nachweis der Europäischen Klone I-III

Isolate, die bei einem Schwellenwert von mindestens 80 % mit dem jeweiligen Referenzstamm clustern, werden als Europäische Klone definiert.

Insgesamt konnten 19 (83%) der 23 *A. baumannii*-Isolate als EU-Klone charakterisiert werden (**Abbildung 14**). Die Isolate Nr. 4 und 44 clusterten bei 81,5 % mit den Referenzstämmen für den EU-Klon I (LUH 06015, RUH 0875 und RUH 3282). Das größte Cluster wurde gebildet aus 15 *A. baumannii*-Feldisolaten sowie den Referenzstämmen des zweiten EU-Klons (LUH 04578, RUH 0134 und RUH 3245). Für diese Gruppe konnte eine Ähnlichkeit von 82 % ermittelt werden. Das dritte Cluster basierte auf den Isolaten Nr. 38 und 46 sowie den Referenzstämmen LUH 05875, LUH 06030 und LUH 10879, die den dritten EU-Klon repräsentierten.

Vier *A. baumannii*-Isolate (Nr. 14, 49, 55 und 56) wiesen auf Grund einer zu geringen molekularen Ähnlichkeit keine Zugehörigkeit zu den EU-Klonen auf.

2.4 Vergleich der PFGE- und AFLP-Ergebnisse

Es fiel auf, dass die Stammzugehörigkeit, die mittels AFLP eruiert werden konnte, nicht in allen Teilen mit den Ergebnissen der PFGE übereinstimmte. Sieben Feldisolate (13 %) (Nr. 30, 35, 48, 49, 52, 55 und 56) wurden in beiden Methoden jeweils einem einzelnen Stamm zugeordnet. Während die Isolate Nr. 14, 43 und 51 mittels PFGE nicht typisiert werden konnten, repräsentierten sie in der AFLP-Analyse drei unterschiedliche Stämme.

In mehreren Fällen zeigte sich, dass die AFLP-Analyse eine geringere diskriminatorische Stärke aufwies als die PFGE. Während die beiden Isolate Nr. 38 und 46 in der AFLP-Analyse Vertreter ein und desselben Stamms (6) darstellten, wurden sie in der PFGE als Abkömmlinge zweier unterschiedlicher Stämme charakterisiert. Eine entsprechende Diskrepanz konnte für die Isolate Nr. 4 und 44 gezeigt werden. Darüber hinaus wurde deutlich, dass die

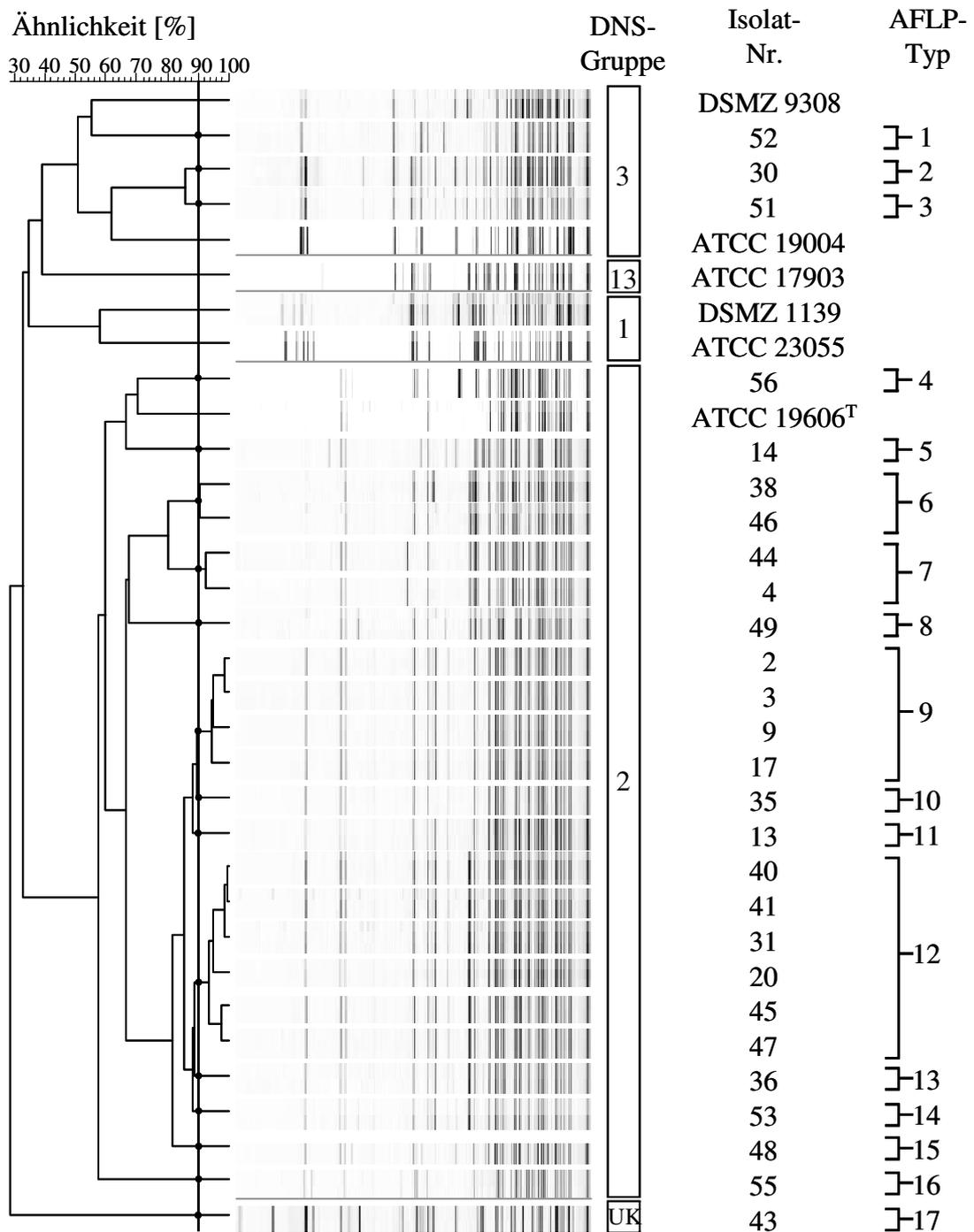


Abbildung 13: Dendrogramm zur Darstellung der AFLP-Typen. Cut-off für Stämme = 90 %; DNS-Gruppe 1 = *A. calcoaceticus*; DNS-Gruppe 2 = *A. baumannii*; DNS-Gruppe 3 = *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157]); DNS-Gruppe 13 = *A. genomsp. 13TU* (*A. nosocomialis* sp. nov., [157]); **UK** = unklassifiziertes Isolat

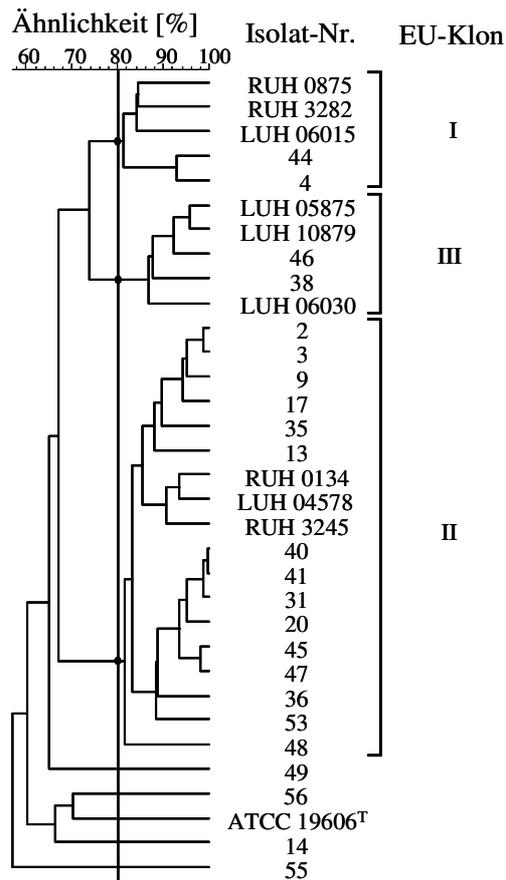


Abbildung 14: Dendrogramm zur Darstellung der EU-Klonzugehörigkeit (n = 27).
Cut-off für Klone = 80 %; **LUH** = Leiden University Hospital;
RUH = Rotterdam University Hospital

Untersuchung mittels PFGE die Isolate Nr. 2, 3, 9 und 17 insgesamt drei verschiedenen Stämmen zuordnete, wohingegen sie in der AFLP-Analyse alle als Angehörige eines einzelnen Stamms (9) identifiziert wurden. Bei den Isolaten Nr. 20, 31, 40, 41, 45 und 47 zeigte sich eine Zugehörigkeit zu fünf unterschiedlichen Stämmen in der PFGE, in der AFLP-Analyse repräsentierten sie den Stamm 12.

Umgekehrt verhielt es sich mit den Isolaten Nr. 36 und 53. Während die AFLP-Analyse sie als zwei unterschiedliche Stämme definierte, stellten sie in der PFGE Vertreter eines Stamms dar.

3 Gegenüberstellung von Phänotyp und Genotyp

Ein detaillierter Überblick über die Ergebnisse der phänotypischen sowie der genotypischen Untersuchungen findet sich in **Tabelle 27**.

Tabelle 27: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus der phänotypischen und genotypischen Charakterisierung von 56 *Acinetobacter*-Isolaten.

Isolat-Nr.	Phänotypische Eigenschaften			Genotyp		
	Wachstum bei 44 °C	Antibiotika-Empfindlichkeit		ARDRA (Spezies)	PFGE (Cluster)	AFLP- Analyse (EU-Klon)
		Agardiffusions- test	Mikrobouillon- dilutionstest			
37	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	1	n.g.
39	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	1	n.g.
46	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	1	III
50	+	A	b	<i>A. baumannii</i>	1	n.g.
13	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
19	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
20	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
21	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
22	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
23	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
24	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
25	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
26	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
27	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
28	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
29	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
32	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
40	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
41	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
45	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
47	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
1	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
2	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
3	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
5	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
7	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
8	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
9	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
10	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
11	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
12	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
15	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
16	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
17	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
18	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
33	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
34	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
35	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II

Fortsetzung der **Tabelle** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle

Isolat-Nr.	Phänotypische Eigenschaften			Genotyp		
	Wachstum bei 44 °C	Antibiotika-Empfindlichkeit		ARDRA (Spezies)	PFGE (Cluster)	AFLP- Analyse (EU-Klon)
		Agardiffusions- test	Mikrobouillon- dilutionstest			
36	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
42	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
53	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	II
54	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	2	n.g.
4	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	3	I
6	+	B	c	<i>A. baumannii</i>	3	n.g.
31	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	T	II
38	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	T	III
44	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	T	I
49	+	C	c	<i>A. baumannii</i>	T	kein Klon
48	+	B	b	<i>A. baumannii</i>	T	II
55	+	C	c	<i>A. baumannii</i>	T	kein Klon
56	+	C	c	<i>A. baumannii</i>	T	kein Klon
52	-	C	c	<i>A. genomsp. 3</i>	T	kein Klon
30	(+)	C	c	<i>A. genomsp. 3</i>	T	kein Klon
14	+	C	c	<i>A. baumannii</i>	n.t.	kein Klon
51	(+)	C	c	<i>A. genomsp. 3</i>	n.t.	kein Klon
43	-	C	c	unklassifiziert	n.t.	kein Klon

Erläuterung: (+) = eingeschränktes Wachstum; - = kein Wachstum; **A** = Isolat empfindlich gegenüber keinem der getesteten Antibiotika; **B/b** = Isolat empfindlich gegenüber ≤ 5 der getesteten Antibiotika; **C/c** = Isolat empfindlich gegenüber > 5 der getesteten Antibiotika; **n.t.** = Isolat nicht typisierbar; **n.g.** = Isolat nicht getestet mittels AFLP-Analyse; **T** = einzelner PFGE-Typ

Die Gegenüberstellung von Phänotyp und Genotyp ergab, dass alle *Acinetobacter*-Isolate, die ein Wachstum bei 44 °C zeigten und somit phänotypisch als *A. baumannii* identifiziert wurden, auch in der genotypischen Analyse als solche bestätigt werden konnten. Für Feldisolate mit einem eingeschränkten oder fehlenden Wachstum (non-*A. baumannii*-Spezies) erfolgte die endgültige Spezieszuordnung als Genomosp. 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) bzw. nicht klassifizierbar mittels ARDRA und AFLP-Analyse. Des Weiteren fiel auf, dass die Isolate, die einem der drei EU-Klone zugeordnet werden konnten, eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber den in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika aufwiesen.

4 Untersuchungen zur klinischen Relevanz von *A. baumannii*-Isolaten bei Tieren

Im Jahr 2007 wurden insgesamt 5571 und in 2008 6615 Proben von Patienten der Kleintier- und Pferdeklinik, der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie, der Klinik für Wiederkäuer und Schweine sowie des Instituts für Veterinär-Pathologie im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der JLU Gießen untersucht. In 168 (122) Proben konnte die Spezies *A. baumannii* nachgewiesen werden.

4.1 Hunde

2007 und 2008 konnte bei 32 Hunden, die in der Kleintierklinik der JLU Gießen vorstellig bzw. stationär aufgenommen wurden, *A. baumannii* entweder als Reinkultur oder Mischkultur mit einer Begleitflora nachgewiesen werden. Das Alter der Tiere variierte dabei zwischen zwei Monaten und 13 Jahren. Das Geschlechterverhältnis der Hunde lag bei 3,6 Rüden zu 1 Hündin. Bei den vertretenen Rassen dominierten Golden Retriever (15,6 %) und Deutscher Schäferhund (9,4 %). 12,5 % der betroffenen Hunde waren Mischlinge. Für jeweils 28 der 32 Hunde konnte zum Zeitpunkt der Probenentnahme ein stationärer Aufenthalt und eine Behandlung mit antibiotischen Wirkstoffen belegt werden. Hinsichtlich der Krankheitsbilder erfolgte eine Einteilung in solche, die eine chirurgische Intervention erforderten (68,6 %) und solche mit Grunderkrankungen (31,4 %). Im Anschluss an die Behandlung konnte der Großteil der Tiere (87,5 %) entlassen werden. Jeweils zwei Hunde wurden euthanasiert bzw. sind gestorben.

In **Tabelle 28** sind die Ergebnisse der Datenrecherche für *A. baumannii*-positive Hunde aus den Jahren 2007 und 2008, die in der universitären Kleintierklinik behandelt wurden, zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 28: Daten der mit *A. baumannii* infizierten/kolonisierten Hunde.

Tagebuch-Nr.	Signalement		Dauer des stationären Aufenthalts		Antibiotika-Gabe	Diagnose	Klinischer Ausgang
	Rasse	Geschlecht	Geburtsdatum	stationären Aufenthalts			
900/2007	Bearded Collie	m	08/2000	3 Tage	AMI, CZN	Endocarditis valvularis	Tod
4986/2008	Bobtail	m	01/2001	5 Tage	AMC	Torsio ventriculi	Entlassung
754/2007	Border Collie	m	03/2006	1)	AMC, ENR	Lebershunt	k. A.
4497/2008	Border Collie	w	01/2005	19 Tage	AMC, MNZ	Wunde	Entlassung
2619/2008	Collie	mk	11/1998	5 Tage	AMC, MAF	Wunde	Entlassung
3794/2007	Dackel	m	04/2000	nein	AMC	Pneumonie	Entlassung
2811/2007	Dackel	m	09/2006	8 Tage	ENR	Niereninsuffizienz	Entlassung
2285/2007	Dalmatiner	m	07/2002	3 Tage	AMC	Zystolithiasis	Entlassung
4513/2007	Deutsche Dogge	w	04/2002	-	CLN	Paronychie	Entlassung
5944/2008	Deutscher Schäferhund	m	10/1998	19 Tage	MNZ	Meläna	Euthanasie
2543/2007	Deutscher Schäferhund	m	03/2006	13 Tage	AMC, ENR	Perikarderguss	Entlassung
1356/2008	Deutscher Schäferhund	m	09/2006	11 Tage	AMC, ENR	Wunde	Entlassung
2311/2007	Englischer Cockerspaniel	m	05/1996	11 Tage	AMC	Genitalumore	Entlassung
2858/2008	Golden Retriever	m	11/2001	5 Tage	AMC	Ileus	Entlassung
2578/2008	Golden Retriever	m	02/2007	10 Tage	AMC, ENR, MNZ	Peritonitis	Entlassung
5413/2007	Golden Retriever	w	07/2007	14 Tage	CVN	Lebershunt	Entlassung
2839/2008	Golden Retriever	w	03/2008	3 Tage	AMC	Persistierender Ductus arteriosus	Entlassung
3816/2007	Golden Retriever	wk	09/2002	2 Tage	AMP	Niereninsuffizienz	Euthanasie
5967/2008	Kanadischer Schäferhund	m	06/2008	16 Tage	AMC, AMI	Persistierender Ductus arteriosus	Entlassung
1721/2008	Kleiner Münsterländer	mk	07/2000	2 Tage	ENR	Hydronephrose	Tod

Fortsetzung der **Tabelle** auf der nächsten Seite

Fortsetzung der Tabelle

Tagebuch-Nr.	Signalement		Geburtsdatum	Dauer des stationären Aufenthaltes	Antibiotika-Gabe	Diagnose	Klinischer Ausgang
	Rasse	Geschlecht					
773/2008	Malinois	m	09/1998	23 Tage	AMC, AMI, ENR	Wunde	Entlassung
1173/2008	Malinois	m	05/2004	-	AMC, ENR, MNZ	Wunde	Entlassung
5538/2007	Mischling	m	06/1996	5 Tage	AMC	Nebennierentumor	Entlassung
1613/2008	Mischling	m	01/1999	31 Tage	AMC, AMI, MAF	Wunde	Entlassung
1202/2007	Mischling	mk	01/1994	6 Tage	ENR	Prostatakarzinom	Entlassung
1785/2007	Mischling	mk	01/1998	10 Tage	AMC	Immunhämolytische Anämie	Entlassung
955/2007	Rottweiler	mk	01/1996	20 Tage	AMC, CVN, ENR, MNZ	Milztumor	Entlassung
4626//2007	Sheltie	m	01/1999	33 Tage	AMC, AMI	Wunde	Entlassung
2201/2007	Tibet Terrier	w	12/2000	-	CTM, ENR	Otitis	Entlassung
1936//2008	Weimaraner	w	05/2007	8 Tage	AMC, ENR	Lebershunt	Entlassung
3699/2007	WHWT	m	02/2007	14 Tage	CVN	Lebershunt	Entlassung
407/2008	Yorkshire Terrier	m	09/2006	13 Tage	AMC, ENR	Lebershunt	Entlassung

Erläuterung: ¹⁾Hund wurde von der Klinik für Kleintiere übernommen

AMC = Amoxicillin/Clavulansäure; AMI = Amikacin; CLN = Cephalexin; CTM = Ceftazidim; CVN = Cefovecin; CZN = Cephazolin; ENR = Enrofloxacin; k. A. = keine Angaben; m = männlich; MAF = Marbofloxacin; mk = männlich-kastriert; MNZ = Metronidazol; w = weiblich; WHWT = West Highland White Terrier; wk = weiblich-kastriert

4.2 Katzen

Bei insgesamt sechs Katzen der Kleintierklinik der JLU Gießen konnte die Spezies *A. baumannii* in den Jahren 2007 und 2008 nachgewiesen werden. Das Alter der Tiere variierte zwischen einem Jahr und acht Jahren. Dabei waren doppelt so viele Kater wie Kätzinnen betroffen. Hinsichtlich der Rassen dominierte Europäisches Kurzhaar (50 %) gegenüber Persern (33,3 %) und Ragdoll (16,7 %). Alle Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme in stationärer Behandlung und wurden mit Antibiotika therapiert. Als Krankheitsbilder traten bei drei Katzen Erkrankungen der unteren Harnwege und bei drei weiteren Katzen ein Lebershunt in Erscheinung. Alle Tiere wurden im Anschluss an ihre Behandlung aus der Klinik entlassen.

