

Isolierung und Charakterisierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben

Wissenschaftliche Abschlussarbeit

im Rahmen der Ersten Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker/innen

an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Fachgebiet Lebensmittelchemie

vorgelegt von

Marie Thérèse Poppel

Experimentelle Durchführung: Robert Koch-Institut, Wernigerode, in der Zeit vom
01. Oktober 2012 – 02. April 2013

Wissenschaftlicher Betreuer der experimentellen Arbeit: Herr PD Dr. Gottfried Wilharm

1. Gutachter: PD Dr. Gottfried Wilharm
2. Gutachter: Prof. Dr. André Lipski

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt *Herrn PD Dr. Gottfried Wilharm* für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Aufgabenstellung, hervorragende Betreuung sowie für die Begutachtung dieser Arbeit. Seine ständige Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und wertvollen Anregungen während der Anfertigung dieser Arbeit waren sehr hilfreich und haben den Umfang der Arbeit erst ermöglicht.

Bei *Herrn Prof. Dr. André Lipski* bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe, besonders *Evelyn Skiebe*, für das sehr angenehme Arbeitsklima, die Unterstützung bei der Durchführung der praktischen Arbeiten sowie für die vielen Tipps und Ratschläge.

Frau Dr. Böhland danke ich für die zahlreichen Proben, die sie aus ihrem Labor zur Verfügung gestellt hat. *Herrn Dr. Paul Higgins (Universität Köln)* danke ich für die Durchführung der epidemiologischen Typisierung mit dem DiversiLabTM-System. Außerdem bedanke ich mich bei *Frau Dr. Yvonne Pfeifer (RKI, Wernigerode)* für die Bestimmung der Antibiotika-Resistenzen sowie für die Durchführung der epidemiologischen Typisierung mit der Pulsed-field-Gelelektrophorese und der Multiplex-PCR. Ein weiterer Dank gilt *Dr. Michael Laue (RKI, Berlin)* für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Ein besonderer Dank geht auch an *Laura Kaiser* und *Teresa Brandes*, die stets ein offenes Ohr für mich haben und ohne die das Studium sicherlich nicht so angenehm verlaufen wäre.

Für das gründliche Korrekturlesen dieser Arbeit sei *Christina Poppel* und *Tobias Dahmen* gedankt.

Der Familie Brandt danke ich für die gute Versorgung und Unterbringung während meines Aufenthaltes in Wernigerode.

Last but not least geht ein großes Dankeschön an meine Familie, besonders an meine Eltern und meine Schwester für die große Unterstützung während des ganzen bisherigen Studiums.

Vielen Dank!

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis.....	XI
Abkürzungsverzeichnis	XIII
1 Einleitung und theoretische Grundlagen.....	1
1.1 Die Gattung <i>Acinetobacter</i>	1
1.1.1 Allgemeine Beschreibung	1
1.1.2 Taxonomische Entwicklung.....	2
1.1.3 Einteilung der <i>Acinetobacter</i> spp.	2
1.2 Die Spezies <i>Acinetobacter baumannii</i>	3
1.2.1 Bedeutung.....	3
1.2.2 Natürliche Reservoirs	4
1.2.3 Pathogenese und Virulenz.....	5
1.2.3.1 Übersicht	5
1.2.3.2 Motilität und natürliche Kompetenz	6
1.2.3.3 Antibiotika-Resistenzen.....	8
1.2.3.4 Biofilmbildung.....	9
1.2.4 Infektionen	10
1.3 Abgrenzung von <i>A. baumannii</i> zu anderen <i>Acinetobacter</i> spp.	11
1.4 Zielsetzung.....	12
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Geräte und Zubehör.....	15
2.1.2 Puffer, Gele und Lösungen.....	16
2.1.3 Enzyme, Kits und Standards	17
2.1.4 Primer	17
2.1.5 Bakterienstämme	18

2.1.6	Nährmedien	19
2.1.7	Weitere Materialien	21
2.2	Methoden	21
2.2.1	Kultivierung	21
2.2.2	Konservierung	22
2.2.3	Bestimmung der Zelldichte von Bakteriensuspensionen	22
2.2.4	Gewinnung von Tier- und Umweltproben	22
2.2.5	Isolierung von <i>Acinetobacter</i> spp. aus Tier- und Umweltproben	23
2.2.6	Minipräparation von Plasmiden	24
2.2.7	Gewinnung von Bakterien-Schnelllysaten	24
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.8.1	Grundlagen und allgemeine Durchführung	25
2.2.8.2	Reaktionsansätze	25
2.2.8.3	Gradienten-PCR	27
2.2.8.4	Verwendung verschiedener Polymerasen und Supplemente	28
2.2.8.5	Veränderung der Elongationszeit	31
2.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.10	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten	32
2.2.11	Sequenzierung	32
2.2.12	Biochemische Identifizierung	33
2.2.12.1	Identifizierung mit den API-Testsystemen	33
2.2.12.2	Identifizierung durch den Oxidase-Test	34
2.2.13	Motilitäts-Assay	34
2.2.14	Transformations-Experiment zur Überprüfung natürlicher Kompetenz	35
2.2.15	Biofilm-Assay	36
2.2.16	<i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell	36
2.2.17	Gram-Färbung	37

3	Ergebnisse	39
3.1	Untersuchung von Tier- und Umweltproben	39
3.1.1	Gewinnung und Identifizierung von <i>Acinetobacter</i> -Isolaten	39
3.1.2	Biochemische Identifizierung mit den API-Testsystemen	40
3.1.3	Wachstumstest bei höheren Temperaturen	41
3.1.4	Vergleich der Selektivnährmedien	42
3.1.5	Abgrenzung von <i>Acinetobacter</i> spp. zu anderen Isolaten	43
3.2	Weitergehende Charakterisierung der <i>Acinetobacter</i> -Isolate	45
3.2.1	Untersuchung auf Verotoxin-Gene	45
3.2.2	Plasmidprofil-Analyse	46
3.2.3	Motilitäts-Assay	47
3.2.4	Transformations-Experiment zur Überprüfung natürlicher Kompetenz	48
3.2.5	Biofilm-Assay	50
3.2.6	<i>Galleria mellonella</i> -Infektionsmodell	51
3.2.7	Epidemiologische Typisierung mit dem DiversiLab TM -System	54
3.2.8	Epidemiologische Typisierung mittels Multiplex-PCR und PFGE	55
3.2.9	Antibiotika-Resistenzen	56
3.3	Weitere Vorarbeiten zur Beschreibung einer potenziell neuen Spezies	58
3.3.1	Sequenzierungen	58
3.3.2	Gram-Färbung	60
3.3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchung	60
3.4	PCR-Etablierung	62
3.4.1	Entwicklung der PCR	62
3.4.1.1	Bestimmung der Annealing-Temperatur	62
3.4.1.2	Vergleich verschiedener Polymerasen und Supplemente	63
3.4.1.3	Bestimmung der Elongationszeit	65
3.4.1.4	Endergebnis	67

3.4.2	Evaluierung der entwickelten PCR	68
4	Diskussion.....	69
4.1	Identifizierung natürlicher Reservoirs von <i>A. baumannii</i>	69
4.2	Bewertung der Selektivnährmedien zur Isolierung von <i>Acinetobacter</i> spp. aus Tier- und Umweltproben	70
4.3	Charakterisierung der isolierten <i>Acinetobacter</i> spp.....	73
4.4	Vorarbeiten zur Beschreibung einer neuen Spezies	77
4.5	PCR-Etablierung.....	79
5	Zusammenfassung und Ausblick	81
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang.....	101
8	Selbstständigkeitserklärung	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3-1: Oxidase-Test zur Abgrenzung von <i>Acinetobacter</i> spp. zu anderen Bakteriengattungen.....	44
Abbildung 3-2: Kultivierung von <i>Acinetobacter</i> spp. und anderen Bakterien-Gattungen auf ChromAgar <i>Acinetobacter</i>	45
Abbildung 3-3: Plasmidprofile von 18 <i>Acinetobacter</i> -Isolaten auf einem 0,7 %igen Agarosegel.....	47
Abbildung 3-4: Motilitäts-Test auf Motilitäts-Medium am Beispiel eines <i>Acinetobacter</i> -Isolates.....	48
Abbildung 3-5: Wachstumsvergleich von Transformanten und ihren entsprechenden Wildtypen auf LB-Agar mit Kanamycin (links) und Simmons-Citrat-Agar (rechts).	49
Abbildung 3-6: Bestätigung der Transformation durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar SR_for und SR_rev.	50
Abbildung 3-7: Biofilm-Assays der <i>A. baumannii</i> -Isolate und des <i>Acinetobacter</i> -Isolates aus Probe 4.....	51
Abbildung 3-8: Überlebensraten der <i>Galleria mellonella</i> -Raupen nach der Infektion mit <i>A. baumannii</i>	52
Abbildung 3-9: Überlebensraten der <i>Galleria mellonella</i> -Raupen nach der Infektion mit <i>Acinetobacter</i> spp.	53
Abbildung 3-10: <i>Galleria mellonella</i> -Raupen 24 h nach der Infektion.	54
Abbildung 3-11: Ergebnisse des DiversiLab TM -Systems für die <i>A. baumannii</i> -Isolate (durchgeführt von Dr. Higgins).....	55
Abbildung 3-12: Ergebnisse der PFGE für die <i>A. baumannii</i> -Isolate (durchgeführt von Dr. Pfeifer).....	56
Abbildung 3-13: Phylogenetischer Baum basierend auf den 16S rRNA-Gen-Sequenzen (erhalten durch die DSMZ).....	60
Abbildung 3-14: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Acinetobacter</i> sp. nov. Stamm 114 (erhalten durch Dr. Laue, RKI).	61
Abbildung 3-15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Acinetobacter</i> sp. nov. Stamm 114 (erhalten durch Dr. Laue, RKI).	61
Abbildung 3-16: Gradienten-PCR für das <i>A. baumannii</i> -Isolat ATCC 17978 auf einem 1 %igem Agarosegel.	62

Abbildung 3-17: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung des HotStarTaq [®] Plus Master Mix Kits.....	63
Abbildung 3-18: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung des High Fidelity PCR Enzyme Mix.....	64
Abbildung 3-19: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung der AccuPrime [™] Pfx DNA Polymerase.....	64
Abbildung 3-20: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung des PCR SuperMix High Fidelity.....	65
Abbildung 3-21: PCR-Ergebnisse zur Optimierung der Elongationszeit auf 1 %igem Agarosegel.....	66
Abbildung 3-22: Ergebnis der entwickelten AB_UNI-PCR auf 1 %igem Agarosegel.....	67
Abbildung 7-1: Wachstumsvergleich von <i>Acinetobacter</i> -Isolaten bei Inkubationstemperaturen von 37 °C und 44 °C.....	118
Abbildung 7-2: Kultivierung von Referenzstämmen auf Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium (LAM) und ChromAgar <i>Acinetobacter</i> (CA).....	119
Abbildung 7-3: Isolierung von <i>Acinetobacter</i> spp. aus Tier- und Umweltproben mittels Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium (LAM) und ChromAgar <i>Acinetobacter</i> (CA).....	120
Abbildung 7-4: Vollständige Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens von <i>Acinetobacter</i> sp. nov. Stamm 114 (erhalten durch die DSMZ).....	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Geräte und sonstiges Zubehör.....	15
Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Enzyme, Kits und Standards.....	17
Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Primer.....	18
Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Referenzstämme.....	19
Tabelle 2-5: Übersicht über die verwendeten Nährmedien und ihre Zusammensetzung.	20
Tabelle 2-6: Reaktionsansätze der PCR.....	26
Tabelle 2-7: PCR-Temperaturprogramme.	27
Tabelle 2-8: Temperaturprogramm der Gradienten-PCR für das AB_UNI-Primerpaar.....	28
Tabelle 2-9: Reaktionsansätze der PCR für das HotStarTaq [®] Plus Master Mix Kit.	29
Tabelle 2-10: Reaktionsansätze der PCR für den High Fidelity PCR Enzyme Mix.....	29
Tabelle 2-11: Reaktionsansätze der PCR für die AccuPrime [™] Pfx DNA Polymerase.....	30
Tabelle 2-12: Reaktionsansätze der PCR für den PCR SuperMix High Fidelity.....	30
Tabelle 2-13: Temperaturprogramm der PCR für das HotStarTaq [®] Plus Master Mix Kit, den High Fidelity PCR Enzyme Mix und den PCR SuperMix High Fidelity.	30
Tabelle 2-14: Temperaturprogramm der PCR für die AccuPrime [™] Pfx DNA Polymerase. ..	31
Tabelle 3-1: Ergebnisse der E-Tests und der Untersuchung auf Resistenz-vermittelnde Enzyme.....	57
Tabelle 3-2: Antibiogramme (Mikrobouillonverdünnungstest).....	57
Tabelle 3-3: Übersicht über die Sequenzierungsergebnisse.....	58
Tabelle 3-4: Temperaturprogramm der entwickelten Nachweis-PCR.....	67
Tabelle 3-5: Pipettierschema für die entwickelte Nachweis-PCR.	67
Tabelle 7-1: Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Untersuchung von Tier- und Umweltproben auf <i>Acinetobacter baumannii</i>	102
Tabelle 7-2: Ergebnisse des API 20 NE Testsystems nach 48 h.	116
Tabelle 7-3: Ergebnisse des API 20 E Testsystems nach 24 h.	117
Tabelle 7-4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Motilitäts-Assays.	121
Tabelle 7-5: 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeiten [%] für den <i>Acinetobacter</i> sp. nov. Stamm 114 und nahe verwandte Spezies (erhalten durch die DSMZ).	122
Tabelle 7-6: Übersicht über die für die PCR-Etablierung verwendeten Bakterienstämme mit ihrer Herkunft, epidemiologischen Gruppe (sofern verfügbar) und ihren PCR-Ergebnissen.	124

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Acinetobacter</i>
ACB-Komplex	<i>A. calcoaceticus</i> - <i>A. baumannii</i> -Komplex
API	Analytischer-Profil-Index
<i>ATCC</i>	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CA	ChromAgar <i>Acinetobacter</i>
ca.	circa
d	Tag, Tage
d.h.	das heißt
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>engl. desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dr.	Doktor
<i>DSMZ</i>	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	<i>engl. ethylenediaminetetracetic acid</i> , Ethyldiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ESBL	Extended-Spectrum-β-Lactamasen
<i>et al.</i>	<i>lat. et alii</i> , und andere
EtBr	Ethidiumbromid
E-test	Epsilometer-Test
evtl.	eventuell
g	Gramm
GC	Guanin und Cytosin
GCG	Galle-Chrysoidin-Glycerol
gen. sp.	genomische Spezies

griech.	griechisch
h	Stunde
HPLC	<i>engl. High-performance liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
i.d.R.	in der Regel
IC	internationale klonale Linie
inkl.	inklusive
kb	Kilobasenpaare
KbE	koloniebildende Einheit
Km	Kanamycin
L	Liter
LAM	Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium
lat.	lateinisch
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar
Max. Ident.	Maximale Identität
MBL	Metallo- β -Lactamasen
MDR	<i>engl. multidrug resistant</i> , multiresistent (-er/-en)
μ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHA	Mueller-Hinton-Agar
min	Minute, Minuten
μ L	Mikroliter
mL	Milliliter
mM	millimolar
n.b.	nicht bekannt
n.g.	nicht getestet
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer, Nummern
OD	optische Dichte

p.a.	<i>lat. pro analysis</i> , zur Analyse
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>engl. polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsed-field-Gelelektrophorese
pH	<i>lat. potentium hydrogenii</i> , negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration in einer wässrigen Lösung
pmol	Picomol
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	<i>engl. ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rpm	<i>engl. revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rRNA	<i>engl. ribosomal ribonucleic acid</i> , ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg
SC-Agar	Simmons-Citrat-Agar
sec	Sekunde, Sekunden
sog.	sogenannte
sp.	<i>lat. species</i> , Spezies
spp.	<i>lat. species pluralis</i> , mehrerer Spezies
SR/SR	Sulfitreduktase/kodierendes Gen für die Sulfitreduktase
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
USA	<i>engl. United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	<i>engl. volume per volume</i> , Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vis	<i>engl. visible</i> , sichtbar
Vtx/vtx	Verotoxin/kodierendes Gen für Verotoxin
w/v	<i>engl. weight per volume</i> , Masse pro Volumen
WW	weltweite klonale Linie
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 Einleitung und theoretische Grundlagen

1.1 Die Gattung *Acinetobacter*

1.1.1 Allgemeine Beschreibung

Die Gattung *Acinetobacter* (griech. akinētos: bewegungslos) gehört zu der Familie der *Moraxellaceae* innerhalb der Klasse der Gamma-Proteobakterien.^[1,2] Im Jahre 1911 konnte erstmals ein Vertreter der heutigen Gattung von dem niederländischen Mikrobiologen Beijerinck aus Bodenmaterial isoliert werden.^[3]

Die Gattung setzt sich aus gram-negativen, kokkoiden Stäbchenbakterien zusammen, die strikt aerob, anspruchslos, nicht-fermentierend, katalase-positiv und oxidase-negativ sind.^[4] Zudem zeichnen sie sich durch einen GC-Gehalt der DNA von 39–47 % aus.^[4] Der Gattungsname *Acinetobacter* deutet darauf hin, dass die Bakterien innerhalb dieser Gattung aufgrund des Fehlens von Flagellen unbeweglich sind.^[4,5] So werden diese auch häufig in der Literatur als nicht-motil beschrieben.^[4,6] Allerdings konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Flagellen-unabhängige Bewegungsformen existieren.^[7–10]

Vertreter der Gattung *Acinetobacter* sind aufgrund ihrer metabolischen Vielseitigkeit meist ubiquitär verbreitet. So lassen sie sich nicht nur aus nahezu allen Boden- und Wasserproben einschließlich Leitungswasser gewinnen, sondern können auch aus Nahrungsmitteln und Tieren sowie von der Haut des Menschen isoliert werden.^[11–21] Gerade die Fähigkeit einiger *Acinetobacter* Spezies (spp.) zur Psychrotoleranz ermöglicht auch die Besiedlung von Orten, in denen niedrige Temperaturen herrschen, wie sie oftmals im Lebensmittelbereich zu finden sind. Hier konnten *Acinetobacter* spp. in gefrorenem Gemüse und Fischprodukten, sowie in gekühlter Rohmilch gefunden werden.^[18,22,23] Des Weiteren lassen sich *Acinetobacter* spp. auch im Krankenhausumfeld von verschiedenen leblosen Gegenständen, wie z.B. von Beatmungsgeräten oder Handschuhen, isolieren.^[6,24] Dies und die Tatsache, dass sich *Acinetobacter* spp. auch auf der Haut des Pflegepersonals und der Patienten befinden können, kann gegebenenfalls durch Übertragung der Keime zum Ausbruch von nosokomialen Infektionen führen.^[25] Ein erhöhtes Risiko für eine solche nosokomiale Infektion besitzen vor allem immungeschwächte Patienten und Patienten auf Intensivstationen, die häufig künstlich beatmet werden.^[6,25] Neben den häufig auftretenden nosokomialen Infektionen können *Acinetobacter* spp. auch ambulant-erworbene Infektionen verursachen. Diese ambulant erworbenen Infektionen, die nicht im Zusammenhang mit einem Aufenthalt oder einer

Behandlung im Krankenhaus stehen, sind allerdings aufgrund ihres seltenen Erscheinens von untergeordneter Bedeutung.^[26]

Als besorgniserregend werden vor allem die oftmals auftretenden Resistenzen von *Acinetobacter* spp. gegenüber gängigen Antibiotika, wie z.B. den meisten β -Lactam-Antibiotika und den Aminoglykosiden, angesehen, wodurch die Behandlungen von *Acinetobacter*-Infektionen erschwert werden.^[27] Hier ist vor allem der opportunistische Krankenhausproblemkeim *Acinetobacter baumannii* zu nennen, der in zunehmenden Maße Antibiotika-Resistenzen aufweist.^[1]

1.1.2 Taxonomische Entwicklung

Die Bakterien, die heute zur Gattung *Acinetobacter* zugeordnet werden, wurden im Laufe der Zeit durch eine Reihe von taxonomischen Veränderungen geprägt. So wurde der erste isolierte Vertreter der Gattung *Acinetobacter* im Jahre 1911 von seinem Entdecker, dem niederländischen Mikrobiologen Beijerinck, ursprünglich als *Micrococcus calco-aceticus* beschrieben.^[3] In den darauffolgenden Jahren wurde dieser Organismus verschiedenen Gattungen, wie z.B. *Achromobacter*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Diplococcus* oder *Herellea* zugeordnet.^[4] Um die nicht-motilen von den motilen Mikroorganismen innerhalb der Gattung *Achromobacter* abzugrenzen, wurde im Jahr 1954 der bis heute bestehende Gattungsname *Acinetobacter* (griech. akinētos: bewegungslos) von Brisou und Prevot erstmals vorgeschlagen.^[5] Der Gattungsname wurde allerdings erst 1971 auf der Grundlage einer umfassenden Studie von Baumann *et al.*^[28] offiziell anerkannt.^[29] In dieser Studie zeigten Baumann *et al.*,^[28] dass bestimmte zuvor beschriebene Mikroorganismen unterschiedlicher Gattungen alle zu einer einzigen Gattung zusammengefasst werden können und sich z.T. auf Spezies-Ebene anhand von phänotypischen Merkmalen nicht mehr unterscheiden lassen. Für diese Mikroorganismen wurde von Baumann *et al.*^[28] der Gattungsname *Acinetobacter* nach Brisou und Prevot^[5] vorgeschlagen, allerdings mit einer leicht veränderten Gattungsbeschreibung. Bis zum jetzigen Zeitpunkt konnten stetig neue Spezies entdeckt und in die Gattungsbeschreibung von *Acinetobacter* eingegliedert werden.

1.1.3 Einteilung der *Acinetobacter* spp.

Die Gattung *Acinetobacter* umfasst zahlreiche Spezies, die für die große Diversität dieser Gattung verantwortlich sind. Zurzeit sind 36 *Acinetobacter* spp. bekannt, die in 27 namentlich

genannte Spezies und in neun genomische Spezies (gen. sp.) unterteilt werden.^[30] Die neun genomischen Spezies unterscheiden sich deutlich in ihrem Genom von anderen *Acinetobacter* spp., besitzen allerdings noch keinen zugeteilten Namen.^[31] Die Unterscheidung bezüglich des Genoms basiert hierbei auf der DNA-DNA-Hybridisierungstechnik.^[32,33]

Die große Diversität von *Acinetobacter* spp. wird unter anderem durch die unterschiedliche klinische Relevanz der einzelnen Spezies verdeutlicht. So gibt es sowohl *Acinetobacter* Spezies, die dominierend als menschliche Krankheitserreger vorkommen, als auch Spezies, die vorwiegend umweltrelevant sind oder lediglich die Haut von Menschen besiedeln.^[4] Beispielsweise sind *A. baumannii*, *A. pittii* und *A. nosocomialis* als besonders klinisch relevante *Acinetobacter* Spezies an zahlreichen Ausbrüchen und Erkrankungen beteiligt und weisen zudem oftmals Multiresistenzen auf, während hingegen *A. calcoaceticus* als Umweltkeim seltener an schweren klinischen Erkrankungen beteiligt ist.^[4,34,35] Diese vier genannten *Acinetobacter* Spezies, *A. baumannii*, *A. pittii* (früher: *Acinetobacter* gen. sp. 3), *A. nosocomialis* (früher: *Acinetobacter* gen. sp. 13TU) und *A. calcoaceticus*, werden auch unter der Bezeichnung *A. calcoaceticus*-*A. baumannii*-Komplex (ACB-Komplex) zusammengefasst, da sie eine hohe DNA-Sequenzhomologie aufweisen und zudem phänotypisch nur schwer voneinander zu unterscheiden sind.^[4,31,33,36] Dadurch kommt es bei der Spezies-Identifizierung in mikrobiologischen Laboratorien oftmals zu Fehlern.^[4,31]

1.2 Die Spezies Acinetobacter baumannii

1.2.1 Bedeutung

Der opportunistische Krankenhausproblemkeim *A. baumannii* ist aufgrund seiner klinischen Relevanz sowohl der bekannteste Vertreter des ACB-Komplexes als auch der gesamten Gattung *Acinetobacter*.^[1,4,34,35,37] So wurde z.B. durch Wisplinghoff *et al.* gezeigt, dass *A. baumannii* heutzutage häufiger an nosokomialen Infektionen beteiligt ist als andere *Acinetobacter* spp. einschließlich den Spezies *A. pittii* und *A. nosocomialis*.^[35] In den letzten Jahrzehnten ist er zudem zu einem der wichtigsten Verursacher von nosokomialen Infektionen und Krankenhausausbrüchen weltweit geworden.^[4,26,31,38,39] Daher kommt diesem opportunistischen Krankheitserreger eine besondere Bedeutung zu.