In **Tabelle 29** sind die Ergebnisse der Datenrecherche für *A. baumannii*-positive Katzen aus den Jahren 2007 und 2008 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 29: Daten der mit *A. baumannii* infizierten/kolonisierten Katzen.

Tagebuch-Nr.	Signalement		Dauer des stationären Aufenthaltes	Antibiotika-Gabe	Diagnose	Klinischer Ausgang	
	Rasse	Geschlecht					Geburtsdatum
5504/2007	EKH	mk	05/2002	8 Tage	ENR	FLUDT	Entlassung
3641/2008	EKH	mk	04/2000	4 Tage	ENR	FLUDT	Entlassung
23/2007	EKH	mk	01/1999	5 Tage	AMC	FLUDT	Entlassung
929/2007	Perser	mk	01/2006	19 Tage	CVN	Lebershunt	Entlassung
4287/2007	Perser	wk	06/2006	10 Tage	AMC, ENR	Lebershunt	Entlassung
760/2008	Ragdoll	wk	07/2006	15 Tage	AMC, ENR	Lebershunt	Entlassung

Erläuterung: AMC = Amoxicillin/Clavulansäure; CVN = Cefovecin; EKH = Europäisches Kurzhaar; ENR = Enrofloxacin; FLUDT = Feline Lower Urinary Tract Disease; mk = männlich-kastriert; wk = weiblich-kastriert

VII Diskussion

Zahlreiche Publikationen weisen *Acinetobacter* spp., insbesondere *A. baumannii*, als nosokomialen Erreger in der Humanmedizin aus [9, 64]. Auch in der Veterinärmedizin gelang die Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus klinischem Probenmaterial, so dass sich die Frage nach der tiermedizinischen Relevanz dieser Erreger sowie dem Verwandtschaftsgrad zu humanen Isolaten stellte. Für die Klärung dieser Fragen wurden 56 animale *Acinetobacter*-Feldisolate aus den Jahren 2000-2008 phäno- und genotypisch analysiert. Die Charakterisierung der animalen *Acinetobacter*-Isolate mittels phänotypischer Methoden ergab ein vergleichsweise einheitliches Bild. Nach Gramfärbung erwiesen sich alle Isolate mikroskopisch als gramnegative bis gramlabile kokkoide Stäbchenbakterien, wodurch ihre Zugehörigkeit zur Gattung *Acinetobacter* bestätigt wurde [10, 110, 138]. Hinsichtlich ihrer Enzymausstattung, ihres Substratprofils sowie der Wachstumsfähigkeit bei 37 °C und 41 °C unterschieden sich die 56 Feldisolate nicht. Bei der Fähigkeit, sich bei 44 °C zu vermehren, teilten sich die Isolate in zwei Gruppen. Laut Literatur ist diese Eigenschaft der Spezies *A. baumannii* sowie einem Teil der Genomosp. 13TU (*A. nosocomialis* sp. nov., [157])-Stämme vorbehalten [18, 215, 218]. Dass es sich nicht um letztere handelt, wurde anhand der fehlenden Gelatinhydrolyse festgestellt, die von TOWNER *et. al.* (1991) für diese Genomosp. als charakteristisch beschrieben wurde [218]. Vier Isolate mit eingeschränktem bzw. keinem Wachstum bei 44 °C wurden als non-*A. baumannii*-Spezies bestimmt. Kommerzielle Identifikationssysteme sind bislang nicht in der Lage alle 34 *Acinetobacter*-Spezies zu unterscheiden. Folglich können auch Stämme des *Acb*-Komplexes, welcher drei der klinisch relevanten Spezies sowie eine Umweltspezies umfasst, nicht voneinander abgegrenzt werden. Neben der ausgeprägten phänotypischen Ähnlichkeit wird die Spezieszuordnung auch dadurch erschwert, dass das biochemische Verhalten von Stämmen innerhalb der einzelnen *Acinetobacter*-Spezies z. T. sehr inhomogen ist [18, 215, 218]. Demzufolge sind für eine exakte Speziesdiagnose weiterführende molekulargenetische Untersuchungen unentbehrlich [105, 110, 113].

Humane Stämme der Spezies *A. baumannii* zeichnen sich u. a. durch ihre Multiresistenz gegenüber z. T. allen im Handel verfügbaren Antibiotika aus. Die Untersuchung der animalen Feldisolate hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber antibiotischen Wirkstoffen zeigte, dass die Mehrzahl der Isolate ebenfalls über multiple Resistenzen verfügt. Diese Ergebnisse entsprechen damit weitgehend denen aus bislang veröffentlichten Studien sowohl aus der Human- als auch aus der Veterinärmedizin [14, 77, 78, 126, 231]. Alle 56 Isolate waren

gegenüber den β -Lactam-Antibiotika Cephalexin, Cephalotin, Oxacillin und Penicillin G resistent. Gegenüber anderen Vertretern dieser Substanzklasse (Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin und Cefovecin) wiesen 68 % bis 98 % der Isolate Resistenzen auf. Verschiedene Mechanismen induzieren diese Unempfindlichkeit der Bakterien gegenüber β -Lactam-Antibiotika [96]. Es kann davon ausgegangen werden, dass v. a. „Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen“ in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle spielen. Die Gene für diese Enzyme sind vorrangig im Genom von Bakterien der Familie *Enterobacteriaceae* lokalisiert, können allerdings über horizontalen Gentransfer auf *A. baumannii*-Stämme übertragen werden [38, 150, 251]. Bei der *in vitro*-Testung der Feldisolate gegenüber Imipenem, einem Wirkstoff, der als Vertreter der Carbapeneme ebenfalls in die Gruppe der β -Lactame gehört, erwies sich lediglich ein Isolat (Nr. 4) als resistent. In der Humanmedizin darf Imipenem nur angewendet werden, wenn keine alternativen Antibiotika wirksam sind. Als Indikation gilt die kalkulierte Initialtherapie schwerer Infektionen [94, 165, 245]. 1986 konnten noch keine Imipenem-resistenten Isolate nachgewiesen werden [137], inzwischen häufen sich jedoch die Berichte über *Acinetobacter*-Isolate, die auf Grund von natürlich vorkommenden Oxacillinasen (OXA-51-ähnliche Varianten) sowie den erworbenen Carbapenemasen OXA-23, OXA-40 oder OXA-58 resistent gegenüber allen β -Lactam-Antibiotika sind [102]. Infolgedessen kommen diese speziellen Oxacillinasen und Carbapenemasen auch als Ursache für die Imipenem-Resistenz des Feldisolats Nr. 4 in Frage. Aber auch das Fehlen des äußeren Membranproteins CarO wird als möglicher Grund für eine Carbapenem-Unempfindlichkeit von *A. baumannii*-Isolaten in Betracht gezogen. Für dieses 29 kDa große Protein konnten Poren-bildende Eigenschaften, jedoch keine spezifische Bindungsstelle für Imipenem nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass CarO als unspezifischer, monomerer Kanal fungiert [206, 210].

Resistenzen gegenüber anderen Antibiotikaklassen, namentlich der Aminoglykoside, Tetracycline und Fluorchinolone traten bei 66 % bis 100 % der Isolate auf. Diese Daten decken sich weitgehend mit den Angaben aus der Literatur [9, 26, 32, 49, 60, 125, 172, 193, 219, 239]. Eine Ausnahme hinsichtlich des Resistenzspektrums stellte das Aminoglycosid-Antibiotikum Amikacin dar. Es zeigte eine *in vitro*-Aktivität gegenüber 98 % der Isolate im Mikrobouillondilutionsverfahren sowie gegenüber 61 % der Isolate im Agardiffusionstest. Da die Gene für die Amikacin-inaktivierende Phosphotransferase (APH(3')VI) vermutlich auf einem Transposon lokalisiert sind [30], scheint die Verbreitung dieses mobilen Elements unter animalen *A. baumannii*-Stämmen bislang noch nicht sehr ausgeprägt zu sein. Darüber hinaus korrelieren Resistenzraten mit dem Einsatz eines Wirkstoffes [9, 30]. Derzeit sind in

Deutschland keine Tierarzneimittel verfügbar, in denen Amikacin als wirksamer Bestandteil enthalten ist. Demzufolge bleibt die Verwendung auf die Fälle beschränkt, in denen humane Fertigarzneimittel infolge eines Therapienotstands (§ 56a Abs. (2) Nr. 2 bzw. Nr. 3 AMG) umgewidmet und eingesetzt werden können.

Aus der Gruppe der Polymyxine wurden in dieser Arbeit die beiden Substanzen Colistin (Polymyxin E) und Polymyxin B getestet. Die Ergebnisse der *in vitro*-Aktivität beider Wirkstoffe wiesen deutliche Differenzen auf. Während lediglich zwei Isolate (Nr. 10 und 50) eine Unempfindlichkeit gegenüber Polymyxin B zeigten, waren 96 % der Isolate resistent gegenüber Colistin. Die Ursache für diese Resistenz könnte eine verminderte Expression des äußeren Membranproteins OmpW sein, was zu einer reduzierten Aufnahme dieses Wirkstoffes in die Bakterienzelle führt [9, 210]. FRANCEY *et al.* (2000) berichteten von 19 animalen *Acinetobacter*-Stämmen, die im Gegensatz zu denen aus der vorliegenden Studie alle empfindlich gegenüber Colistin waren. Ursächlich für diese Diskrepanz könnte der frühere Isolierungszeitpunkt (1995-1997) der Stämme sein. Resistenzeigenschaften gegen Colistin, welches bereits seit den 60iger Jahren in der Veterinärmedizin eingesetzt wird, waren zu diesem Zeitpunkt möglicherweise noch nicht soweit verbreitet. In der Humanmedizin war der Einsatz von Polymyxinen auf Grund ihrer Nephro- bzw. Neurotoxizität lange Zeit auf ein Minimum reduziert worden. Aktuell kommt es allerdings zu einer Wiederbelebung des Polymyxin-Einsatzes [93, 244], da für Colistin eine hohe *in vitro*-Aktivität, auch gegen panresistente *A. baumannii*-Stämme, nachgewiesen werden konnte [106, 192]. Ähnliche Daten wurden von RAMASUBBAN *et al.* (2008) für das Antibiotikum Polymyxin B publiziert [183].

Rifampicin, ein bakterizides Antibiotikum aus der Gruppe der Ansamycine, zeigte in der vorliegenden Arbeit keinerlei *in vitro*-Aktivität gegenüber den getesteten Feldisolaten. Laut Literatur lassen sich trotz *in vitro*-Resistenzen jedoch gute Erfolge bei der Therapie bakterieller Infektionen dadurch erzielen, dass man Rifampicin mit weiteren antibiotischen Wirkstoffen (Polymyxin B, Imipenem) kombiniert [244]. Im Rahmen einer Resistenzstudie von APPLEMAN *et al.* (2000) zeigte sich, dass humane *A. baumannii*-Stämme unterschiedliche Empfindlichkeiten gegenüber Rifampicin aufweisen [5].

Alle getesteten *Acinetobacter*-Isolate waren überdies resistent gegenüber Chloramphenicol. Diese Daten stimmen mit den Angaben von FRANCEY *et al.* (2000) überein [78]. Der Produktion einer Chloramphenicol-spezifischen Acetyltransferase wird dabei die entscheidende Bedeutung zugeschrieben [60]. Allerdings konnten die für dieses Enzym kodierenden Gene bisher nicht bei allen Chloramphenicol-resistenten *A. baumannii*-Stämmen nachgewiesen werden [239]. Es ist deshalb anzunehmen, dass weitere Mechanismen existieren, die

zu dieser Unempfindlichkeit führen. Diskutiert werden eine erhöhte Permeabilität, ein vermehrter Efflux des Antibiotikums oder eine Veränderung des Zielproteins [239].

Das Lincosamid Lincomycin und dessen Derivat Clindamycin, das Makrolidantibiotikum Erythromycin sowie Fusidinsäure (terpenoide Carbonsäure) zeigten keine *in vitro*-Aktivität gegenüber den animalen *Acinetobacter*-Isolaten. Diese Wirkstoffe wurden getestet, da sie häufig in der Veterinärmedizin zum Einsatz kommen. Allerdings werden sie i. d. R. für andere Anwendungsgebiete als *A. baumannii*-Infektionen eingesetzt. Aus diesem Grund existieren in der Literatur kaum Beschreibungen über spezifische Resistenzmechanismen gegenüber diesen Substanzen. Einige Autoren berichten von Effluxpumpen (AdeABC, AdeIJK, AbeM), die zu den Antibiotika-unspezifischen Abwehrmechanismen gehören und in der Lage sind, u. a. Erythromycin und Fusidinsäure aus der Bakterienzelle zu schleusen [58, 134, 208]. Makrolide und Lincosamide wirken bakteriostatisch, indem sie an die 50-S-Untereinheit bakterieller Ribosomen binden. Auf Grund einer ähnlichen Wirkungsweise dieser beiden Antibiotika-Klassen kann es zum Auftreten von Kreuzresistenzen kommen. Angesichts dieser Tatsache liegt die Vermutung nahe, dass Effluxpumpen auch an der Resistenz gegenüber Lincosamiden beteiligt sein könnten.

Die Kombination aus Trimethoprim/Sulfamethoxazol wies keine *in vitro*-Aktivität gegenüber zwei Drittel der untersuchten *Acinetobacter*-Isolate auf. Studien aus der Humanmedizin beschreiben Resistenzen gegenüber den Einzelsubstanzen Trimethoprim und Sulfonamiden [107, 239]. Auf Grund einer niedrigen Affinität der Dihydrofolatreduktase zu dem Wirkstoff Trimethoprim geht man von einer intrinsischen Resistenz aus. Daneben existieren mehrere erworbene Resistenzmechanismen. Hierzu zählen Mutationen im Dihydrofolatreduktasegen oder Änderungen, die zu einer verminderten Permeabilität der äußeren Bakterienmembran für das Antibiotikum führen [9]. Darüber hinaus kodiert das von einigen Stämmen über horizontalen Gentransfer erworbene *dhfr*-Gen für eine niedrigaffine Dihydrofolatreduktase. Trotz einiger Berichte über humane Trimethoprim-resistente *Acinetobacter*-Stämme konnte der molekulare Hintergrund bislang nicht detailliert aufgeklärt werden [9, 88, 239].

Die Sulfonamidresistenz ist im Gegensatz zur Trimethoprimresistenz ausschließlich Plasmidgebunden. In gramnegativen Bakterien existieren die beiden Gene *sulI* und *sulII*, welche für alternative Formen der Dihydropteroat-Synthase kodieren [9, 107]. Diese sind in der Lage, selektiv zwischen dem natürlichen Substrat p-Aminobenzoesäure und dem antibiotischen Wirkstoff Sulfonamid zu differenzieren. Studien zeigten, dass zwischen 28 % und 44 % der untersuchten humanen *A. baumannii*-Stämme das *sulI*-Gen besitzen [9, 56, 89, 124, 155, 185, 190, 221].

Für eine weitergehende Differenzierung der 56 *Acinetobacter*-Isolate wurde der Polymorphismus der 16S rRNS-Gene mittels ARDRA untersucht. Bei diesen Genen handelt es sich um hochkonservierte Regionen, die universell verbreitet sind und in mehreren Kopien im Genom vorkommen. Auf Grund der Stabilität dieser Regionen ist ihre Sequenzierung heutzutage ein wichtiger Bestandteil im Rahmen der Klassifizierung von Bakterien und Eukaryonten [95]. Bei der Spezieszuordnung von *Acinetobacter*-Isolaten erwies sich die Methode zwar als nützlich [140], jedoch ergaben sich z. T. abweichende Ergebnisse zu DNS-DNS-Hybridisierungsstudien, welche bis heute als Goldstandard für die Spezies-einteilung von *Acinetobacter*-Isolaten gelten [83]. Obwohl die Sequenzierung der 16S rRNS-Gene bei *Acinetobacter* spp. in den Hintergrund gerückt ist, gelang es mehreren Arbeitsgruppen eine Methode (ARDRA) zu etablieren, die auf der Basis von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen der rRNS-Gene eine Speziesidentifizierung von *Acinetobacter*-Isolaten erlaubt [65, 233]. In diesem Fall liegen der Analyse nicht alle Mutationen des Gens zugrunde, sondern nur diejenigen, welche zu Veränderungen im Schnittmuster der Restriktionsenzyme führen.

Die PCR-RFLP-Analyse zeigte, dass die Größe des 16S rDNS-Amplifikats bei den isolierten *Acinetobacter*-Spezies nahezu gleich war und mit einer Länge von ca. 1500 bp den Angaben aus der Literatur entsprach [117]. Die nachfolgend durchgeführte Restriktion der Amplifikate ergab fünf verschiedene Restriktionsprofile. Insgesamt konnten 52 Feldisolate der Spezies *A. baumannii* zugeordnet werden. Sie unterschieden sich untereinander lediglich in ihrem *MspI*-Muster, das in drei unterschiedlichen Varianten (Nr. 1, 3 und 1+3) auftrat. Auffallend war, dass das dritte *MspI*-Muster eine Kombination aus den ersten beiden darstellt. Ursache hierfür ist das Vorhandensein mehrerer Kopien der 16S rDNS innerhalb des bakteriellen Genoms. VANEECHOUTTE *et al.* (1995) publizierten die Kombination zunächst als eigenständiges Muster (Nr. 5) [233]. DIJKSHOORN *et al.* (1998) konnten nachweisen, dass das *MspI*-Muster 5 alle Banden des *MspI*-Musters 1 und des *MspI*-Musters 3 umfasst. Folglich benannten sie das Muster 5 in das Muster 1+3 um [65].

Drei der phänotypisch als non-*A. baumannii*-Spezies charakterisierten Isolate wurden mittels ARDRA der Genomosp. 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) zugeordnet. In der Literatur wurden für diese Genomospesies zwei verschiedene *CfoI*-Restriktionsmuster (Nr. 2 und 2+3) beschrieben [65]. Bei den drei animalen Feldisolaten trat nur das Muster Nr. 2 auf.

Ein Feldisolat (Nr. 43) konnte keiner der bislang bekannten DNS-Gruppen zugeordnet werden und wurde demzufolge vorerst als nicht klassifizierbar definiert. Isolate mit gleichem Restriktionsprofil wurden bereits von NEMEC *et al.* isoliert. Er prägte für diese Isolate den

Begriff „Phenon 5“, welcher analoge biochemische Eigenschaften impliziert. Derzeit wird davon ausgegangen, dass Vertreter dieser Gruppe einer neuen Spezies angehören, deren endgültige taxonomische Zuordnung jedoch weiterführender Untersuchungen bedarf.

Die Ergebnisse der PCR-RFLP-Analyse stimmen mit den Daten der phänotypischen Charakterisierung überein. Die anhand ihres eingeschränkten bzw. fehlenden Wachstums bei 44 °C identifizierten non-*A. baumannii*-Spezies konnten mittels ARDRA weiter differenziert und der Genomsp. 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) bzw. dem Phenon 5 zugeordnet werden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Aussagen zahlreicher Publikationen, die auf ein mangelndes diskriminatorisches Potential phänotypischer Tests im Bezug auf die Vertreter des *Acb*-Komplexes bzw. den non-*A. baumannii*-Spezies hinweisen [40, 67, 84, 110]. Sowohl das Phenon 5-Isolat als auch die Genomsp. 3 (*A. pittii* sp. nov., [157])-Isolate wiesen deutlich weniger Resistenzen gegenüber den getesteten Antibiotika auf. Sie waren gegenüber mindestens fünf von 27 antibiotischen Wirkstoffen empfindlich. Im Gegensatz dazu konnten bei *A. baumannii*-Feldisolaten Empfindlichkeiten gegenüber höchstens vier Antibiotika nachgewiesen werden. Das Auftreten multipler Resistenzen, v. a. bei *A. baumannii*-Stämmen im Gegensatz zu non-*A. baumannii*-Stämmen, wurde bereits beschrieben [229]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Resistenzprofil eines *Acinetobacter*-Isolats eventuell erste Hinweise auf dessen Spezieszugehörigkeit geben könnte.

Insgesamt ließ sich die Mehrzahl der animalen Feldisolate der Spezies *A. baumannii* zuordnen, welcher in der Humanmedizin die größte klinische Bedeutung zugesprochen wird [64, 110]. Ähnliche Beobachtungen konnten bei der Analyse von humanmedizinischem Probenmaterial auch von CHANDRA *et al.* (2002) bzw. LEE *et al.* (2007) gemacht werden [39, 122]. Untersuchungen im Hinblick auf eine eventuelle klinische Bedeutung der Genomsp. 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) bei Menschen sowie deren Anteil an klinischen *Acinetobacter*-Isolaten führten zu unterschiedlichen Ergebnissen [109, 227]. In der vorliegenden Studie stammten Proben, aus denen diese Genomsp. isoliert werden konnte, ausschließlich von Tieren aus außeruniversitären Kliniken und privaten Tierarztpraxen. Da keine Berichte diesbezüglich in der Veterinärmedizin existieren, kann über die klinische Bedeutung der Genomsp. 3 (*A. pittii* sp. nov., [157]) in deutschen Tierkliniken derzeit keine Aussage getroffen werden.

Die Makrorestriktionsanalyse bakterieller Genome mit Hilfe der Pulsfeldgelelektrophorese gilt als Goldstandard für die Feintypisierung von Bakterien. Sie bietet die Möglichkeit, Ausbrüche sowie Erregerübertragungen innerhalb von Institutionen zu erfassen [200]. Darüber hinaus kann die Makrorestriktionsanalyse auch dazu genutzt werden, den Verlauf

einer Infektion zu analysieren, indem Keime der transienten physiologischen Flora von den pathogenen Keimen unterschieden werden können [226]. Trotz standardisierter PFGE-Protokolle für die meisten nosokomialen Erreger und einer guten laborinternen Reproduzierbarkeit erwies sich ein Vergleich von Fragmentmustern, die in verschiedenen Laboratorien erzeugt wurden, lange Zeit als schwierig [200]. Zu diesem Zweck wurde eine zentrale Datenbank (<http://www.cdc.gov/pulsenet/>) eingerichtet, über die PFGE-Profile mittlerweile weltweit verglichen werden können. Für die vergleichende Analyse von Fragmentmustern dienen v. a. die von TENOVER *et al.* (1995) publizierten Kriterien: a) Isolate, die den Ausbruchsstamm repräsentieren, sind die jüngsten Nachkommen eines gemeinsamen Vorfahren, b) solche Isolate besitzen denselben Genotyp und c) epidemiologisch nicht verwandte Isolate weisen einen separaten Genotyp auf [212].

In der vorliegenden Studie wurden 56 Feldisolate aus den Jahren 2000 bis 2008 untersucht. Für Studien mit einer so großen Anzahl an Stämmen, die über einen Zeitraum von mehr als einem Jahr isoliert wurden, sind die von TENOVER beschriebenen Kriterien nicht anwendbar. Die Auswertung der Verwandtschaftsverhältnisse in dieser Arbeit basiert deshalb auf den von SEIFERT *et al.* (2005) speziell für die Gattung *Acinetobacter* etablierten PFGE-Kriterien. Eine Ähnlichkeit zweier Fragmentmuster von mindestens 87 % definiert dabei die Isolate, die zum selben epidemischen Stamm gehören [200]. Die dementsprechend interpretierten Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass der größte Teil der über acht Jahre aus mehreren Veterinärkliniken der JLU Gießen sowie außeruniversitären Kliniken kultivierten *Acinetobacter*-Isolate einem von drei Klonen zugeordnet werden kann. Daraus folgt, dass es in dem Zeitraum von 2000 bis 2008 innerhalb der universitären Kleintierklinik mindestens drei verschiedene *A. baumannii*-Ausbrüche gegeben haben muss. Der Schwellenwert für die Zugehörigkeit zweier Isolate zu einem *Acinetobacter*-Stamm wurde von SEIFERT *et al.* (2005) durch eine Ähnlichkeit von mindestens 95 % definiert [200]. Demzufolge kann es sich wie im Falle des zweiten Clusters auch um einen Ausbruch handeln, der von mehreren verschiedenen Stämmen verursacht wurde. Neun Isolate, zu denen u. a. auch die non-*A. baumannii*-Spezies gehören, clusterten weit unterhalb des Schwellenwerts. Das weist darauf hin, dass lediglich eine marginale Verwandtschaft zu den epidemischen Stämmen besteht.

Der Spezies *A. baumannii* wird seit langem ein Potential zur endemischen Verbreitung nachgesagt. Ursächlich hierfür ist zum einen die Multiresistenz vieler Stämme. Diese Eigenschaft konnte auch für die Isolate dieser Studie nachgewiesen werden. Zum anderen zeichnen sich endemische Stämme durch eine hohe Tenazität innerhalb des klinischen Umfelds aus [200]. Dass die Makrorestriktionsmuster der sieben *A. baumannii*-Isolate aus

Einsendungen von außeruniversitären Tierkliniken keine abweichenden PFGE-Profile aufweisen, deutet auf einen hohen Verwandtschaftsgrad hin. Obwohl kein epidemiologischer Zusammenhang zu den Isolaten aus der Veterinärklinik der JLU Gießen erkennbar war, konnten sie z. T. identischen Genotypen zugeordnet werden. Demzufolge liegt die Vermutung nahe, dass die genetische Diversität innerhalb der Spezies *A. baumannii* begrenzt ist [154]. Ähnliche Ergebnisse wurden für MRSA-Stämme beschrieben. Man geht davon aus, dass MRSA-Stämme mit geringer genetischer Diversität von einer geringen Anzahl an Vorfahren abstammen. Auf Grund dieser geringen genetischen Diversität können endemische Stämme häufig nicht von Stämmen unterschieden werden, die für einen Ausbruch innerhalb einer Klinik verantwortlich sind [212]. Eine komplette Übereinstimmung der Bandenmuster wurde v. a. zwischen den Isolaten aus der Chirurgischen und der Inneren Kleintierklinik der JLU Gießen festgestellt. In diesem Fall kann eine Ausbreitung der Stämme aus klonalen Linien vermutet werden. Aufgrund der epidemiologischen Gegebenheiten besteht die Möglichkeit, dass sowohl die Patienten selbst, aber auch die Tierbesitzer oder das Klinikpersonal an einer Verbreitung endemischer *A. baumannii*-Stämme beteiligt sein könnten. BOERLIN *et al.* beschrieben bereits 2001 die Übertragung eines multiresistenten *Acinetobacter*-Isolats aus einer schweizerischen Kleintierklinik auf einen Patienten der nahe gelegenen Pferdeklunik. Eine häufige Händedesinfektion von Seiten des Klinikpersonals hatte keinen präventiven Effekt im Hinblick auf die Verbreitung von *A. baumannii*-Stämmen [14]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu MRSA-Studien, bei denen der Übertragung über kontaminierte Hände eine herausragende Bedeutung zugesprochen wird [198].

Abgesehen von der Möglichkeit einer Übertragung der *A. baumannii*-Isolate innerhalb der universitären Kleintierklinik, muss auch daran gedacht werden, dass die Patienten sich nicht während ihres Aufenthalts sondern bereits vor der Aufnahme in die Klinik infiziert hatten. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass der zweite PFGE-Klon über acht Jahre durchgehend aus dem Patientenmaterial der universitären Kleintierklinik isoliert werden konnte. Selbst unter Berücksichtigung der hohen Tenazität multiresistenter *A. baumannii*-Stämme in der klinischen Umgebung, ist der Nachweis über einen so langen Zeitraum fraglich. Es ist deshalb eher anzunehmen, dass regelmäßig Tiere aufgenommen wurden, die Keime dieser klonalen Linie wiederholt in die Klinik eingeschleppt haben. Obwohl die Spezies *A. baumannii* bislang nicht als Keim der physiologischen Flora von Tieren beschrieben wurde [48, 119], stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob Tiere eventuell das natürliche Habitat sind. Eine abschließende Beurteilung diesbezüglich ist anhand der vorliegenden Ergebnisse noch nicht möglich und bedarf weiterführender Untersuchungen. Es muss auch geklärt werden, ob es

sich tatsächlich um ein akutes Ausbruchsgeschehen innerhalb der universitären Kleintierklinik gehandelt hat oder ob den Ergebnissen ein endemisches Geschehen zugrunde liegt. Ein Ausbruch ist laut Infektionsschutzgesetz (§ 6 Abs. 3) als „Häufung von Infektionen, bei denen ein epidemiologischer Zusammenhang vermutet wird“ definiert. Bis dato konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, ob *A. baumannii*-Stämme Tiere infizieren oder nur die Schleimhäute und die Haut der Tiere besiedeln. Da die *Acinetobacter*-Isolate der vorliegenden Studie über einen Zeitraum von acht Jahren isoliert wurden, ist es sehr schwierig einen epidemiologischen Zusammenhang herzustellen. Aus diesem Grund ist es fraglich, ob die Definition eines Ausbruchs laut Infektionsschutzgesetz für die Situation in der universitären Kleintierklinik angewendet werden kann. Außerdem ist keine erhöhte Inzidenz von *A. baumannii* bedingten Erkrankungen innerhalb eines bestimmten Zeitrahmens sowie Zeitraums zu erkennen. Im Rahmen der Routinediagnostik fiel jedoch auf, dass die Isolierung multiresistenter *A. baumannii*-Stämme aus Proben der Kleintierklinik der JLU Gießen seit 1998 bis heute kontinuierlich zunimmt. Eine Ausnahme stellten die Jahre 2004 und 2005 dar. In diesem Zeitraum sank vorübergehend die Anzahl isolierter *A. baumannii*-Stämme. Laut einer Studie von SEIFERT *et al.* (2005) handelt es sich um einen Ausbruch, wenn das PFGE-Profil der beteiligten Bakterienisolate zu mindestens 87 % übereinstimmt [200]. Nach dieser Definition hat es in der universitären Kleintierklinik in den letzten acht Jahren mindestens drei verschiedene Ausbrüche mit *Acinetobacter*-Stämmen gegeben. Eine abschließende Beurteilung, ob es sich bei dem Nachweis von *A. baumannii* aus Proben der Kleintierklinik um einen bzw. mehrere Ausbrüche gehandelt hat, ist auf Grund unterschiedlicher Definitionen und dem großen Untersuchungszeitraum nicht möglich. In der Humanmedizin sind Berichte hinsichtlich der Bewertung von Endemien oder Epidemien in Krankenhäusern ebenfalls widersprüchlich. Verschiedene Autoren berichteten von Epidemien mit multiresistenten *A. baumannii*-Stämmen in Krankenhäusern weltweit. Besonders betroffen waren Intensivstationen und dort v. a. mechanisch beatmete Patienten [6, 30, 36, 37, 55, 57, 87, 97]. Eine andere Bewertung ergab sich in einer niederländischen, humanmedizinischen Universitätsklinik. Dort konnte im Rahmen einer retrospektiven Studie (1999-2006) gezeigt werden, dass die Inzidenz zwischen 1,7 und 3,7 *Acinetobacter*-Isolaten pro 10000 Patienten jährlich betrug. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass es sich in der niederländischen Universitätsklinik eher um eine endemische Situation gehandelt hat als um verschiedene *A. baumannii*-Epidemien [227].

Die hochauflösende AFLP-Technik ist neben der Ribotypisierung und der PCR/ESI-MS eine von drei Methoden, die gleichzeitig sowohl eine Speziesidentifizierung als auch eine

Typisierung von Bakterien-Isolaten ermöglicht [112, 243]. Ein weiterer Vorteil der AFLP-Analyse besteht darin, dass für die Interpretation der AFLP-Profile definierte Cut-offs in der Literatur beschrieben werden. Demnach weisen Stämme derselben Spezies eine Übereinstimmung der AFLP-Profile von mindestens 50 % auf. Der Prozentsatz für die Klon- bzw. Stammdentifikation liegt bei 80 % bzw. 90 % [226]. In der vorliegenden Arbeit stellte sie eine Ergänzung sowohl zu den ARDRA- als auch zu den PFGE-Ergebnissen dar.

Die Speziesidentifikation der *A. baumannii*-Feldstämme mit Hilfe der AFLP-Analyse führte zu denselben Ergebnissen wie die Zuordnung mittels ARDRA. Für beide Methoden konnte ein hohes diskriminatorisches Potential hinsichtlich der Speziesdifferenzierung nachgewiesen werden [65, 233]. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass die AFLP-Analyse und die ARDRA zwei unterschiedliche Methoden darstellen, denen unterschiedliche Techniken zugrunde liegen. Bei der ARDRA handelt es sich um eine schnelle und kostengünstige Methode, die darauf abzielt intraspezifische Unterschiede anhand abweichender Restriktionsmuster aufzudecken. Die AFLP-Analyse hingegen ist eine zeit- und kostenaufwendige Technik, die bislang noch nicht in der Routinediagnostik eingesetzt wird [236]. Obwohl die ARDRA von einem Großteil der Autoren [39, 65, 233] als eine für die Differenzierung von *Acinetobacter*-Spezies zuverlässige Methode beschrieben wird, stellten KOELEMEN *et al.* in ihrer Studie lediglich ein geringes diskriminatorisches Potential fest [118].

Im Gegensatz zur PFGE (94,6 %) lag die Typisierbarkeit mittels AFLP-Analyse bei 100 %. Somit konnten auch die Isolate (Nr. 14, 43 und 51) typisiert werden, für die sich mittels PFGE keine Fragmentmuster erzeugen ließen. Ursächlich für das Versagen der Typisierung mittels PFGE sind vermutlich die von den Keimen sezernierten DNAsen. Ferner gibt es Stämme, deren DNS auf Grund modifizierter Restriktionsschnittstellen durch die im Allgemeinen verwendeten Restriktionsenzyme nicht gespaltet werden kann [249]. Die Ergebnisse der Typisierung stimmten bei beiden Methoden größtenteils überein. Diese Feststellung deckt sich mit Daten aus der Literatur [54, 204, 228]. Laut D'AGATA *et al.* (2001) sind die Typisierungsergebnisse von PFGE und AFLP-Analyse für die Spezies *A. baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa* vergleichbar. Im Gegensatz dazu bleibt für die Typisierung von Vancomycin-resistenten Enterokokken die Pulsfeldgelelektrophorese auf Grund eines höheren diskriminatorischen Potentials das Mittel der Wahl [54]. In der vorliegenden Arbeit wies die PFGE im Rahmen der Stammdifferenzierung in einigen Fällen ein größeres diskriminatorisches Potential auf als die AFLP-Analyse. Diese Beobachtung wurde bereits 2005 von SHAALY *et al.* gemacht [202].

Mit Hilfe der AFLP-Analyse wurde erstmalig die Zugehörigkeit animaler *A. baumannii*-Stämme zu den bislang ausschließlich in der Humanmedizin beschriebenen Europäischen Klone I-III nachgewiesen. Erste Aufmerksamkeit schenkte man diesen Klonen Mitte der 90iger Jahre [63]. Diese Stämme zeichnen sich neben der Multiresistenz gegenüber den meisten Antibiotika überdies durch eine hohe genetische Stabilität sowie eine rasche Adaptation an äußere Einflüsse aus [64]. Anhand vergleichender Untersuchungen konnte eine intraklonale Variabilität beim Ribo-, Sero- und Biotyp festgestellt werden, welche eine fortlaufende Veränderung der Klone über einen längeren Zeitraum bewirkt [154, 156, 167]. Auf Grund dieser Variabilität und einer weltweiten Verbreitung der EU-Klone ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Stämmen um evolutionsgeschichtlich alte klonale Linien handelt [154]. Es bleibt zu klären, ob die Stämme der EU-Klone spezielle Virulenzattribute aufweisen, die ihre Verbreitung begünstigen. Man geht davon aus, dass die Ausbreitung entweder auf dem Patientenaustausch zwischen den Krankenhäusern basiert oder dass diese Klone innerhalb der Gesellschaft kursieren und der antibiotische Selektionsdruck in den Kliniken zur Anhäufung dieser Stämme führte [63].

In der vorliegenden Arbeit konnten 19 (82,6 %) der 23 mittels AFLP-Analyse als *A. baumannii* identifizierten Feldisolate einem der drei Klone zugeordnet werden. NEMEC *et al.* (2004) berichteten von der Existenz der EU-Klone I und II bei Menschen in Tschechien. Der Anteil multiresistenter *A. baumannii*-Isolate, für die eine Zugehörigkeit zu den beiden Klonen nachgewiesen werden konnte, betrug 88,6 %. VAN DESSEL *et al.* (2004) beschrieben neben dem Vorkommen der ersten beiden Klone bei humanmedizinischen Patienten in den Niederlanden eine weitere PFGE-Gruppe von Isolaten, die er als EU-Klon III bezeichnete [154, 228].

Auffallend war, dass die vier *A. baumannii*-Isolate, die keinem der drei EU-Klone entsprachen, aus dem Genitaltrakt von Tieren stammten, so dass sich die Frage stellt, ob diese *A. baumannii*-Isolate der physiologischen Flora der Genitalschleimhäute zuzurechnen sind. Laut CLEMETSON *et al.* (1990) gehören *Acinetobacter* spp. zwar zur physiologischen Flora der Vagina und des Uterus gesunder Katzen, allerdings erfolgte in dieser Studie keine weitere Speziesdifferenzierung der *Acinetobacter*-Isolate [48].

Aus dem zoonotischen Aspekt ergibt sich weiterhin ein nicht einschätzbares Risiko der animalen *A. baumannii*-Stämme. Bislang ist keine Übertragung zwischen Menschen und Tieren beschrieben worden. Allerdings konnten Stämme der EU-Klone parallel bei Mensch und Tier nachgewiesen werden. Demgemäß kann nicht ausgeschlossen werden, dass es zu

einer Übertragung dieser Stämme von Tieren z. B. auf immunsupprimierte Personen kommen könnte.

Für Folgeuntersuchungen bietet sich u. a. eine MLST-Analyse humaner und animaler *A. baumannii*-Stämme an. Sie gilt als Goldstandard für phylogenetische Untersuchungen pathogener Bakterien [223].