1.2.2 Natürliche Reservoirs

Im Gegensatz zu den meisten anderen Vertretern der Gattung *Acinetobacter*, die ubiquitär in Umweltproben zu finden sind, sind die natürlichen Reservoirs von *A. baumannii* nur unzureichend bekannt.^[4,19] Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich *A. baumannii* nur sporadisch in verschiedenem Probenmaterial finden lässt. So wurde z.B. nur gelegentlich über das Vorkommen von *A. baumannii* in Gemüse, Tieren, Bodenmaterial, Fisch und Fleisch berichtet.^[2,19,40–42] Zudem konnte *A. baumannii* im Gegensatz zu den anderen *Acinetobacter* spp. auch nur selten auf der Haut des Menschen gefunden werden. Die Kolonisationsraten betragen hierfür lediglich 0,5–3 %.^[21,43] In welchem Ausmaß die sporadischen Funde von *A. baumannii* speziell in Umweltproben allerdings auf ein Umweltreservoir oder den Kontakt mit Menschen oder Tieren zurückzuführen ist, ist bisher nicht bekannt.^[31] Jedoch scheint es, dass *A. baumannii* trotz der Isolation aus einigen Umweltproben kein typischer Umweltkeim ist.^[4]

Die einzigen bislang bekannten Reservoirs stellen die Kopf- und die Kleiderläuse von Menschen dar, aus denen *A. baumannii* regelmäßig isoliert werden konnte.^[44,45] Vor kurzem konnte *A. baumannii* auch in einem weiteren Insekt, der Schmetterlingsmücke *Clogmia albipunctata*, in hohen Mengen in Krankenhauspopulationen beobachtet werden (Kolonisationsrate von 0–17,5 %).^[46] Die hohen Kolonisationsraten von *A. baumannii* auf dem Exoskelett der Schmetterlingsmücke *Clogmia albipunctata* ist auf die hohe Affinität zwischen der hydrophoben Kutikula der Motte und der ebenfalls hydrophoben Zellwand von *A. baumannii* zurückzuführen.^[46] So kann sich *A. baumannii* auf dem Exoskelett der Schmetterlingsmücke anreichern, während diese sich in entsprechend kontaminierter Umgebung aufhält.^[46] Da sowohl die Kopf- und die Kleiderlaus als auch die Schmetterlingsmücke *Clogmia albipunctata* mit dem Menschen bzw. seiner Umgebung assoziiert sind, liegt die Vermutung nahe, dass sie den Krankheitserreger *A. baumannii* auch auf Menschen übertragen und Infektionen verursachen können.^[44,46]

Als nosokomialer Krankheitserreger lässt sich *A. baumannii* desweiteren häufig von leblosen Gegenständen in Krankenhäusern isolieren. Vor allem während Krankenhausausbrüchen durch *A. baumannii* lässt sich der Keim unter anderem auf Möbeln in den Patientenzimmern, Bettwäschen der Patienten und auf der medizinischen Ausstattung finden.^[31] Obwohl *A. baumannii* oftmals mit wässrigen Umgebungen verbunden ist, ist er dennoch resistent gegenüber Trockenheit, wodurch das Überleben in der Krankenhausumgebung begünstigt wird.^[1,4,47,48] Aber auch die Fähigkeit zur Biofilmbildung und der Erwerb von Antibiotika-

Resistenzen (Kapitel 1.2.3) sowie die Resistenz gegenüber Desinfektionsmitteln unterstützen das Überleben des Keims unter ungünstigen Bedingungen, wie sie auf leblosen Gegenständen im Krankenhaus herrschen.^[4,49] So ist es *A. baumannii* möglich, auf nahezu allen Gegenständen im Krankenhaus auch über einen längeren Zeitraum zu überleben.^[4] Dies führt zu der Vermutung, dass das Krankenhaus selbst mit seiner gesamten Einrichtung, vor allem während Ausbrüchen durch *A. baumannii*, ein potenzielles Reservoir für diesen Keim darstellt.^[31,50] Allerdings bleibt die Frage offen, aus welchem Reservoir außerhalb des Krankenhauses der Keim in die Krankenhausumgebung eingetragen wird.^[31]

1.2.3 Pathogenese und Virulenz

1.2.3.1 Übersicht

Über das pathogenetische Potential und die Virulenz von *A. baumannii* ist im Gegensatz zu vielen anderen gram-negativen Bakterien, wie z.B. von *Pseudomonas aeruginosa*, bisher nur wenig bekannt.^[1,4] Infektionen, die durch *A. baumannii* ausgelöst werden, treten im Allgemeinen seltener in Erscheinung als die einfache Kolonisation mit diesem Krankheitserreger.^[31] Dies ist auch der Fall bei Menschen mit prädisponierenden Faktoren für eine *A. baumannii*-Infektion, wodurch verdeutlicht wird, dass die Pathogenität dieses Erregers relativ gering ist.^[31] Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass *A. baumannii* der virulenteste Vertreter der Gattung *Acinetobacter* ist und daher einmal eingetretene Infektionen einen schweren Verlauf nehmen können (Kapitel 1.2.4).^[31,51]

Bei der Kolonisierung und Infektion sowie bei der epidemischen Ausbreitung von *A. baumannii* spielen eine Reihe von unterschiedlichen Mechanismen eine entscheidende Rolle.^[31] Ein notwendiger Schritt für die Kolonisation und anschließende Infektion des Wirtes ist die zuvorige Anheftung von *A. baumannii* an die Epithelzellen des Wirtes.^[52,53] Dies erfolgt mithilfe von Adhäsinen, die sich auf der Oberfläche der Bakterien befinden und eine spezifische Interaktion mit den Rezeptoren der Wirtszelle gewährleisten.^[53] Bei *A. baumannii* handelt es sich dabei z.B. um das äußere Membranprotein A (OmpA, *früher* Omp38) und um Pili, die an der Zelloberfläche der Bakterien exprimiert werden.^[54,55] Außerdem wird vermutet, dass die hydrophoben Zuckermoleküle der O-spezifischen Seitenkette der Lipopolysaccharide (LPS) an der Interaktion mit den Rezeptoren der Wirtszelle beteiligt sind.^[31] Die Wirtsrezeptoren bestehen in der Regel aus Glycoproteinen oder Glycolipiden und sind komplementär zu den Adhäsinen.^[56] Die in der äußeren Membran der Zellwand befindlichen LPS sind bei einer *A. baumannii*-Infektion zudem in der Lage das Immunsystem

der Eukaryoten zu stimulieren.^[57] So konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die LPS von *A. baumannii* während einer Infektion zu einer proinflammatorischen Immunantwort im Wirt führen.^[57] Des Weiteren ist das äußere Membranprotein A von *A. baumannii* in einem frühen Stadium der Infektion für den Zelltod von Epithelzellen des Wirtes verantwortlich.^[58] Diese Zytotoxizität beruht darauf, dass das äußere Membranprotein A eine Signalsequenz für die Mitochondrien der Wirtszelle besitzt, wodurch es an diese binden kann und die Freigabe von proapoptotischen Molekülen, wie Cytochrom C und dem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) ins Cytosol auslöst.^[58] Dadurch wird sowohl ein Caspase-abhängiger als auch Caspase-unabhängiger Weg der Apoptose induziert.^[58]

Verschiedene Mechanismen zur Eisenaufnahme, wie z.B. über Siderophore, und die Resistenz gegenüber der bakteriziden Wirkung des menschlichen Serums gewährleisten das Überleben von *A. baumannii* im Blut des Wirtes während einer Infektion.^[59–63] Die Mechanismen zur Eisenaufnahme sind für *A. baumannii* notwendig, um sich an die geringen Konzentrationen an freiem Eisen im Blut des Wirtes anzupassen.

Weitere wichtige Mechanismen, die für die Pathogenese des opportunistischen Krankenhausproblemkeims von Bedeutung sind, sind u.a. die Fähigkeit zur Motilität, der Erwerb von Antibiotika-Resistenzen und die Fähigkeit zur Biofilmbildung.^[31,64,65]

1.2.3.2 Motilität und natürliche Kompetenz

A. baumannii besitzt genauso wie die übrigen Vertreter der Gattung *Acinetobacter* keine Flagellen und wird daher oft als unbeweglicher Organismus beschrieben.^[4,5] Dennoch wurden verschiedene Bewegungsformen bei *A. baumannii* und anderen Vertretern der Gattung beobachtet, die für die Besiedlung von medizinischen Geräten, Geweben und feuchten Oberflächen im Krankenhaus wichtig sein könnten.^[64] In der Literatur wurden diese unterschiedlichen Bewegungsformen als *gliding*, *twitching*, *sliding*, *swarming*, und *ditching* bezeichnet.^[7–10,64,66,67] Die zuvor von Lautrop *et al.*^[7] und von Mukerji *et al.*^[66] als *gliding* beschriebene oberflächenassoziierte Motilität wurde allerdings einige Zeit später dem Begriff *twitching*-Motilität zugeordnet, genauso wie das von Barker *et al.*^[9] beobachtete *ditching*.^[67,68] Trotz intensiver Anstrengung konnte bisher noch keiner der beschriebenen Bewegungsformen mechanistisch aufgeklärt werden.^[64] Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass den unterschiedlich beschriebenen Motilitätsformen derselbe Mechanismus zugrunde liegt.^[64] Allerdings gibt es einige Hinweise darauf, dass sich *A. baumannii* zumindest teilweise mithilfe von Typ IV-Pili entlang feuchter Oberflächen bewegt.^[64,69]

Grundlage für diese Annahme lieferten unter anderem Untersuchungen von Smith *et al.*^[70], Peleg *et al.*^[30], Clemmer *et al.*^[71] und Eijkelkamp *et al.*^[72], die zeigten, dass die Gen-Ausstattung für Typ IV-Pili in *Acinetobacter* vorhanden und für die Motilität notwendig ist. Diese Typ IV-Pili, die auch in anderen Gattungen wie *Pseudomonas* schon beobachtet wurden, führen durch die Abfolge von Polymerisation, Anhaftung und Depolymerisation der Pili zu solch einer ruckartigen Bewegung, wie sie 1961 erstmals von Lautrop *et al.*^[7] für die Gattung *Acinetobacter* beobachtet werden konnte.^[73] Daher kann durch die Typ IV-Pili die sog. *twitching*-Motilität vermittelt werden.^[69,73]

Die Oberflächenmotilität von *A. baumannii* ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Motilität von *A. baumannii* in Anwesenheit von Licht abnimmt.^[74] Außerdem wurde von *Quorum Sensing*, der Fähigkeit zur Bestimmung der momentanen Zelldichte über chemische Kommunikation, als ein wichtiges Kriterium für die Motilität von *A. baumannii* berichtet.^[31,71] Auch die Zusammensetzung des Motilitätsmediums kann die Motilität beeinflussen.^[64] Zudem konnte gezeigt werden, dass das Polyamin 1,3-Diaminopropan, das ubiquitär in *Acinetobacter* gebildet wird, für die Motilität von klinischen *A. baumannii*-Isolaten erforderlich ist.^[64]

Ein Zusammenhang zwischen der Typ IV-Pili vermittelten *twitching*-Motilität und der natürlichen Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA, der sog. natürlichen Kompetenz, wurde kürzlich für *A. baumannii* demonstriert. [Wilharm & Skiebe, zur Veröffentlichung eingereicht] So sind Typ IV-Pili nicht nur in der Lage das sog. *twitching* zu verursachen, sondern können auch viele Isolate von *A. baumannii* natürlich kompetent machen, während diese sich über feuchte Oberflächen in einer Typ IV-Pili-abhängigen Weise fortbewegen. [Wilharm & Skiebe, zur Veröffentlichung eingereicht] Die Kompetenz ist eine wichtige Voraussetzung für die Transformation von Bakterien.^[75] Neben der Konjugation und Transfektion stellt die Transformation einen Mechanismus des horizontalen Gentransfers bei Bakterien dar, bei dem es zur Aufnahme freier DNA und Integration dieser in das bakterielle Chromosom mithilfe von homologer Rekombination kommt.^[75,76] Das Genom von *A. baumannii* wurde im Laufe der Zeit bedeutend durch horizontalen Gentransfer verändert.^[51,77-79] Besonders Gene für Antibiotika-Resistenzen konnten somit erworben werden.^[77] Diese wurden vermutlich zum größten Teil von Vertretern der Familie der *Enterobacteriaceae* und der Gattung *Pseudomonas* erhalten, mit denen *A. baumannii* genetische Austauschgemeinschaften bildet.^[77,80,81]

1.2.3.3 Antibiotika-Resistenzen

Durch den erstaunlich schnellen Erwerb von Resistenzen und der schnellen Verbreitung in Krankenhäusern und Gesundheitspflegeeinrichtungen ist es innerhalb von wenigen Jahrzehnten zu einer dramatischen Steigerung in dem Auftreten von multiresistenten (MDR) *A. baumannii*-Stämmen gekommen.^[31,77,82] Daher wird *A. baumannii* heute auch unter dem Akronym **ESKAPE** (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter spp.*) zu einem der wichtigsten MDR-Erregern gezählt, für den therapeutische Möglichkeiten immer knapper werden.^[83] Auch panresistente-Stämme konnten in neuerer Zeit beobachtet werden.^[4,84–86] Zudem wurde die bislang größte Resistenzinsel mit einem Cluster von 45 Genen und einer Größe von 86 kb vor kurzem von Fournier *et al.*^[77] in dem MDR *A. baumannii* Stamm AYE entdeckt. Resistenzinseln sind Regionen im Genom, die für mehrere Resistenz-Mechanismen kodieren, v.a. für verschiedene Antibiotika-Resistenz-Mechanismen, die wahrscheinlich durch horizontalen Gentransfer in das Genom der Bakterien eingebracht worden sind (Kapitel 1.2.3.2).^[77,78]

Bei *A. baumannii* sind mehrere Mechanismen bekannt, die Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika vermitteln können.^[31] Diese sind entweder intrinsisch, von anderen Bakterien erworben oder durch zufällige DNA-Mutationen entstanden.^[4] Besondere Bedeutung erhalten hierbei die β -Lactamasen, die in der Lage sind, eine Reihe von β -Lactam-Antibiotika durch Hydrolyse außer Gefecht zu setzen.^[31] Dazu werden unter anderem die AmpC Cephalosporinasen gezählt, die chromosomal kodiert und intrinsisch für alle *A. baumannii* Stämme sind.^[87] Eine Insertionssequenz in der Nähe des *ampC*-Gens ist allerdings notwendig, um die Expression dieser β -Lactamasen so zu erhöhen, dass die Resistenz auch klinisch bemerkbar ist.^[88,89] Zu den am weitesten in *A. baumannii* verbreiteten β -Lactamasen mit zusätzlicher Carbapenemase-Aktivität gehören die Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen.^[31] Diese werden in die vier Gruppen OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-51-like und OXA-58-like eingeteilt.^[4,31] Während die plasmidal oder chromosomal kodierten Enzyme der Gruppen OXA-23-like, OXA-24-like und OXA-58-like erworben sind, sind die chromosomal kodierten Enzyme der OXA-51-like Gruppe intrinsisch für *A. baumannii*.^[4,31] Allerdings wird für einen signifikanten Beitrag zur β -Lactam Resistenz durch die OXA-51-like Enzyme ebenfalls eine in der Nähe gelegene Insertionssequenz benötigt.^[90] Vor kurzem wurde noch ein weiteres Enzym, OXA-143, entdeckt, das ebenfalls zu den Carbapenem-hydrolysierenden Oxacillinasen gehört. Dieses kann allerdings zu keinem der bestehenden OXA-Gruppen zugeordnet werden.^[91] Die Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika kann

neben der Hydrolyse durch Enzyme auch durch eine reduzierte Expression oder Mutation der bakteriellen Porinkanäle verursacht werden, wodurch es zur Hemmung des Durchtrittes von β -Lactam-Antibiotika durch die äußere Membran kommt.^[87] Ein weiterer Resistenz-Mechanismus ist die Umwandlung von Aminoglykosiden. Diese Umwandlung erfolgt durch spezielle Aminoglykosid-modifizierende Enzyme, die von *A. baumannii* exprimiert werden können und zu einer Resistenz gegenüber verschiedenen Aminoglykosiden führen.^[4] Spezifische Punktmutationen der Gene *gyrA* und *parC* stehen im Zusammenhang mit einer Chinolon-Resistenz.^[92] Außerdem können Effluxpumpen durch den aktiven Transport bestimmter Antibiotika, wie z.B. den Tetracyclinen, nach außen zum Resistenzvermögen von *A. baumannii* beitragen.^[4,31,51,78]

1.2.3.4 Biofilmbildung

Biofilme sind mikrobielle Aggregate, die an allen Grenzflächen des Wassers gebildet werden können.^[93,94] Neben der Hauptkomponente Wasser, die bis zu über 90 % ausmachen kann, bestehen die Biofilme aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und Mikroorganismen.^[95,96] Die EPS werden von den Mikroorganismen selbst synthetisiert und umfassen eine Reihe von Biopolymeren wie Polysaccharide, Proteine, Lipide und Nukleinsäuren.^[95] Diese bilden zusammen mit Wasser dreidimensionale, wassergefüllte Netzwerke, sog. Hydrogele, aus, von denen die Mikroorganismen umhüllt werden.^[95]

Bei einigen *Acinetobacter* spp., vor allem bei einigen Vertretern des ACB-Komplexes wie *A. baumannii*, wurde die Bildung von Biofilmen bereits beobachtet.^[97] Die Fähigkeit zur Biofilmbildung ermöglicht den Bakterien sich auch unter ungünstigen Bedingungen, wie sie z.B. auf leblosen Oberflächen in Krankenhäusern herrschen, zu vermehren.^[1] Ein Grund dafür ist, dass die Biofilme eine Art Schutzbarriere für die darin enthaltenen Bakterien darstellen, sodass diese vor verschiedenen Umwelteinflüssen weitestgehend geschützt sind.^[95] So ist es Bakterien durch die Ausbildung von Biofilmen nicht nur möglich, Angriffe des menschlichen Immunsystems, sondern auch verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe zu überleben.^[65,95] Zudem kann die EPS-Matrix durch ihre sorptiven Eigenschaften gelöste und partikuläre Nährstoffe anreichern, sodass das Überleben der Bakterien sogar in oligotropher Umgebung gewährleistet wird.^[95] Kanäle und Poren innerhalb des Biofilmes erlauben den Transport von Nährstoffen auch in tiefere Regionen des Biofilmes bei Vorhandensein einer Strömung.^[98] Des Weiteren besitzt die EPS-Matrix die Fähigkeit das Wasser zurückzuhalten.^[95] Dadurch können die Bakterien vor dem Austrocknen geschützt werden und somit längere Zeit auch in

trockener Umgebung überleben.^[95] Im Allgemeinen scheint die EPS-Produktion und die nachfolgende Bildung von Biofilmen eine Antwort der Bakterien auf Stress zu sein.^[95]

A. baumannii ist in der Lage sowohl auf abiotischen Oberflächen, wie Glas und Polystyren, als auch auf biotischen Oberflächen, wie Epithelzellen, Biofilme zu erzeugen.^[49] Gerade die Bildung von Biofilmen auf medizinischen Geräten wie Endotrachealtuben oder intravaskuläre Katheter erhöhen das Risiko für den Menschen, eine Atemwegs- oder Blutbahninfektion zu erleiden.^[31] Reguliert wird die Biofilmbildung bei *A. baumannii* unter anderem durch die Kommunikation der Bakterien über kleine Signalmoleküle, dem sog. *Quorum sensing*, durch die Nährstoffverfügbarkeit und durch die Konzentration an freien Kationen.^[1,31,49,99]

1.2.4 Infektionen

Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung einer *A. baumannii*-Infektion sind längere Krankenhausaufenthalte (v.a. auf Intensivstationen), größere chirurgische Eingriffe, vorangegangene Antibiotika-Behandlungen, fortgeschrittenes Alter, geschwächtes Immunsystem, häufige invasive Eingriffe, schwere Traumata (v.a. Verbrennungstraumata) und die Präsenz von medizinischen Fremdkörpern wie Kathetern, Nähten oder Beatmungstuben.^[31,100] Daher treten *A. baumannii*-Infektionen oftmals im Zusammenhang mit einer Hospitalisierung auf, sind also nosokomial. Neben beatmungsassoziierten Lungenentzündungen können sich diese nosokomialen Infektionen auch in Form von Harnwegsinfekten, Wund- und Weichteilinfektionen, Meningitis oder Sepsis äußern.^[31] In Krankenhäusern und anderen Gesundheitspflegeeinrichtungen gilt *A. baumannii* aufgrund seiner schnellen Übertragung und anschließenden Infektion von Patienten als besonders besorgniserregend.^[31] Das Übertragungspotential dieses opportunistischen Erregers ist sogar höher als das von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämmen.^[101] Die Übertragung von *A. baumannii* auf prädisponierte Patienten erfolgt primär über die Hände des Pflegepersonals.^[31] Kontaminierte medizinische Geräte und Oberflächen innerhalb des Krankenhauses bzw. anderer Gesundheitspflegeeinrichtungen stellen zudem neben dem direkten Kontakt mit infizierten Patienten ein weiteren Übertragungsweg dar.^[31] Die Häufigkeiten von nosokomialen *A. baumannii*-Infektionen sind stark von der Jahreszeit abhängig.^[102] Vor allem in den Sommermonaten wird von einer Zunahme nosokomialer Infektionen berichtet.^[102] Ursache dafür ist wahrscheinlich, dass die feuchtere und wärmere Umgebungsluft in diesen Monaten das Wachstum von *A. baumannii* begünstigt.^[102] Das

häufigere Auftreten von nosokomialen *A. baumannii*-Infektionen in südlicheren als in nördlicheren Regionen unterstützt zudem diese Annahme.^[4,103,104]

Neben den nosokomialen Infektionen ist *A. baumannii* auch in der Lage, ambulant erworbene Infektionen zu verursachen. Obwohl diese Art der Infektion mit *A. baumannii* über die Jahre ebenfalls zugenommen hat, bleibt sie dennoch eher eine seltene Erscheinung.^[31] Ambulant erworbene *A. baumannii*-Infektionen treten fast ausschließlich in tropischen Klimaten wie Australien oder Asien auf und sind oftmals mit zugrundeliegenden Bedingungen wie Alkoholismus, Rauchen, Krebs und/oder Diabetes mellitus verbunden.^[31,105] Die Infektionen äußern sich meist in Form einer Lungenentzündung.^[31]

Besondere Bekanntheit hat *A. baumannii* durch den Irakkrieg erhalten.^[1] So wurde während des Irakkrieges mehrfach von MDR *A. baumannii*-Infektionen bei schwer verwundeten Soldaten berichtet.^[106] Ursache für das gehäufte Auftreten dieser Infektion ist wahrscheinlich eine Kontamination der Feldlazarette im Irak sowie die Übertragung der Infektion innerhalb der Gesundheitspflegeeinrichtungen gewesen.^[107] Seitdem ist *A. baumannii* auch unter dem Spitznamen „Iraqibacter“ bekannt.^[1] Neben Menschen können auch Tiere durch *A. baumannii* infiziert werden. Vor allem in Tierkliniken konnten diese Infektionen verzeichnet werden.^[108–111]

1.3 Abgrenzung von *A. baumannii* zu anderen *Acinetobacter* spp.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung als Erreger nosokomialer Infektionen und der dramatischen Steigerung in dem Auftreten von MDR-Stämmen kommt der Identifizierung von *A. baumannii* eine besondere Bedeutung zu. Gerade eine Differenzierung von *A. baumannii* zu weniger klinisch relevanten Spezies der Gattung *Acinetobacter* ist im Hinblick auf die unterschiedliche klinische Relevanz der einzelnen Spezies notwendig.^[4,30] Die kommerziell erwerblichen Testsysteme wie API 20 NE, die in der Routinediagnostik häufig verwendet werden, erlauben keine zuverlässige Unterscheidung der Spezies anhand ihres Phänotyps.^[31,112] Deshalb werden kontinuierlich neue Methoden entwickelt, die es ermöglichen sollen, die *Acinetobacter*-Stämme den verschiedenen Spezies zuzuordnen.^[31] Dies dient zum einen dazu, dass speziell *A. baumannii* besser von anderen *Acinetobacter*-Spezies, besonders von denen des ACB-Komplexes, abgegrenzt werden kann und zum anderen zur Erhöhung des Wissens über die Epidemiologie, Pathogenität und klinische Bedeutung der einzelnen Spezies.^[4,31] Zu den bereits entwickelten und validierten molekularbiologischen Methoden zur Spezies-Identifizierung von *Acinetobacter*-Stämmen,

vor allem zur Unterscheidung der Spezies des ACB-Komplexes, gehören die *Restriktionsanalyse der amplifizierten 16S rRNA (ARDRA)*,^[113] der *Amplifizierte Fragment-Längen-Polymorphismus (AFLP)*,^[114] die *Ribotypisierung*,^[115] die *Restriktionsanalyse der 16S-23S rRNA Intergenic Spacer-Sequenzen*,^[116] die *Sequenzanalyse der 16S – 23S rRNA-Gen Spacer-Region*^[117] und die *Sequenzierung des rpoB-Gens und seiner flankierenden Spacer*.^[118] Die größte Bedeutung kommt hierbei der ARDRA- und der AFLP-Methode zu.^[4] Allerdings sind diese Methoden meist zu aufwendig, um sie in der mikrobiologischen Routinediagnostik anzuwenden.^[4] Neuere Methoden, wie die Untersuchung des *gyrB*-Gens mittels Multiplex-PCR^[119] und die PCR-basierte Identifizierung der *A. baumannii* spezifischen *bla*_{OXA-51-like}-Carbapenemase-Gene,^[120] stellen einfachere und schnellere Methoden dar, die eine zuverlässige Identifizierung von *A. baumannii* auf Spezies-Ebene ermöglichen. Während bei der *gyrB*-Multiplex-PCR die Unterschiede in den *gyrB*-Gen-Sequenzen der einzelnen *Acinetobacter*-Spezies des ACB Komplexes zur Identifizierung ausgenutzt werden, stehen bei der *bla*_{OXA-51-like}-PCR die Gene der OXA-51-like Enzyme im Vordergrund.^[119,120] Diese sind im Vergleich zu anderen *Acinetobacter*-Arten spezifisch für *A. baumannii* und können daher als genetischer Marker zur Identifizierung von *A. baumannii* herangezogen werden.^[120]

1.4 Zielsetzung

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, sind die natürlichen Reservoirs von *A. baumannii* weitestgehend unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Beitrag zur Identifizierung natürlicher Reservoirs von *A. baumannii* geliefert werden, die zur Entwicklung und Verbreitung multiresistenter *A. baumannii* beitragen. Ausgehend von einigen publizierten Beobachtungen wurde vermutet, dass *A. baumannii* ein bislang unerkanntes Reservoir in Vögeln besitzen könnte. Als Grundlage hierfür dienten verschiedenste Arbeiten, wie z.B. die von Ahmed *et al.*^[41], Muller *et al.*^[2] und Chmielowiec-Korzeniowska *et al.*^[121], die das Auftreten von *A. baumannii* in unterschiedlichen Vogelarten bzw. deren unmittelbaren Umgebung beobachtet haben. Über Vögel, die als Nutztiere dienen, wäre dann auch eine sporadische Kontamination von Lebensmitteln möglich. Die Hypothese wird zudem dadurch gestützt, dass Vögel eine im Vergleich zu den Säugetieren höhere Körpertemperatur von 38 – 42 °C aufweisen, bei der sich *A. baumannii* im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien noch gut vermehren kann.^[122] Daher war v.a. die Untersuchung von Proben aus verschiedenen Vogelarten Gegenstand dieser Arbeit. Aber auch Proben aus der

Umwelt und von anderen Tieren wurden bei der Untersuchung auf *A. baumannii* berücksichtigt. Dazu sollten die verschiedenen Proben nach der Gewinnung zunächst auf drei unterschiedlichen Selektivnährböden für *Acinetobacter* ausplattiert werden: ChromAgar *Acinetobacter*, Simmons-Citrat-Agar und Leeds *Acinetobacter* Medium.^[6,123] Dadurch konnte nebenbei ein Vergleich der drei Selektivnährmedien gewährleistet werden. Anschließend sollten die selektiv angereicherten Isolate erst mittels PCR auf das *rpoB*-Gen von *Acinetobacter* spp. und dann auf den *A. baumannii* spezifischen Marker *bla*_{OXA-51-like} untersucht werden.^[44,120] Alle durch PCR-Nachweis als wahrscheinlich *Acinetobacter* spp. zugehörig identifizierten Isolate sollten daraufhin einer DNA-Sequenzierung des 16S rRNA-Gens unterzogen werden. Die Identität der *A. baumannii*-Isolate sollte zudem mit biochemischen Reaktionen und durch die Inkubation bei einer Temperatur von 44 °C abgesichert werden. Durch die Arbeiten von Kempf *et al.*^[44] und Faulde *et al.*^[46] wurden auch Parasiten, z.B. von Vögeln, als ein potenzielles Reservoir von *A. baumannii* in Betracht gezogen. Daher sollte zusätzliches Probenmaterial speziell von Zecken mittels PCR auf den *A. baumannii* spezifischen Marker *bla*_{OXA-51-like} überprüft werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate weiter zu charakterisieren. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Isolate bezüglich ihrer Motilität, Resistenz, natürlichen Kompetenz, Fähigkeit zur Biofilmbildung und ihrer Virulenz im *Galleria mellonella* Infektionsmodell untersucht werden. Weiterhin sollten die Plasmide einiger *Acinetobacter*-Isolate, soweit vorhanden, präpariert und die Plasmidprofile untereinander verglichen werden. Durch Grotiuz *et al.*^[124] konnte kürzlich ein Verotoxin 2 (Vtx2)-produzierender *A. haemolyticus*-Stamm entdeckt werden. Daher sollten alle isolierten *Acinetobacter*-Stämme zusätzlich mittels PCR auf die für Vtx1 und Vtx2 kodierenden Gene *vtx1* und *vtx2* untersucht werden.

Da eines der *Acinetobacter*-Isolate nur eine geringe 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit zu allen anderen *Acinetobacter* spp. aufwies und aufgrund dessen keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden konnte, waren Vorarbeiten zur Beschreibung dieser potenziell neuen Spezies ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Daher sollte das entsprechende Isolat zusätzlich zu den oben beschriebenen Methoden noch einer Gramfärbung unterzogen und dessen Genom mit weiteren Primern sequenziert werden, um die taxonomische Stellung des Isolates zu verdeutlichen.

Aufgrund der zunehmenden Bedeutung von *A. baumannii* (Kapitel 1.2.1) und des Problems der Unterscheidung zu anderen *Acinetobacter*-Spezies werden kontinuierlich neue Methoden

zum Nachweis von *A. baumannii* und zur gleichzeitigen Abgrenzung zu den anderen Spezies entwickelt, die eine verbesserte Identifizierung von *A. baumannii* ermöglichen sollen (Kapitel 1.3). Sahl *et al.*^[78] haben kürzlich ein Gen (ABAYE1332) in *A. baumannii*-Isolaten entdeckt, das für ein großes hypothetisches Protein (YP_001713249) codiert. Dieses Gen ist hoch konserviert für diese Spezies und wurde bisher in keinen weiteren *Acinetobacter*-Spezies gefunden, wodurch es als Biomarker zum Nachweis von *A. baumannii*-Isolaten mittels PCR genutzt werden könnte. Zu diesem Zweck haben Sahl *et al.* ein Primerpaar (AB_UNI-Primer) für diese kodierende Region entwickelt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, eine Nachweis-PCR für das von Sahl *et al.* beschriebene *A. baumannii*-spezifische Gen mit dem entsprechenden Primerpaar zu entwickeln und zu evaluieren. Dazu sollte zunächst die Verwendung verschiedener Supplemente, Polymerasen und PCR-Rahmenbedingungen an *A. baumannii*-Isolaten getestet werden. Anschließend sollte die entwickelte Nachweis-PCR an den zuvor gesammelten *Acinetobacter*-Isolaten sowie an weiteren im Labor vorhandenen *Acinetobacter*-Isolaten getestet werden, um die PCR hinsichtlich Spezifität und Sensitivität zu evaluieren. Zum Vergleich sollten dieselben Isolate zusätzlich mit der bereits etablierten *bla*_{OXA-51-like}-PCR, die bisher die PCR-basierte Standardmethode zur Identifikation von *A. baumannii* darstellt, überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

In Tabelle 2-1 sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte und sonstiges Zubehör aufgeführt.

Tabelle 2-1: Übersicht über die verwendeten Geräte und sonstiges Zubehör.

Geräte/Zubehör	Modell	Firma
Autoklav	3870 ELV/MLV	<i>Biomedis, Gießen</i>
Brutschrank	Typ B6200	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
Brutschrank/Schüttelinkubator	innova 4200; innova 4230	<i>New Brunswick Scientific, Nürtingen</i>
Elektrophoresekammer	Wide Mini-Sub Cell GT	<i>Bio-Rad, München</i>
Gefrierschrank	G 2433 Comfort	<i>Liebherr, Biberach</i>
Geldokumentation	Gel Doc 2000	<i>Bio-Rad, München</i>
Heizblock/Thermomixer	compact	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Kühlschrank	KBes 3864 Premium	<i>Liebherr, Biberach</i>
Laborwaage	KERB EMB-600-2	<i>KERN & Sohn, Balingen</i>
Magnetrührer	MR 3002	<i>Heidolph, Schwabach</i>
Mikrowelle	NN-E201W	<i>Panasonic, Hamburg</i>
PCR-Cycler	2720 Thermal Cycler	<i>Applied Biosystems, Foster City, USA</i>
	Labcycler Gradient	<i>SensoQuest, Göttingen</i>
Pipetten	PhysioCare Concept	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pipettenspitzen	ep T.I.P.S. Standard bulk	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Reaktionsgefäße	Safe-Lock-Gefäße TM , 0,5 mL und 1,5 mL, farblos	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Spannungsquelle	Power Pac Basic	<i>Bio-Rad, München</i>
Spritze	701 RN SYR, 10 µL	<i>Hamilton Company, Höchst</i>
Sterilwerkbank	HERA safe	<i>Heraeus Instruments, Hanau</i>
UV/Vis-Photometer	BioPhotometer plus	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
UV-Küvetten	UV-Küvetten mikro, Zentrumshöhe: 8,5 mm	<i>Brand, Wertheim</i>
Videodrucker für Gele	VP-1200	<i>SEIKO Precision, Neu-Isenburg</i>
Vortexer	MS1 Minishaker	<i>IKA-Werke, Staufen</i>
Zentrifuge	5418; 5417R	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

PCR, Polymerase-Kettenreaktion; USA, Vereinigte Staaten von Amerika, UV, Ultraviolett; Vis, sichtbar.

2.1.2 Puffer, Gele und Lösungen

Die Chemikalien, die zur Herstellung von Puffern, Gelen und Lösungen verwendet wurden, stammen von der Firma *Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)* und besaßen den Reinheitsgrad p.a.

PBS-Puffer:	140 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat in ddH ₂ O pH 7,4
TAE-Puffer (50x):	2 M Tris 1 M Eisessig 50 mM EDTA-Lösung, pH 8 in ddH ₂ O
TAE-Puffer (1x):	40 mM Tris 20 mM Eisessig 1 mM EDTA-Lösung, pH 8 in ddH ₂ O
Agarosegel:	Für lineare DNA: 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer Für Plasmid-DNA: 0,7 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer
Coomassie-Färbelösung:	25 % (v/v) Isopropanol 10 % (v/v) Eisessig 0,05 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in ddH ₂ O
Ethidiumbromid-Lösung:	0,5 µg EtBr pro mL ddH ₂ O
1x Gel-Ladepuffer: (für Plasmid-DNA)	0,025 % (w/v) Bromphenolblau 3 % (v/v) Glycerol in 1x TAE-Puffer

Der bereits fertig erworbene **Gel-Ladepuffer** *GelPilot[®] DNA Loading Dye* wurde von der Firma Qiagen (*Hilden, Deutschland*) bezogen und für lineare DNA-Proben verwendet.

2.1.3 Enzyme, Kits und Standards

Eine Übersicht über die Enzyme, Kits und Standards, die in dieser Arbeit genutzt wurden, sind in der Tabelle 2-2 aufgelistet.

Tabelle 2-2: Übersicht über die verwendeten Enzyme, Kits und Standards.

Produkt	Hersteller	Preis pro 1000 Reaktionen
1 Kb Plus DNA Ladder (DNA-Größenstandard)	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	-
AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	1664 €
FastStart High Fidelity PCR System	<i>Roche, Mannheim</i>	-
Gram Staining Kit	<i>Fluka Analytical, Seelze</i>	-
Hi Yield® Plasmid Mini DNA-Kit	<i>SLG, Gauting</i>	-
High Fidelity PCR Enzyme Mix	<i>Fermentas, Sankt Leon-Rot</i>	632 €
HotStarTaq® DNA Polymerase	<i>Qiagen, Hilden</i>	-
HotStarTaq® Plus Master Mix Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>	565 €
PCR SuperMix High Fidelity	<i>Invitrogen, Karlsruhe</i>	2190 €
QIAquick® PCR Purification Kit	<i>Qiagen, Hilden</i>	-

2.1.4 Primer

Die für diese Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma *Thermo Fisher Scientific (Ulm, Deutschland)* synthetisiert, HPLC-gereinigt und in lyophilisierter Form versendet. Zur Herstellung von Stammlösungen der Konzentration 100 pmol/μL wurden die jeweiligen Primer nach Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst. Die Stammlösungen wurden dann wiederum für die Anwendung in der PCR auf eine Konzentration von 5 pmol/μL und für die Sequenzierung durch die Firma *GATC Biotech (Köln, Deutschland)* auf eine Konzentration von 10 pmol/μL mit ddH₂O verdünnt. In Tabelle 2-3 sind die verwendeten Primer mit ihrer entsprechenden Sequenz, Annealing-Temperatur und ihrem Ziel-Gen bzw. Ziel-Genen aufgeführt.

Tabelle 2-3: Übersicht über die verwendeten Primer.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Annealing-Temperatur [°C]	Ziel-Gen/Gene
16S-fD2	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	42	16S rRNA-Gen
16S-rP1	ACGGTTACCTTGTTACGACTT		
AB_UNI-for	CTTTCAGGKAGTATTGGTCT	n.b.	ABAYE1332
AB_UNI-rev	CTCATTAGAGTTCACCGAAG		
Ab-23S rRNA-for	TGGGTGTTGTATAGTCAAGCCTC	58	23S rRNA-Gen
Ab-23S rRNA-rev	AGTCAAGTAATTAAGTGCATGTGG		
Ac-rpoB-for	TACTCATATACCGAAAAGAAACGG	58	<i>rpoB</i> -Gen von <i>A. spp.</i>
Ac-rpoB-rev	GGYTTACCAAGRCTATACTCAAC		
OXA-51-likeF	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	58	<i>bla</i> _{OXA-51-like} -Gene
OXA-51-likeR	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
recA-rA1F	CCTGAATCTTCTGGTAAAAC	58	<i>recA</i> -Gen von <i>A. spp.</i>
recA-rA2R	GTTTCTGGGCTGCCAAACATTAC		
RpoB_Ac696F	TAYCGYAAAGAYTTGAAAGAAG	55	<i>rpoB</i> -Gen von <i>A. spp.</i>
RpoB_Ac1598R	CGBGCRTGCATYTTGTCRT		
SR_for	ATCGGTAATAAAGCCGATATGCG	58	SR-Gen von <i>A. baumannii</i>
SR_rev	TCAGCAGCTGATTAATCAACGAG		
VT1A-F	GAAGAGTCCGTGGGATTACG	55	<i>vtx1</i> -Gen
VT1B-R	AGCGATGCAGCTATTAATAA		
VT2A-F	TTAACCACACCCACGGCAGT	55	<i>vtx2</i> -Gen
VT2B-R	GCTCTGGATGCATCTCTGGT		

for/F/f, forward (vorwärts); n.b., nicht bekannt; rev/R/r, reverse (rückwärts); SR, Sulfitreduktase.

2.1.5 Bakterienstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Bakterienstämme wurden aus den Stammsammlungen des RKIs, der ATCC, der DSMZ und der Universität Köln erhalten. Alle Stämme wurden als Glycerolkulturen bei -80 °C gelagert. Tabelle 2-4 liefert eine Übersicht über die als Referenz verwendeten Stämme mit ihrer entsprechenden Herkunft. Die *Acinetobacter*-Stämme, die für die Entwicklung und Evaluierung der AB_UNI-PCR verwendet wurden, sind mit ihrer Herkunft gesondert in Tabelle 7-6 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Übersicht über die verwendeten Referenzstämme.

Stamm	Herkunft
<i>Acinetobacter baumannii</i>	
ATCC 17978	ATCC, Rockville, USA
30011	DSMZ, Braunschweig
SDF	RKI, Wernigerode
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	
	RKI, Wernigerode
<i>Acinetobacter baylyi</i>	
ADP1	ATCC, Rockville, USA
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
K279a	RKI, Wernigerode
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	RKI, Wernigerode
<i>Achromobacter sp.</i>	
	RKI, Wernigerode

ATCC, American Type Culture Collection; DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen; RKI, Robert Koch-Institut; USA, Vereinigte Staaten von Amerika.

2.1.6 Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden nach dem Zusammenfügen der jeweiligen Komponenten für 20 min bei 121 °C im Autoklaven hitzesterilisiert. Falls notwendig, wurden Antibiotika nach dem Autoklavieren und Abkühlen den entsprechenden Medien in steril filtrierter Form zugegeben. Die Zubereitung der Nährmedien aus Fertigmischungen erfolgte nach Angaben des Herstellers. Abweichungen von der Vorgehensweise sind gesondert unter den Nährmedien vermerkt.

Die Chemikalien für die Herstellung der Medien wurden von der Firma *Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)* mit dem Reinheitsgrad p.a. bezogen. Nährmedien, die aus Fertigmischungen hergestellt wurden, stammten von den Firmen *Becton, Dickinson & Company¹ (Heidelberg, Deutschland)*, *CHROMagar² (Paris, Frankreich)* und *Heipha³ (Heidelberg, Deutschland)*. Bereits in fertiger Form erworbene Nährmedien wurden von der Firma *Oxoid⁴ (Wesel, Deutschland)* bezogen. Bei den in Tabelle 2-5 aufgeführten Nährmedien handelt es sich mit Ausnahme von dem in flüssiger Form vorliegenden LB-Medium um feste bzw. halb feste Nährmedien.

Tabelle 2-5: Übersicht über die verwendeten Nährmedien und ihre Zusammensetzung.

Simmons-Citrat-Agar¹	ChromAgar <i>Acinetobacter</i>²	Nutrient-Agar⁴
5 g Natriumchlorid	1,8 g chromogene Mischung	5 g Natriumchlorid
1 g Ammoniumdihydrogenphosphat	12 g Pepton- und Hefeextrakt	1 g Rindfleischextrakt
1 g Dikaliumphosphat	4 g Salze	2 g Hefeextrakt
2 g Natriumcitrat	1 g flüssiges Supplement	5 g Pepton
0,2 g Magnesiumsulfat	(Wachstums- und	15 g Agar
0,08 g Bromthymolblau	Regulationsfaktoren)	ad 1 L dH ₂ O
15 g Agar	15 g Agar	
ad 1 L dH ₂ O	ad 1 L dH ₂ O	
	pH 7,0	
Leeds <i>Acinetobacter</i> Medium	GCG-Agar³	MHA mit Schafsblut⁴
5 g Natriumchlorid	5 g Natriumchlorid	2 g getrocknete Rind-
15 g Trypton	10 g Pepton	fleischinfusion
5 g Sojapepton	2 g Eiweißhydrolysat	17,5 g Caseinhydrolysat
5 g D-Fructose	5 g Hefeextrakt	1,5 g Stärke
5 g Sucrose	8 g Ochsen-galle	50 g Schafsblut
5 g D-Mannitol	1 g Natriumthiosulfat	17 g Agar
1 g DL-Phenylalanin	0,12 g Bromthymolblau	ad 1 L dH ₂ O
0,4 g Ammoniumeisen(III)-citrat	2 g Ammoniumeisen(III)-citrat	pH 7,4
0,02 g Phenolrot	1 g Harnstoff	
0,01 g Vancomycin	20 mL Glycerol	
0,015 g Cefsulodin	12,5 mg Chrysoidin	
0,05 g Cephradin	15 g Agar	
15 g Agar	ad 1 L dH ₂ O	
ad 1 L dH ₂ O		
LB-Medium*	LB-Agar mit Kanamycin	Motilitäts-Medium
5 g Natriumchlorid	5 g Natriumchlorid	2,5 g Natriumchlorid
10 g Trypton	10 g Trypton	5 g Trypron
5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt	5 g Agarose
ad 1 L dH ₂ O	0,03 g Kanamycin	ad 1 L dH ₂ O
pH 7,4	15g Agar	
	ad 1 L dH ₂ O	
	pH 7,4	

GCG, Galle-Chrysoidin-Glycerol; LB, Luria-Bertani; MHA, Mueller-Hinton-Agar.

*Das Leeds *Acinetobacter* Medium wurde für 15 min bei 121 °C autoklaviert.

2.1.7 Weitere Materialien

Verbrauchsmaterialien aus Plastik wurden von den Firmen *Eppendorf (Hamburg, Deutschland)*, *Becton, Dickinson & Company (Heidelberg, Deutschland)*, *Sterilin (Newport, Vereinigtes Königreich)*, *Nalge Nunc International Corporation (Rochester, USA)* und *Brand (Wertheim, Deutschland)* bezogen. Die Glasware stammte von der Firma *DURAN Group (Wertheim, Deutschland)* und gebrauchsfertige Abstrich- und Transportsysteme (transsystem[®]) wurden von der Firma *Hain Lifescience (Nehren, Deutschland)* eingesetzt. Die Firma *Bio-Rad (München, Deutschland)* lieferte saugfähiges Filterpapier.

Für die Infektionsversuche kamen die Wachsmotten *Galleria melonella* von *Reptilienkosmos.de (Niederkrüchten, Deutschland)* zum Einsatz. Die API-Testsysteme, API 20 E und API 20 NE, und das Oxidase-Reagenz wurden von der Firma *bioMérieux (Nürtingen, Deutschland)* erhalten. Für die Transformationsversuche wurde bereits isolierte und aufgereinigte chromosomale DNA einer aus Vorarbeiten erhaltenen Kanamycin-resistenten Transposon-Mutante [SR::Km] des *A. baumannii* Stammes ATCC 17978 verwendet.^[64] Isoliertes DNA-Material von *Escherichia coli* O157:H7 Stamm EDL933 kam als Positivkontrolle für die PCR-Untersuchung auf die Gene *vtx1* und *vtx2* zum Einsatz.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung

Zur Kultivierung der Bakterienstämme (Kapitel 2.1.5) und der zusätzlich in dieser Arbeit gewonnenen Isolate kamen verschiedene Agarplatten und ein Flüssigmedium zum Einsatz (Kapitel 2.1.6). Um eine Agarplatte anzupflanzen, wurde auf diese mithilfe eines sterilen Glasstabes oder Drigalski-Spatels die Bakteriensuspension bzw. im Falle des sterilen Glasstabes auch die Bakterienkolonie einer anderen Agarplatte ausgestrichen. Die Platten wurden dann i.d.R. bei 37 °C im Brutschrank unter aeroben Bedingungen für 24 h inkubiert. Abweichungen hiervon gab es bei der Kultivierung auf Leeds *Acinetobacter* Medium, die zudem auch bei 30 °C und mit sonst identischen Bedingungen erfolgte. Außerdem wurden die gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate zusätzlich noch bei einer Temperatur von 44 °C auf MHA-Platten mit Schafsblut aerob für 24 h inkubiert, um deren Fähigkeit zum Wachstum bei dieser Temperatur zu überprüfen. Für das Anpflanzen des Flüssigmediums wurde zunächst ein Kulturröhrchen mit 3 mL LB-Medium befüllt. Anschließend wurden mit einem sterilen

Glasstab einzelne Kolonien von einer Agarplatte in das Kulturröhrchen überführt. Dieses wurde dann im Schüttelinkubator bei 37 °C und 160 rpm über Nacht schüttelnd kultiviert.

2.2.2 Konservierung

Die kurzzeitige Aufbewahrung der Bakterienstämme erfolgte auf den entsprechenden Nährböden bei einer Temperatur von 4 °C. Zur Langzeitlagerung wurde zunächst eine Über-Nacht-Schüttelkultur nach Kapitel 2.2.1 angelegt. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur verdünnt, indem von dieser 60 µL nochmals in ein Kultur-Röhrchen mit 3 mL LB-Medium gegeben und für zwei bis drei Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C inkubiert wurde. 1 mL der verdünnten Bakterienkultur wurde anschließend mit 176,5 µL 100 %igem (v/v) Glycerol in einem 2 mL Kryoröhrchen (Nalgene®) vermischt, wodurch eine 15 %ige (v/v) Glycerolkultur erhalten wurde. Diese wurde bei -80 °C tiefgefroren.

2.2.3 Bestimmung der Zelldichte von Bakteriensuspensionen

Um die Zelldichte von Bakteriensuspensionen zu ermitteln, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) mit dem UV/Vis-Photometer (Kapitel 2.1.1) gemessen. Eine optische Dichte von 1,0 entspricht dabei ungefähr einer Zelldichte von 10^8 Zellen/mL. Die Messung erfolgte in dafür vorgesehenen UV-Küvetten (Kapitel 2.1.1). Als Leerwert diente das entsprechende Umgebungsmedium der Bakterien.

2.2.4 Gewinnung von Tier- und Umweltproben

Die Gewinnung von Tier- und Umweltproben erfolgte mit gebrauchsfertigen Abstrich- und Transportsystemen (Kapitel 2.1.7) nach Angaben des Herstellers. Es wurden Tier- und Umweltproben aus verschiedenen Bereichen im Zeitraum vom 23.08 – 07.11.2012 gesammelt. Die Umweltproben wurden in der Regel von feuchten Stellen genommen, wie z.B. von Schlamm, verschiedenen Gewässern oder von nassem Erdmaterial. Gewonnen wurden die Proben aus Wernigerode und Umgebung sowie aus Oberegurgl (Österreich). Bei der Gewinnung der Tierproben wurde der Schwerpunkt auf Vogelproben gelegt. Hier wurden unter anderem Vogelproben von Wachteln, Haushühnern, Entenvögeln und Tauben genommen. Die Vogelproben wurden zudem von verschiedenen Stellen der Tiere gewonnen: aus dem Schnabel und dem Kot, von dem Bereich unter den Flügeln und von der Kloake. Neben Vogelproben wurden auch Kotproben und Proben aus dem Maul von Hasen und

Pferden sowie von den Nüstern der Pferde gewonnen. Die Tierproben wurden im Allgemeinen aus Wernigerode und Umgebung, Obergurgl und aus dem Rhein-Sieg-Kreis (Nordrhein-Westfalen) bezogen. Des Weiteren wurden etliche Tierproben mit Schwerpunkt auf Geflügel aus dem *Lebensmittel-Qualitäts-Sicherungslabor* von Frau Dr. Böhland (Fachärztin für Geflügel, Deersheim) aus deren Routineuntersuchungen erhalten. Aufgrund der Vielzahl an Proben wurden von diesen allerdings nur einige stichprobenartig untersucht. Die Proben wurden wiederum von verschiedenen Körperstellen der Tiere erhalten. So befanden sich unter dem erhaltenen Material Kloaken-, Scheiden-, Nasen-, Knochenmark-, After-, Trachea-, Augen-, Gelenk-, Rachen- und Choanentupfer. Auch Tupfer von Blutkuchen, Kot, der Leber und anderen inneren Organen waren enthalten. Die Proben wurden zudem meist aus größeren Geflügelherden gewonnen, sodass auch mehrere Proben aus einer Geflügelherde vorhanden waren. Das Probenmaterial speziell von Zecken wurde in Wäldern von Berlin und deren Umgebung gesammelt. Dieses wurden als Flüssigkeit vom RKI (Berlin, Deutschland) bereitgestellt, in der sich die von den Zecken isolierte DNA befand.

2.2.5 Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier-und Umweltproben

Die gewonnenen Tier- und Umweltproben wurden zur Isolierung von *Acinetobacter* spp. zunächst auf die drei verschiedenen Selektivnährmedien in der angegebenen Reihenfolge ausgestrichen: (1) Simmons-Citrat-Agar, (2) ChromAgar *Acinetobacter* und (3) Leeds *Acinetobacter* Medium (Kapitel 2.1.6). Allerdings wurden aufgrund des nicht überzeugenden Ergebnisses nur ein geringer Teil der Proben zum direkten Vergleich mit den anderen beiden Selektivnährmedien auf Leeds *Acinetobacter* Medium ausgestrichen. Auch Simmons-Citrat-Agar wurde wegen des größeren Aufwandes nicht durchgängig verwendet.