Infolge steigender Nachweisraten multiresistenter *A. baumannii*-Stämme aus veterinärmedizinischem Probenmaterial, stellt sich darüber hinaus die Frage nach möglichen prädisponierenden Faktoren für eine Besiedlung bzw. Infektion mit *A. baumannii*. Als Risikofaktoren in der Humanmedizin gelten die Entwicklung der Notfallmedizin, die Einrichtung von Intensivstationen, die immer komplexer werdenden Behandlungen sowie die daraus resultierenden verlängerten Klinikaufenthalte [14]. Auf Grund der erhöhten Dichte infizierter Tiere innerhalb der Klinik für Kleintiere der JLU Gießen muss man davon ausgehen, dass dieselben Faktoren auch für die Tiermedizin gelten und es sich hierbei um ein Hospitalismusgeschehen handelt.

Die retrospektive Datenrecherche zeigte, dass *A. baumannii*-positive Proben bei Hunden aller Altersklassen (<1 bis 13 Jahre) isoliert werden konnten. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Angaben aus der Literatur [78, 142]. Im Gegensatz dazu treten in der Humanmedizin *A. baumannii*-Infektionen vorrangig bei Neugeborenen sowie Patienten hohen Alters auf [105, 110]. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Recherche überwiegend Hunde männlichen Geschlechts (78 %) betroffen waren, gibt Anlass zu Spekulationen. Das Geschlechterverhältnis der in die universitäre Kleintierklinik eingelieferten Hunde in den Jahren 2007 und 2008 lag bei 1,16 Rüden : 1 Hündin. In Anbetracht dieser Verteilung ist anzunehmen, dass andere Faktoren für das häufige Auftreten von *A. baumannii*-Stämmen bei Rüden eine Rolle spielen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die verhältnismäßig hohe Anzahl an Patienten mit Wundinfektionen sein, wenn man davon ausgeht, dass v. a. unkastrierte Rüden häufiger in Auseinandersetzungen mit Artgenossen involviert sind. Ähnliche Beobachtungen konnten auch von FRANCEY *et al.* (2000) gemacht werden. Zehn der 17 Hunde, aus denen *A. baumannii* isoliert werden konnte, waren männlichen Geschlechts [78]. Die Datenerhebung bei *A. baumannii*-positiven Katzen besitzt auf Grund der geringen Anzahl von lediglich sechs Tieren keine zufriedenstellende Aussagekraft und bleibt daher für die vorliegende Studie unberücksichtigt.

Im Rahmen einer retrospektiven Studie aus der Humanmedizin berichten VAN DEN BROEK *et al.* (2009) ebenfalls von einer Ungleichverteilung der Geschlechter. Obwohl über den

Untersuchungszeitraum von neun Jahren mehr Frauen als Männer (1 : 0,91) in das niederländische Universitätsklinikum eingeliefert wurden, lag der Anteil *Acinetobacter*-positiver Männer durchschnittlich bei 1,6 [227].

In der Humanmedizin gelten Patienten mit einer vorausgegangenen Antibiotikatherapie als besonders anfällig für eine Infektion mit *Acinetobacter*-Spezies [47, 81, 253]. Hierzu passend erscheint die Beobachtung, dass 88 % der betroffenen Hunde sowie alle Katzen aus der Kleintierklinik der JLU Gießen zum Zeitpunkt des *A. baumannii*-Nachweises mit Wirkstoffen aus den Gruppen der β -Lactame, Fluorchinolone, Aminoglykoside und/oder der Nitroimidazole behandelt wurden. Eine häufige oder langfristige Antibiotika-Therapie fördert die Ausbildung von Resistenzen. Diese können von den Erregern untereinander ausgetauscht werden und auch auf opportunistische Keime wie z. B. *Acinetobacter* spp. übertragen werden. Folglich kommt es zu einer Unempfindlichkeit gegenüber den in der Veterinärmedizin zur Verfügung stehenden antiinfektiven Wirkstoffen [13, 247].

Ein zusätzlicher Risikofaktor in der Humanmedizin stellt die Dauer des Krankenhausaufenthalts dar [81, 110]. *A. baumannii* ist in der Lage, auf belebten sowie unbelebten Oberflächen tage- bzw. wochenlang zu überleben, da er u. a. die Fähigkeit besitzt Biofilme zu bilden und sich unter eisenarmen Bedingungen zu vermehren [1, 69-71, 216]. In der vorliegenden Studie variierte der Aufenthalt *A. baumannii*-positiver Hunde zwischen 2 und 33 Tagen. Bei den Katzen betrug der stationäre Aufenthalt zwischen 5 und 19 Tagen. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob sich diese Tiere schon im Vorfeld mit *A. baumannii*-Stämmen infizierten bzw. besiedelt waren oder erst innerhalb der Klinik mit diesen in Kontakt gekommen sind. Daher ist eine Aussage, ob die Dauer des stationären Aufenthalts der Tiere (ähnlich wie in der Humanmedizin) einen Risikofaktor für die Infektion mit *A. baumannii* darstellt, nicht möglich.

Hinsichtlich der Erkrankungen, die bei den infizierten Hunden und Katzen diagnostiziert wurden, konnten zwei Gruppen unterschieden werden. In der ersten Gruppe lagen Erkrankungen vor (**Tabelle 28, Tabelle 29**), die eine chirurgische Intervention erforderlich machten. In diesen Fällen wurden die Tiere z. T. äußerst schwierigen operativen Methoden unterzogen. Zur gezielten Narkoseeinleitung sowie einer optimalen medikamentellen Versorgung *inter* und *post operationem* wurden bei diesen Tieren venöse Gefäßzugänge gelegt. Über Gefäßkatheter-assoziierte *A. baumannii*-Infektionen in der Humanmedizin wurde bereits berichtet [111]. VANEECHOUTTE *et al.* (2000) beschrieben die Isolierung multiresistenter *A. baumannii*-Stämme aus Jugularkathetern bei Pferden [231]. Demgemäß

könnten die Gefäßzugänge bei den Hunden und Katzen dieser Studie als Eintrittspforte für den Erreger fungiert haben.

Die zweite Gruppe bildeten Hunde, die in der Kleintierklinik der JLU Gießen auf Grund diverser Grunderkrankungen, wie z. B. einer Niereninsuffizienz oder einer Endocarditis valvularis thromboticans, vorgestellt wurden. Man kann davon ausgehen, dass diese Erkrankungen zu einer Immunsuppression bei den Patienten geführt haben, woraus letztlich eine erhöhte Anfälligkeit für opportunistische *A. baumannii*-Stämme resultierte.

In der vorliegenden Studie wurden ausschließlich Proben von Kleintieren ausgewertet, aus denen *A. baumannii* entweder als Reinkultur oder zusammen mit Kommensalen isoliert werden konnte. Diese Vorselektion sollte eine Aussage über die Bedeutung dieses Erregers in klinischer Hinsicht erleichtern. 88 % der Hunde und alle sechs Katzen konnten nach erfolgreichem chirurgischen Eingriff bzw. internistischer Therapie wieder aus der universitären Kleintierklinik entlassen werden. Diese Rekonvaleszenzrate steht im Einklang mit den Beobachtungen von VANEECHOUTTE *et al.* (2000), in deren Studie alle betroffenen Pferde ebenfalls nach Behandlung ihrer Grunderkrankung entlassen wurden [231]. Im Gegensatz dazu lag die Mortalitätsrate *A. baumannii*-positiver Hunde und Katzen, die in einer schweizerischen Universitätsklinik behandelt wurden, bei 59 % [78]. BRACHELENTE *et al.* (2007) schilderten den tödlichen Verlauf infolge einer durch *A. baumannii* verursachten nekrotisierenden Faszitis bei einer Katze, MOHRI *et al.* (2008) infolge einer *A. baumannii*-Pericarditis bei einem Hund [21, 142]. Widersprüchliche Mortalitätsraten bei Patienten mit *A. baumannii*-Infektionen stehen auch im Fokus einer aktuellen Diskussion in der Humanmedizin. Hier berichten zahlreiche Autoren von einer ca. 40 %igen Mortalität bei Patienten mit *A. baumannii*-Pneumonie oder -Septikämien [22, 42, 47]. Da *A. baumannii*-Infektionen allerdings ausschließlich bei immunsupprimierten Menschen mit schweren Grunderkrankungen auftreten [81], stellt sich die Frage, ob diese Patienten tatsächlich wegen oder lediglich mit der bestehenden *A. baumannii*-Infektion sterben. Zur Klärung dieser Frage wurde in verschiedenen Studien die sog. „attributable mortality“ (Mortalität bei Patienten mit *A. baumannii*-Infektion minus Mortalität bei Patienten ohne *A. baumannii*-Infektion) erfasst. Weder bei BLOT *et al.* (2003) noch bei FALAGAS *et al.* (2006) zeigte sich eine statistische Signifikanz für die erhöhte Mortalität *A. baumannii*-positiver Patienten, so dass beide Arbeitsgruppen eine Mitwirkung dieser Spezies am Tod der Patienten ausschlossen [12, 75]. Die Beurteilung der klinischen Bedeutung dieses Erregers sowohl für die Humanmedizin als auch für die Veterinärmedizin muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen bleiben.

VIII Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klassifizierung und Charakterisierung *Acinetobacter*-Isolate, die von Patienten aus deutschen Tierkliniken stammten. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Analyse des Verwandtschaftsgrads der animalen Isolate untereinander sowie des Verwandtschaftsgrads zu humanen Stämmen. Für die Untersuchungen standen 56 *Acinetobacter*-Feldisolate, die zwischen 2000 und 2008 aus unterschiedlichen Proben von Hunden, Katzen, Pferden, Rindern, einem Meerschweinchen, einem Wellensittich und einer Umgebungsprobe kultiviert werden konnten, zur Verfügung. Den Abschluss dieser Studie bildete eine retrospektiv durchgeführte Datenrecherche zur Ermittlung des Vorkommens von *A. baumannii* in veterinärmedizinischem Probenmaterial sowie einer etwaigen klinischen Bedeutung des Erregers.

Hinsichtlich des Phänotyps unterschieden sich die Isolate lediglich in ihrer Wachstumsfähigkeit bei 44 °C. Dadurch war eine Einteilung in *A. baumannii* (n = 52) bzw. non-*A. baumannii*-Spezies (n = 4) möglich. Die animalen *Acinetobacter*-Isolate wiesen Mehrfachresistenzen auf. Mit Ausnahme der Antibiotika Amikacin, Imipenem und Polymyxin B waren die getesteten Chemotherapeutika bei der Mehrzahl der untersuchten Feldisolate unwirksam.

Die molekulare Charakterisierung der 56 *Acinetobacter*-Feldisolate erfolgte durch Analyse der 16S rDNS und DNS-Fingerprinting.

Mittels der „Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis“ der 16S rRNS-Gene mit fünf Restriktionsenzymen wurde die phänotypische Klassifizierung von 52 der 56 Feldisolate als Angehörige der klinisch bedeutsamsten Spezies *A. baumannii* bestätigt. Für drei der phänotypisch als non-*A. baumannii* deklarierten Isolate konnte ein dem *A. genomsp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157]) ATCC 19004-Referenzstamm entsprechendes Restriktionsprofil nachgewiesen werden. Ein Isolat (Nr. 43) wies ein bislang nicht klassifizierbares Profil auf.

Durch die Makrorestriktion genomischer DNS mit der Endonuclease *ApaI* und der sich anschließenden Pulsfeldgelelektrophorese wurde ein genetischer Fingerabdruck erstellt. Die *Acinetobacter*-Isolate aus deutschen Tierkliniken zeigten hierbei einen hohen, bis zu 100 %igen Verwandtschaftsgrad. Auch die zehn Isolate aus außeruniversitären Tierkliniken und privaten Tierarztpraxen wiesen z. T. identische Bandenmuster auf. Insgesamt konnten drei Cluster sowie neun einzelne PFGE-Typen differenziert werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass mehrere epidemische *A. baumannii*-Klone in deutschen Tierkliniken

und Tierarztpraxen kursieren. Die genetische Diversität innerhalb dieser Spezies scheint darüber hinaus begrenzt zu sein.

Eine weitere hochauflösende Fingerprinting-Methode, die sog. AFLP-Analyse, ermöglicht zeitgleich eine Speziesidentifikation sowie eine Typisierung von *Acinetobacter*-Feldisolaten. Die Ergebnisse der AFLP-Analysen stimmten weitgehend mit denen der PFGE überein. Darüber hinaus konnte die Zugehörigkeit von 19 Isolaten zu humanen Stämmen, den EU-Klonen I, II oder III, nachgewiesen werden.

Nach diesen Ergebnissen ist *A. baumannii* die vorherrschende *Acinetobacter*-Spezies in Probenmaterial von Patienten deutscher Tierkliniken. Das Vorkommen von Isolaten des PFGE-Clusters 2 bei verschiedenen Tieren in einer Kleintierklinik über einen Zeitraum von acht Jahren weist auf ein endemisches Geschehen hin. Der Nachweis der Europäischen Klone I, II und III in kranken, hospitalisierten Tieren lässt darauf schließen, dass es sich bei der Spezies *A. baumannii*, ähnlich wie in der Humanmedizin, um einen ernst zunehmenden nosokomialen Erreger in der Veterinärmedizin handelt. Auf Grund der Verwandtschaft animaler und humaner Stämme ist nicht auszuschließen, dass es zu einer wechselseitigen Übertragung der *A. baumannii*-Stämme zwischen Mensch und Tier kommt.

IX Summary

The aim of the present study was to classify and characterize *Acinetobacter* isolates from German veterinary clinic patients. Analysing the degree of relationship among the animal isolates themselves as well as comparison with human strains has been the main focus. Altogether, 56 *Acinetobacter* isolates gaining from samples taken from dogs, cats, horses, cattle, one guinea pig, one budgerigar and one environmental swab in between 2000 and 2008 were examined thoroughly. Finally, a retrospective data investigation was performed to determine the frequency of *A. baumannii* in veterinary samples and a possible clinical impact of this organism.

Regarding the phenotype, isolates only differed in their ability to grow at 44 degrees. Based on this result, they were either identified as *A. baumannii* (n = 52) or non-*A. baumannii* species (n = 4). Animal *Acinetobacter* isolates featured multiple drug resistances. Except amikacin, imipenem and polymyxin B, tested chemotherapeutics were ineffective against the majority of the field isolates.

Molecular characterization of the 56 *Acinetobacter* field isolates was performed by 16S rDNA analysis and DNA fingerprinting.

The 16S rRNA gene sequences have been the target of PCR-RFLP studies by use of five restriction endonucleases resulting in the classification of 52 from 56 field isolates as members of the clinically most important species *A. baumannii*. Three phenotypically assigned to non-*A. baumannii* isolates yielded the same restriction profile like the *A. genomosp. 3* (*A. pittii* sp. nov., [157]) ATCC reference strain 19004. One isolate (no. 43) revealed a not yet classified profile.

DNA fingerprints were produced by macrorestriction of genomic DNA with the endonuclease *ApaI* and subsequent pulsed-field gel electrophoresis. *Acinetobacter* isolates from different German veterinary clinics showed a high degree of molecular relatedness of up to 100 %. Even the ten isolates from non-university hospitals featured in part identical band patterns. In general, three clusters and nine unique PFGE types could be detected. These results imply circulating of several epidemic *A. baumannii* clones in German veterinary clinics as well as animal veterinary practices and that the genetic diversity within this species seems to be limited.

Another high resolution fingerprinting method called AFLP analysis was performed. Thereby species identification and typing of the *Acinetobacter* field isolates can be carried out simultaneously. The AFLP results showed a correlation with those obtained by PFGE. In

addition, membership of 19 isolates to human strains, the European clones I, II or III, could be detected.

Within the genus *Acinetobacter*, *A. baumannii* is the predominant species in specimens from patients of German veterinary clinics. The occurrence of PFGE cluster 2 isolates in different animals of a small animal clinic over eight years might indicate endemic occurrence of these organisms. Occurrence of the European clones I, II and III in ill, hospitalized animals might indicate that, like in human medicine, *A. baumannii* is an upcoming nosocomial pathogen in veterinary medicine. Due to the relationship of animal and human strains, it cannot be ruled out that it comes to a mutual transmission of *A. baumannii* strains between humans and animals.

X Literaturverzeichnis

1. Actis, L.A., M.E. Tolmasky, L.M. Crosa and J.H. Crosa, *Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol, 1993. **31**(10): p. 2812-5.
2. Afzal-Shah, M., N. Woodford and D.M. Livermore, *Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(2): p. 583-8.
3. Allardet-Servent, A., N. Bouziges, M.J. Carles-Nurit, G. Bourg, A. Gouby and M. Ramuz, *Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(9): p. 2057-61.
4. Anstey, N.M., B.J. Currie, M. Hassell, D. Palmer, B. Dwyer and H. Seifert, *Community-acquired bacteremic Acinetobacter pneumonia in tropical Australia is caused by diverse strains of Acinetobacter baumannii, with carriage in the throat in at-risk groups*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 685-6.
5. Appleman, M.D., H. Belzberg, D.M. Citron, P.N. Heseltine, A.E. Yellin, J. Murray and T.V. Berne, *In vitro activities of nontraditional antimicrobials against multiresistant Acinetobacter baumannii strains isolated in an intensive care unit outbreak*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(4): p. 1035-40.
6. Aygun, G., O. Demirkiran, T. Utku, B. Mete, S. Urkmez, M. Yilmaz, H. Yasar, Y. Dikmen and R. Ozturk, *Environmental contamination during a carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii outbreak in an intensive care unit*. J Hosp Infect, 2002. **52**(4): p. 259-62.
7. Bartual, S.G., H. Seifert, C. Hippler, M.A. Luzon, H. Wisplinghoff and F. Rodriguez-Valera, *Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4382-90.
8. Baumann, P., *Isolation of Acinetobacter from soil and water*. J Bacteriol, 1968. **96**(1): p. 39-42.
9. Bergogne-Berezin, E., H. Friedman and M. Bendinelli, *Acinetobacter Biology and Pathogenesis*. Acinetobacter Biology and Pathogenesis Infectious Agents And Pathogenesis, ed. M. Bendinelli, Friedman, H. 2008: Springer Science+Business Media, LLC, New York, USA. 220.
10. Bergogne-Berezin, E. and K.J. Towner, *Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(2): p. 148-65.
11. Berlau, J., H.M. Aucken, E. Houang and T.L. Pitt, *Isolation of Acinetobacter spp. including A. baumannii from vegetables: implications for hospital-acquired infections*. J Hosp Infect, 1999. **42**(3): p. 201-4.
12. Blot, S., K. Vandewoude and F. Colardyn, *Nosocomial bacteremia involving Acinetobacter baumannii in critically ill patients: a matched cohort study*. Intensive Care Med, 2003. **29**(3): p. 471-5.
13. Boerlin, P., *Molecular epidemiology of antimicrobial resistance in veterinary medicine: where do we go?* Anim Health Res Rev, 2004. **5**(1): p. 95-102.
14. Boerlin, P., S. Eugster, F. Gaschen, R. Straub and P. Schawalder, *Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital*. Vet Microbiol, 2001. **82**(4): p. 347-59.