Alle Platten wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C für 24 h im Brutschrank bebrütet. ChromAgar *Acinetobacter* wurde zusätzlich bei 42 °C unter den gleichen Bedingungen inkubiert, um die Selektivität gegenüber *A. baumannii* zu erhöhen. Hingegen wurde Leeds *Acinetobacter* Medium neben der Inkubation bei 37 °C auch bei 30 °C aerob für 24 h bebrütet, um einen Vergleich mit den Ergebnissen von Jawad *et al.*^[6] zu gewährleisten. Nach der 24-stündigen Inkubation wurden die Platten ausgewertet. Hierbei wurden bei ChromAgar *Acinetobacter* nach Angaben des Herstellers rote Kolonien als *Acinetobacter* spp. verdächtig gewertet. Bei Simmons-Citrat-Agar wurden sowohl farblos gewachsene Kolonien mit Blaufärbung des Mediums als auch ohne Blaufärbung des Mediums und bei Leeds

Acinetobacter Medium rosagefärbte Kolonien mit malvenfarbenden Medium als potenziell *Acinetobacter* spp. zugehörig identifiziert.^[6]

Anschließend wurden einzelne Kolonien, die auf den verschiedenen Selektivnährmedien als *Acinetobacter* spp. verdächtig gewertet worden waren, auf GCG-Agar (Kapitel 2.1.6) überimpft und bei 37 °C für 24 h unter aeroben Bedingungen inkubiert. Dies diente zum einen zur Kontrolle, da auf diesem Medium mit Ausnahme von Enterokokken und einigen Staphylokokken nur gram-negative Bakterien wachsen können, und zum anderen zur weiteren Selektion der einzelnen Kolonien. Dadurch wurde sichergestellt, dass die Einzelkolonien auch wirklich rein waren. Außerdem wurde durch das Überimpfen auf GCG-Agar gegebenenfalls eine Differenzierung zu anderen gram-negativen Bakterien gewährleistet, da *Acinetobacter* spp. nach Angaben des Herstellers auf diesem Medium im Gegensatz zu einigen anderen gram-negativen Bakterien als grüne Kolonien erscheinen. Beim Vorliegen von Mischkulturen wurden die verschiedenen Spezies der Mischkultur solange auf weiteren GCG-Agarplatten im 3-Ösenausstrich vereinzelt, bis diese in reiner Form erhalten wurden.

2.2.6 Minipräparation von Plasmiden

Zur Isolierung der Plasmid-DNA ausgewählter *Acinetobacter*-Isolate wurde das Hi Yield[®] Plasmid Mini DNA-Kit (Kapitel 2.1.3) verwendet. Die Isolation beruht hierbei auf dem Prinzip der alkalischen Lyse der Bakterienzellen. Aus dem Lysat wurde störendes RNA-Material durch die Behandlung mit RNase entfernt und die Plasmid-DNA in Anwesenheit eines chaotropen Salzes an die Glasfasermembran einer Minisäule gebunden. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten zur Entfernung weiterer Verunreinigungen wurde die Plasmid-DNA mithilfe eines salzarmen Puffers von der Säule eluiert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Im Anschluss an die Präparation wurden die Plasmide mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.9) analysiert.

2.2.7 Gewinnung von Bakterien-Schnelllysaten

Diese Methode dient zur schnellen Gewinnung von Gesamt-Zelllysaten. Dazu wurde eine Bakterienkolonie von einem Festmedium mithilfe eines sterilen Glasstabes in 50 µL ddH₂O suspendiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend im Heizblock für 10 min bei 95 °C erhitzt.

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.8.1 Grundlagen und allgemeine Durchführung

Zur Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Diese einfache und schnelle *in vitro*-Methode ermöglicht die Vervielfältigung kleinster DNA-Mengen mithilfe eines dreistufigen, zyklischen Prozesses: 1. Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges (Denaturierung) 2. Hybridisierung der Primer an die Ziel-DNA (Annealing) 3. Synthese der komplementären Stränge zur Ziel-DNA durch die DNA-Polymerase (Elongation). Die einzelnen Schritte der Vervielfältigung werden ausschließlich über ein sich wiederholendes Temperaturprogramm gesteuert.^[125]

Für die PCR wurden entweder die Gesamtzell-Lysate (Kapitel 2.2.7) der aus den Proben gewonnenen Isolate (Kapitel 2.2.5) oder das bereits isolierte DNA-Material der Zecken (Kapitel 2.2.4) als Template-DNA verwendet. Speziell für die Entwicklung und anschließende Evaluierung der PCR mit den AB_UNI-Primern wurden die Gesamtzell-Lysate der *Acinetobacter*-Stämme aus Tabelle 7-6 eingesetzt. Die DNA-Polymerase, dNTPs, Magnesium-Ionen sowie der PCR-Puffer, die neben der Template-DNA und den Primern für eine erfolgreiche PCR benötigt werden, wurden den einzelnen Reaktionsansätzen hinzugegeben. Die Standardamplifikation erfolgte unter Verwendung des HotStarTaq® Plus Master Mix (Kapitel 2.1.3), der bereits die HotStarTaq Plus DNA Polymerase, den PCR-Puffer, die dNTPs und die Magnesium-Ionen in einem Gemisch lieferte. Mit Ausnahme der Gradienten-PCR (Kapitel 2.2.8.3) wurden bei allen PCR-Ansätzen sowohl Negativ- als auch Positivkontrollen mitgeführt. Bei den Positivkontrollen diente immer das Schnelllysat eines *A. baumannii*-Referenzstammes aus Tabelle 2-4 als Template-DNA. Abweichung hiervon gab es nur bei der PCR zur Überprüfung auf die Gene *vtx1* und *vtx2*, bei der für die Positivkontrolle isoliertes DNA-Material von *Escherichia coli* O157:H7 Stamm EDL933 eingesetzt wurde (Kapitel 2.1.7). Als Negativkontrolle wurde lediglich der PCR-Reaktionsansatz ohne Zugabe einer Template-DNA verwendet. Die PCRs wurden mit dem 2720 Thermal Cycler oder dem Labcycler Gradient (Kapitel 2.1.1) durchgeführt. Nach erfolgter PCR wurden die Ergebnisse mittels Agarosegelen kontrolliert (Kapitel 2.2.9).

2.2.8.2 Reaktionsansätze

Die PCR-Reaktionen wurden mit den Primern aus Tabelle 2-3 durchgeführt. Die Verwendung des *rpoB*-Gen-spezifischen Primerpaars Ac-*rpoB*-for/Ac-*rpoB*-rev diente zur Identifizierung möglicher *Acinetobacter* spp., während das Primerpaar für die *bla*_{OXA-51-like}-Gene zur

Identifizierung möglicher *A. baumannii* aus den Tier- und Umweltproben herangezogen wurde. Die *bla*_{OXA-51-like}-PCR wurde zudem für die Isolate aus Tabelle 7-6 eingesetzt, um einen Vergleich mit der in dieser Arbeit entwickelten AB-UNI-PCR zu gewährleisten. Eine Universal-PCR für Bakterien mit den Primern für das 16S rRNA-Gen wurde im Vorfeld für die Sequenzierung (Kapitel 2.2.11) durchgeführt, genauso wie die Amplifizierung der beiden *rpoB*-Gene, des *recA*-Gens und des 23S-rRNA-Gens. Die Untersuchung der gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate auf die beiden Gene *vtx1* und *vtx2* erfolgte unter Verwendung der Primerpaare VT1A-F/VT1B-R und VT2A-F/VT2B-R. Zur Amplifizierung des SR kodierenden Gens von *A. baumannii*-Isolaten wurde die PCR mit dem Primerpaar SR_for und SR_rev angewendet. Die Pipettierschemata der einzelnen PCR-Reaktionen sind in Tabelle 2-6 ersichtlich.

Tabelle 2-6: Reaktionsansätze der PCR.

	<i>Standard-Reaktionsansatz</i>			<i>Reaktionsansatz zur anschließenden Sequenzierung</i>		
	Probe	Positiv	Negativ	Probe	Positiv	Negativ
ddH ₂ O	ad 10 µL	ad 10 µL	ad 9 µL	ad 50 µL	ad 50 µL	ad 45 µL
Vorwärts-Primer	1 µL	1 µL	1 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Rückwärts-Primer	1 µL	1 µL	1 µL	5 µL	5 µL	5 µL
HotStarTaq® Plus Master Mix	4,5 µL	4,5 µL	4,5 µL	22,5 µL	22,5 µL	22,5 µL
CoralLoad-Konzentrat (10x) ¹	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Template-DANN	1 µL	1 µL	-	1 µL	1 µL	-

Negativ, Negativkontrolle; Positiv, Positivkontrolle.

¹Das CoralLoad-Konzentrat diente lediglich als Ladepuffer für die anschließende Gelelektrophorese.

Die PCRs für die oben erwähnten Primer wurden mit dem PCR-Thermocycler nach den Temperaturprogrammen in Tabelle 2-7 durchgeführt.

Tabelle 2-7: PCR-Temperaturprogramme.

<i>OXA, rec und Ac-rpoB</i>			<i>16S und RpoB</i>	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec
Annealing	58 °C	30 sec	X °C ¹	30 sec
Elongation	72 °C	45 sec	72 °C	2 min
finale Elongation	72 °C	7 min	72 °C	7 min
Abkühlung	4 °C	∞	4 °C	∞
<i>Ab-23S</i>			<i>VT1 und VT2</i>	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	94 °C	5 min
Denaturierung	94 °C	30 sec	94 °C	30 sec
Annealing	58 °C	30 sec	55 °C	30 sec
Elongation	72 °C	3 min	72 °C	1 min
finale Elongation	72 °C	10 min	72 °C	7 min
Abkühlung	4 °C	∞	4 °C	∞
<i>Primerpaar SR_for/ SR_rev</i>				
	Temperatur	Zeit		
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min		
Denaturierung	94 °C	30 sec		
Annealing	58 °C	30 sec		
Elongation	72 °C	2,5 min		
finale Elongation	72 °C	7 min		
Abkühlung	4 °C	∞		

16S, Primerpaar 16S-fD2/16S-rP1; *Ab-23S*, Primerpaar Ab-23SrRNA-for/Ab-23SrRNA-rev; *Ac-rpoB*, Primerpaar Ac-rpoB-for/Ac-rpoB-rev; *OXA*, Primerpaar OXA-51-likeF/OXA-51-likeR; *rec*, Primerpaar recA-rA1F/recA-rA2R; *RpoB*, Primerpaar RpoB_Ac696F/ RpoB_Ac1598R; *VT1*, Primerpaar VT1A-F/ VT1B-R; *VT2*, Primerpaar VT2A-F/ VT2B-R.

¹X kennzeichnet die für die jeweiligen Primer erforderliche Annealing-Temperatur (siehe Tabelle 2-3).

2.2.8.3 Gradienten-PCR

Um die optimale Annealing-Temperatur für das AB_UNI-Primerpaar (Kapitel 2.1.4) zu ermitteln, wurde eine Gradienten-PCR mit dem Labcyler Gradient durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte für die Template-DNA eines ausgewählten *A. baumannii*-Stammes unter Verwendung des HotStarTaq[®] Plus Master Mix Kits. Hierzu wurde neunmal der gleiche

Reaktionsansatz in 0,5 μ L Reaktionsgefäßen (Kapitel 2.1.1) für neun verschiedene Annealing-Temperaturen pipettiert. Das Pipettierschema war identisch zu dem Schema aus Tabelle 2-6. Die Ausgangsbedingungen für das Temperaturprogramm der Gradient-PCR wurden von Sahl *et al.*^[78] abgeleitet. In Tabelle 2-8 ist das entsprechende Temperaturprogramm dargestellt.

Tabelle 2-8: Temperaturprogramm der Gradienten-PCR für das AB_UNI-Primerpaar.

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing	52,7 – 60,0 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	
finale Elongation	72 °C	7 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

2.2.8.4 Verwendung verschiedener Polymerasen und Supplemente

Zur weiteren Entwicklung der PCR unter Verwendung der AB_UNI-Primer wurden vier verschiedene Polymerasen bzw. Polymerasen-Gemische (Kapitel 2.1.3) an denselben DNA-Templates ausgewählter *A. baumannii*-Isolate getestet. Die verwendeten Polymerasen bzw. Polymerasen-Gemische zeichnen sich durch unterschiedliche Eigenschaften aus. So wird in dem HotStarTaq® Plus Master Mix Kit lediglich die thermostabile *Taq*-Polymerase verwendet, die über keine Korrekturlesefähigkeit (3'→5' Exonuklease-Aktivität) verfügt, während hingegen bei dem High Fidelity PCR Enzyme Mix und dem PCR SuperMix High Fidelity eine Kombination aus der thermostabilen *Taq*-Polymerase und einer thermostabilen DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion zum Einsatz kommt. Die Fähigkeit der Korrekturlesefunktion ermöglicht eine weniger fehlerhafte Amplifikation, wodurch die Genauigkeit der PCR erhöht wird. Bei der AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase wird nur eine DNA Polymerase mit 3'→5' Exonuklease-Aktivität ohne die oftmals verwendete *Taq*-Polymerase eingesetzt. Diese hoch prozessive Polymerase ermöglicht eine schnellere Kettenverlängerung und eine sehr hohe Genauigkeit bei der Amplifikation.^[126–129]

Zusätzlich wurde für alle vier Polymerasen bzw. Polymerasen-Gemische auch der Zusatz von drei Supplementen getestet. Hierbei kam die 5x Q-Solution (Bestandteil des HotStarTaq® DNA Polymerase Kits), 25 mM MgCl₂ (Bestandteil des High Fidelity PCR Enzyme Mix) und DMSO (Bestandteil des Fast Start High Fidelity PCR Systems) zum Einsatz (Kapitel 2.1.3).

Sowohl DMSO als auch die Q-Solution dienen dazu, die Amplifikation schwieriger Templates mit hohen GC-Gehalten oder einem hohen Grad an Sekundärstrukturen durch Veränderung des DNA-Schmelzverhaltens zu erleichtern. Dadurch kann gegebenenfalls eine suboptimale PCR verbessert werden.^[130,131] MgCl₂ hingegen stellt bei PCR-Reaktionen einen Kofaktor für die Polymerase dar und beeinflusst dadurch die Enzymaktivität. Außerdem bindet es an die Template-DNA, die Primer und die dNTPs. Liegen in einem PCR-Reaktionsansatz übermäßig hohe Konzentrationen dieser Substanzen vor, so ist eine Erhöhung der MgCl₂-Konzentration für die einwandfreie Tätigkeit der Polymerase erforderlich. Auch bei Anwesenheit von Komplexbildnern, wie EDTA, muss die MgCl₂-Konzentration für eine erfolgreiche PCR erhöht werden.^[127,132] Die Zusammensetzung der einzelnen PCR-Reaktionsansätze wird aus den Tabellen Tabelle 2-9 bis Tabelle 2-12 ersichtlich.

Tabelle 2-9: Reaktionsansätze der PCR für das HotStarTaq[®] Plus Master Mix Kit.

	Ohne Supplement	Q-Solution	MgCl ₂	DMSO
ddH ₂ O	ad 10 µL	ad 10 µL	ad 10 µL	ad 10 µL
AB_UNI-for	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
AB_UNI-rev	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
HotStarTaq [®] Plus Master Mix	4,5 µL	4,5 µL	4,5 µL	4,5 µL
10x CoralLoad-Konzentrat	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL	0,5 µL
Template-DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Supplement	-	1 µL	0,8 µL	0,6 µL

Tabelle 2-10: Reaktionsansätze der PCR für den High Fidelity PCR Enzyme Mix.

	Ohne Supplement	Q-Solution	MgCl ₂	DMSO
ddH ₂ O	ad 10 µL	ad 10 µL	ad 10 µL	ad 10 µL
AB_UNI-for	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
AB_UNI-rev	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
10x High Fidelity PCR-Puffer mit 15mM MgCl ₂	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL
High Fidelity PCR Enzyme Mix	0,1 µL	0,1 µL	0,1 µL	0,1 µL
Template-DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Supplement	-	1 µL	0,8 µL	0,6 µL

Tabelle 2-11: Reaktionsansätze der PCR für die AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase.

	Ohne Supplement	Q-Solution	MgCl ₂	DMSO
ddH ₂ O	ad 50 µL	ad 50 µL	ad 50 µL	ad 50 µL
AB_UNI-for	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
AB_UNI-rev	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
10X AccuPrime™ <i>Pfx</i> Reaktions Mix	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
AccuPrime™ <i>Pfx</i> DNA Polymerase	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Template-DNA	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Supplement	-	5 µL	4 µL	3 µL

Tabelle 2-12: Reaktionsansätze der PCR für den PCR SuperMix High Fidelity.

	Ohne Supplement	Q-Solution	MgCl ₂	DMSO
ddH ₂ O	ad 50 µL	-	ad 50 µL	ad 50 µL
AB_UNI-for	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
AB_UNI-rev	3 µL	3 µL	3 µL	3 µL
PCR SuperMix High Fidelity	38 µL	38 µL	38 µL	38 µL
Template-DNA	1 µL	1 µL	1 µL	1 µL
Supplement	-	5 µL	4 µL	3 µL

Die PCR-Experimente wurden im 2720 Thermal Cycler mit den in Tabellen Tabelle 2-13 und Tabelle 2-14 aufgeführten Temperaturprogrammen für die jeweiligen Polymerasen durchgeführt. Für die Annealing-Temperatur (X °C) wurde in beiden Temperaturprogrammen der Wert eingestellt, der bei der Gradienten-PCR (Kapitel 2.2.8.3) das bestmögliche Ergebnis lieferte.

Tabelle 2-13: Temperaturprogramm der PCR für das HotStarTaq® *Plus* Master Mix Kit, den High Fidelity PCR Enzyme Mix und den PCR SuperMix High Fidelity.

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing	X °C	30 sec	
Elongation	72 °C	45 sec	
finale Elongation	72 °C	7 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

X: nach Kapitel 2.2.8.3 optimierte Annealing-Temperatur.

Tabelle 2-14: Temperaturprogramm der PCR für die AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase.

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing	X °C	30 sec	
Elongation	68 °C	45 sec	
finale Elongation	68 °C	7 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

X: nach Kapitel 2.2.8.3 optimierte Annealing-Temperatur.

2.2.8.5 Veränderung der Elongationszeit

Zur Optimierung der Elongationszeit für die AB_UNI-PCR wurden für dieselben DNA-Templates ausgewählter *A. baumannii*-Isolate mehrere PCR-Läufe mit unterschiedlichen Elongationszeiten durchgeführt. Da die Elongationszeit abhängig von der Größe des Templates ist und es sich bei dem zu amplifizierenden DNA-Fragment um ein relativ kurzes Fragment von ca. 400 bp handelt, wurde die Elongationszeit von 45 sec auf 15 sec, 20 sec und 30 sec verkürzt. Die übrigen PCR-Bedingungen (Annealing-Temperatur, DNA-Polymerase und Supplemente) wurden an die bereits optimierten Bedingungen angepasst (Kapitel 2.2.8.3 und 2.2.8.4). Die PCR erfolgte mithilfe des 2720 Thermal Cyclers.

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Elektrophorese bezeichnet die Wanderung von geladenen Teilchen in einem Trägermedium unter Einfluss eines elektrischen Feldes. Die elektrophoretische Beweglichkeit (Mobilität) ist eine substanzspezifische Größe, die die Wanderungsgeschwindigkeit der Teilchen im elektrischen Feld bestimmt. Sie ist abhängig von der Stärke des angelegten elektrischen Feldes, der Ladung und Größe der Teilchen sowie der Viskosität des Mediums. Bei der Agarose-Gelelektrophorese erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel. Agarosegele stellen dreidimensionale Netzwerke mit relativ großen Poren dar, sodass auch die Wanderung von höhermolekularen Teilchen wie Nukleinsäuren gewährleistet wird. Die Größe der Poren ist allerdings von der Agarose-Konzentration abhängig, weshalb bei höheren Konzentrationen nur noch kleinere DNA-Fragmente getrennt werden können. Die negativ geladenen Phosphatgruppen des Zucker-Phosphat-Rückgrats führen dazu, dass sich die DNA-Moleküle in der Agarosematrix zur Anode hinbewegen. Da die Nukleinsäuren eine

weitestgehend identische Ladungsdichte aufweisen, erfolgt die Trennung unterschiedlicher DNA-Moleküle fast ausschließlich aufgrund ihrer Größe. D.h. je kleiner das Molekül ist, desto schneller kann es sich durch die Poren der polymersierten Agarosematrix bewegen.

Zur Herstellung des Agarosegels (Kapitel 2.1.2) wurden die Bestandteile des Gels nach dem Zusammengeben in der Mikrowelle solange aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Nach dem Abkühlen der Agarose-Lösung auf eine Temperatur von ca. 60 °C wurde diese zum Aushärten in ein Gelschiff gegossen. Die Vertiefungen im Gel für die Proben wurden mithilfe eines Kamms gebildet. Das ausgehärtete Agarosegel konnte anschließend in die mit 1x-TAE-Puffer (Kapitel 2.1.2) als Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer platziert werden. Jeweils 5 µL der DNA-Proben sowie 5 µL des DNA-Größenstandards (Kapitel 2.1.3) wurden in die Probenaschen des Gels aufgetragen und bei einer Spannung von 150 V innerhalb von 38 – 45 min aufgetrennt. Die Auftrennung speziell von Plasmid-DNA erfolgte bei 100 V und benötigte 90 min. Zudem wurden Plasmid-Proben vor der Auftragung auf das Agarosegel mit dem 1x-Gel-Ladepuffer (Kapitel 2.1.2) im Verhältnis 1:1 versetzt. Auch lineare DNA-Proben, bei denen nicht der HotStarTaq® Plus Master Mix mit dem CoralLoad-Konzentrat für die PCR verwendet wurde, wurden zuvor bei einem Gesamt-Probenvolumen von 10 bzw. 50 µL mit 2 bzw. 10 µL Gel-Ladepuffer (Kapitel 2.1.2) gemischt. Die Auswertung des Gels erfolgte nach ca. 15-minütiger Färbung in einer EtBr-Lösung (Kapitel 2.1.2) unter UV-Licht mit der Geldokumentation (Kapitel 2.1.1). Hierbei kam die Software *Gel Doc Quantity One 4.6.9* der Firma *Bio-Rad (München, Deutschland)* zum Einsatz.

2.2.10 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Die PCR-Amplifikate wurden vor der Sequenzierung (Kapitel 2.2.11) mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* (Kapitel 2.1.3) gereinigt. Die Reinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers und diente dazu, störende Komponenten, wie Primer, Nukleotide, Enzyme und Salze durch eine Reihe von Wasch- und Zentrifugationsschritten abzutrennen, während die DNA selektiv an der Silika-Membran einer Minisäule gebunden war. Die Elution der PCR-Amplifikate von der Silika-Säule wurde mit 30 µL ddH₂O durchgeführt.

2.2.11 Sequenzierung

Zur Bestätigung der durch PCR-Nachweis als wahrscheinlich *Acinetobacter* spp. zugehörig identifizierten Isolate wurden von diesen DNA-Sequenzierungen des 16S rRNA-Gens

durchgeführt. Zudem wurden auch einige Isolate sequenziert, die zwar in der *Acinetobacter* spp. spezifischen PCR (Kapitel 2.2.8.2) negativ waren, die aber auf dem Selektivnährmedium „ChromAgar *Acinetobacter*“ als *Acinetobacter* spp. verdächtige rote Kolonien gewachsen waren. Dies diente zur Bewertung der Selektivität des Nährmediums bezüglich der Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben. Zudem wurde ein *Acinetobacter*-Isolat aufgrund der geringen 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit zu anderen *Acinetobacter* spp. noch bezüglich weiterer Gene sequenziert (Kapitel 2.2.8.2).

Die Sequenzierungen wurden von der Firma *GATC Biotech (Köln, Deutschland)* durchgeführt. Dazu wurden 20 µL der aufgereinigten PCR-Amplifikate in einer Konzentration von 10 – 50 ng/µL eingesandt. Außerdem wurden die entsprechenden Primer (Kapitel 2.1.4), die für die Sequenzierung benötigt wurden, in einer Konzentration von 10 pmol/µL den PCR-Amplifikaten bei der Versendung in separaten Reaktionsgefäßen (Kapitel 2.1.1) beigelegt. Das Gesamtvolumen der Primer variierte von 20 – 40 µL in Abhängigkeit von der Menge der zu sequenzierenden Proben. Die Daten wurden mit dem Softwarepaket *Lasergene 10 SeqMan Pro* der Firma *DNASTAR (Madison, USA)* und der online Software BLAST^[133] ausgewertet.

2.2.12 Biochemische Identifizierung

2.2.12.1 Identifizierung mit den API-Testsystemen

API steht für den *Analytischen Profil Index*. Diese Testsysteme eignen sich für die Routinediagnostik und erlauben eine einfache und schnelle Identifizierung von Bakterien anhand von charakteristischen, biochemischen Reaktionen. Mit den verschiedenen kommerziell erhältlichen API-Testsystemen, die eine standardisierte und miniaturisierte Version der Bunten Reihe darstellen, ist es derzeit möglich über 600 unterschiedliche Spezies zu identifizieren.^[134]

Um die Identität der *Acinetobacter*-Isolate abzusichern, die bei der 16S rRNA-Sequenzierung der Spezies *A. baumannii* oder keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden konnten, wurde das „API 20 E-Testsystem zur Identifikation von *Enterobacteriaceae* und anderen gramnegativen Stäbchen“ und das „API 20 NE-Testsystem zur Identifizierung von gramnegativen nicht fermentierenden Bakterien“ (Kapitel 2.1.7) verwendet. Dies diente neben der Identifizierung zudem dazu, die Isolate hinsichtlich ihrer biochemischen Merkmale zu charakterisieren. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Das Ergebnis für die Oxidase-Reaktion wurde durch den Oxidase-Test (Kapitel 2.2.12.2) erhalten.

Ausgewertet wurden die Teststreifen mit der Identifizierungssoftware *apiweb*TM von der Firma *bioMérieux (Nürtingen, Deutschland)*.^[135]

2.2.12.2 Identifizierung durch den Oxidase-Test

Der Oxidase-Test dient zum Nachweis des Enzyms Cytochrom-c-Oxidase. Dieses Enzym ist bei einigen Bakterien Bestandteil der Atmungskette, in der es die Oxidation von Cytochrom c und der damit verbundenen Elektronenübertragung auf den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff katalysiert. Da nicht alle Bakterien dieses Enzym besitzen, kann der Oxidase-Test zur Differenzierung einzelner Bakterien herangezogen werden.

Zur Identifizierung von *Acinetobacter* spp. und gleichzeitigen Abgrenzung zu anderen Isolaten, die auf den verwendeten Selektivnährmedien gewachsen waren, wurde der Oxidase-Test durchgeführt. Hierzu wurde saugfähiges Filterpapier (Kapitel 2.1.7) mit ddH₂O befeuchtet. Die befeuchtete Stelle wurde dann mit einer Bakterien-Kolonie eingerieben. Anschließend wurde das Oxidase-Reagenz (Kapitel 2.1.7) auf die Kolonie getropft. Nach wenigen Minuten konnte das Ergebnis abgelesen werden. Eine blaue Färbung der Kolonie deutet auf das Vorhandensein der Cytochrom-c-Oxidase hin und wurde daher als oxidase-positiv gewertet.

2.2.13 Motilitäts-Assay

Obwohl Bakterien der Gattung *Acinetobacter* keine Flagellen besitzen, konnten unterschiedliche Bewegungsformen bei Vertretern der Gattung beobachtet werden.^[7-10,64,66,67] Um die aus den Tier- und Umweltprouben gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Motilität zu untersuchen, wurden Motilitäts-Tests nach Skiebe *et al.*^[64] durchgeführt. Dazu wurde das Bakterienmaterial viermal in das halbfeste Motilitäts-Medium (Kapitel 2.1.6) mit einer Pipettenspitze bis zum Boden der Petrischale eingestochen, um nicht nur das Wachstum auf der Agaroseoberfläche, sondern auch an der Grenze zwischen der Unterseite des Mediums und der Petrischale, der sog. Interphase, zu gewährleisten. Vor der Inkubation wurden die Platten mit Parafilm verschlossen. Dies diente dazu, einer Austrocknung des Mediums entgegenzuwirken. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (Kapitel 2.1.1). Am nächsten Tag fand die Auswertung der Platten statt. Um an der Interphase anhaftende Bakterien besser sichtbar zu machen, wurden einige Platten nach Entfernung des Mediums mit Coomassie-Lösung (Kapitel 2.1.2) angefärbt.

2.2.14 Transformations-Experiment zur Überprüfung natürlicher Kompetenz

Die Transformation ist neben der Konjugation und Transfektion ein Mechanismus des horizontalen Gentransfers bei Bakterien.^[76] Hierbei kommt es zur Aufnahme von exogener, frei vorliegender DNA in die Bakterienzelle und anschließender Integration der aufgenommenen DNA in das bakterielle Chromosom.^[75,76] Die Integration erfolgt dabei über homologe Rekombination.^[75] Die Fähigkeit von Bakterien, freie DNA natürlicherweise aus der Umgebung aufzunehmen, wird als natürliche Kompetenz bezeichnet.^[75] Diese Fähigkeit ermöglicht neben der Reparatur von DNA-Abschnitten auch die Erweiterung der Genausstattung des Empfänger-Bakteriums. In der Gattung *Acinetobacter* gibt es Stämme, die natürlich kompetent sind, darunter Stämme von *A. baumannii* und *A. baylyi*.^[136,137] [Wilharm & Skiebe, zur Veröffentlichung eingereicht]

Um die aus den Tier- und Umweltproben gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate auf die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz zu überprüfen, wurden Transformations-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die Isolate zunächst auf ihre Kanamycin-Sensitivität getestet, indem LB-Agarplatten mit 30 µg/mL Kanamycin (Kapitel 2.1.6) mit den entsprechenden Isolaten beimpft und bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Kanamycin-resistente Isolate, die auf den Agarplatten Wachstum zeigten, wurden nicht weiter auf natürliche Kompetenz untersucht. Hingegen wurden von den sensitiven Isolaten einzelne Kolonien in sterilem PBS-Puffer (Kapitel 2.1.2) suspendiert und im Verhältnis 1:1 mit chromosomaler DNA einer Kanamycin-resistenten Mutante mit Transposon Insertion in dem SR-kodierendem Gen (Kapitel 2.1.7) gemischt. Von dem Gemisch wurden 7 x 2 µL in halbfestes Motilitäts-Medium (Kapitel 2.1.6) injiziert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte das Abschwemmen der Bakterien von der Agaroseoberfläche und der Interphase mit 1 mL sterilem PBS-Puffer. Die Transformanten wurden anschließend selektiert, indem 200 µL der erhaltenen Bakteriensuspension auf Kanamycin-Platten (Kapitel 2.1.6) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden. Zur Kontrolle wurde der Ansatz für jedes Isolat ohne Zugabe chromosomaler DNA durchgeführt.

Die Bestätigung der Transformations-Ereignisse erfolgte durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar SR_for und SR_rev (Kapitel 2.2.8) sowie mit Wachstumstests auf Simmons-Citrat-Agar (Kapitel 2.1.6), in dem Sulfat als einzige Schwefelquelle enthalten ist. Vor der Kolonie-PCR wurden die selektierten Transformanten allerdings noch auf neuen Kanamycin-Platten subkultiviert, um mehrdeutige Ergebnisse aufgrund des Hintergrundes von

transformierender DNA und DNA getöteter Bakterien zu verhindern. Für die Wachstumstests wurden jeweils die transformierten Bakterien und ihre entsprechenden Wildtypen auf dem Agar ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Auswertung erfolgte am folgenden Tag. Transformanten wurden dadurch bestätigt, dass sie im Gegensatz zu ihrem Wildtyp kein Wachstum auf dem Agar zeigten, da sie durch die Inaktivierung des SR-kodierenden Gens Sulfat als Schwefelquelle nicht mehr verwerten können.

2.2.15 Biofilm-Assay

Bakterien können sich an den Grenzflächen des Wassers akkumulieren und dort Biofilme ausbilden.^[94] Daher stellen Grenzflächen zwischen Flüssig- und Festphasen, zwischen Gas- und Flüssigphasen sowie zwischen Flüssig- und Flüssigphasen bevorzugte Besiedlungsräume für Bakterien dar.^[94] Bei einigen *Acinetobacter* spp. wurde bereits die Fähigkeit zur Biofilmbildung beobachtet.^[97] So ist z.B. *A. baumannii* in der Lage, sowohl auf abiotischen als auch auf biotischen Oberflächen Biofilme auszubilden.^[49]

Der Biofilm-Assay wurde für die in dieser Arbeit gewonnenen *A. baumannii*-Isolate und das *Acinetobacter*-Isolat, das nur eine geringe Sequenzähnlichkeit zu anderen *Acinetobacter* spp. aufwies, durchgeführt. Dazu wurden 3 mL LB-Medium in ein 14 mL Polystyren-Rundbodenröhrchen gegeben und mit einer Kolonie des jeweiligen Isolats beimpft. Inkubiert wurden die Röhrchen bei Raumtemperatur für 72 h ohne Schütteln. Anschließend erfolgte die Auswertung.

2.2.16 *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Die Virulenz der gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate wurde im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell im Vergleich zum *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 charakterisiert. Verwendung findet dabei die Raupe der großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*).^[138] Diese besitzt genauso wie Säugetiere ein angeborenes Immunsystem und kann zudem bei Temperaturen von 37 °C gehalten werden.^[139] Es wurde gezeigt, dass zwischen der Virulenz eines Erregers in *Galleria mellonella* und der Virulenz desselben Erregers in Säugetier-Modellen eine Korrelation besteht, sodass *Galleria mellonella* als Modellorganismus zur Untersuchung von menschlichen Pathogenen herangezogen werden kann.^[140,141] Für Bakterien der Gattung *Acinetobacter* ist dieses Infektionsmodell bereits etabliert.^[138]

Die Infektion der *Galleria mellonella*-Raupen (Kapitel 2.1.7) fand hauptsächlich nach Peleg *et al.*^[138] statt. Dazu wurden die Bakterien zunächst in 3 mL LB-Medium bei 37 °C über Nacht schüttelnd kultiviert (Kapitel 2.2.1), mit dem gleichen Medium 1:50 verdünnt und für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert, um Bakterien der logarithmischen Phase zu erhalten. Anschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation der Bakteriensuspension in LoBind Tubes der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) sowie das Waschen der Bakterienzellen mit sterilem PBS-Puffer (Kapitel 2.1.2). Nachdem die Bakterienzellen in sterilem PBS-Puffer resuspendiert worden waren, wurde für die Suspension eine OD₆₀₀ von 1,0 (Kapitel 2.2.3) eingestellt. Die Suspensionen der *A. baumannii*-Isolate wurden zudem vor der Infektion der Raupen 1:5 verdünnt, da bei diesen Isolaten eine höhere Virulenz vermutet wurde. Auch der *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 wurde 1:5 verdünnt, da dessen erhöhte Virulenz in diesem Modell bereits bekannt war.^[64,138] Anschließend erfolgte die Injektion von 5 µL-Aliquots der jeweiligen Bakteriensuspension mit einer Spritze (Kapitel 2.1.1) in das letzte linke Bauchbein der Raupen. Nach der Injektion wurden die *Galleria mellonella* Raupen in Petrischalen für fünf Tage bei 37 °C inkubiert und täglich auf ihre Vitalität überprüft. Zeigten diese nach Berührung keine Bewegung mehr, so wurden sie als tot betrachtet. Um die tatsächliche Infektionsdosis der injizierten Aliquots retrospektiv zu ermitteln, wurde von den Bakteriensuspensionen (OD₆₀₀ = 1,0) zudem eine Verdünnungsreihe in LoBind Tubes hergestellt. Je 100 µL der Verdünnungen 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ wurden auf Nutrient-Agar (Kapitel 2.1.6) ausplattiert und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Auszählung aller gewachsenen Kolonien pro Platte.

Die Infektionsversuche fanden mit Gruppen von 16 Raupen pro Isolat statt. Zudem wurden bei den Versuchen zwei Kontrollgruppen mitgeführt: in eine Gruppe wurden 5 µL-Aliquote des sterilen PBS-Puffers injiziert und die andere Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Die Ergebnisse wurden verworfen, wenn in einer der beiden Kontrollgruppen innerhalb der Inkubationszeit mehr als zwei Raupen starben. Zur statistischen Absicherung erfolgten mindestens drei unabhängige Infektionsversuche pro Isolat. Bei einigen Isolaten konnte aufgrund Zeitmangels allerdings nur ein Einfach-Ansatz durchgeführt werden.

2.2.17 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung ist eine Methode zur differenzierenden Färbung von Bakterien. Man unterscheidet je nach Färbeverhalten gram-positive und gram-negative Bakterien. Das unterschiedliche Färbeverhalten ist dabei auf Differenzen im Zellwandaufbau der Bakterien

zurückzuführen. Während gram-positive Bakterien eine deutlich dickere Peptidoglykanschicht aufweisen, ist bei gram-negativen Bakterien eine zusätzliche asymmetrische Lipiddoppelschicht (äußere Membran) auf der dünnen Peptidoglykanschicht aufgelagert. So kommt es bei dieser Färbemethode dazu, dass sich die gram-positiven Bakterien blau und die gram-negativen Bakterien rot färben. Neben der Unterscheidung von Bakterien in gram-negativ und gram-positiv dient die Gram-Färbung außerdem zur Darstellung von Bakterien für die mikroskopische Untersuchung.

Um die Zugehörigkeit eines Isolates zur Gattung *Acinetobacter* zu bestätigen, wurde die Gram-Färbung mit anschließender Betrachtung unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Dazu wurde das Gram Staining Kit (Kapitel 2.1.3) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung von Tier- und Umweltproben

3.1.1 Gewinnung und Identifizierung von *Acinetobacter*-Isolaten

Um einen Beitrag zur Identifizierung der bisher unbekannt natürlichen Reservoirs von *A. baumannii* zu liefern, wurde verschiedenes Probenmaterial von Tieren und aus der Umwelt auf *A. baumannii* untersucht. Für die vorliegende Arbeit wurden daher insgesamt 211 Tier- und Umweltproben gewonnen (Kapitel 2.2.4). Bei diesen 211 Proben handelte es sich um 26 Umweltproben und um 185 Tierproben, wobei die Tierproben vorwiegend aus Vogelproben (= 175 Proben) bestanden. Von den 185 Tierproben stammten 150 Proben aus dem Labor von Frau Dr. Böhland.

Zur Untersuchung der Proben auf *A. baumannii* wurden die aus den Proben gewonnenen, selektiv angereicherten Isolate (Kapitel 2.2.5) erst einer *Acinetobacter* spp. spezifischen PCR auf das *rpoB*-Gen unterzogen (Kapitel 2.2.8.2). Alle Isolate, die in der *Acinetobacter* spp. spezifischen PCR positiv waren, wurden als wahrscheinlich *Acinetobacter* zugehörig gewertet. Diese Isolate wurden daraufhin mittels der *A. baumannii* spezifischen PCR (Kapitel 2.2.8.2) auf die *bla*_{OXA-51-like}-Gene untersucht und zusätzlich bezüglich des 16S rRNA-Gens sequenziert (Kapitel 2.2.11). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 7-1 (siehe Anhang). Aus den 211 Tier- und Umweltproben konnten insgesamt 21 *Acinetobacter* spp. aus 20 Proben (~9 %) isoliert werden. Diese Isolate erschienen alle als grüne Kolonien auf GCG-Agar und waren in der *rpoB*-Gen-PCR positiv, was auf *Acinetobacter* spp. hindeutete. Zudem wurde die *rpoB*-Gen-PCR für alle 21 Proben durch die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens bestätigt. Eine Umweltprobe (Proben-Nr. 45) war zwar bezüglich der *rpoB*-Gen-PCR positiv, aber die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens ergab, dass es sich hierbei nicht um ein Bakterium der Gattung *Acinetobacter* handelte, sondern dass das Bakterium der Gattung *Pseudomonas* zugehörig war. Eines der *Acinetobacter*-Isolate (aus Proben-Nr. 4) zeigte zudem nur eine geringe 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit von 98 % zu den bereits bekannten *Acinetobacter* Spezies. Da bei den in der Literatur neu beschriebenen *Acinetobacter* spp. i.d.R. eine 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit von ≤ 98 % zu anderen *Acinetobacter* spp. mit gültiger Speziesbezeichnung vorlag, wurde vermutet, dass es sich auch bei diesem Isolat möglicherweise um eine neue Spezies handeln könnte.^[13,14] Daher gab das 16S rRNA-Sequenzierungsergebniss Anlass für zusätzliche Untersuchungen bezüglich dieses Isolates.

Von den 21 als *Acinetobacter* spp. identifizierten Isolaten handelte es sich bei sechs Isolaten um *A. baumannii*. Diese waren sowohl in der *rpoB*-Gen-PCR als auch in der *A. baumannii* spezifischen *bla*_{OXA-51-like}-Gene-PCR positiv und wuchsen zudem auf ChromAgar *Acinetobacter* bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C. Das Ergebnis wurde außerdem durch die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens bestätigt. Die der Gattung *Acinetobacter* zugehörig identifizierten Isolate, ohne die *A. baumannii*-Isolate, stammten zum größten Teil aus tierischem Probenmaterial (80 %) und nur ein geringer Anteil wurde aus Umweltproben isoliert (20 %). Hingegen wurden die *A. baumannii*-Isolate ausschließlich aus Tierproben bzw. genauer aus Geflügelproben erhalten. So stammten die sechs *A. baumannii*-Isolate aus Choanen- (50 %) und Rachen-Tupfern (50 %) von drei verschiedenen Geflügelherden.

Des Weiteren wurde zusätzliches Probenmaterial speziell von Zecken (Kapitel 2.2.4) mittels PCR auf den *A. baumannii* spezifischen Marker *bla*_{OXA-51-like} überprüft (Kapitel 2.2.8.2). Hierzu wurden aus den 176 erhaltenen Zeckenproben mehrere Pools aus jeweils zehn Proben bzw. ein Pool aus sechs Proben gebildet. Diese wurden dann zur Untersuchung auf *A. baumannii* mittels PCR eingesetzt. Hierbei konnte allerdings kein positives Ergebnis erzielt werden.

3.1.2 Biochemische Identifizierung mit den API-Testsystemen

Um die durch die Sequenzierung erhaltenen Ergebnisse zu bestätigen bzw. weitere Informationen zur Identität des Isolates aus Probe 4 zu erhalten, wurden die sechs als *A. baumannii* identifizierten Isolate sowie das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 (Tabelle 7-1) mit zwei API-Testsystemen analysiert. Die Durchführung erfolgte nach Kapitel 2.2.12.1. Hierbei wurden die Testsysteme API 20 NE und API 20 E eingesetzt, die größtenteils auf unterschiedlichen biochemischen Reaktionen basieren und neben der Identifizierung auch eine Charakterisierung der verschiedenen biochemischen Merkmale von Bakterien gewährleisten. Die Auswertungen der einzelnen biochemischen Reaktionen sowie der *apiweb*TM Software sind in Tabelle 7-2 und Tabelle 7-3 zusammengefasst (siehe Anhang). Alle sechs *A. baumannii*-Isolate reagierten in beiden Testsystemen bei allen Reaktionen identisch. Bei beiden Testsystemen wurden die Stämme mit einer Identifizierungswahrscheinlichkeit (ID-Wert) von 94,8 – 99,9 % und einer Identifizierungssicherheit (T-Wert) von 1,0 als *A. baumannii*/*A. calcoaceticus* identifiziert. Da eine Unterscheidung anhand biochemischer Reaktionen bei Vertretern des ACB-Komplexes nicht möglich ist (Kapitel 1.3), werden von der *apiweb*TM Software beide Spezies angegeben.

Allerdings sollte beachtet werden, dass auch die Spezies *A. pittii* und *A. nosocomialis* des ACB-Komplexes bei einem solchen Ergebnis in Frage kommen können, auch wenn sie von der Software nicht angegeben werden. Für das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 ergaben beide Testsysteme kein zufriedenstellendes Ergebnis. Das Isolat wurde bei dem API 20 NE-Testsystem nur mit einem geringen T-Wert (0,13) und einem geringen ID-Wert (62,1 %) der Gattung *Pasteurella* zugeordnet. Hingegen wurde das Isolat bei dem API 20 E-Testsystem in die Gattung *Pseudomonas* eingegliedert, ebenfalls mit einem geringen T-Wert (0,84) und einem geringen ID-Wert (81,2 %).

Die biochemischen Reaktionen der *A. baumannii*-Isolate stimmten mit den meisten *A. baumannii/A.calcoaceticus* Referenzstämmen überein (siehe Tabelle 7-2 und Tabelle 7-3). So konnten diese Glucose, Arabinose, Caprat, Adipat, Malat, Citrat und Phenylacetat assimilieren sowie D-Glucose, D-Melibiose und L-Arabinose fermentieren. Das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 konnte hingegen Adipat und Malat assimilieren, Nitrat reduzieren sowie Glucose und L-Arabinose fermentieren.

3.1.3 Wachstumstest bei höheren Temperaturen

Da sich *A. baumannii* im Gegensatz zu den meisten anderen Spezies der Gattung *Acinetobacter* bei Temperaturen von 44 °C noch gut vermehren kann, ist es möglich, *A. baumannii*-Isolate durch Inkubation bei 44 °C von vielen anderen *Acinetobacter*-Spezies zu unterscheiden.^[122] Durch diesen Zusatztest lässt sich *A. baumannii* sogar zu einigen Vertretern des ACB-Komplexes abgrenzen,^[122] die mit den API-Testsystemen nicht differenziert werden können.

Um die Identität der *A. baumannii*-Isolate zusätzlich abzusichern und um die anderen *Acinetobacter*-Isolate von den *A. baumannii*-Isolaten abzugrenzen, wurden alle gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate (Tabelle 7-1) nach Kapitel 2.2.1 bei einer Temperatur von 44 °C kultiviert. Zum Vergleich wurden die Isolate auch auf dem gleichen Nährmedium bei der Standard-Temperatur von 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7-1 ersichtlich. Während alle Isolate bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C ein mehr oder weniger starkes Wachstum zeigten, wuchsen bei 44 °C nur noch die als *A. baumannii* identifizierten Isolate.

3.1.4 Vergleich der Selektivnährmedien

Zur Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben kamen drei verschiedene Selektivnährmedien zum Einsatz: Simmons-Citrat-Agar, ChromAgar *Acinetobacter* und Leeds *Acinetobacter* Medium (Kapitel 2.2.5). Dadurch war es möglich, die drei Nährmedien bezüglich ihrer Selektivität und ihrer Eignung zur Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben untereinander zu vergleichen.

Mit den beiden verwendeten Selektivnährmedien Simmons-Citrat-Agar (SC-Agar) und ChromAgar *Acinetobacter* (CA) konnten die *Acinetobacter* spp. gut erfasst werden (vgl. Tabelle 7-1). So wuchsen alle elf als *Acinetobacter* zugehörig identifizierten Isolate, bei deren Isolierung SC-Agar zur Anwendung kam, auf SC-Agar und die meisten auch auf CA (neun von elf). Allerdings zeigte sich oftmals ein wesentlich stärkeres Wachstum einzelner Spezies auf SC-Agar im Gegensatz zu CA, nicht nur bezüglich der *Acinetobacter* spp. Zudem wurden auf SC-Agar meist aus einer Probe mehrere Bakterien-Spezies nebeneinander kultiviert, während hingegen beim CA oftmals reine oder gar keine Kolonien bei derselben Probe erhalten wurden. Daher war der Aufwand zur Gewinnung von reinen *Acinetobacter* spp. mit dem SC-Agar wesentlich höher. Aufgrund dessen wurde SC-Agar auch nur bis zur Proben-Nr. 110 eingesetzt. Gewachsene Kolonien von *Acinetobacter* spp. zeigten sich bei CA meist durch eine auffällige rote Färbung auf dem sonst farblosen bzw. leicht beige Medium, aber auch blassrot gefärbte Kolonien wurden von einigen *Acinetobacter*-Isolaten gebildet. Zudem wuchsen bei manchen Proben auch blau gefärbte Kolonien auf dem Medium, die jedoch nach Angaben des Herstellers der Gattung *Enterobacteriaceae* zuzuordnen sind und daher nicht weiter untersucht wurden. Das Wachstum von *Acinetobacter* spp. auf SC-Agar äußerte sich in Form farbloser Kolonien, die durch den Umschlag des pH-Indikators Bromthymolblau von grün nach blau hervorgehoben wurden. Allerdings war der Umschlag des Indikators manchmal verzögert oder blieb aus, sodass auch Kolonien auf einem farblosen Medium z.T. Repräsentanten der Gattung *Acinetobacter* darstellten.

Zur Bewertung der Selektivität speziell von CA bezüglich der Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben wurden zudem auch ausgewählte Isolate von CA sequenziert (Kapitel 2.2.11), die in der *Acinetobacter* spp. spezifischen PCR (Kapitel 2.2.8.2) negativ waren und gleichzeitig als rote, *Acinetobacter* spp. verdächtige Kolonien auf dem Medium erschienen. Die Auswertung der Sequenzierung ergab hier, dass es sich meist um Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* (10 Isolate), *Chryseobacterium* (10 Isolate), *Stenotrophomonas* (4 Isolate) und *Enterococcus* (4 Isolate) handelte. Daneben wurden auch

einzelne Isolate der Gattungen *Achromobacter*, *Paenochrobactrum*, *Myroides* und *Alcaligenes* detektiert, die als rote Kolonien auf CA neben Bakterien der Gattung *Acinetobacter* wuchsen. Viele dieser Isolate wuchsen zudem bei 42 °C. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7-1 zusammengefasst.

Auf Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) wurden nur ausgewählte Proben, von denen durch PCR und Sequenzierung bekannt war, dass Bakterien der Gattung *Acinetobacter* enthalten waren, und Referenzstämme aus Tabelle 2-4 ausgestrichen, da das Ergebnis dabei im Allgemeinen nicht sehr überzeugend war. Die Kultivierung der Referenzstämme bzw. die Isolierung der *Acinetobacter* spp. aus den Proben erfolgte nach Kapitel 2.2.1 und Kapitel 2.2.5. Zum direkten Vergleich wurden dieselben Proben und Referenzstämme auch auf CA ausplattiert und bei 37 °C inkubiert. Die Ergebnisse des LAM-Testes sind in Abbildung 7-2 und Abbildung 7-3 dargestellt. Im Gegensatz zu CA konnten mit LAM zwei *Acinetobacter* Referenzstämme (*A. baylyi* und *A. baumannii* Stamm *SDF*) nicht bzw. nur sehr schwach erfasst werden. Außerdem zeigten auch hier die Referenzstämme, die nicht zur Gattung *Acinetobacter* gehörten und auf CA als rote Kolonien erschienen, Wachstum auf LAM. Obwohl die Koloniefarbe bei diesen zwar i.d.R. weiß war, erschienen die Kolonien durch die Färbung des Mediums leicht rosa gefärbt, wodurch die Differenzierung zu *Acinetobacter* spp. erschwert wurde. Bei den *Acinetobacter*-Isolaten war die Färbung des Mediums und der Kolonien auf LAM zwar gut zu erkennen, allerdings nur in Bereichen größerer Bakterienmassen. Einzelne Kolonien und deren Umgebung blieben farblos. Bei der Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben mithilfe von LAM wurde deutlich, dass *Acinetobacter* spp. aus diesen Proben wesentlich besser mit CA isoliert werden konnten. Während die Kolonien der *Acinetobacter* spp. auf dem CA optisch gut erfasst werden konnten und neben diesen auch nichts weiter wuchs, konnten Kolonien von *Acinetobacter* spp. auf LAM nicht bzw. nur bei Probe 62 als klare pinke Kolonien identifiziert werden und das auch nur bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C und neben starkem Wachstum anderer Bakterien. Im Allgemeinen konnte bei den anderen Proben und Referenzstämmen kein großer Unterschied zwischen einer Inkubationstemperatur von 30 °C und 37 °C verzeichnet werden.