15. Boom, R., C.J. Sol, M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M. Wertheim-van Dillen and J. van der Noordaa, *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(3): p. 495-503.
16. Bou, G. and J. Martinez-Beltran, *Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC beta-lactamase in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(2): p. 428-32.
17. Bou, G., A. Oliver and J. Martinez-Beltran, *OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an Acinetobacter baumannii clinical strain*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(6): p. 1556-61.
18. Bouvet, P.J. and P. Grimont, *Taxonomy of the genus Acinetobacter with the recognition of Acinetobacter baumannii sp. nov., Acinetobacter haemolyticus sp. nov., Acinetobacter johnsonii sp. nov., and Acinetobacter junii sp. nov. and emended descriptions of Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter lwoffii*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1986: p. 228-240.
19. Bouvet, P.J. and P.A. Grimont, *Identification and biotyping of clinical isolates of Acinetobacter*. Ann Inst Pasteur Microbiol, 1987. **138**(5): p. 569-78.
20. Bouvet, P.J. and S. Jeanjean, *Delineation of new proteolytic genomic species in the genus Acinetobacter*. Res Microbiol, 1989. **140**(4-5): p. 291-9.
21. Brachelente, C., D. Wiener, Y. Malik and D. Huessy, *A case of necrotizing fasciitis with septic shock in a cat caused by Acinetobacter baumannii*. Vet Dermatol, 2007. **18**(6): p. 432-8.
22. Brahmi, N., O. Beji, N. Abidi, N. Kouraiichi, Y. Blel, H. El Ghord, H. Thabet and M. Amamou, *Epidemiology and risk factors for colonization and infection by Acinetobacter baumannii in an ICU in Tunisia, where this pathogen is endemic*. J Infect Chemother, 2007. **13**(6): p. 400-4.
23. Braun, G. and M.C. Vidotto, *Evaluation of adherence, hemagglutination, and presence of genes codifying for virulence factors of Acinetobacter baumannii causing urinary tract infection*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 2004. **99**(8): p. 839-44.
24. Brisou, J. and A.R. Prevot, [*Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under Acromobacter group.*]. Ann Inst Pasteur (Paris), 1954. **86**(6): p. 722-8.
25. Brisse, S., D. Milatovic, A.C. Fluit, K. Kusters, A. Toelstra, J. Verhoef and F.J. Schmitz, *Molecular surveillance of European quinolone-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter spp. using automated ribotyping*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(10): p. 3636-45.
26. Brodersen, D.E., W.M. Clemons, Jr., A.P. Carter, R.J. Morgan-Warren, B.T. Wimberly and V. Ramakrishnan, *The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit*. Cell, 2000. **103**(7): p. 1143-54.
27. Brown, S. and S. Amyes, *OXA (beta)-lactamases in Acinetobacter: the story so far*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(1): p. 1-3.
28. Brown, S. and S.G. Amyes, *The sequences of seven class D beta-lactamases isolated from carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii from four continents*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(4): p. 326-9.
29. Brown, S., H.K. Young and S.G. Amyes, *Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of Acinetobacter baumannii from Argentina*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(1): p. 15-23.
30. Buisson, Y., G. Tran Van Nhieu, L. Ginot, P. Bouvet, H. Schill, L. Driot and M. Meyran, *Nosocomial outbreaks due to amikacin-resistant tobramycin-sensitive Acinetobacter species: correlation with amikacin usage*. J Hosp Infect, 1990. **15**(1): p. 83-93.

31. Burak, S., S. Engelhart, M. Exner, G. Marklein, I. Purr, C. Putensen, I. Wiegand and B. Wiedemann, *Nosokomiale Ausbrüche multiresistenter Klebsiella-pneumoniae-Stämme auf Intensivstationen*. Chemotherapie Journal, 2006(15): p. 112-118.
32. Burdett, V., *Tet(M)-promoted release of tetracycline from ribosomes is GTP dependent*. J Bacteriol, 1996. **178**(11): p. 3246-51.
33. Bush, K., *New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(7): p. 1085-9.
34. Carr, E.L., P. Kampfer, B.K. Patel, V. Gurtler and R.J. Seviour, *Seven novel species of Acinetobacter isolated from activated sludge*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 4): p. 953-63.
35. Carretto, E., D. Barbarini, C. Farina, A. Grosini, P. Nicoletti and E. Manso, *Use of the DiversiLab semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on Acinetobacter baumannii isolates in different Italian hospitals*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **60**(1): p. 1-7.
36. Catalano, M., L.S. Quelle, P.E. Jeric, A. Di Martino and S.M. Maimone, *Survival of Acinetobacter baumannii on bed rails during an outbreak and during sporadic cases*. J Hosp Infect, 1999. **42**(1): p. 27-35.
37. Cefai, C., J. Richards, F.K. Gould and P. McPeake, *An outbreak of Acinetobacter respiratory tract infection resulting from incomplete disinfection of ventilatory equipment*. J Hosp Infect, 1990. **15**(2): p. 177-82.
38. Celenza, G., C. Pellegrini, M. Caccamo, B. Segatore, G. Amicosante and M. Perilli, *Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(5): p. 975-8.
39. Chandra, R., A. Kapil, P. Sharma and B. Das, *Identification of Acinetobacter species isolated from clinical specimens by amplified ribosomal DNA restriction analysis*. Indian J Med Res, 2002. **116**: p. 1-4.
40. Chang, H.C., Y.F. Wei, L. Dijkshoorn, M. Vaneechoutte, C.T. Tang and T.C. Chang, *Species-level identification of isolates of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex by sequence analysis of the 16S-23S rRNA gene spacer region*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 1632-9.
41. Chastre, J. and J.L. Trouillet, *Problem pathogens (Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter)*. Semin Respir Infect, 2000. **15**(4): p. 287-98.
42. Chen, M.Z., P.R. Hsueh, L.N. Lee, C.J. Yu, P.C. Yang and K.T. Luh, *Severe community-acquired pneumonia due to Acinetobacter baumannii*. Chest, 2001. **120**(4): p. 1072-7.
43. Chen, S.F., W.N. Chang, C.H. Lu, Y.C. Chuang, H.H. Tsai, N.W. Tsai, H.W. Chang, P.Y. Lee, C.C. Chien and C.R. Huang, *Adult Acinetobacter meningitis and its comparison with non-Acinetobacter gram-negative bacterial meningitis*. Acta Neurol Taiwan, 2005. **14**(3): p. 131-7.
44. Chu, G. and K. Gunderson, *Separation of large DNA by a variable-angle contour-clamped homogeneous electric field apparatus*. Anal Biochem, 1991. **194**(2): p. 439-46.
45. Chu, G., D. Vollrath and R.W. Davis, *Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields*. Science, 1986. **234**(4783): p. 1582-5.
46. Chu, Y.W., M. Afzal-Shah, E.T. Houang, M.I. Palepou, D.J. Lyon, N. Woodford and D.M. Livermore, *IMP-4, a novel metallo-beta-lactamase from nosocomial Acinetobacter spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(3): p. 710-4.

47. Cisneros, J.M. and J. Rodriguez-Bano, *Nosocomial bacteremia due to Acinetobacter baumannii: epidemiology, clinical features and treatment*. Clin Microbiol Infect, 2002. **8**(11): p. 687-93.
48. Clemetson, L. and A. Ward, *Bacterial flora of the vagina and uterus of healthy cats*. JAVMA, 1990. **196**(6): p. 902-906.
49. Connell, S.R., D.M. Tracz, K.H. Nierhaus and D.E. Taylor, *Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3675-81.
50. Cornaglia, G., M.L. Riccio, A. Mazzariol, L. Lauretti, R. Fontana and G.M. Rossolini, *Appearance of IMP-1 metallo-beta-lactamase in Europe*. Lancet, 1999. **353**(9156): p. 899-900.
51. Corvec, S., L. Poirel, T. Naas, H. Drugeon and P. Nordmann, *Genetics and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-23 in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(4): p. 1530-3.
52. Costa, S.F., J. Woodcock, M. Gill, R. Wise, A.A. Barone, H. Caiaffa and A.S. Levin, *Outer-membrane proteins pattern and detection of beta-lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii from Brazil*. Int J Antimicrob Agents, 2000. **13**(3): p. 175-82.
53. Crosa, J.H., D.J. Brenner and S. Falkow, *Use of a single-strand specific nuclease for analysis of bacterial and plasmid deoxyribonucleic acid homo- and heteroduplexes*. J Bacteriol, 1973. **115**(3): p. 904-11.
54. D'Agata, E.M., M.M. Gerrits, Y.W. Tang, M. Samore and J.G. Kusters, *Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment-length polymorphism for epidemiological investigations of common nosocomial pathogens*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2001. **22**(9): p. 550-4.
55. D'Agata, E.M., V. Thayer and W. Schaffner, *An outbreak of Acinetobacter baumannii: the importance of cross-transmission*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2000. **21**(9): p. 588-91.
56. Da Silva, G.J., M. Correia, C. Vital, G. Ribeiro, J.C. Sousa, R. Leitao, L. Peixe and A. Duarte, *Molecular characterization of bla(IMP-5), a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from an Acinetobacter baumannii nosocomial isolate in Portugal*. FEMS Microbiol Lett, 2002. **215**(1): p. 33-9.
57. Dalla-Costa, L.M., J.M. Coelho, H.A. Souza, M.E. Castro, C.J. Stier, K.L. Bragagnolo, A. Rea-Neto, S.R. Penteado-Filho, D.M. Livermore and N. Woodford, *Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3403-6.
58. Damier-Piolle, L., S. Magnet, S. Bremont, T. Lambert and P. Courvalin, *AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(2): p. 557-62.
59. Davis, K.A., K.A. Moran, C.K. McAllister and P.J. Gray, *Multidrug-resistant Acinetobacter extremity infections in soldiers*. Emerg Infect Dis, 2005. **11**(8): p. 1218-24.
60. Devaud, M., F.H. Kayser and B. Bachi, *Transposon-mediated multiple antibiotic resistance in Acinetobacter strains*. Antimicrob Agents Chemother, 1982. **22**(2): p. 323-9.
61. Di Cello, F. and e. al., *Emended description of "Acinetobacter venetianus"*. IJSEM 2008, 1997.
62. Di Cello, F., M. Pepi, F. Baldi and R. Fani, *Molecular characterization of an n-alkane-degrading bacterial community and identification of a new species, Acinetobacter venetianus*. Res Microbiol, 1997. **148**(3): p. 237-49.

63. Dijkshoorn, L., H. Auckan, P. Gerner-Smidt, P. Janssen, M.E. Kaufmann, J. Garaizar, J. Ursing and T.L. Pitt, *Comparison of outbreak and nonoutbreak Acinetobacter baumannii strains by genotypic and phenotypic methods*. J Clin Microbiol, 1996. **34**(6): p. 1519-25.
64. Dijkshoorn, L., A. Nemeč and H. Seifert, *An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii*. Nat Rev Microbiol, 2007. **5**(12): p. 939-51.
65. Dijkshoorn, L., B. Van Harsselaar, I. Tjernberg, P.J. Bouvet and M. Vaneechoutte, *Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of Acinetobacter genomic species*. Syst Appl Microbiol, 1998. **21**(1): p. 33-9.
66. Dobrewski, R., E. Savov, A.T. Bernards, M. van den Barselaar, P. Nordmann, P.J. van den Broek and L. Dijkshoorn, *Genotypic diversity and antibiotic susceptibility of Acinetobacter baumannii isolates in a Bulgarian hospital*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(11): p. 1135-7.
67. Dolzani, L., E. Tonin, C. Lagatolla, L. Prandin and C. Monti-Bragadin, *Identification of Acinetobacter isolates in the A. calcoaceticus-A. baumannii complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(5): p. 1108-13.
68. Donald, H.M., W. Scaife, S.G. Amyes and H.K. Young, *Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in Acinetobacter baumannii 6B92*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(1): p. 196-9.
69. Dorsey, C.W., M.S. Beglin and L.A. Actis, *Detection and analysis of iron uptake components expressed by Acinetobacter baumannii clinical isolates*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(9): p. 4188-93.
70. Dorsey, C.W., A.P. Tomaras, P.L. Connerly, M.E. Tolmasky, J.H. Crosa and L.A. Actis, *The siderophore-mediated iron acquisition systems of Acinetobacter baumannii ATCC 19606 and Vibrio anguillarum 775 are structurally and functionally related*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 11): p. 3657-67.
71. Echenique, J.R., H. Arienti, M.E. Tolmasky, R.R. Read, R.J. Staneloni, J.H. Crosa and L.A. Actis, *Characterization of a high-affinity iron transport system in Acinetobacter baumannii*. J Bacteriol, 1992. **174**(23): p. 7670-9.
72. Endimiani, A., F. Luzzaro, R. Migliavacca, E. Mantengoli, A.M. Hujer, K.M. Hujer, L. Pagani, R.A. Bonomo, G.M. Rossolini and A. Toniolo, *Spread in an Italian hospital of a clonal Acinetobacter baumannii strain producing the TEM-92 extended-spectrum beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(6): p. 2211-4.
73. Enright, M.C., P.E. Carter, I.A. MacLean and H. McKenzie, *Phylogenetic relationships between some members of the genera Neisseria, Acinetobacter, Moraxella, and Kingella based on partial 16S ribosomal DNA sequence analysis*. Int J Syst Bacteriol, 1994. **44**(3): p. 387-91.
74. Enright, M.C. and B.G. Spratt, *Multilocus sequence typing*. Trends Microbiol, 1999. **7**(12): p. 482-7.
75. Falagas, M.E., I.A. Bliziotis and Siempos, II, *Attributable mortality of Acinetobacter baumannii infections in critically ill patients: a systematic review of matched cohort and case-control studies*. Crit Care, 2006. **10**(2): p. R48.
76. Figueiredo, S., L. Poirel, A. Papa, V. Koulourida and P. Nordmann, *First identification of VIM-4 metallo-beta-lactamase in Acinetobacter spp.* Clin Microbiol Infect, 2008. **14**(3): p. 289-90.
77. Fournier, P.E., D. Vallenet, V. Barbe, S. Audic, H. Ogata, L. Poirel, H. Richet, C. Robert, S. Mangenot, C. Abergel, P. Nordmann, J. Weissenbach, D. Raoult and J.M. Claverie, *Comparative genomics of multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet, 2006. **2**(1): p. e7.

78. Francey, T., F. Gaschen, J. Nicolet and A.P. Burnens, *The role of Acinetobacter baumannii as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit*. J Vet Intern Med, 2000. **14**(2): p. 177-83.
79. Frota, C. and J. Moreira, *Frequency of nonfermentative gram-negative bacilli isolated from clinical materials of patients at universidade federal do ceara hospital complex-brazil*. Revista de Micriobiologia, 1998. **29**(3).
80. Gales, A.C., M.C. Tognim, A.O. Reis, R.N. Jones and H.S. Sader, *Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an Acinetobacter baumannii clinical strain from a Brazilian teaching hospital*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **45**(1): p. 77-9.
81. Garcia-Garmendia, J.L., C. Ortiz-Leyba, J. Garnacho-Montero, F.J. Jimenez-Jimenez, C. Perez-Paredes, A.E. Barrero-Almodovar and M. Gili-Miner, *Risk factors for Acinetobacter baumannii nosocomial bacteremia in critically ill patients: a cohort study*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(7): p. 939-46.
82. Gehrlein, M., H. Leying, W. Cullmann, S. Wendt and W. Opferkuch, *Imipenem resistance in Acinetobacter baumannii is due to altered penicillin-binding proteins*. Chemotherapy, 1991. **37**(6): p. 405-12.
83. Gerischer, U., *Acinetobacter Molecular Biology*, ed. U. Gerischer. 2008: Caister Academic Press, Norfolk, UK. 348.
84. Gerner-Smidt, P., *Ribotyping of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(10): p. 2680-5.
85. Gerner-Smidt, P. and I. Tjernberg, *Acinetobacter in Denmark: II. Molecular studies of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex*. Apmis, 1993. **101**(11): p. 826-32.
86. Gilson, E., J.M. Clement, D. Brutlag and M. Hofnung, *A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in E. coli*. Embo J, 1984. **3**(6): p. 1417-21.
87. Giordano, A., P. Varesi, A. Bertini, L. Villa, A.M. Dionisi, M. Venditti, P. Carfagna, I. Luzzi, C. Mancini and A. Carattoli, *Outbreak of Acinetobacter baumannii producing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58 in Rome, Italy*. Microb Drug Resist, 2007. **13**(1): p. 37-43.
88. Goldstein, F.W., A. Labigne-Roussel, G. Gerbaud, C. Carlier, E. Collatz and P. Courvalin, *Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in Acinetobacter*. Plasmid 10, 1983: p. 138-147.
89. Gombac, F., M.L. Riccio, G.M. Rossolini, C. Lagatolla, E. Tonin, C. Monti-Bragadin, A. Lavenia and L. Dolzani, *Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of Acinetobacter baumannii from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays*. Antimicrob Agents Chemother, 2002. **46**(11): p. 3665-8.
90. Gouby, A., M.J. Carles-Nurit, N. Bouziges, G. Bourg, R. Mesnard and P.J. Bouvet, *Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol, 1992. **30**(6): p. 1588-91.
91. Grimont, P., M. Popoff, F. Grimont, C. Coynault and M. Lemelin, *Reproducibility and Correlation Study of Three Deoxyribonucleic Acid Hybridization Procedures*. Current Microbiology, 1980. **4**: p. 325-330.
92. Guardabassi, L., A. Dalsgaard and J.E. Olsen, *Phenotypic characterization and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. isolated from aquatic sources*. J Appl Microbiol, 1999. **87**(5): p. 659-67.
93. Gupta, S., D. Govil, P.N. Kakar, O. Prakash, D. Arora, S. Das, P. Govil and A. Malhotra, *Colistin and polymyxin B: A re-emergence*. Indian J Crit Care Med, 2009. **13**(2): p. 49-53.

94. Hahn, H., D. Falke, S.H.E. Kaufmann and U. Ullmann, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5 ed. 2004, Springer-Verlag GmbH, Berlin, Germany. 1050.
95. Harmsen, D., *16S rRNA-Gen basierte Identifizierung von pathogenen Mikroorganismen*. BIOSpektrum, Sonderausgabe, 2002. **11**: p. 528-529.
96. Heisig, P., *Wirkungs- und Resistenzmechanismen der β -Lactam-Antibiotika*. Pharmazie in unserer Zeit, 2006. **35**: p. 400-408.
97. Heritier, C., A. Dubouix, L. Poirel, N. Marty and P. Nordmann, *A nosocomial outbreak of Acinetobacter baumannii isolates expressing the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-58*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(1): p. 115-8.
98. Heritier, C., L. Poirel, D. Aubert and P. Nordmann, *Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(1): p. 268-73.
99. Heritier, C., L. Poirel, P.E. Fournier, J.M. Claverie, D. Raoult and P. Nordmann, *Characterization of the naturally occurring oxacillinase of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(10): p. 4174-9.
100. Heritier, C., L. Poirel, T. Lambert and P. Nordmann, *Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(8): p. 3198-202.
101. Heritier, C., L. Poirel and P. Nordmann, *Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAbal in Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect, 2006. **12**(2): p. 123-30.
102. Higgins, P.G., C. Dammhayn, M. Hackel and H. Seifert, *Global spread of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2010. **65**(2): p. 233-8.
103. Higgins, P.G., H. Wisplinghoff, O. Krut and H. Seifert, *A PCR-based method to differentiate between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(12): p. 1199-201.
104. Higgins, P.G., H. Wisplinghoff, D. Stefanik and H. Seifert, *Selection of topoisomerase mutations and overexpression of adeB mRNA transcripts during an outbreak of Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(4): p. 821-3.
105. Horrevorts, A., K. Bergman, L. Kollee, I. Breuker, I. Tjernberg and L. Dijkshoorn, *Clinical and epidemiological investigations of Acinetobacter genomospecies 3 in a neonatal intensive care unit*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(6): p. 1567-72.
106. Huang, J., Y.Q. Tang and J.Y. Sun, *Intravenous colistin sulfate: A rarely used form of polymyxin E for the treatment of severe multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections*. Scand J Infect Dis, 2010.
107. Huovinen, P., L. Sundstrom, G. Swedberg and O. Skold, *Trimethoprim and sulfonamide resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(2): p. 279-89.
108. Huys, G., M. Cnockaert, A. Nemeč, L. Dijkshoorn, S. Brisse, M. Vaneechoutte and J. Swings, *Repetitive-DNA-element PCR fingerprinting and antibiotic resistance of pan-European multi-resistant Acinetobacter baumannii clone III strains*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 9): p. 851-6.
109. Idzenga, D., M.A. Schouten and A.R. van Zanten, *Outbreak of Acinetobacter genomic species 3 in a Dutch intensive care unit*. J Hosp Infect, 2006. **63**(4): p. 485-7.
110. Janata, O. and E. Reisinger, *Infektiologie Aktuelle Aspekte - Jahrbuch 2006*. 2006: Österreichische V.-G. 406.
111. Jang, T.N., S.H. Lee, C.H. Huang, C.L. Lee and W.Y. Chen, *Risk factors and impact of nosocomial Acinetobacter baumannii bloodstream infections in the adult intensive care unit: a case-control study*. J Hosp Infect, 2009. **73**(2): p. 143-50.