3.1.5 Abgrenzung von *Acinetobacter* spp. zu anderen Isolaten

Um eine schnelle und einfache Methode zu finden, die eine Unterscheidung von *Acinetobacter* spp. zu den anderen Bakterien-Gattungen erlaubt, die auf ChromAgar

Acinetobacter als *Acinetobacter* spp. verdächtige Kolonien erschienen waren, wurde der Oxidase-Test (Kapitel 2.2.12.2) durchgeführt. Hierzu wurde von jeder isolierten Gattung ein Vertreter getestet (siehe Tabelle 7-1). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass außer den Gattungen *Enterococcus*, *Stenotrophomonas* und *Acinetobacter* alle Vertreter oxidase-positiv waren. Daher lässt sich mit dieser einfachen Methode die *Acinetobacter* spp. im Vorfeld von den meisten anderen Bakterien-Gattungen auf CA abgrenzen.

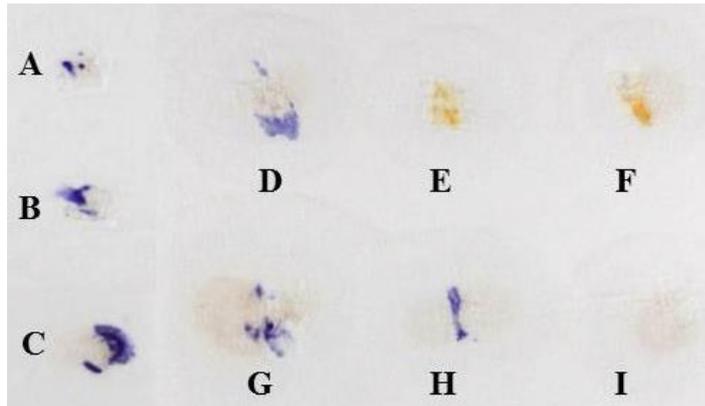


Abbildung 3-1: Oxidase-Test zur Abgrenzung von *Acinetobacter* spp. zu anderen Bakteriengattungen. **A:** *Paenochrobactrum* sp. (Nr. 139), oxidase-positiv; **B:** *Alcaligenes* sp. (Nr. 201), oxidase-positiv; **C:** *Myroides* sp. (Nr. 194), oxidase-positiv; **D:** *Pseudomonas* sp. (Nr. 22), oxidase-positiv; **E:** *Enterococcus* sp. (Nr. 63), oxidase-negativ; **F:** *Stenotrophomonas* sp. (Nr. 160), oxidase-negativ; **G:** *Chryseobacterium* sp. (Nr. 49), oxidase-positiv; **H:** *Achromobacter* sp. (Nr. 3), oxidase-positiv; **I:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 27), oxidase-negativ; die Nummern (Nr.) kennzeichnen die entsprechenden Proben-Nummern, aus denen die Isolate erhalten wurden (siehe Tabelle 7-1).

Zudem wurden dieselben Isolate, die für den Oxidase-Test verwendet wurden, sowie weitere *Acinetobacter*-Isolate nebeneinander auf CA nach Kapitel 2.2.1 kultiviert, um durch den direkten Vergleich mögliche Unterschiede in der Koloniemorphologie und -farbe einzelner Gattungen feststellen zu können. Das Ergebnis ist in Abbildung 3-2 dargestellt. Alle Isolate zeigten eine ähnliche, kaum unterscheidbare rote Koloniefarbe. Verschiedene Koloniemorphologien konnten beobachtet werden. Da es allerdings schon allein bei den Vertretern der Gattung *Acinetobacter* starke Variationen in der Koloniemorphologie und -farbe gab, können diese Kriterien nicht zur Unterscheidung der verschiedenen Gattungen herangezogen werden. Lediglich die Gattungen *Paenochrobactrum* und *Alcaligenes* ließen sich durch eine Färbung des Mediums eindeutig abgrenzen. Außerdem könnte das schwache Wachstum der Gattungen *Paenochrobactrum* und *Pseudomonas* für die Isolierung von *Acinetobacter* spp. von Vorteil sein.

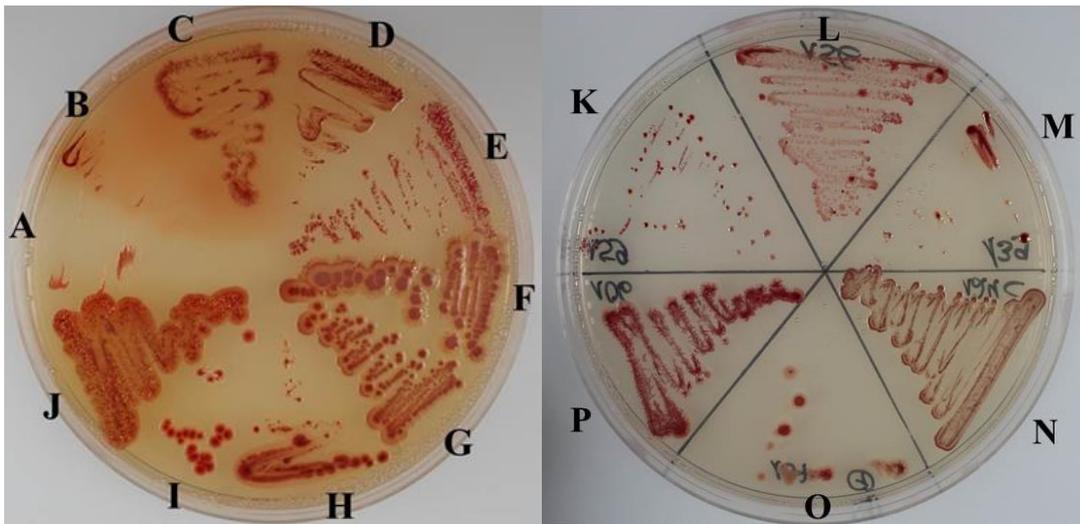


Abbildung 3-2: Kultivierung von *Acinetobacter* spp. und anderen Bakterien-Gattungen auf ChromAgar *Acinetobacter*.

A: *Pseudomonas* (Nr. 22); **B:** *Paenochrobactrum* (Nr. 139); **C:** *Alcaligenes* (Nr. 201); **D:** *Achromobacter* (Nr. 3); **E:** *Enterococcus* (Nr. 63); **F:** *Acinetobacter baumannii* (Nr. 124); **G:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 27); **H:** *Myroides* (Nr.194); **I:** *Chryseobacterium* (Nr. 49); **J:** *Stenotrophomonas* (Nr. 160); **K:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 159) **L:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 156) **M:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 139) **N:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 124) **O:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 107) **P:** *Acinetobacter* sp. (Nr. 106); die Nummern (Nr.) kennzeichnen die entsprechenden Proben-Nummern, aus denen die Isolate erhalten wurden (siehe Tabelle 7-1).

3.2 Weitergehende Charakterisierung der *Acinetobacter*-Isolate

3.2.1 Untersuchung auf Verotoxin-Gene

Die Verotoxine von *Escherichia coli* und das dazu nahe verwandte Shigatoxin von *Shigella dysenteriae*, das auch gelegentlich von einigen anderen *Shigella* spp. produziert wird, sind zytotoxische Proteine.^[142–144] Diese sind in der Lage die eukaryotische Proteinsynthese zu beeinträchtigen und somit für eine hohe Virulenz dieser Erreger zu sorgen.^[142] Aufgrund der Beobachtung von Grotiuz *et al.*, dass ein *A. haemolyticus*-Stamm in der Lage ist, Verotoxin 2 zu produzieren,^[124] wurden alle in dieser Arbeit gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate mittels PCR auf die beiden Gene *vtx1* und *vtx2* untersucht (Kapitel 2.2.8.2). Bei keinem der untersuchten Isolate konnte hierbei ein Amplifikat erhalten werden, was darauf hindeutet, dass diese nicht über Verotoxin kodierende Gene verfügen und somit nicht in der Lage sind Verotoxine zu produzieren.

3.2.2 Plasmidprofil-Analyse

Um eine schnelle Aussage über die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den *Acinetobacter*-Isolaten zu erhalten, wurden die Plasmide der einzelnen Stämme nach Kapitel 2.2.6 isoliert und im Agarosegel nach Kapitel 2.2.9 analysiert. Hierbei wurden bevorzugt die Isolate untersucht, die aus Geflügelherden stammten, da eine Verbindung zwischen diesen wahrscheinlicher war als zwischen den einzelnen Umweltisolaten. Die Ergebnisse der Plasmid-Auftrennungen sind in Abbildung 3-3 dargestellt. Mit Ausnahme von vier Isolaten ergaben sich in allen Isolaten Hinweise auf Plasmide. Allerdings handelte es sich bei der oberen Bande in Spur 1, 10, 11 und 12 möglicherweise um chromosomale DNA, die bei der Plasmidpräparation nicht vollständig abgetrennt worden ist, sodass mehr als vier Isolate keine Plasmide aufweisen würden. Eindeutig identische Profile lieferten die *A. baumannii*-Isolate aus Probe 65, 66, 117 und 202 (Spur 14, 15, 16 und 18), die auch mit Ausnahme von Probe 202 aus Proben derselben Geflügelherde stammten (siehe Tabelle 7-1). Auch die *A. baumannii*-Isolate aus Probe 62 und 124 (Spur 13 und 17) wiesen identische Plasmidprofile auf und wurden zudem aus derselben Geflügelherde isoliert. Die anderen Isolate zeigten hingegen voneinander unabhängige Plasmidprofile, darunter auch ein weiteres Isolat aus Probe 124 (Spur 6).

Bei der Auftrennung von Plasmiden im Agarosegel können im Allgemeinen mehrere Banden durch ein einziges Plasmid gebildet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Plasmide in unterschiedlichen Konformationen vorliegen können und sich je nach Konformation auch unterschiedlich schnell im elektrischen Feld bewegen. Aus Abbildung 3-3 ist daher nicht ersichtlich, wieviele unterschiedliche Plasmide die einzelnen Isolate besitzen. Auch ein direkter Vergleich mit dem linearen DNA-Größenstandard ist somit nicht möglich.

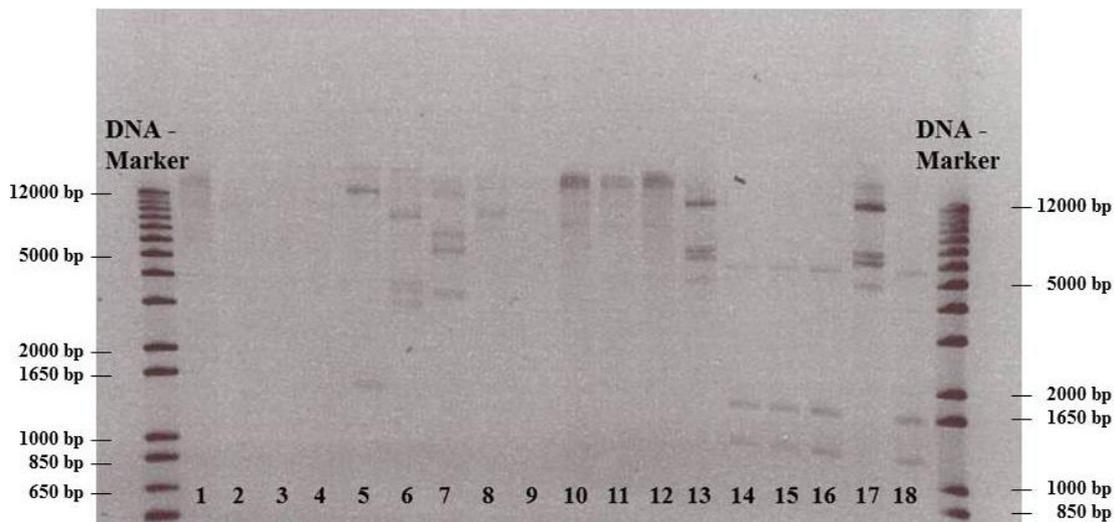


Abbildung 3-3: Plasmidprofile von 18 *Acinetobacter*-Isolaten auf einem 0,7 %igen Agarosegel.
Spur 1: Isolat Probe 4; **Spur 2:** Isolat Probe 11; **Spur 3:** Isolat Probe 43; **Spur 4:** Isolat Probe 106; **Spur 5:** Isolat Probe 107; **Spur 6:** Isolat Probe 124 (*A. calcoaceticus*); **Spur 7:** Isolat Probe 139; **Spur 8:** Isolat Probe 156; **Spur 9:** Isolat Probe 159; **Spur 10:** Isolat Probe 187; **Spur 11:** Isolat Probe 188; **Spur 12:** Isolat Probe 211; **Spur 13:** Isolat Probe 62; **Spur 14:** Isolat Probe 65; **Spur 15:** Isolat Probe 66; **Spur 16:** Isolat Probe 117; **Spur 17:** Isolat Probe 124 (*A. baumannii*); **Spur 18:** Isolat Probe 202; **DNA-Marker:** linearer DNA-Größenstandard.

3.2.3 Motilitäts-Assay

Um die aus den Tier- und Umweltproben gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Motilität auf der Agaroseoberfläche und an der Interphase zu untersuchen, wurden Motilitäts-Tests nach Kapitel 2.2.13 durchgeführt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 7-4. So zeigten von den 21 Isolaten 15 Motilität an der Interphase. Bei den sechs Isolaten (aus Probe 11, 106, 107, 139, 156 und 159), bei denen hingegen keine Motilität an der Interphase beobachtet werden konnte, handelte es sich wahrscheinlich in allen Fällen auf Grundlage der 16S rRNA-Sequenzierung um die Spezies *A. Iwoffii* (siehe Tabelle 7-1). Von diesen zeigten wiederum drei Isolate (aus Probe 106, 107 und 139) keine Motilität auf der Agaroseoberfläche. Bei allen anderen untersuchten *Acinetobacter*-Isolaten konnte sowohl Motilität auf der Agaroseoberfläche als auch an der Interphase verzeichnet werden, allerdings je nach Isolat in unterschiedlichem Ausmaß.

Zur Veranschaulichung der Oberflächen- und Interphasenmotilität ist exemplarisch das Ergebnis des Motilitäts-Testes für das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 202 in Abbildung 3-4 dargestellt.

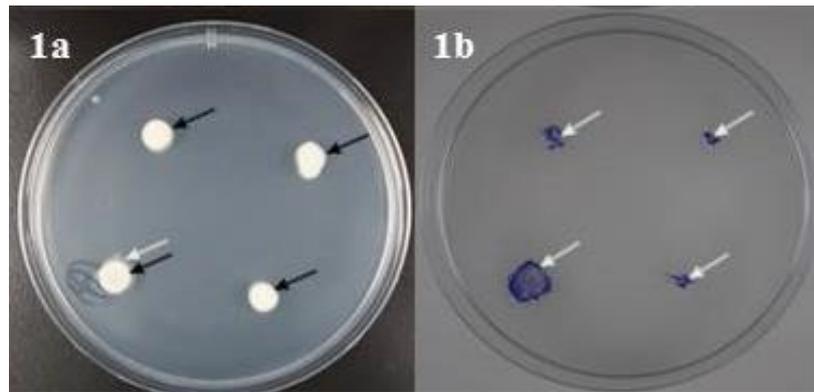


Abbildung 3-4: Motilitäts-Test auf Motilitäts-Medium am Beispiel eines *Acinetobacter*-Isolates.

1a: Motilitäts-Medium nach viermaligem Einstechen des *Acinetobacter*-Isolates aus Probe 202 und nachfolgender Inkubation; **1b:** Platte aus 1a nach Entfernung des Mediums und anschließender Coomassie-Färbung des anhaftenden bakteriellen Biofilms; die weißen Pfeile kennzeichnen die sichtbare Front der Interphasen-Motilität; die schwarzen Pfeile kennzeichnen die Front der Oberflächen-Motilität.

3.2.4 Transformations-Experiment zur Überprüfung natürlicher Kompetenz

Zur Überprüfung der gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate auf die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz wurden Transformations-Experimente nach Kapitel 2.2.14 durchgeführt. Dazu wurden die Isolate zunächst auf ihre Kanamycin-Sensitivität durch Beimpfung von LB-Agar mit Kanamycin getestet. Hierbei zeigten nur zwei *A. baumannii*-Isolate (aus Probe 62 und 124) Wachstum. Dies belegte eine Resistenz gegenüber der eingesetzten Kanamycin-Konzentration, sodass diese für die Transformations-Versuche nicht eingesetzt werden konnten. Von den übrigen 19 Kanamycin-sensitiven Isolaten konnten nach erfolgten Transformations-Experimenten von vier *A. baumannii*-Isolaten (aus Probe 65, 66, 117 und 202) Transformanten erhalten werden, die im Gegensatz zu ihren Wildtypen resistent gegenüber der in der Platte verwendeten Kanamycin-Konzentration waren (Abbildung 3-5: 1a-1d). Die Transformation der vier Isolate konnte durch Wachstumstests auf Simmons-Citrat-Agar bestätigt werden. In Transformanten ist das SR-kodierende Gen durch die Integration der DNA ausgeschaltet, sodass diese Sulfat nicht als Schwefelquelle nutzen können. So zeigten die Transformanten der vier Isolate auch kein Wachstum auf Simmons-Citrat-Agar, während hingegen ihre Wildtypen Kolonien bildeten und eine Blaufärbung des Mediums verursachten (Abbildung 3-5: 2a-2d).

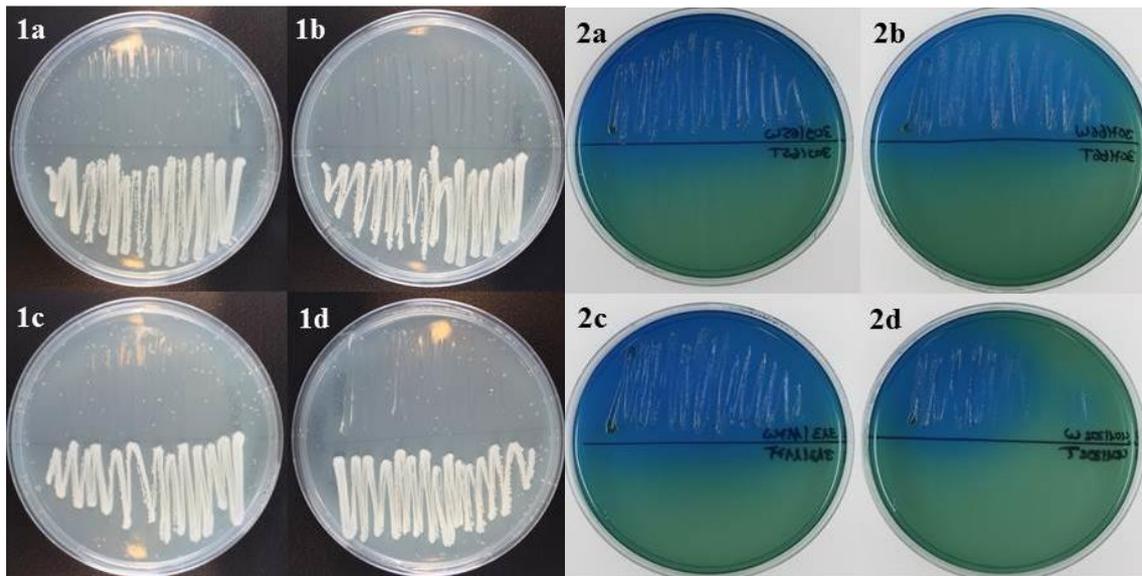


Abbildung 3-5: Wachstumsvergleich von Transformanten und ihren entsprechenden Wildtypen auf LB-Agar mit Kanamycin (links) und Simmons-Citrat-Agar (rechts).

1: Wachstum auf LB-Agar mit Kanamycin; **1a:** oben Wildtyp 65, unten Transformant 65; **1b:** oben Wildtyp 66, unten Transformant 66; **1c:** oben Wildtyp 117, unten Transformant 117; **1d:** oben Wildtyp 202, unten Transformant 202; **2:** Wachstum auf Simmons-Citrat-Agar; **2a:** oben Wildtyp 65, unten Transformant 65; **2b:** oben Wildtyp 66, unten Transformant 66; **2c:** oben Wildtyp 117, unten Transformant 117; **2d:** oben Wildtyp 202, unten Transformant 202; die Nummern 65, 66, 117, 202 kennzeichnen die Proben-Nummer, aus denen die *Acinetobacter*-Stämme isoliert wurden.

Die stattgefundene Transformation der vier Isolate konnte zudem durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar SR_for und SR_rev und anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte auf 1 %iger Agarose abgesichert werden. Die Ergebnisse der Kolonie-PCR sind in Abbildung 3-6 dargestellt. Für alle Wildtypen konnte ein PCR-Produkt von etwa 1200 bp amplifiziert werden. Aufgrund der in das SR-Gen eingebrachten Kanamycin-Kassette (1200 bp) wurden für die vier Transformanten PCR-Amplifikate von ca. 2400 bp erhalten.

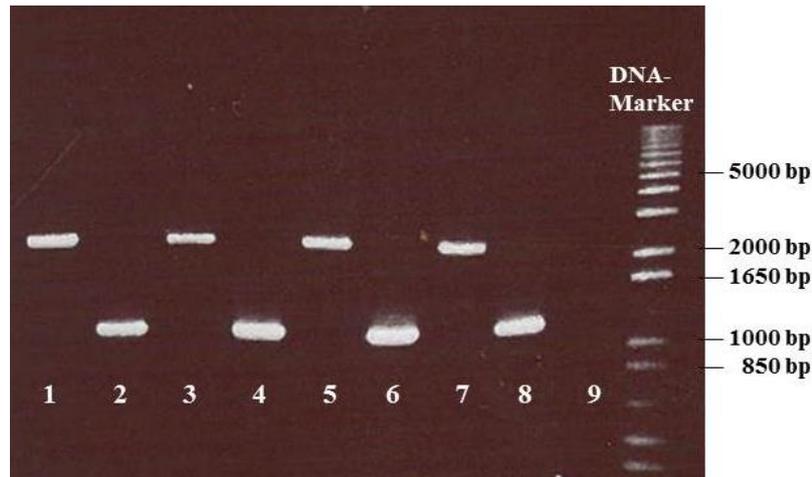


Abbildung 3-6: Bestätigung der Transformation durch Kolonie-PCR mit dem Primerpaar SR_for und SR_rev. **Spur 1:** Transformant 65; **Spur 2:** Wildtyp 65; **Spur 3:** Transformant 66; **Spur 4:** Wildtyp 66; **Spur 5:** Transformant 117; **Spur 6:** Wildtyp 117; **Spur 7:** Transformant 202; **Spur 8:** Wildtyp 202; **Spur 9:** Negativkontrolle; die Nummern 65, 66, 117, 202 kennzeichnen die Proben-Nummer, aus denen die *Acinetobacter*-Stämme isoliert wurden.

Durch das Experiment konnte somit gezeigt werden, dass die *A. baumannii*-Isolate aus Probe 65, 66, 117 und 202 natürlich kompetent sind.

3.2.5 Biofilm-Assay

Die sechs *A. baumannii*-Isolate und das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 wurden bezüglich ihrer Fähigkeit zur Biofilmbildung untersucht. Dazu wurden Biofilm-Assays nach Kapitel 2.2.15 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 dargestellt. Unter den gegebenen Bedingungen konnte nur eine sehr schwache Biofilmbildung bei allen *A. baumannii*-Isolaten beobachtet werden. Bei diesen zeigte sich der Biofilm weniger an der Grenze zwischen der Oberfläche des Nährmediums und der Luft, sondern vielmehr an der Grenze zwischen der Oberfläche des Mediums und der Wandung des Polystyren-Röhrchens. So sind in Abbildung 3-7 die an dem Polystyren-Röhrchen anhaftenden Bakterien als weißer Kranz sichtbar. Zudem konnte vor allem bei dem *A. baumannii*-Isolaten aus Probe 65, 66, 117 und 202 beobachtet werden, dass der Biofilm an der Polystyren-Wandung nach oben wächst. Dies ist als leichte Trübung oberhalb des weißen Kranzes bei den entsprechenden Isolaten in Abbildung 3-7 zu erkennen. Das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 zeigte hingegen keinen Ansatz zur Biofilmbildung. Allerdings war hier das Medium auch nicht ganz so trüb wie bei den *A. baumannii*-Isolaten, sodass bei diesem Isolat nach der Inkubation wahrscheinlich auch eine geringer Zelldichte vorlag.

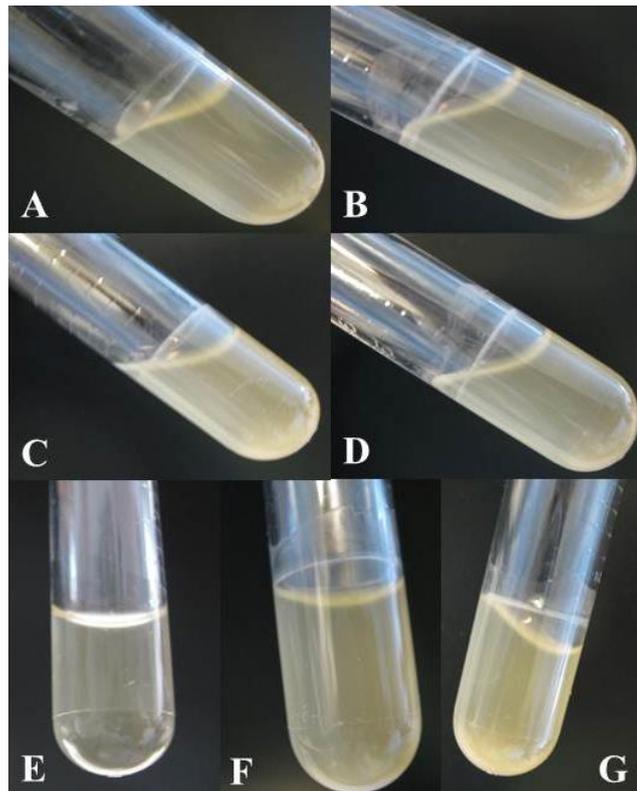


Abbildung 3-7: Biofilm-Assays der *A. baumannii*-Isolate und des *Acinetobacter*-Isolates aus Probe 4. **A:** Isolat Probe 62; **B:** Isolat Probe 117; **C:** Isolat Probe 124; **D:** Isolat Probe 202; **E:** Isolat Probe 4; **F:** Isolat Probe 66; **G:** Isolat Probe 65.

3.2.6 *Galleria mellonella*-Infektionsmodell

Alle 21 gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate wurden hinsichtlich ihrer Virulenz im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell untersucht (Kapitel 2.2.16). Die Raupen wurden dazu jeweils mit $1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ KbE der *A. baumannii*-Isolate bzw. im Falle von nicht *A. baumannii*-Isolaten, bei denen eine schwächere Virulenz vermutet wurde, mit $1 \times 10^6 - 4 \times 10^6$ KbE infiziert und für fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Bei jedem Versuch wurden zudem zwei Kontrollen (Injektion von PBS und unbehandelt) mitgeführt. Zum Vergleich wurden einige *Galleria mellonella*-Raupen in derselben Weise mit $2 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ KbE des *A. baumannii* Stammes ATCC 17978 infiziert, da dessen Virulenz im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell bereits bekannt war.^[64,138] Die Ergebnisse der Versuche sind für ausgewählte Isolate und den *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 mit den beiden Kontrollen in Abbildung 3-10 Abbildung 3-9 dargestellt. Während bei einigen Isolaten die zur statistischen Absicherung benötigten drei unabhängigen Infektionsversuche durchgeführt wurden, konnte bei anderen Isolaten nur ein einziger Ansatz erhalten werden. Dies ist in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet. In Übereinstimmung mit Peleg *et al.*^[138] und Skiebe *et al.*^[64] wurden über 75 % der *Galleria mellonella*-Raupen bei der verwendeten Infektionsdosis durch *A. baumannii* ATCC 17978

innerhalb von 48 h getötet. Im Vergleich dazu zeigten die sechs *A. baumannii*-Isolate (aus Probe 62, 65, 66, 124, 117 und 202) eine ähnlich starke Reaktion. In Abbildung 3-8 sind die Überlebensraten der Raupen nach Infektion mit zwei der sechs *A. baumannii*-Isolate im Vergleich zur Infektion mit dem *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 graphisch dargestellt. Hier wurden exemplarisch die Isolate aus Probe 62 und 65 als Repräsentanten der anderen *A. baumannii*-Isolate aufgetragen, da durch die Untersuchungen in Kapitel 3.2.7 und 3.2.8 festgestellt wurde, dass die Isolate aus Probe 62 und 124 sowie die Isolate aus Probe 65, 66 und 202 nah miteinander verwandt sind. So zeigten diese auch ein ähnliches Verhalten im Infektionsmodell.

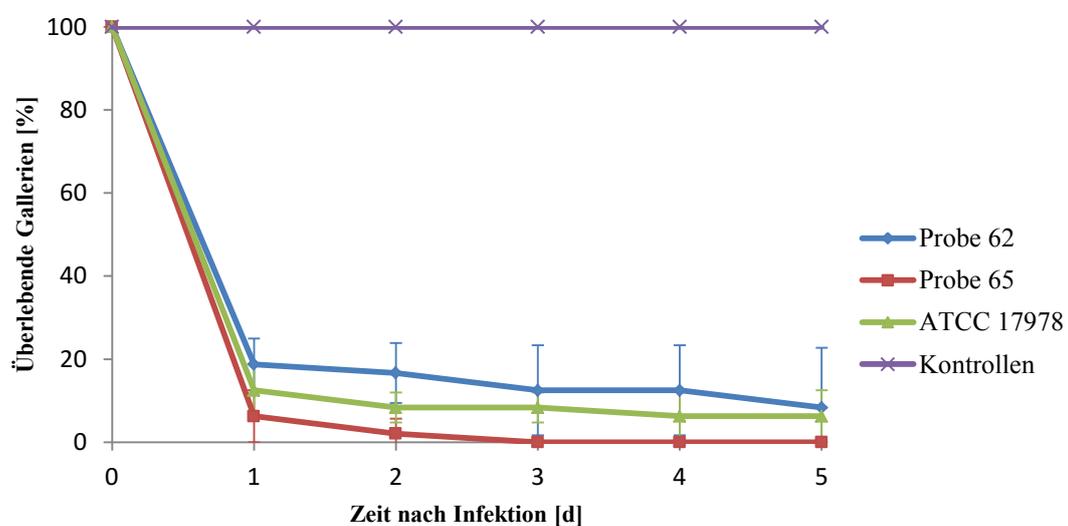


Abbildung 3-8: Überlebensraten der *Galleria mellonella*-Raupen nach der Infektion mit *A. baumannii*. Die Gallerien wurden mit 1×10^5 – 3×10^5 KbE der jeweiligen Bakterien infiziert. Von jedem Versuch wurde ein 3-fach Ansatz erhalten. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit ihrer entsprechenden Standardabweichung.

Die übrigen *Acinetobacter*-Isolate zeigten entweder nur einer sehr schwache Virulenz im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell (Isolate aus Probe 4, 11, 27, 106, 107, 124, 139, 156 und 159) oder konnten bezüglich ihrer Virulenz zwischen den schwachen und den *A. baumannii*-Isolaten eingeordnet werden (Isolate aus Probe 21, 32, 43, 187, 188 und 211). In Abbildung 3-9 sind die Überlebensraten der Raupen nach der Infektion mit einem schwach virulenten Isolat (aus Probe 4) und einem etwas stärker virulenten Isolat (aus Probe 21) im Vergleich zur Infektion mit *A. baumannii* ATCC 17978 graphisch dargestellt. Die Virulenzabstufungen lassen sich hier gut erkennen. So starben durch das Isolat aus Probe 4 weniger als 15 % der Raupen in dem fünftägigen Beobachtungszeitraum, während hingegen durch das Isolat aus Probe 21 innerhalb der fünf Tage fast 90 % umkamen. Der Referenzstamm *A. baumannii* ATCC 17978 ist im Vergleich zu diesen Isolaten wesentlich

virulenter, zumal er in einer geringeren Dosis in die Raupen injiziert wurde und trotzdem mehr Gallerien in dem Zeitraum abtötete.

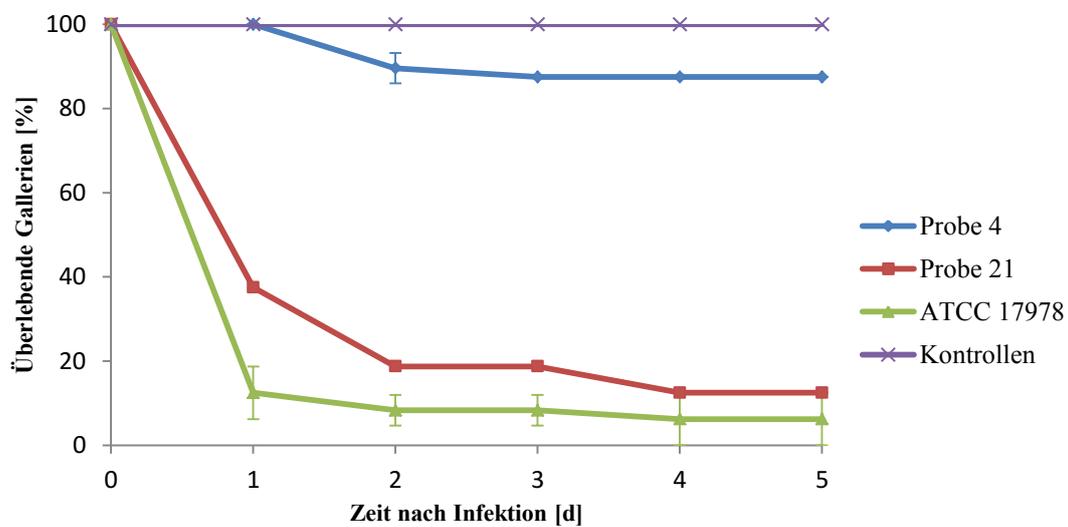


Abbildung 3-9: Überlebensraten der *Galleria mellonella*-Raupen nach der Infektion mit *Acinetobacter* spp. Die Gallerien wurden mit 1×10^6 – 4×10^6 KbE der jeweiligen Bakterien aus Probe 4 und 21 infiziert. Die Infektion mit ATCC 17978 erfolgte mit 2×10^5 – 3×10^5 KbE. Mit Ausnahme des Isolates aus Probe 21 wurde von jedem Versuch ein 3-fach Ansatz erhalten. Aufgetragen sind die Mittelwerte mit ihrer entsprechenden Standardabweichung bzw. bei Probe 21 entsprechend die Werte aus dem Einfach-Ansatz.

In Abbildung 3-10 sind die *Galleria mellonella*-Raupen 24 h nach der Infektion mit den entsprechenden Isolaten sowie die mitgeführten Kontrollen abgebildet. Hier lässt sich vor allem bei den Raupen, die mit den stärker virulenten *A. baumannii*-Stämmen infiziert wurden, eine deutliche schwarz-braune Färbung der Kutikula erkennen. Diese Färbung nahm im weiteren Verlauf der Infektion kontinuierlich zu. Auch bei den weniger virulenten *Acinetobacter*-Stämmen konnte im Gegensatz zu den beiden Kontrollen diese Färbung beobachtet werden, allerdings in deutlich geringerem Ausmaß. Die schwarz-braune Erscheinung der Kutikula nach der Infektion lässt sich auf die Freisetzung von Melanin in den Raupen zurückführen. Dieser Melanisierungs-Prozess ist eine Stressantwort der Raupen auf die Infektion und dient zur Abwehr von eingedrungenen Erregern.^[139]



Abbildung 3-10: *Galleria mellonella*-Raupen 24 h nach der Infektion.

A: PBS-Kontrolle; **B:** unbehandelte Kontrolle; **C:** Isolat aus Probe 4 injiziert; **D:** Isolat aus Probe 62 injiziert; **E:** Isolat aus Probe 65 injiziert; **F:** ATCC 17978 injiziert.

3.2.7 Epidemiologische Typisierung mit dem DiversiLab™-System

In einer Studie von Higgins *et al.* konnten acht weltweite klonale Linien (WW 1 – WW 8) von *A. baumannii* identifiziert werden, die im Folgenden als internationale klonale Linien (IC 1 – IC 8) bezeichnet werden.^[145] Diese sich ausbreitenden klonalen Linien konnten bereits in zahlreichen Ländern der Welt gefunden werden.^[145] Zu den IC 1 – IC 3 werden auch die europäischen Klone I – III gezählt.^[145] Vor allem die Vertreter dieser Linien sind mit dem Menschen assoziiert und verantwortlich für die Mehrheit von *A. baumannii*-Ausbrüchen in Krankenhäusern vieler Länder.^[146–148]

Um zu überprüfen, ob die sechs *A. baumannii*-Isolate (aus Probe 62, 65, 66, 117, 124 und 202), die aus Geflügelproben gewonnen wurden, mit den internationalen klonalen Linien bzw. untereinander in Beziehung stehen, wurden die Isolate durch Dr. Higgins (*Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Universität Köln*) zunächst mit dem DiversiLab™-System untersucht.^[145] Anschließend wurden die Ergebnisse mit einer Datenbank von internationalen Klonen verglichen. Die Ergebnisse, die mit dem DiversiLab-System™ für die *A. baumannii*-Isolate erhalten wurden, sind in Abbildung 3-11 dargestellt. Für eines der Isolate (aus Probe 124) konnte allerdings kein Ergebnis erhalten werden. Von den anderen Isolaten sind die aus Probe 65, 66, 117 und 202 sehr eng miteinander verwandt

und stellen daher identische bzw. nahezu identische Stämme dar (Ähnlichkeit des rep-PCR Bandenmusters $\geq 95\%$), während sich das Isolat aus Probe 62 hingegen deutlich unterscheidet. Verglichen mit den internationalen Klonen konnte keine Verbindung zu den in dieser Arbeit isolierten *A. baumannii*-Stämmen festgestellt werden. Die höchste Übereinstimmung wurde zwischen den Stämmen aus Probe 65, 66, 117 und 202 und dem internationalen Klon 8 mit $\sim 92\%$ erzielt.

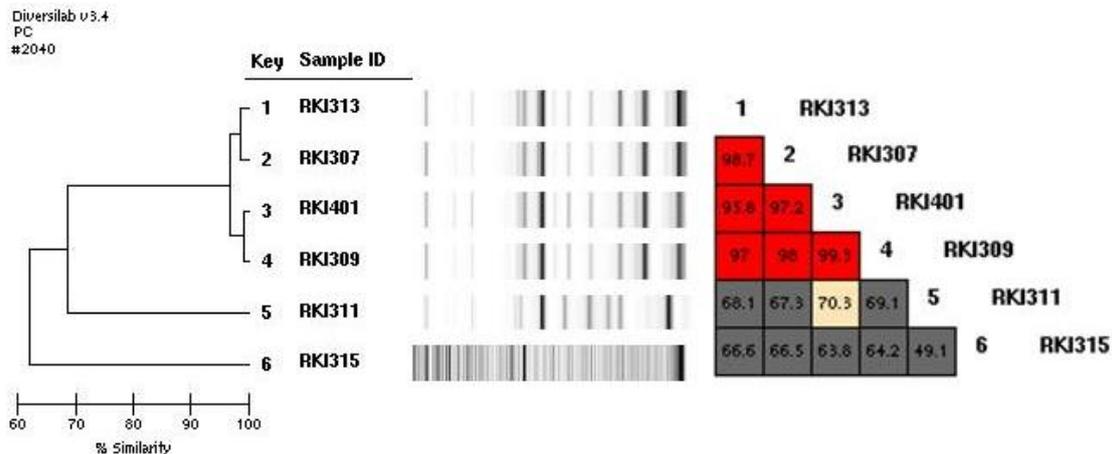


Abbildung 3-11: Ergebnisse des DiversiLabTM-Systems für die *A. baumannii*-Isolate (durchgeführt von Dr. Higgins).

1: *A. baumannii*-Isolat aus Probe 117; **2:** *A. baumannii*-Isolat aus Probe 66; **3:** *A. baumannii*-Isolat aus Probe 202; **4:** *A. baumannii*-Isolat aus Probe 65; **5:** *A. baumannii*-Isolat aus Probe 62; **6:** *A. baumannii*-Isolat aus Probe 124; für das Isolat aus Probe 124 konnte kein Ergebnis erhalten werden; in der Mitte ist das Bandenmuster der rep-PCR dargestellt; die Zahlen in den Quadraten kennzeichnen die Ähnlichkeiten der rep-PCR-Bandenmuster zwischen den Isolaten in Prozent [%].

3.2.8 Epidemiologische Typisierung mittels Multiplex-PCR und PFGE

Zusätzlich zu der Untersuchung nach Kapitel 3.2.7 wurden die sechs *A. baumannii*-Isolate durch Dr. Pfeifer (*RKI, Wernigerode*) noch mittels Multiplex-PCR und Pulsed-field-Gelelektrophorese (PFGE) nach Turton *et al.* typisiert.^[149]

Durch die Multiplex-PCR konnten alle Isolate dem europäischen Klon II zugeordnet werden. Die Ergebnisse der PFGE für die *A. baumannii*-Isolate sind in Abbildung 3-12 dargestellt. Auch hier konnte die Einordnung zur klonalen Linie II festgestellt werden. So zeigte sich, dass die PFGE-Profile aller Isolate Ähnlichkeiten zu den PFGE-Profilen von Vertretern des europäischen Klons II aufwiesen. Z.B. sind in allen Profilen die Banden bei ca. 80 kb und 105 kb ersichtlich. Zudem lässt sich erkennen, dass jeweils die Isolate aus Probe 65, 66, 117 und 202 sowie die Isolate aus Probe 62 und 124 ein identisches PFGE-Profil aufweisen. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis aus Kapitel 3.2.7 handelt es sich daher bei den Isolaten

aus Probe 65, 66, 117 und 202 um den gleichen *A. baumannii*-Stamm. Aber auch die Isolate aus Probe 62 und 124 sind dem gleichen Stamm zuzuordnen, der sich allerdings von den Isolaten aus Probe 65, 66, 117 und 202 unterscheidet.

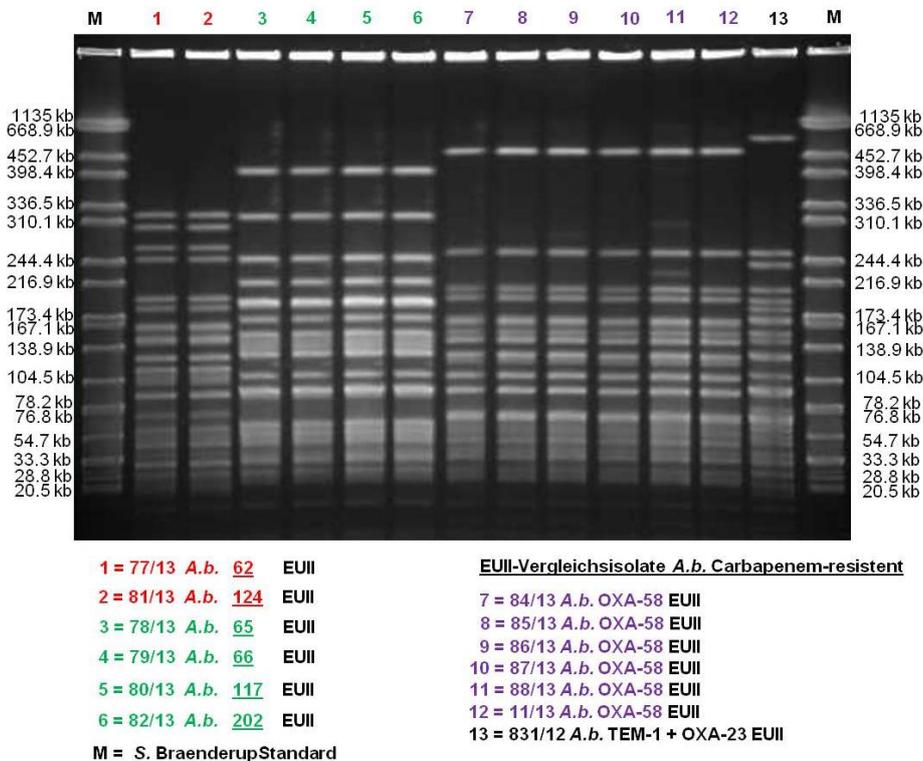


Abbildung 3-12: Ergebnisse der PFGE für die *A. baumannii*-Isolate (durchgeführt von Dr. Pfeifer). *A.b.*, *Acinetobacter baumannii*; EUII, europäischer Klon II.

3.2.9 Antibiotika-Resistenzen

Als besorgniserregend werden vor allem die oftmals auftretenden Resistenzen von *Acinetobacter* spp. gegenüber gängigen Antibiotika, wie z.B. den meisten β -Lactam-Antibiotika und den Aminoglykosiden, angesehen.^[27] Vor allem *A. baumannii* weist in zunehmendem Maße Antibiotika-Resistenzen auf.^[1] Daher wurden die sechs *A. baumannii*-Isolate von Dr. Pfeifer (*RKI, Wernigerode*) mit verschiedenen Methoden auf Antibiotika-Resistenzen sowie auf die Anwesenheit von Antibiotika-Resistenz-vermittelnden Enzymen überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-1 und Tabelle 3-2 zusammengefasst. Bei keinem der Isolate konnten β -Lactamasen (inkl. Extended-Spectrum- β -Lactamasen) oder Carbapenemasen identifiziert werden. Resistenzen zeigten die Isolate gegenüber Ampicillin, Mezlocillin, Cefotiam, Cefotaxim und Chloramphenicol. Außerdem konnte bei allen Isolaten eine Cefoxitin- und Ertapenem-Resistenz beobachtet werden. Die Isolate aus Probe 62 und 124 wiesen zudem Gentamycin- und Kanamycin-Resistenzen auf und differenzierten sich

somit von den anderen *A. baumannii*-Isolaten hinsichtlich des Resistenzprofils. Zudem konnte eine geringe AmpC-Expression in den *A. baumannii*-Isolaten festgestellt werden.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der E-Tests und der Untersuchung auf Resistenz-vermittelnde Enzyme.

Nr. ¹	Carbapenemase ²	β -Lactamase ³	E-Test IMP ⁴	E-Test IP/IPI (MBL)	E-Test MPM ⁴	E-Test ETP ⁴	MAST ⁶ (ESBL/AmpC)
62	-	-	0,19	negativ (sensibel) ⁵	0,19	1,5	AmpC-positiv
65	-	-	0,19	negativ (sensibel) ⁵	0,125	1,5	n.g.
66	-	-	0,19	negativ (sensibel) ⁵	0,125	1,5	n.g.
117	-	-	0,19	negativ (sensibel) ⁵	0,125	1,5	n.g.
124	-	-	0,19	negativ (sensibel) ⁵	0,125	2	n.g.
202	-	-	0,19	negativ (sensibel) ⁵	0,125	1,5	AmpC-positiv

Grau = resistent; E-Test, Epsilon-Test; ETP, Ertapenem; ESBL, Extended-Spectrum- β -Lactamase; IMP, Imipenem; MPM, Meropenem; n.g., nicht getestet.

¹Nr. kennzeichnet die Proben-Nummer, aus der das *A. baumannii*-Isolat erhalten wurde (siehe Tabelle 7-1).

²Getestet: OXA-23-24-58-143-51+ISAbal; VIM, OXA-48, KPC, NDM, cMY, DHA, MOX, EBC mittels PCR.

³Getestet: TEM, SHV, CTX-M mittels PCR.

⁴Angegeben sind die minimalen Hemmkonzentrationen in mg/L.

⁵Keine Hemmhofdeformation, wie bei Metallo- β -Lactamase (MBL), sonst sichtbar.

⁶Testsystem von der Firma *MAST Diagnostika (Reinfeld, Deutschland)*.

Tabelle 3-2: Antibiogramme (Mikrobouillonverdünnungstest).

Nr. ¹	AMP ²	MEZ ²	MSU ²	CTM ²	CTX ²	CAZ ²	FOX ²	SMZ ²	SXT ²
62	16	32	≤ 2	> 8	8	4	> 32	≤ 32	≤ 4
65	16	32	≤ 2	> 8	8	4	> 32	≤ 32	≤ 4
66	> 16	16	≤ 2	> 8	8	4	> 32	≤ 32	≤ 4
117	16	32	≤ 2	> 8	8	4	> 32	≤ 32	≤ 4
124	16	16	≤ 2	> 8	8	4	> 32	≤ 32	≤ 4
202	> 16	> 32	≤ 2	> 8	8	4	> 32	≤ 32	≤ 4
Nr. ¹	GEN ²	KAN ²	AMK ²	STR ²	NAL ²	CMP ²	OTE ²	CIP ²	
62	8	> 32	≤ 2	16	8	> 32	4	1	
65	$\leq 0,5$	≤ 2	≤ 2	16	≤ 4	> 32	4	0,5	
66	1	≤ 2	≤ 2	8	≤ 4	> 32	4	0,25	
117	$\leq 0,5$	≤ 2	≤ 2	16	≤ 4	> 32	4	0,25	
124	> 8	> 32	4	16	8	> 32	4	0,5	
202	$\leq 0,5$	≤ 2	4	8	8	> 32	4	0,5	

Grau = resistent; AMP, Ampicillin; MEZ, Mezlocillin; MSU, Mezlocillin/Sulbactam (0,8 μ g/ml); CTM, Cefotiam; CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim; FOX, Cefoxitin; SMZ, Sulfameracin; SXT, Sulfameracin-Trimethoprim; GEN, Gentamycin; KAN, Kanamycin; AMK, Amikacin; STR, Streptomycin; NAL, Nalidixinsäure; CMP, Chloramphenicol; OTE, Oxytetracyclin; CIP, Ciprofloxacin.

¹Nr. kennzeichnet die Proben-Nummer, aus der das *A. baumannii*-Isolat erhalten wurde (siehe Tabelle 7-1).

²Angegeben sind die minimalen Hemmkonzentrationen in mg/L.

3.3 Weitere Vorarbeiten zur Beschreibung einer potenziell neuen Spezies

3.3.1 Sequenzierungen

Da das *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 (Tabelle 7-1) nur eine geringe 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit zu allen anderen bereits bekannten *Acinetobacter* spp. aufwies, konnte es keiner Spezies eindeutig zugeordnet werden. Um das zuvor erhaltene Sequenzierungsergebnis (Tabelle 7-1) zu bestätigen und um zusätzliche Informationen über die Nukleotidabfolge des Gens zu erhalten, wurde das 16S rRNA-Gen des Isolates resequenziert. Zudem wurden Sequenzierungen weiterer Bereiche des Genoms mithilfe von verschiedenen Primern durchgeführt. Diese erfolgten nach Kapitel 2.2.11 im Anschluss an die mit den jeweiligen Primern durchgeführten PCRs (Kapitel 2.2.8) und Aufreinigung der Amplifikate (Kapitel 2.2.10). Die für die (Re-)Sequenzierung verwendeten Primer sowie die Sequenzierungsergebnisse sind in Tabelle 3-3 aufgelistet.

Tabelle 3-3: Übersicht über die Sequenzierungsergebnisse.