112. Janssen, P., R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau and K. Kersters, *Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy*. Microbiology, 1996. **142**(Pt 7): p. 1881-93.
113. Janssen, P., K. Maquelin, R. Coopman, I. Tjernberg, P. Bouvet, K. Kersters and L. Dijkshoorn, *Discrimination of Acinetobacter genomic species by AFLP fingerprinting*. Int J Syst Bacteriol, 1997. **47**(4): p. 1179-87.
114. Jeon, B.C., S.H. Jeong, I.K. Bae, S.B. Kwon, K. Lee, D. Young, J.H. Lee, J.S. Song and S.H. Lee, *Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the OXA-23 beta-lactamase in Korea*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(5): p. 2241-5.
115. Juni, E. and A. Janik, *Transformation of Acinetobacter calco-aceticus (Bacterium anitratum)*. J Bacteriol, 1969. **98**(1): p. 281-8.
116. Kim, D., K.S. Baik, M.S. Kim, S.C. Park, S.S. Kim, M.S. Rhee, Y.S. Kwak and C.N. Seong, *Acinetobacter soli sp. nov., isolated from forest soil*. J Microbiol, 2008. **46**(4): p. 396-401. Epub 2008 Aug 31.
117. Knippers, R., *Molekulare Genetik*. 6 ed. 1995: Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. 508.
118. Koeleman, J.G., J. Stoof, D.J. Biesmans, P.H. Savelkoul and C.M. Vandenbroucke-Grauls, *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*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(9): p. 2522-9.
119. Krogh, H. and S. Kristensen, *A Study of Skin Diseases in Dogs and Cats*. Nord. Vet.-Med., 1981. **33**: p. 17-22.
120. La Scola, B., P.E. Fournier, P. Brouqui and D. Raoult, *Detection and culture of Bartonella quintana, Serratia marcescens, and Acinetobacter spp. from decontaminated human body lice*. J Clin Microbiol, 2001. **39**(5): p. 1707-9.
121. LeBlanc, D.J., L.N. Lee, B.M. Titmas, C.J. Smith and F.C. Tenover, *Nucleotide sequence analysis of tetracycline resistance gene tetO from Streptococcus mutans DL5*. J Bacteriol, 1988. **170**(8): p. 3618-26.
122. Lee, J.H., C.H. Choi, H.Y. Kang, J.Y. Lee, J. Kim, Y.C. Lee, S.Y. Seol, D.T. Cho, K.W. Kim, Y. Song do and J.C. Lee, *Differences in phenotypic and genotypic traits against antimicrobial agents between Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomic species 13TU*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(4): p. 633-9.
123. Lee, K., W.G. Lee, Y. Uh, G.Y. Ha, J. Cho and Y. Chong, *VIM- and IMP-type metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean hospitals*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(7): p. 868-71.
124. Lee, K., J.H. Yum, D. Yong, H.M. Lee, H.D. Kim, J.D. Docquier, G.M. Rossolini and Y. Chong, *Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(11): p. 4485-91.
125. Leipe, D.D., Y.I. Wolf, E.V. Koonin and L. Aravind, *Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases*. J Mol Biol, 2002. **317**(1): p. 41-72.
126. Lim, Y.M., K.S. Shin and J. Kim, *Distinct antimicrobial resistance patterns and antimicrobial resistance-harboring genes according to genomic species of Acinetobacter isolates*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(3): p. 902-5.
127. Livermore, D.M. and N. Woodford, *Carbapenemases: a problem in waiting?* Curr Opin Microbiol, 2000. **3**(5): p. 489-95.
128. Löffler, *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. 5 ed. 2003: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York. 834.

129. Lolans, K., T.W. Rice, L.S. Munoz-Price and J.P. Quinn, *Multicity outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates producing the carbapenemase OXA-40*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 2941-5.
130. Lomovskaya, O. and K.A. Bostian, *Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use*. Biochem Pharmacol, 2006. **71**(7): p. 910-8.
131. Lopez-Otsoa, F., L. Gallego, K.J. Towner, L. Tysall, N. Woodford and D.M. Livermore, *Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among Acinetobacter baumannii isolates from a hospital in northern Spain*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(12): p. 4741-3.
132. Lupski, J.R. and G.M. Weinstock, *Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes*. J Bacteriol, 1992. **174**(14): p. 4525-9.
133. Maegele, M., S. Gregor, E. Steinhausen, B. Bouillon, M.M. Heiss, W. Perbix, F. Wappler, D. Rixen, J. Geisen, B. Berger-Schreck and R. Schwarz, *The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects*. Crit Care Med, 2005. **33**(5): p. 1136-40.
134. Magnet, S., P. Courvalin and T. Lambert, *Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in Acinetobacter baumannii strain BM4454*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(12): p. 3375-80.
135. Marchand, I., L. Damier-Piolle, P. Courvalin and T. Lambert, *Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in Acinetobacter baumannii is regulated by the AdeRS two-component system*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. **48**(9): p. 3298-304.
136. Marti, S., F. Fernandez-Cuenca, A. Pascual, A. Ribera, J. Rodriguez-Bano, G. Bou, J. Miguel Cisneros, J. Pachon, L. Martinez-Martinez and J. Vila, *[Prevalence of the tetA and tetB genes as mechanisms of resistance to tetracycline and minocycline in Acinetobacter baumannii clinical isolates]*. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2006. **24**(2): p. 77-80.
137. McDonald, L.C., *Trends in antimicrobial resistance in health care-associated pathogens and effect on treatment*. Clin Infect Dis, 2006. **42**(Suppl 2): p. S65-71.
138. McDonald, L.C., S.N. Banerjee and W.R. Jarvis, *Seasonal variation of Acinetobacter infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(5): p. 1133-7.
139. Metan, G., E. Alp, B. Aygen and B. Sumerkan, *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii: an emerging threat for patients with post-neurosurgical meningitis*. Int J Antimicrob Agents, 2007. **29**(1): p. 112-3.
140. Misbah, S., H. Hassan, M.Y. Yusof, Y.A. Hanifah and S. AbuBakar, *Genomic species identification of Acinetobacter of clinical isolates by 16S rDNA sequencing*. Singapore Med J, 2005. **46**(9): p. 461-4.
141. Mitchell A.E., L.B. Siviz and R.E. Black, *Gulf War and Health, Infectious Diseases*. 2007. **5**.
142. Mohri, T., K. Takashima, T. Yamane, H. Sato and Y. Yamane, *Purulent pericarditis in a dog administered immune-suppressing drugs*. J Vet Med Sci, 2009. **71**(5): p. 669-72.
143. Mussi, M.A., A.S. Limansky and A.M. Viale, *Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of Acinetobacter baumannii: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(4): p. 1432-40.

144. Mussi, M.A., V.M. Relling, A.S. Limansky and A.M. Viale, *CarO, an Acinetobacter baumannii outer membrane protein involved in carbapenem resistance, is essential for L-ornithine uptake*. FEBS Lett, 2007. **581**(29): p. 5573-8.
145. Naas, T., P. Bogaerts, C. Bauraing, Y. Degheldre, Y. Glupczynski and P. Nordmann, *Emergence of PER and VEB extended-spectrum beta-lactamases in Acinetobacter baumannii in Belgium*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(1): p. 178-82.
146. Naas, T., B. Coignard, A. Carbonne, K. Blanckaert, O. Bajolet, C. Bernet, X. Verdeil, P. Astagneau, J.C. Desenclos and P. Nordmann, *VEB-1 Extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii, France*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(8): p. 1214-22.
147. Naas, T., S. Kernbaum, S. Allali and P. Nordmann, *Multidrug-resistant Acinetobacter baumannii, Russia*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(4): p. 669-71.
148. Naas, T., M. Levy, C. Hirschauer, H. Marchandin and P. Nordmann, *Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4826-9.
149. Naas, T., F. Namdari, H. Reglier-Poupet, C. Poyart and P. Nordmann, *Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing Acinetobacter baumannii from New York City*. J Antimicrob Chemother, 2007. **60**(5): p. 1174-6.
150. Nagano, N., Y. Nagano, C. Cordevant, N. Shibata and Y. Arakawa, *Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii in a neurosurgery ward*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(9): p. 3978-84.
151. Nemec, A., T. De Baere, I. Tjernberg, M. Vaneechoutte, T.J. van der Reijden and L. Dijkshoorn, *Acinetobacter ursingii sp. nov. and Acinetobacter schindleri sp. nov., isolated from human clinical specimens*. Int J Syst Evol Microbiol, 2001. **51**(Pt 5): p. 1891-9.
152. Nemec, A., L. Dijkshoorn, I. Cleenwerck, T. De Baere, D. Janssens, T.J. Van Der Reijden, P. Jezek and M. Vaneechoutte, *Acinetobacter parvus sp. nov., a small-colony-forming species isolated from human clinical specimens*. Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 5): p. 1563-7.
153. Nemec, A., L. Dijkshoorn and P. Jezek, *Recognition of two novel phenons of the genus Acinetobacter among non-glucose-acidifying isolates from human specimens*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(11): p. 3937-41.
154. Nemec, A., L. Dijkshoorn and T.J. van der Reijden, *Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant Acinetobacter baumannii strains in the Czech Republic*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 2): p. 147-53.
155. Nemec, A., L. Dolzani, S. Brisse, P. van den Broek and L. Dijkshoorn, *Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class I integrons among strains of pan-European Acinetobacter baumannii clones*. J Med Microbiol, 2004. **53**(Pt 12): p. 1233-40.
156. Nemec, A., L. Janda, O. Melter and L. Dijkshoorn, *Genotypic and phenotypic similarity of multiresistant Acinetobacter baumannii isolates in the Czech Republic*. J Med Microbiol, 1999. **48**(3): p. 287-96.
157. Nemec, A., L. Krizova, M. Maixnerova, J.K. Tanny der Reijden, P. Deschaght, V. Passet, M. Vaneechoutte, S. Brisse and L. Dijkshoorn, *Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU)*. Res, 2011. **162**(4): p. 393-404.

158. Nemeč, A., M. Musilek, M. Maixnerová, T. De Baere, T.J. van der Reijden, M. Vaneechoutte and L. Dijkshoorn, *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009. **59**(Pt 1): p. 118-24.
159. Nemeč, A., M. Musilek, O. Sedo, T. De Baere, M. Maixnerová, T.J. van der Reijden, Z. Zdrahal, M. Vaneechoutte and L. Dijkshoorn, *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. **60**(Pt 4): p. 896-903. Epub 2009 Aug 6.
160. Nishimura, Y., T. Ino and H. Iizuka, *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *Int J Syst Bacteriol*, 1988. **38**(2): p. 209-211.
161. Nordmann, P. and T. Naas, *Sequence analysis of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa and comparison with class A beta-lactamases*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994. **38**(1): p. 104-14.
162. Olson, M.V., *Separation of large DNA molecules by pulsed-field gel electrophoresis. A review of the basic phenomenology*. *J Chromatogr*, 1989. **470**(2): p. 377-83.
163. Olut, A.I. and E. Erkek, *Early prosthetic valve endocarditis due to Acinetobacter baumannii: a case report and brief review of the literature*. *Scand J Infect Dis*, 2005. **37**(11-12): p. 919-21.
164. Oncul, O., O. Keskin, H.V. Acar, Y. Kucukardali, R. Evrenkaya, E.M. Atasoyu, C. Top, S. Nalbant, S. Ozkan, G. Emekdas, S. Cavuslu, M.H. Us, A. Pahsa and M. Gokben, *Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake*. *J Hosp Infect*, 2002. **51**(1): p. 47-51.
165. Pachon-Ibanez, M.E., F. Docobo-Perez, R. Lopez-Rojas, J. Dominguez-Herrera, M.E. Jimenez-Mejias, A. Garcia-Curiel, C. Pichardo, L. Jimenez and J. Pachon, *Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models caused by imipenem-resistant Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*.
166. Pannek, S., P.G. Higgins, P. Steinke, D. Jonas, M. Akova, J.A. Bohnert, H. Seifert and W.V. Kern, *Multidrug efflux inhibition in Acinetobacter baumannii: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide*. *J Antimicrob Chemother*, 2006. **57**(5): p. 970-4.
167. Pantophlet, R., A. Nemeč, L. Brade, H. Brade and L. Dijkshoorn, *O-antigen diversity among Acinetobacter baumannii strains from the Czech Republic and Northwestern Europe, as determined by lipopolysaccharide-specific monoclonal antibodies*. *J Clin Microbiol*, 2001. **39**(7): p. 2576-80.
168. Pantophlet, R., J.A. Severin, A. Nemeč, L. Brade, L. Dijkshoorn and H. Brade, *Identification of Acinetobacter isolates from species belonging to the Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex with monoclonal antibodies specific for O Antigens of their lipopolysaccharides*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2002. **9**(1): p. 60-5.
169. Paul, G., M.L. Joly-Guillou, E. Bergogne-Berezin, P. Nevot and A. Philippon, *Novel carbenicillin-hydrolyzing beta-lactamase (CARB-5) from Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus*. *FEMS Microbiol Lett*, 1989. **50**(1-2): p. 45-50.
170. Piddock, L.J., *Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria*. *Clin Microbiol Rev*, 2006. **19**(2): p. 382-402.
171. Pino, I.C., Y.M. Dominguez, R.G. Gonzalez, T.H. Bello, A.M. Sepulveda, M.S. Mella, M.C. Zemelman and Z.R. Zemelman, *[Extended spectrum beta lactamases (ESBL) production in Acinetobacter baumannii strains isolated from Chilean hospitals belonging to VIII Region]*. *Rev Chilena Infectol*, 2007. **24**(2): p. 137-41.

172. Pioletti, M., F. Schlunzen, J. Harms, R. Zarivach, M. Gluhmann, H. Avila, A. Bashan, H. Bartels, T. Auerbach, C. Jacobi, T. Hartsch, A. Yonath and F. Franceschi, *Crystal structures of complexes of the small ribosomal subunit with tetracycline, edeine and IF3*. *Embo J*, 2001. **20**(8): p. 1829-39.
173. Poirel, L., L. Cabanne, H. Vahaboglu and P. Nordmann, *Genetic environment and expression of the extended-spectrum beta-lactamase blaPER-1 gene in gram-negative bacteria*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(5): p. 1708-13.
174. Poirel, L., S. Corvec, M. Rapoport, P. Mugnier, A. Petroni, F. Pasteran, D. Faccone, M. Galas, H. Drugeon, V. Cattoir and P. Nordmann, *Identification of the novel narrow-spectrum beta-lactamase SCO-1 in Acinetobacter spp. from Argentina*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007. **51**(6): p. 2179-84.
175. Poirel, L., S. Figueiredo, V. Cattoir, A. Carattoli and P. Nordmann, *Acinetobacter radioresistens as a silent source of carbapenem resistance for Acinetobacter spp.* *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(4): p. 1252-6.
176. Poirel, L., A. Karim, A. Mercat, I. Le Thomas, H. Vahaboglu, C. Richard and P. Nordmann, *Extended-spectrum beta-lactamase-producing strain of Acinetobacter baumannii isolated from a patient in France*. *J Antimicrob Chemother*, 1999. **43**(1): p. 157-8.
177. Poirel, L., W. Mansour, O. Bouallegue and P. Nordmann, *Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii isolates from Tunisia producing the OXA-58-like carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-97*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008. **52**(5): p. 1613-7.
178. Poirel, L., S. Marque, C. Heritier, C. Segonds, G. Chabanon and P. Nordmann, *OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(1): p. 202-8.
179. Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen and P. Nordmann, *Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of Acinetobacter baumannii in a French hospital*. *J Clin Microbiol*, 2003. **41**(8): p. 3542-7.
180. Poirel, L. and P. Nordmann, *Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology*. *Clin Microbiol Infect*, 2006. **12**(9): p. 826-36.
181. Poirel, L. and P. Nordmann, *Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(4): p. 1442-8.
182. Prashanth, K. and S. Badrinath, *Nosocomial infections due to Acinetobacter species: Clinical findings, risk and prognostic factors*. *Indian J Med Microbiol*, 2006. **24**(1): p. 39-44.
183. Ramasubban, S., A. Majumdar and P.S. Das, *Safety and efficacy of polymyxin B in multidrug resistant Gram-negative severe sepsis and septic shock*. *Indian J Crit Care Med*, 2008. **12**(4): p. 153-7.
184. Ribera, A., I. Roca, J. Ruiz, I. Gibert and J. Vila, *Partial characterization of a transposon containing the tet(A) determinant in a clinical isolate of Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*, 2003. **52**(3): p. 477-80.
185. Ribera, A., J. Vila, F. Fernandez-Cuenca, L. Martinez-Martinez, A. Pascual, A. Beceiro, G. Bou, J.M. Cisneros, J. Pachon and J. Rodriguez-Bano, *Type I integrons in epidemiologically unrelated Acinetobacter baumannii isolates collected at Spanish hospitals*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004. **48**(1): p. 364-5.
186. Riccio, M.L., N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante and G.M. Rossolini, *Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of Acinetobacter baumannii AC-54/97 reveals the existence of bla(IMP)*

- allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny*. Antimicrob Agents Chemother, 2000. **44**(5): p. 1229-35.
187. Richet, H. and P.E. Fournier, *Nosocomial infections caused by Acinetobacter baumannii: a major threat worldwide*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006. **27**(7): p. 645-6.
188. Roberts, M.C., *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution*. FEMS Microbiol Rev, 1996. **19**(1): p. 1-24.
189. Rossau, R., A. van Landschoot, M. Gillis and J. de Ley, *Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera Moraxella, Acinetobacter, and Psychrobacter and Related Organisms*. Int J Syst Bacteriol, 1991. **41**(2): p. 310-319.
190. Ruiz, J., M.M. Navia, C. Casals, J.M. Sierra, M.T. Jimenez De Anta and J. Vila, *Integron-mediated antibiotic multiresistance in Acinetobacter baumannii clinical isolates from Spain*. Clin Microbiol Infect, 2003. **9**(9): p. 907-11.
191. Ruzin, A., D. Keeney and P.A. Bradford, *AdeABC multidrug efflux pump is associated with decreased susceptibility to tigecycline in Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(5): p. 1001-4.
192. Saleem, A.F., I. Ahmed, F. Mir, S.R. Ali and A.K. Zaidi, *Pan-resistant Acinetobacter Infection in Neonates in Karachi, Pakistan*. J Infect Dev Ctries, 2009. **4**(1): p. 30-7.
193. Sanchez-Pescador, R., J.T. Brown, M. Roberts and M.S. Urdea, *Homology of the TetM with translational elongation factors: implications for potential modes of tetM-conferred tetracycline resistance*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(3): p. 1218.
194. Saphir, D.A. and G.R. Carter, *Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites*. J Clin Microbiol, 1976. **3**(3): p. 344-9.
195. Scaife, W., H.K. Young, R.H. Paton and S.G. Amyes, *Transferable imipenem-resistance in Acinetobacter species from a clinical source*. J Antimicrob Chemother, 1995. **36**(3): p. 585-6.
196. Schwartz, D.C. and C.R. Cantor, *Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis*. Cell, 1984. **37**(1): p. 67-75.
197. Scott, P., G. Deye, A. Srinivasan, C. Murray, K. Moran, E. Hulten, J. Fishbain, D. Craft, S. Riddell, L. Lindler, J. Mancuso, E. Milstrey, C.T. Bautista, J. Patel, A. Ewell, T. Hamilton, C. Gaddy, M. Tenney, G. Christopher, K. Petersen, T. Endy and B. Petruccioli, *An outbreak of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq*. Clin Infect Dis, 2007. **44**(12): p. 1577-84.
198. Seguin, J.C., R.D. Walker, J.P. Caron, W.E. Kloos, C.G. George, R.J. Hollis, R.N. Jones and M.A. Pfaller, *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(5): p. 1459-63.
199. Seifert, H., L. Dijkshoorn, P. Gerner-Smidt, N. Pelzer, I. Tjernberg and M. Vaneechoutte, *Distribution of Acinetobacter species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods*. J Clin Microbiol, 1997. **35**(11): p. 2819-25.
200. Seifert, H., L. Dolzani, R. Bressan, T. van der Reijden, B. van Strijen, D. Stefanik, H. Heersma and L. Dijkshoorn, *Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(9): p. 4328-35.

201. Seifert, H. and P. Gerner-Smidt, *Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of Acinetobacter isolates*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(5): p. 1402-7.
202. Shaaly, A., M.G. Tellevik, N. Langeland, E.A. Hoiby and R. Jureen, *Comparison of serotyping, pulsed field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism for typing of Streptococcus pneumoniae*. J Med Microbiol, 2005. **54**(Pt 5): p. 467-72.
203. Siegrist, H., *Nosokomiale Infektionen und Spitalhygiene: Aktuelle Aspekte*. Swiss-NOSO, 2000. **7**(1).
204. Silbert, S., M.A. Pfaller, R.J. Hollis, A.L. Barth and H.S. Sader, *Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2004. **25**(10): p. 847-51.
205. Sinha, M., H. Srinivasa and R. Macaden, *Antibiotic resistance profile & extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production in Acinetobacter species*. Indian J Med Res, 2007. **126**(1): p. 63-7.
206. Siroy, A., V. Molle, C. Lemaitre-Guillier, D. Vallenet, M. Pestel-Caron, A.J. Cozzone, T. Jouenne and E. De, *Channel formation by CarO, the carbapenem resistance-associated outer membrane protein of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(12): p. 4876-83.
207. Stern, M.J., G.F. Ames, N.H. Smith, E.C. Robinson and C.F. Higgins, *Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome*. Cell, 1984. **37**(3): p. 1015-26.
208. Su, X.Z., J. Chen, T. Mizushima, T. Kuroda and T. Tsuchiya, *AbeM, an H⁺-coupled Acinetobacter baumannii multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(10): p. 4362-4.
209. Sun, L. and J. Irudayaraj, *Quantitative surface-enhanced Raman for gene expression estimation*. Biophys J, 2009. **96**(11): p. 4709-16.
210. sVila, J., S. Marti and J. Sanchez-Cespedes, *Porins, efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother, 2007. **59**(6): p. 1210-5.
211. Szabo, D., J. Szentandrassy, Z. Juhasz, K. Katona, K. Nagy and L. Rokusz, *Imported PER-1 producing Pseudomonas aeruginosa, PER-1 producing Acinetobacter baumannii and VIM-2-producing Pseudomonas aeruginosa strains in Hungary*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2008. **7**: p. 12.
212. Tenover, F.C., R.D. Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing and B. Swaminathan, *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(9): p. 2233-9.
213. Theuretzbacher, U., *Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren*. Chemother. J., 2004. **13**: p. 206-217.
214. Theuretzbacher, U., *β -Lactamasen*. Pharmazie in unserer Zeit, 2006. **35**(5): p. 416-421.
215. Tjernberg, I. and J. Ursing, *Clinical strains of Acinetobacter classified by DNA-DNA hybridization*. Apmis, 1989. **97**(7): p. 595-605.
216. Tomaras, A.P., C.W. Dorsey, R.E. Edelman and L.A. Actis, *Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 12): p. 3473-84.
217. Tong, M.J., *Septic complications of war wounds*. Jama, 1972. **219**(8): p. 1044-7.
218. Towner, K.J., E. Bergogne-Berezin and C.A. Fewson, *The Biology of Acinetobacter-Taxonomy, Clinical Importance, Molecular Biology, Industrial Relevance*. 1991: p. 31.

219. Trieber, C.A., N. Burkhardt, K.H. Nierhaus and D.E. Taylor, *Ribosomal protection from tetracycline mediated by Tet(O): Tet(O) interaction with ribosomes is GTP-dependent*. Biol Chem, 1998. **379**(7): p. 847-55.
220. Tsakris, A., A. Ikonmidis, S. Pournaras, L.S. Tzouvelekis, D. Sofianou, N.J. Legakis and A.N. Maniatis, *VIM-1 metallo-beta-lactamase in Acinetobacter baumannii*. Emerg Infect Dis, 2006. **12**(6): p. 981-3.
221. Turton, J.F., M.E. Kaufmann, J. Glover, J.M. Coelho, M. Warner, R. Pike and T.L. Pitt, *Detection and typing of integrons in epidemic strains of Acinetobacter baumannii found in the United Kingdom*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3074-82.
222. Turton, J.F., M.E. Ward, N. Woodford, M.E. Kaufmann, R. Pike, D.M. Livermore and T.L. Pitt, *The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **258**(1): p. 72-7.
223. Urwin, R. and M.C. Maiden, *Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology*. Trends Microbiol, 2003. **11**(10): p. 479-87.
224. Vahaboglu, H., F. Budak, M. Kasap, G. Gacar, S. Torol, A. Karadenizli, F. Kolayli and C. Eroglu, *High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of Acinetobacter spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres*. J Antimicrob Chemother, 2006. **58**(3): p. 537-42.
225. Valero, C., M.C. Farinas, D. Garcia Palomo, J.C. Mazarrasa and J. Gonzalez Macias, *Endocarditis due to Acinetobacter lwoffii on native mitral valve*. Int J Cardiol, 1999. **69**(1): p. 97-9.
226. van Belkum, A., P.T. Tassios, L. Dijkshoorn, S. Haeggman, B. Cookson, N.K. Fry, V. Fussing, J. Green, E. Feil, P. Gerner-Smidt, S. Brisse and M. Struelens, *Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13 Suppl 3**: p. 1-46.
227. van den Broek, P.J., T.J. van der Reijden, E. van Strijen, A.V. Helmig-Schurter, A.T. Bernards and L. Dijkshoorn, *Endemic and epidemic acinetobacter species in a university hospital: an 8-year survey*. J Clin Microbiol, 2009. **47**(11): p. 3593-9.
228. van Dessel, H., L. Dijkshoorn, T. van der Reijden, N. Bakker, A. Paauw, P. van den Broek, J. Verhoef and S. Brisse, *Identification of a new geographically widespread multiresistant Acinetobacter baumannii clone from European hospitals*. Res Microbiol, 2004. **155**(2): p. 105-12.
229. Van Looveren, M. and H. Goossens, *Antimicrobial resistance of Acinetobacter spp. in Europe*. Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(8): p. 684-704.
230. Vanechoutte, M., T. De Baere, A. Nemeč, M. Musilek, T.J. van der Reijden and L. Dijkshoorn, *Reclassification of Acinetobacter grimontii Carr et al. 2003 as a later synonym of Acinetobacter junii Bouvet and Grimont 1986*. Int J Syst Evol Microbiol, 2008. **58**(Pt 4): p. 937-40.
231. Vanechoutte, M., L.A. Devriese, L. Dijkshoorn, B. Lamote, P. Deprez, G. Verschraegen and F. Haesebrouck, *Acinetobacter baumannii-infected vascular catheters collected from horses in an equine clinic*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(11): p. 4280-1.
232. Vanechoutte, M., L. Dijkshoorn and A. Nemeč, *Identification of Acinetobacter genomic species by means of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA)*, 2009, <http://users.ugent.be/~mvanech/ARDRA/Acinetobacter.html>, Zugriff am 03.01.2011.
233. Vanechoutte, M., L. Dijkshoorn, I. Tjernberg, A. Elaichouni, P. de Vos, G. Claeys and G. Verschraegen, *Identification of Acinetobacter genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis*. J Clin Microbiol, 1995. **33**(1): p. 11-5.
234. Vanechoutte, M., A. Nemeč, M. Musilek, T.J. van der Reijden, M. van den Barselaar, I. Tjernberg, W. Calame, R. Fani, T. De Baere and L. Dijkshoorn, *Description of*

- Acinetobacter venetianus* ex Di Cello et al. 1997 sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2009. **59**(Pt 6): p. 1376-81.
235. Vaneechoutte, M., I. Tjernberg, F. Baldi, M. Pepi, R. Fani, E.R. Sullivan, J. van der Toorn and L. Dijkshoorn, *Oil-degrading Acinetobacter strain RAG-1 and strains described as 'Acinetobacter venetianus sp. nov.' belong to the same genomic species*. Res Microbiol, 1999. **150**(1): p. 69-73.
236. Vaneechoutte, M., L. Vauterin, B. van Harsselaar, L. Dijkshoorn and P. De Vos, *Considerations in evaluation of the applicability of DNA fingerprinting techniques for species differentiation*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(10): p. 3428-9.
237. Vaneechoutte, M., D.M. Young, L.N. Ornston, T. De Baere, A. Nemeč, T. Van Der Reijden, E. Carr, I. Tjernberg and L. Dijkshoorn, *Naturally transformable Acinetobacter sp. strain ADP1 belongs to the newly described species Acinetobacter baylyi*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**(1): p. 932-6.
238. Versalovic, J., T. Koeuth and J.R. Lupski, *Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes*. Nucleic Acids Res, 1991. **19**(24): p. 6823-31.
239. Vila, J., A. Marcos, F. Marco, S. Abdalla, Y. Vergara, R. Reig, R. Gomez-Lus and T. Jimenez de Anta, *In vitro antimicrobial production of beta-lactamases, aminoglycoside-modifying enzymes, and chloramphenicol acetyltransferase by and susceptibility of clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(1): p. 138-41.
240. Vila, J., J. Ruiz, P. Goni, A. Marcos and T. Jimenez de Anta, *Mutation in the gyrA gene of quinolone-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(5): p. 1201-3.
241. Villers, D., E. Espaze, M. Coste-Burel, F. Giauffret, E. Ninin, F. Nicolas and H. Richet, *Nosocomial Acinetobacter baumannii infections: microbiological and clinical epidemiology*. Ann Intern Med, 1998. **129**(3): p. 182-9.
242. Visca, P., A. Petrucca, P. De Mori, A. Festa, E. Boumis, A. Antinori and N. Petrosillo, *Community-acquired Acinetobacter radioresistens bacteremia in an HIV-positive patient*. Emerg Infect Dis, 2001. **7**(6): p. 1032-5.
243. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and et al., *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(21): p. 4407-14.
244. Wachter, K., *Acinetobacter May Emerge as Gram-Negative MRSA Resistance, incidence are growing strong*. Family Practice News, 2006. **36**(2): p. 1.
245. Wadl, M., K. Heckenbach, I. Noll, S. Ziesing, W. Pfister, J. Beer, S. Schubert and T. Eckmanns, *Increasing Occurrence of Multidrug-Resistance in Acinetobacter baumannii Isolates From Four German University Hospitals, 2002-2006*. Infection, 2010.
246. Walsh, T.R., M.A. Toleman, L. Poirel and P. Nordmann, *Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm?* Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(2): p. 306-25.
247. Walther, B. and M. Grobbel, *Nosokomiale Infektionen in der Kleintierpraxis*. Kleintierpraxis, 2009. **54**(1): p. 33-42.
248. Wang, J.T., L.C. McDonald, S.C. Chang and M. Ho, *Community-acquired Acinetobacter baumannii bacteremia in adult patients in Taiwan*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(4): p. 1526-9.
249. Wassenaar, T.M., *Molekularmethoden als Nachweis, Spezifizierung und Subtypisierung von Campylobacter spp*. Lohmann Information, 2002. **2**: p. 1-8.
250. Wayne, L., D. Brenner, R. Colwell, P. Grimont, O. Kandler, M. Krichevsky, L. Moore, W. Moore, R. Murray, E. Stackebrandt, M. Starr and H.G. Truper, *Report of the Ad*

-
- Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics*. Int J Syst Bacteriol, 1987. **37**(4): p. 463-464.
251. Wiegand, I., *Molekulare und biochemische Grundlagen der Beta-Lactam-Resistenz durch Beta-Lactamasen*. Chemother. J., 2003. **12**: p. 151-167.
252. Winter, P. and A. Driesel, *Auftrennung von DNS-Molekülen in Chromosomengröße durch Gelelektrophorese in alternierenden elektrischen Feldern*. Biotech. Forum, 1988. **5**: p. 108-114.
253. Wisplinghoff, H., W. Perbix and H. Seifert, *Risk factors for nosocomial bloodstream infections due to Acinetobacter baumannii: a case-control study of adult burn patients*. Clin Infect Dis, 1999. **28**(1): p. 59-66.
254. Wroblewska, M.M., L. Dijkshoorn, H. Marchel, M. van den Barselaar, E. Swoboda-Kopec, P.J. van den Broek and M. Luczak, *Outbreak of nosocomial meningitis caused by Acinetobacter baumannii in neurosurgical patients*. J Hosp Infect, 2004. **57**(4): p. 300-7.
255. Yong, D., J.H. Shin, S. Kim, Y. Lim, J.H. Yum, K. Lee, Y. Chong and A. Bauernfeind, *High prevalence of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase-producing Acinetobacter spp. in Korea*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(5): p. 1749-51.
256. Yum, J.H., K. Yi, H. Lee, D. Yong, K. Lee, J.M. Kim, G.M. Rossolini and Y. Chong, *Molecular characterization of metallo-beta-lactamase-producing Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genomospecies 3 from Korea: identification of two new integrons carrying the bla(VIM-2) gene cassettes*. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(5): p. 837-40.
257. Zeana, C., E. Larson, J. Sahni, S.J. Bayuga, F. Wu and P. Della-Latta, *The epidemiology of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii: does the community represent a reservoir?* Infect Control Hosp Epidemiol, 2003. **24**(4): p. 275-9.

XI Anhang

1 Übersicht über verwendete Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 30: Verwendete Geräte

Gerät/Modell	Firma
ALFexpress Sizer 50-500	Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL
Autoklav FVS/2	Fa. FEDEGARI, ORT, Italien
Bilddokumentationssystem E.A.S.Y. 429K	Fa. Herolab Laborgeräte GmbH, Wiesloch
BioNumerics version 5.10-Software	Applied Maths NV, Gent, Belgien
BIO-RAD CHEF Mapper und Variable Speed Pump	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Brutschränke	Fa. Heraeus Instruments, Hanau, Binder GmbH, Tuttlingen
Bunsenbrenner	Fa. Schütt, Göttingen
Leica DMRB Durchlichtmikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Eismaschine Scotsman AF 80 AS	Über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Eismaschine UBE-50-35	Fa. Ziegra, Isernhagen
Elektrophoresekammer für Agarosegele (100 ml) (Electro 4)	Fa. HYBAID GmbH, Heidelberg
Feinwaage AE 163	Fa. Mettler-Waagen, Gießen
Feinwaage EW600-2M	Fa. Kern, Albstadt
Gefrierschrank -20 °C GSD2614/01	Fa. Bosch, Jungingen
Gefrierschrank -70 °C HU 9-50 V-T-A	Fa. Heraeus Holding GmbH, Hanau
Gelgießstand und Kamm für PFGE	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Hybridisierungsöfen	Fa. Hybaid/MWG, Ebersberg
Kühlung Colora	Fa. Messtechnik Lorch
Magnetrührer IKA COMBIMAG RED	Fa. Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Staufen
Mehrkanalpipette Biohit elektrisch, 10-300 µl	Fa. Biohit Deutschland GmbH, Rosbach v. d. Höhe
Microprocessor pH-Meter pH537	Fa. Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Mikrowellengerät	Fa. Durabrand
Photometer DU® 640	Fa. Beckman Instruments, München
Pipetten, Research, 0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Fa. Eppendorf AG, Hamburg

Gerät/Modell	Firma
ReproGel High Resolution	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL
Schüttelwasserbad GFL 1083	Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Sicherheitswerkbank Microflow S1424/1	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Sorvall Zentrifuge RC 5B Plus	Fa. Sorval-Dupont, Bad Homburg
Spannungsgerät 250/2.5 Power Supply	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Sterilbank Laminar HB 2472	Fa. Heraeus Instruments, Hanau
Stromgeber 3000 Xi Electrophoresis Power Supply	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Thermocycler 1, GeneAmp PCR Systems 9600	Fa. PERKIN ELMER, Norwalk, U.S.A.
Tischzentrifuge Mikro 20	Fa. Hettich, über MAGV, Rabenau-Londorf
UV-Bildanalyse-Tisch, UV-T	Fa. Herolab
Vortex Type RFAX 1R	Fa. Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Wasserbad	Fa. Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Tabelle 31: Verwendete Chemikalien

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Aceton	Fa. Merck KGaA, Darmstadt	822251
Agarose	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	11404
Amikacin	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. Höhe	M0896317/01
Antibiotika-Testplättchen:		
Amikacin	Fa. Becton Dickinson GmbH, Braunschweig	231596
Amoxicillin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	110135
Amoxicillin/Clavulansäure	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	110116
Cefovecin	Fa. Pfizer Pharma GmbH, Berlin	CT18488
Cephalexin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	113132
Chloramphenicol	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	113016
Clindamycin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	113033
Colistin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	113113

XI Anhang

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Doxycyclin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	111412
Enrofloxacin	Fa. Bayer AG, Leverkusen	3800669
Fusidinsäure	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	110617
Gentamicin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	110712
Lincomycin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	111212
Marbofloxacin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	111355
Oxacillin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	111532
Penicillin G	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	111614
Polymyxin B	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	111632
Rifampicin	Fa. Oxoid, Wesel	CT0078B
Sulfamethoxazol/Trimethoprim	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	113122
Tetracyclin	Fa. Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld	112010
Blue Dextran 2000	Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL	17-0360-01
Blutagar (Basis)	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.10886
Bovines Serumalbumin	Fa. Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	A2153-10G
Citratagar nach Simmons	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.02501.0500
Colistinsulfat	Fa. Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe	CN31.1
Cytochromoxidasereagenz (N, N, N', N'-Tetramethyl-1,4- phenylendiammoniumdichlorid)	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	40600645
EDTA-Disodium	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	
Ethanol	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.00983
Ethanol 99 %	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.00983.1011
Ethidiumbromid	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
Ethidiumbromid 1%-ige Lösung	Fa. Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg	21251
Formamid	Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL	17-1320-01
Gassneragar (Basis)	Fa. Oxoid, Wesel	GFG01B

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
GeneRuler™ 100 bp DNA ladder	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0241
Glucose-Monohydrat	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.04074.1000
Goldstar® Taq DNA Polymerase	Fa. Eurogentec, Maastricht, NL	ME-0064-1ML
GuSCN (Guanidinisothiocyanat)	Fa. Fluka Biochemica, Zwijndrecht, NL	50990
Harnstoff	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.08487.1000
Harnstoffagar nach Christensen (Basis)	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.08492.0500
HCl	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	109060
InCert Agarose	Fa. Cambrex Bio Science Rockland, Inc.	50123
Iso-Sensitest-Agar (Basis)	Fa. Oxoid, Wesel	CM0473
Isopropanol	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.09634.2511
Kieselgur (Celite)	Fa. Acros Organics, Geel, Belgien	173460250
Lambda Ladder PFG Marker	Fa. New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main	N0340S
Lambda DNA/EcoRI+HindIII Marker	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	SM0191
MgCl ₂ (50mM)	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	MB-1101000
Mueller-Hinton-Agar/Bouillon (Basis)	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.10293.0500
NaCl	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	3957.2
NaCl	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.06404
NaOH	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1064981000
Natrium EDTA	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	159294
NEBuffer Pack	Fa. New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main	B7004S
Nucleotide, dNTP	Fa. PAN-BIOTECH GmbH, Aidenbach	PAN 739026
Nucleotide, dNTP Set	Fa. Gibco BRL Life Technologies, Breda, NL	10297-117
Nutrient Gelatin	Fa. Oxoid, Wesel	CM0635
Platinum® Taq DNA Polymerase	Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe	10966-034
Proteinase K	Fa. New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main	P8102S
Restriktionsenzyme:		
<i>AluI</i>	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0011

Reagenz	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
<i>ApaI</i>	Fa. New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main	R0114S
<i>CfoI</i>	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0801
<i>EcoRI</i>	Fa. Promega Corporation, USA	R6011
<i>MboI</i>	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0811
<i>MseI</i>	Fa. New England BioLabs GmbH, Leusden, NL	R0525S
<i>MspI</i>	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER0541
<i>RsaI</i>	Fa. Fermentas GmbH, St. Leon-Rot	ER1121
Rinderserum	Fa. PAA Laboratories GmbH, Cölbe	B15-O11
RNase	Fa. Sigma-Aldrich Chemie B.V., Zwijndrecht, NL	R5503
Schafblut	Institutseigene Gewinnung	
Seakem Gold Agarose	Fa. Cambrex Bio Science Rockland, Inc., über Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf	850152
StandardI-Nährbouillon	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	1.07882.0500
T4 DNA Ligase	Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Roosendaal, NL	9015-85-4
Tris	Fa. Calbiochem, Darmstadt	648309
Tris (Tris-Hydroxymethyl- Aminomethan)	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4855.2
Triton X-100	Fa. BDH, Amsterdam, NL	437002A
Wasserstoffperoxid 30 %	Fa. Merck KgaA, Darmstadt	8.22287.1000
Zienam [®] 500	Fa. MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar/Salmdorf	2786418

Tabelle 32: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
Ausstreichspatel PS	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	12.541.5101
Deckgläschen 60 x 22 mm	Fa. MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	SON0049404
Einmal-Küvette (1,5 ml, halbmikro)	Fa. Brand GmbH & Co. KG, Wertheim	759015
Einmal-Ösen, steril	Fa. Greiner Bio-One GmbH,	731170

Artikel	Bezugsquelle	Artikel-Nr.
	Frickenhausen	
Erlenmeyerkolben, 250 ml	Fa. Schott AG, Mainz, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	112121636
Meditip Holzwatteträger, steril	Fa. Applimed SA, Châtel-St-Denis, CH, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	G8112400
Mehrzweckgefäße, Schnappdeckel	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	203170
Micronaut-S-Kleintiertitrationsplatten	Fa. Genzyme Virotech GmbH	M/E1-954-100
Multipipettenspitzen 5-200µl	Fa Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	8156.1
Objektträger, geschnitten	Fa. IDL, Nidderau, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	3872872
Parafilm	Fa. MAGV, Rabenau	31011
PCR-Gefäße	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	04.022.1100
Petrischalen, steril	Fa. Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe	090310000
Pipettenspitzen blau (100-1000 µl)	Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich	2100611
Pipettenspitzen gelb (10-100 µl)	Fa. Ratiolab GmbH, Dreieich	2100601
Pipettenspitzen kristall (0,5-10 µl)	Fa. Nerbe Plus, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	07.812.0000
Plug-Mold (Gießförmchen)	Fa. BIO-RAD Laboratories GmbH, München	170-3706
PS-Röhrchen, 6 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	175161
PS-Röhrchen, Schnappdeckel 6, 15 ml	Fa. Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen	203170
PS-Rührspatel	Fa. Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe	4893.2
Reaktionsgefäß 1,5/2,0 ml	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf	0030120.086
Sterile Kryoröhrchen	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	368632
TC Microwell 96-U Platten	Fa. Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden	163320

2 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

2.1 Puffer und Lösungen für die Resistenzbestimmung

Ca²⁺-Stammlösung

CaCl₂ • 2 H₂O 3,68 g
A. dest. ad 100 ml

Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon

Mg²⁺-Stammlösung 100 µl
 Ca²⁺-Stammlösung 100 µl
 Mueller-Hinton-Bouillon ad 1000 ml

Mg²⁺-Stammlösung

MgCl₂ • 6 H₂O 8,36 g
A. dest. ad 100 ml

Mueller-Hinton-Bouillon

Mueller-Hinton-Bouillon 21 g
A. dest. ad 1000 ml

NaCl-Lösung (0,89 %)

NaCl 8,9 g
A. dest. ad 1000 ml

2.2 Puffer und Lösungen für ARDRA

Elektrophoresepuffer-Gebrauchslösung (1 x TAE)

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE) 200 ml
A. dest. ad 10 l

Elektrophoresepuffer-Stammlösung (50 x TAE)

1 M Tris-HCl 242 g
 Eisessig 57,1 g
 0,5 M Na₂-EDTA x 2H₂O pH 8.0 100 ml
A. dest. ad 1000 ml

Ethidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid 100 µl
A. dest. ad 1 ml

Ladepuffer (10 x)

Bromphenolblau (Na-Salz)	0,25 g
Xylene Cyanole FF	0,25 g
Glycerin	30,0 g
autoklaviertes <i>A. dest.</i>	100 ml
aliquotiert (1 ml), Lagerung bei -20 °C	

2.3 Puffer und Lösungen für PFGEEthidiumbromid-Färbelösung

Ethidiumbromid	100 µl
<i>A. dest.</i>	ad 1 ml

Lysepuffer

1 M Tris-HCl	5 ml
0,5 M Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O pH 8.0	10 ml
1 % N-Laurylsarcosine	1 g
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

0,5 M Na₂-EDTA-Lösung (pH 8,0)

Na ₂ -EDTA	186,15 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
NaOH	ad 8,0

TBE-Puffer (10 x)

1 M Tris-HCl	108 g
0,5 M Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O pH 8.0	40 ml
Borsäure	55 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

TBE-Puffer (0,5 x)

TBE-Puffer (10 x)	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 2000 ml

TE-Puffer (pH 8,0)

1 M Tris-HCl	5 ml
0,5 M Na ₂ -EDTA-Lösung	1 ml
<i>A. dest.</i>	ad 500 ml

XI Anhang

1 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,0)

Tris	121,14 g
A. dest.	ad 1000 ml
HCl	ad 8,0

Zellsuspensionspuffer (pH 8,0)

1 M Tris-HCl	5 ml
0,5 M Na ₂ -EDTA-Lösung	10 ml
A. dest.	ad 50 ml

2.4 Puffer und Lösungen für AFLP-Analyse

70 %ige Ethanol-Lösung

100 %ige Ethanol-Lösung	70 ml
A. dest.	30 ml

Kieselgur-Suspension

Kieselgur	10 g
A. dest.	50 ml
35 %ige HCl-Lösung	500 µl

Lysepuffer

Guanidinisoithiocyanant	120 g
0,1 M Tris-HCl	100 ml
0,2 M Na ₂ -EDTA	22 ml
Triton X-100	2,6 g

0,2 M Na₂-EDTA-Lösung (pH 8,0)

Na ₂ -EDTA	74,44 g
A. dest.	ad 1000 ml
NaOH	ad 8,0

TBE-Puffer (10 x)

1 M Tris-HCl	108 g
0,5 M Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O pH 8.0	40 ml
Borsäure	55 g
A. dest.	ad 1000 ml

TBE-Puffer (0,5 x)

TBE-Puffer (10 x)	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 2000 ml

0,1 M TE-Puffer (pH 8,0)

1 M TE-Puffer	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

1 M TE-Puffer (pH 8,0)

1 M Tris-HCl	1 ml
0,5 M Na ₂ -EDTA-Lösung	200 µl
<i>A. dest.</i>	ad 100 ml

1 M Tris-HCl-Lösung (pH 8,0)

Tris	121,1 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
HCl	ad 8,0

1 M Tris-HCl-Lösung (pH 6,4)

Tris	121,2 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml
HCl	ad 6,4

0,1 M Tris-HCl-Lösung (pH 6,4)

1 M Tris-HCl-Lösung	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 900 ml

Waschpuffer

Guanidinisothiocyanant	120 g
0,1 M Tris-HCl	100 ml

2.5 Kulturmedien für die Bakterienanzucht

Gassneragar

Gassneragar	77 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

XI Anhang

Iso-Sensitest-Agar

Iso-Sensitest-Agar	23,4 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Schafblutagar

Blut-Agar (Basis)	50 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Serumbouillon

StandardI-Nährbouillon	25 g
Rinderserum	100 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

2.6 Medien zur phänotypischen Differenzierung

Citratagar nach Simmons

Citratagar nach Simmons	22,5 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Nutrient Gelatin-Agar

Nutrient Gelatin	128 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

2.7 Medien zur Resistenzbestimmung

DST-Agar

Mueller-Hinton-Agar	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

NBI-Bouillon

StandardI-Nährbouillon	25 g
<i>A. dest.</i>	ad 1000 ml

Fortsetzung der **Tabelle**

Agardiffusionstest																		Isolat-Nr.	Mikrobouillondilutionstest																						
Amikacin	Amoxicillin	Amox./Clav.	Cefovecin	Cephalexin	Chloram.	Clindamycin	Colistin	Doxycyclin	Enrofloxacin	Fusidinsäure	Gentamicin	Lincomycin	Marbofloxacin	Oxacillin	Penicillin G	Polymycin B	Rifampicin		Tetracyclin	Trim./Sulfa.	Amikacin	Amox./Clav.	Ampicillin	Cefovecin	Cephalotin	Chloram.	Clindamycin	Colistin	Difloxacin	Enrofloxacin	Erythromycin	Gentamicin	Imipenem	Kanamycin	Marbofloxacin	Orbifloxacin	Oxacillin	Penicillin G	Tetracyclin	Trim./Sulfa.	
I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	29	S	I	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	
S	I	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	30	S	S	S	I	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	31	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	32	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	33	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	34	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	35	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	36	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	37	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	S		
I	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	38	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R		
R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	39	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S		
I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	S	40	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S		
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	41	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R		
I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	42	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R		
S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	I	S	43	S	I	I	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
S	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	44	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	45	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	46	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R		
I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	47	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	
I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	48	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R		
S	R	I	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	R	S	49	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	50	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R		
S	I	S	R	R	R	R	R	S	I	R	S	R	S	R	R	S	R	I	S	51	S	S	S	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
S	I	S	I	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	S	52	S	S	I	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	53	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	54	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	I	S	55	S	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	
S	R	S	R	R	R	R	R	S	I	R	S	R	S	R	R	S	R	I	S	56	S	I	I	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	

Erläuterung: A/C = Amoxicillin/Clavulansäure; **Chloram.** = Chloramphenicol; **I** = Intermediär; **R** = Resistent; **S** = Sensibel; **T/S** = Trimethoprim/Sulfamethoxazol

XII Abbildungsverzeichnis

1 Abbildungen

Abbildung 1:	Aufbau einer RND-Effluxpumpe (AdeABC-Pumpe)	22
Abbildung 2:	Gellayout bei der PFGE	46
Abbildung 3:	Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus beiden Resistenzanalysen..	56
Abbildung 4:	PCR-Elektropherogramm zum Nachweis des 16S rRNS-Gens bei <i>Acinetobacter</i> -Referenzstämmen	58
Abbildung 5:	PCR-Elektropherogramm zum Nachweis des 16S rRNS-Gens bei <i>Acinetobacter</i> -Feldisolaten.....	59
Abbildung 6:	Restriktionsmuster der 56 animalen <i>Acinetobacter</i> -Feldisolate.....	60
Abbildung 7:	Pulsfeldgelelektrophorese von 10 animalen <i>Acinetobacter</i> -Isolaten	62
Abbildung 8:	Dendrogramm zur Darstellung der Restriktionsprofile von 52 <i>A. bau-</i> <i>mannii</i> - und zwei <i>A. genomosp.</i> 3-Feldisolaten.....	63
Abbildung 9:	Darstellung der 13 Restriktionsprofile innerhalb der drei Cluster nach dem Verdau mit <i>ApaI</i>	65
Abbildung 10:	Dendrogramm zur Darstellung der Cluster und Subcluster von 52 <i>A. baumannii</i> - und zwei <i>A. genomosp.</i> 3-Feldisolaten	66
Abbildung 11:	Dendrogramm zur Darstellung der Cluster und epidemischen Stämme von 52 <i>A. baumannii</i> - und zwei <i>A. genomosp.</i> 3-Feldisolaten	68
Abbildung 12:	Dendrogramm zur Darstellung der Speziesidentifikation mittels AFLP-Analyse	72
Abbildung 13:	Dendrogramm zur Darstellung der AFLP-Typen.	74
Abbildung 14:	Dendrogramm zur Darstellung der EU-Klonzugehörigkeit.	75

2 Tabellen

Tabelle 1: Zusammenstellung der bekannten <i>Acinetobacter</i> -Arten und –Genomospezies.....	6
Tabelle 2: Phänotypische Eigenschaften von Vertretern des <i>Acb</i> -Komplexes	15
Tabelle 3: Klassifizierung und Eigenschaften der β -Lactamasen von <i>Acinetobacter</i> spp	20
Tabelle 4: Aminoglycosid-modifizierende Enzyme in <i>A. baumannii</i>	24
Tabelle 5: Überblick über die <i>Acinetobacter</i> -Feldisolate.....	31
Tabelle 6: Überblick über die <i>Acinetobacter</i> -Referenzstämme	33
Tabelle 7: Standards zur Interpretation der Hemmhofdurchmesser.....	35
Tabelle 8: Überblick über die im Mikrobouillondilutionstest verwendeten Antibiotika und ihre Konzentrationsbereiche.....	37
Tabelle 9: Art und Herkunft der Kontrollstämme	38
Tabelle 10: Verwendete Oligonukleotid-Primer (ARDRA).....	40
Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR (ARDRA).....	41
Tabelle 12: Cyclerprogramm für die PCR (ARDRA).....	41
Tabelle 13: Für die Restriktion verwendete Restriktionsenzyme (ARDRA).....	42
Tabelle 14: Zusammensetzung des Testansatzes für die Restriktion (ARDRA)	42
Tabelle 15: Elektrophorese-Parameter für die Auftrennung der <i>ApaI</i> -Restriktions- Fragmente (PFGE)	46
Tabelle 16: Überblick über die Restriktionsenzyme (AFLP-Analyse)	48
Tabelle 17: Verwendete Adaptersequenzen (AFLP-Analyse)	48
Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Restriktion/ Ligation (AFLP-Analyse).....	49
Tabelle 19: Verwendete Oligonukleotid-Primer (AFLP-Analyse)	49
Tabelle 20: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR (AFLP-Analyse)	50
Tabelle 21: Cyclerprogramm für die PCR (AFLP-Analyse).....	50
Tabelle 22: Parameter und Laufbedingungen für die Auftrennung der <i>EcoRI/MseI</i> - Restriktionsfragmente (AFLP-Analyse).....	51
Tabelle 23: Empfindlichkeit der 56 <i>Acinetobacter</i> -Feldisolate sowie der 6 Referenz- stämme gegen 20 verschiedene Antibiotika (Agardiffusion).....	53
Tabelle 24: Antibiotikaempfindlichkeit der 56 <i>Acinetobacter</i> -Feldisolate sowie der 6 Re- ferenzstämme gegen 20 verschiedene Antibiotika (Mikrobouillondilution)	54
Tabelle 25: Überblick über das Gesamtergebnis der Restriktionsanalyse von 56 <i>Acineto- bacter</i> -Feldisolaten (ARDRA)	61

Tabelle 26: Gegenüberstellung der PFGE-Ergebnisse von 56 animalen <i>Acinetobacter</i> - Isolaten unterschiedlicher Herkunft	69
Tabelle 27: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse aus der phänotypischen und genotypischen Charakterisierung von 56 <i>Acinetobacter</i> -Isolaten.....	76
Tabelle 28: Daten der mit <i>A. baumannii</i> infizierten/kolonisierten Hunde	79
Tabelle 29: Daten der mit <i>A. baumannii</i> infizierten/kolonisierten Katzen.....	82
Tabelle 30: Verwendete Geräte	118
Tabelle 31: Verwendete Chemikalien	119
Tabelle 32: Verwendete Verbrauchsmaterialien	122
Tabelle 33: Übersicht über die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung von 56 <i>Acine</i> - <i>tobacter</i> -Feldisolaten.....	129

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die diese Doktorarbeit nicht in dieser Form entstanden wäre.

Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der zur Durchführung der Arbeit notwendigen Mittel und die Unterstützung bei der Finanzierung der Arbeit.

Meiner Betreuerin Dr. Ellen Prenger-Berninghoff möchte ich ganz herzlich danken für die Hilfe, Unterstützung und Geduld sowie die gute Zusammenarbeit in allen anderen Bereichen.

Ich danke Herrn Dr. Reinhard Weiss für seine jederzeit freundliche Unterstützung. Mit seinem fachlichen Wissen sowie dem Interesse am Fortgang der Arbeit hat er wesentlich zum Gelingen derselben beigetragen.

Frau Gabriele Köpf danke ich für ihre Hilfestellungen bei der Durchführung der Methoden sowie für die geduldige Einweisung in die molekulargenetischen Techniken.

Allen Mitarbeiterinnen der Diagnostik danke ich für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung.

Bei Frau Dr. Stefanie Barth möchte ich mich für viele nützliche Tips und Hilfestellungen rund um die Doktorarbeit sowie der Soforthilfe bei computerbedingten „Katastrophen“ bedanken.

Allen Doktoranden sei gedankt für den außergewöhnlichen Zusammenhalt und die Hilfe untereinander. Danke für die tolle Zeit!

Bei allen nicht namentlich erwähnten Institutsmitgliedern möchte ich mich für die freundliche Unterstützung und das gute Arbeitsklima bedanken.

Den Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Entnahme der Proben.

Weiterhin danke ich Dr. Lenie Dijkshoorn, Tanny von der Reijden und Beppi van Strijen für die Kooperation sowie die Hilfestellungen bei der Durchführung und Auswertung von Methoden.

Mein großer Dank gilt meinen Eltern, die stets hinter meinen Entscheidungen standen und mich während der Doktorarbeit und auch sonst immer unterstützt und gefördert haben.

Danken möchte ich auch meinem Ehemann Sascha Zordan, der immer für mich da war und mir in jeder Situation zur Seite stand.

Insbesondere danke ich der Akademie für Tiergesundheit e. V. für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch Gewährung eines Stipendiums.

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

Sabrina Zordan



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: 978-3-8359-5752-7



9 783835 195752 7