Verwendete Primer ¹	Sequenzgröße ²	1. Treffer ³	Max. Ident.	2. Treffer ³	Max. Ident.
16S-fD2 16S-rP1	1384 bp	<i>A. lwoffii</i> Stamm 412	98 %	<i>Bacillus weihenstephanensis</i> Stamm CtST10.5	98 %
Ab-23S rRNA-for Ab-23S rRNA-rev	1042 bp	<i>A. oleivorans</i> DR1	97 %	<i>A. calcoaceticus</i>	97 %
Ac-rpoB-for Ac-rpoB-rev	192 bp	<i>A. lwoffii</i> Stamm CIP 64.10	98 %	<i>A. schindleri</i> Stamm CIP 107287	98 %
RpoB_Ac696F RpoB_Ac1598R	905 bp	<i>A. schindleri</i> Stamm CIP 107287	87 %	<i>A. johnsonii</i> Stamm CIP 64.6	87 %
recA-rA1F recA-rA2R	399 bp	<i>A. johnsonii</i> Stamm T3CP1	87 %	<i>A. johnsonii</i> Stamm XBB1	87 %

bp, Basenpaare; Max. Ident., Maximale Identität.

¹Die genauen Informationen über die verwendeten Primer liefert Tabelle 2-3.

²Angegeben ist die Größe der Gesamtsequenz nach Assemblierung der durch die Vorwärts- und Rückwärts-Primer erhaltenen Sequenzen und Entfernung mehrdeutiger Nukleotide. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz wurde zudem noch mit der zuvor erhaltenen 16S rRNA-Gen-Sequenz des Isolates assembliert.

³Als Treffer sind nur Bakterien-Spezies angegeben, die eine gültige Speziesbezeichnung besitzen.

In Tabelle 3-3 fällt auf, dass alle untersuchten Gen-Sequenzen die höchste Ähnlichkeit zu Vertretern der Gattung *Acinetobacter* aufwiesen. Allerdings konnte durch die Sequenzierungen kein einheitliches Ergebnis bezüglich der Spezies erhalten werden. Auch

zeigte keine Sequenz eine höhere Sequenzähnlichkeit als 98 % zu den bekannten Spezies mit gültiger Speziesbezeichnung. Diese Ergebnisse unterstützen also die Annahme, dass es sich bei diesem Isolat um eine mögliche neue Spezies der Gattung *Acinetobacter* handeln könnte. Aufgrund dessen wurde das Isolat bei der DSMZ (*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig*) zur Analyse der 16S rRNA-Sequenz eingereicht. Dazu wurde zunächst die vollständige 16S rRNA-Gensequenz des Isolates von der DSMZ bestimmt. Die hierbei erhaltene Nukleotidabfolge des 16S rRNA-Gens ist in Abbildung 7-4 dargestellt. In den folgenden Tabellen und Abbildungen wurde das Isolat als *Acinetobacter* sp. nov. Stamm 114 bezeichnet, um es von anderen Spezies der Gattung *Acinetobacter* besser abgrenzen zu können. Die 16S rRNA-Gen-Sequenz des Isolates (Abbildung 7-4) wurde von der DSMZ außerdem mit den 16S rRNA-Gen-Sequenzen anderer Gamma-Proteobakterien aligniert und verglichen. Die dabei ermittelten prozentualen Sequenzähnlichkeiten des *Acinetobacter* sp. nov. Stammes zu anderen verwandten Spezies sind in Tabelle 7-5 dargestellt. Auch hier wurde wie in Tabelle 3-3 die höchste 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit mit nur 98,3 % zu der Spezies *A. lwoffii* erhalten. Zu anderen *Acinetobacter* spp. war die Sequenzähnlichkeit entsprechend ≤ 98 %. Die nächsten verwandten Spezies stellen demnach *A. lwoffii* (98,3 %), *A. haemolyticus* (98 %), *A. johnsonii* (97,9 %) und *A. brisonii* (97,9 %) dar. Auf Grundlage der Daten wurde von der DSMZ zusätzlich noch ein phylogenetischer Baum mit der „Neighbor-joining“-Methode^[150] erstellt. Der phylogenetische Baum ist in Abbildung 3-13 ersichtlich. Auch hier wird die distinkte Stellung des Isolates zu den nahe verwandten Spezies der Gattung *Acinetobacter* deutlich. So bildete das Isolat einen eigenen Unterzweig in dem phylogenetischen Baum und konnte nicht zu anderen Spezies zugeordnet werden.

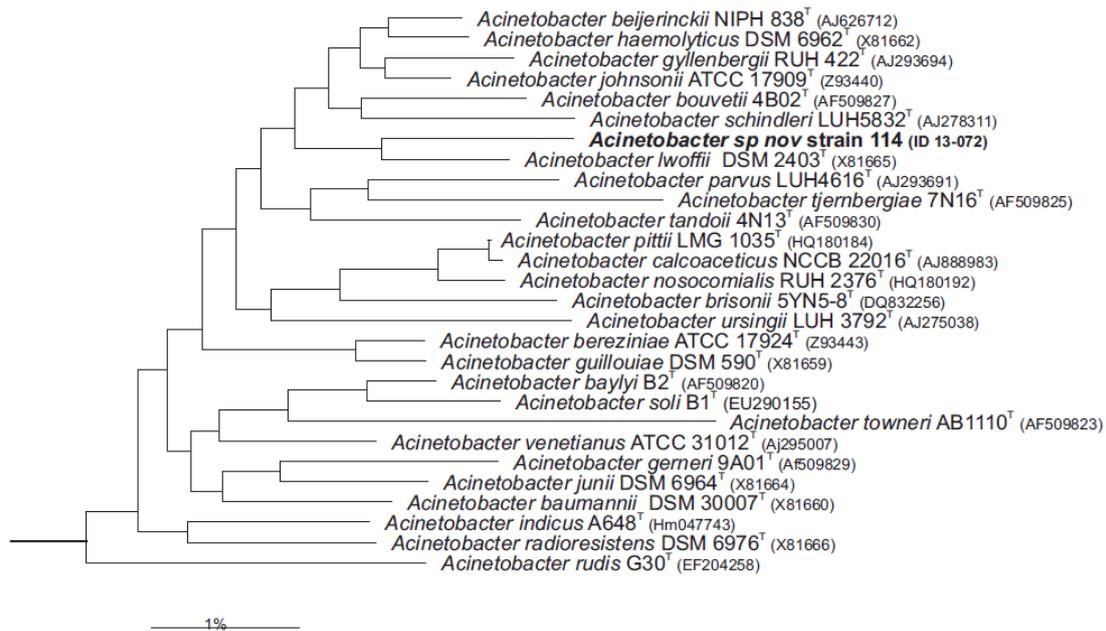


Abbildung 3-13: Phylogenetischer Baum basierend auf den 16S rRNA-Gen-Sequenzen (erhalten durch die DSMZ).

Der phylogenetische Baum zeigt die phylogenetische Verwandtschaft bezüglich des 16S rRNA-Gens zwischen *Acinetobacter* sp. nov. Stamm 114 (= *Acinetobacter*-Stamm, der aus Probe 4 isoliert wurde) und den nah verwandten Spezies der Gattung *Acinetobacter*. Der phylogenetische Baum wurde nach dem „Neighbor-joining“-Verfahren^[150] erstellt. Der Stamm des Baumes wurde durch den Miteinbezug der 16S rRNA-Sequenz von *Psychrobacter immobilis* als Fremdgruppe bestimmt. Der Balken gibt 1 % Sequenzdivergenz an.

3.3.2 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung wurde für das Isolat aus Probe 4 durchgeführt, um zu bestätigen, dass es sich wie bei den übrigen Vertretern der Gattung *Acinetobacter* um ein gram-negatives Bakterium handelt.^[4] Zudem konnten die Bakterien durch die Gram-Färbung unter dem Mikroskop betrachtet werden.

Wie bereits erwartet, färbten sich die Bakterien rot, sodass sie als gram-negativ identifiziert werden konnten. Auch unter dem Mikroskop konnte die rote Färbung gut beobachtet werden. Hier zeigte sich zudem eine für *Acinetobacter* typische kokkoide Stäbchenform der Bakterien.^[4]

3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Isolat zudem von Dr. Laue (*RKI, Berlin*) mittels Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Die Bilder der Untersuchungen sind in Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15 zu sehen. Auch hier lässt sich eine kokkoide Stäbchenform der Bakterien in beiden Abbildungen erkennen. Zudem können in den beiden oberen Bildern von Abbildung 3-14 Pili-ähnliche Anhängsel an der Zellwand der Bakterien

beobachtet werden. Bei Vertretern der Gattung *Acinetobacter* wurde die Anwesenheit von Pili bereits beschrieben.^[55,151]

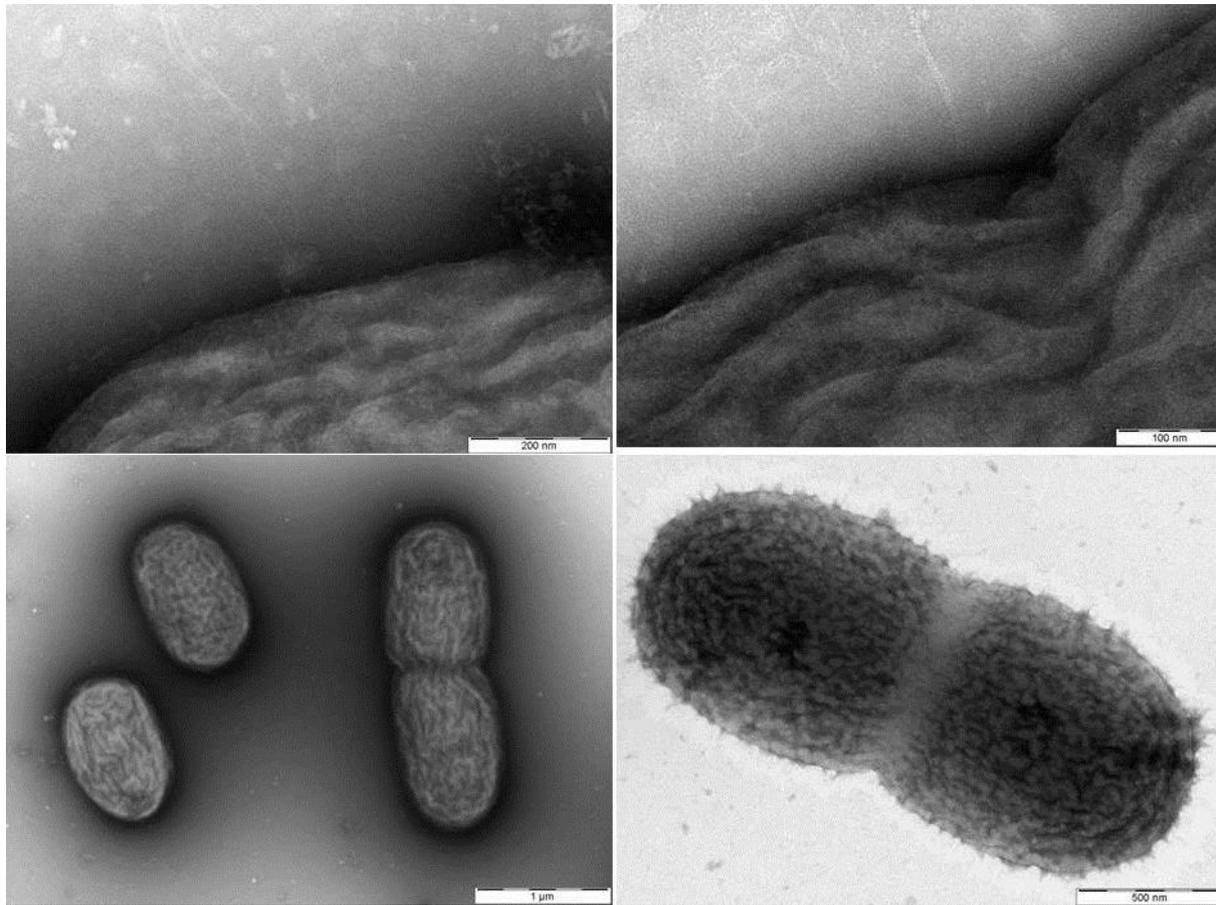


Abbildung 3-14: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von *Acinetobacter* sp. nov. Stamm 114 (erhalten durch Dr. Laue, *RKI*).

In den beiden oberen Bildern ist die Zellwand des Bakteriums mit fadenförmigen Anhängseln zu sehen. In den beiden unteren Bildern sind die Bakterien in der Gesamtansicht dargestellt. Die Bilder wurden in unterschiedlichen Größenverhältnissen aufgenommen.

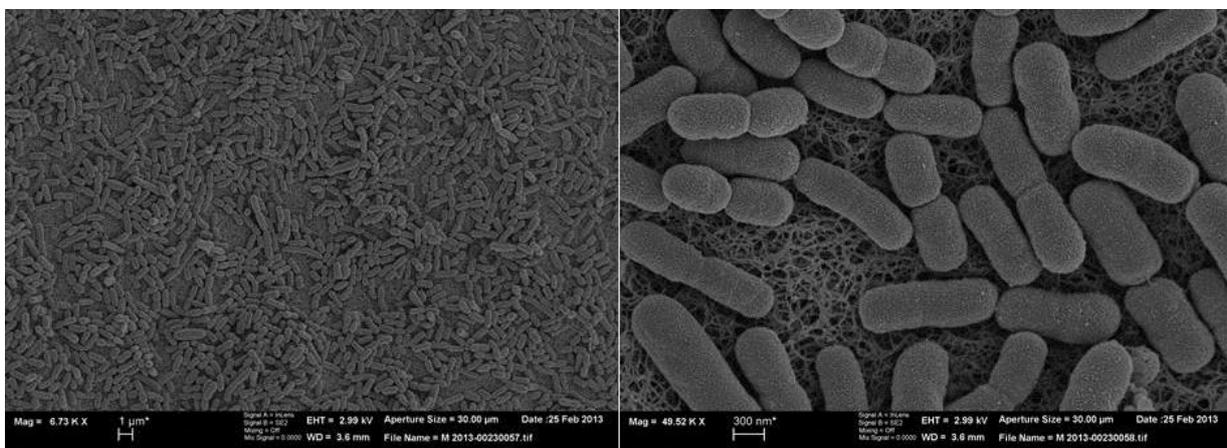


Abbildung 3-15: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von *Acinetobacter* sp. nov. Stamm 114 (erhalten durch Dr. Laue, *RKI*).

Die Bilder wurden in unterschiedlichen Größenverhältnissen aufgenommen.

3.4 PCR-Etablierung

3.4.1 Entwicklung der PCR

3.4.1.1 Bestimmung der Annealing-Temperatur

Wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, sollte ein PCR-Nachweis für das von Sahl *et al.*^[78] beschriebene *A. baumannii* spezifische Gen (ABAYE1332) mit dem AB_UNI-Primerpaar (Kapitel 2.1.4) entwickelt und evaluiert werden. Dazu wurde zunächst eine Gradienten-PCR nach Kapitel 2.2.8.3 mit dem *A. baumannii*-Isolat ATCC 17978 (Isolat Nr. 1, Tabelle 7-6) durchgeführt, um die optimale Annealing-Temperatur für die AB_UNI-Primer zu ermitteln. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1 %igen Agarosegel gelelektrophoretisch analysiert (Kapitel 2.2.9). Das Ergebnis der Gradienten-PCR ist in Abbildung 3-16 dargestellt.

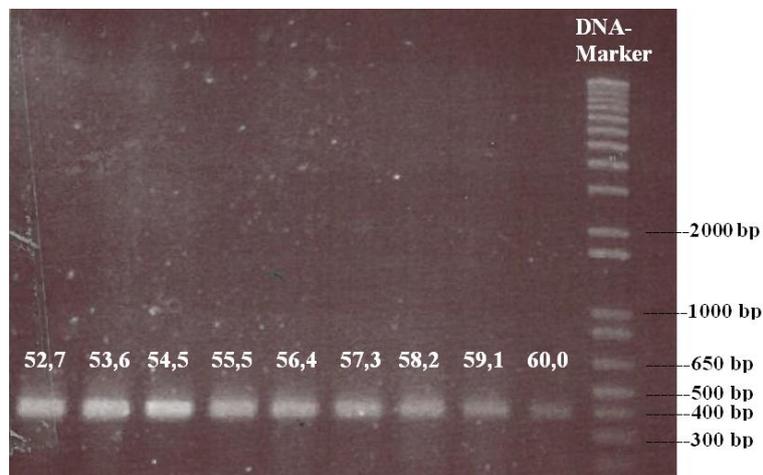


Abbildung 3-16: Gradienten-PCR für das *A. baumannii*-Isolat ATCC 17978 auf einem 1 %igem Agarosegel. Die Zahlen kennzeichnen die entsprechenden Annealing-Temperaturen in °C.

Bei einer zu hohen Annealing-Temperatur wird die Verbindung zwischen Primer und DNA-Zielsequenz aufgeschmolzen und die Primer binden infolgedessen nicht mehr an die komplementären DNA-Stränge. Das PCR-Produkt bleibt daher aus. Hingegen kann es bei einer zu niedrig gewählten Annealing-Temperatur zu unspezifischen, lockeren Bindungen der Primer kommen, wodurch neben dem entsprechenden Ziel-Produkt auch unerwünschte PCR-Produkte entstehen können. Wie in Abbildung 3-16 zu erkennen ist, wurde die optimale Primer-Anlagerung bei einer Annealing-Temperatur von 54,5 °C erreicht, da dies die höchste Temperatur darstellt, bei der eine intensive Bande des PCR-Produktes erhalten wurde. Mit ansteigender Temperatur wurde die Intensität der Bande zunehmend schwächer. Daher wurde für die weitere PCR-Entwicklung eine Annealing-Temperatur von 55 °C gewählt.

3.4.1.2 Vergleich verschiedener Polymerasen und Supplemente

Nach der Bestimmung der Annealing-Temperatur wurde die Verwendung verschiedener Polymerasen bzw. Polymerasen-Gemische und der Zusatz von unterschiedlichen Supplementen zu den PCR-Reaktionsansätzen nach Kapitel 2.2.8.4 getestet. Hierbei wurden alle PCR-Reaktionen mit den folgenden drei *A. baumannii*-Isolaten durchgeführt: ATCC 17978 (Isolat Nr. 1, Tabelle 7-6), Isolat Probe 65 (Isolat Nr. 89, Tabelle 7-6) und Isolat Probe 202 (Isolat Nr. 101, Tabelle 7-6). Nach erfolgter PCR wurden die verschiedenen Reaktionsansätze auf einem Agarosegel analysiert (Kapitel 2.2.9). Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen Abbildung 3-17 bis Abbildung 3-20 für die jeweiligen Polymerasen bzw. Polymerase-Gemische mit und ohne Zusatz der Supplemente dargestellt.

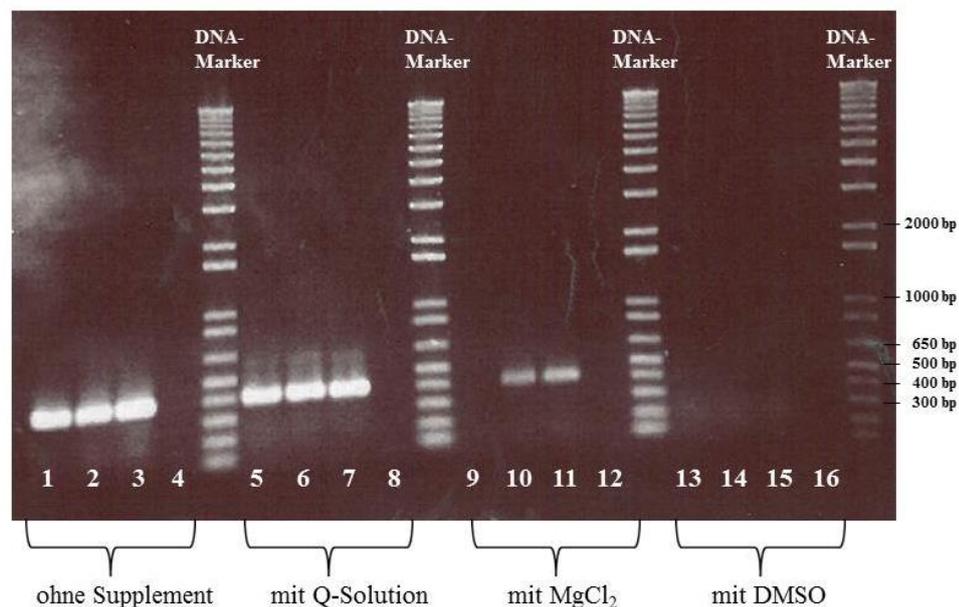


Abbildung 3-17: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung des HotStarTaq[®] Plus Master Mix Kits.

Spur 1, 5, 9 und 13: Isolat Probe 65; **Spur 2, 6, 10 und 14:** Isolat Probe 202; **Spur 3, 7, 11 und 15:** ATCC 17978; **Spur 4, 8, 12 und 16:** Negativkontrolle; DMSO, Dimethylsulfoxid; MgCl₂, Magnesiumchlorid.

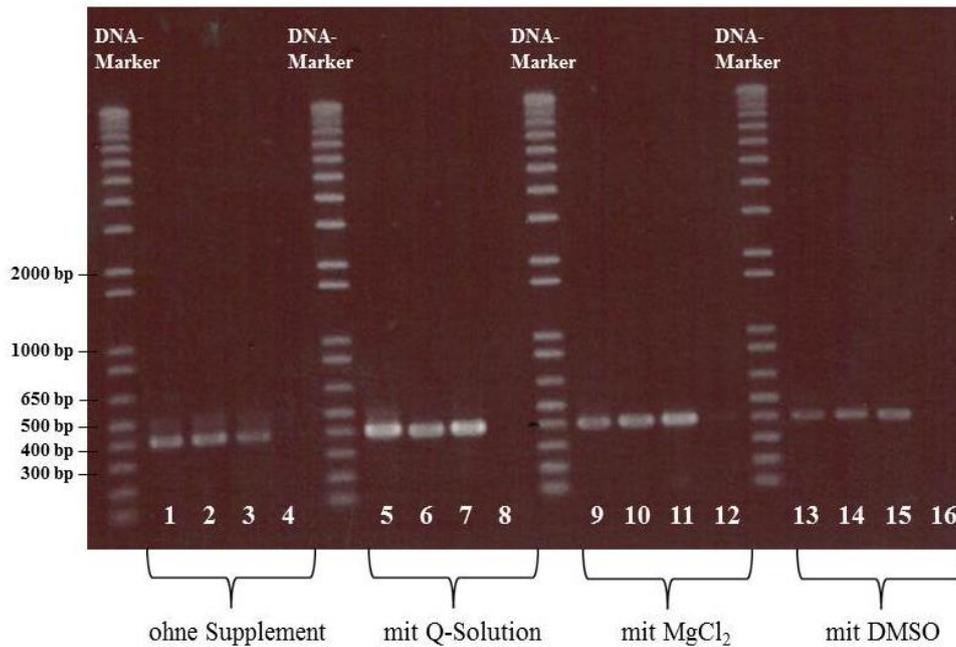


Abbildung 3-18: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung des High Fidelity PCR Enzyme Mix.

Spur 1, 5, 9 und 13: Isolat Probe 65; **Spur 2, 6, 10 und 14:** Isolat Probe 202; **Spur 3, 7, 11 und 15:** ATCC 17978; **Spur 4, 8, 12 und 16:** Negativkontrolle; DMSO, Dimethylsulfoxid; MgCl₂, Magnesiumchlorid.

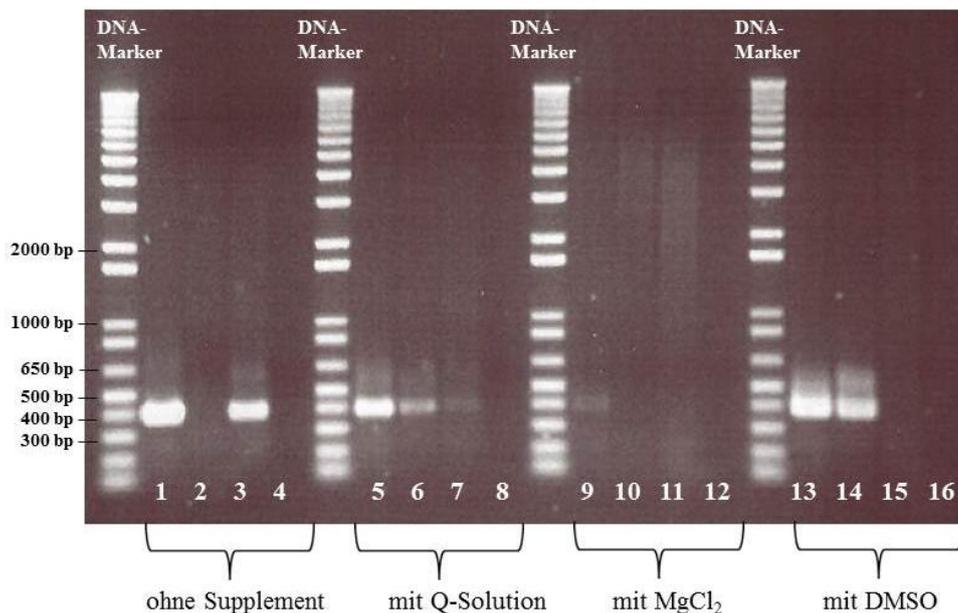


Abbildung 3-19: PCR-Ergebnisse auf 1 %igem Agarosegel nach Verwendung der AccuPrime™ *Pfx* DNA Polymerase.

Spur 1, 5, 9 und 13: Isolat Probe 65; **Spur 2, 6, 10 und 14:** Isolat Probe 202; **Spur 3, 7, 11 und 15:** ATCC 17978; **Spur 4, 8, 12 und 16:** Negativkontrolle; DMSO, Dimethylsulfoxid; MgCl₂, Magnesiumchlorid.

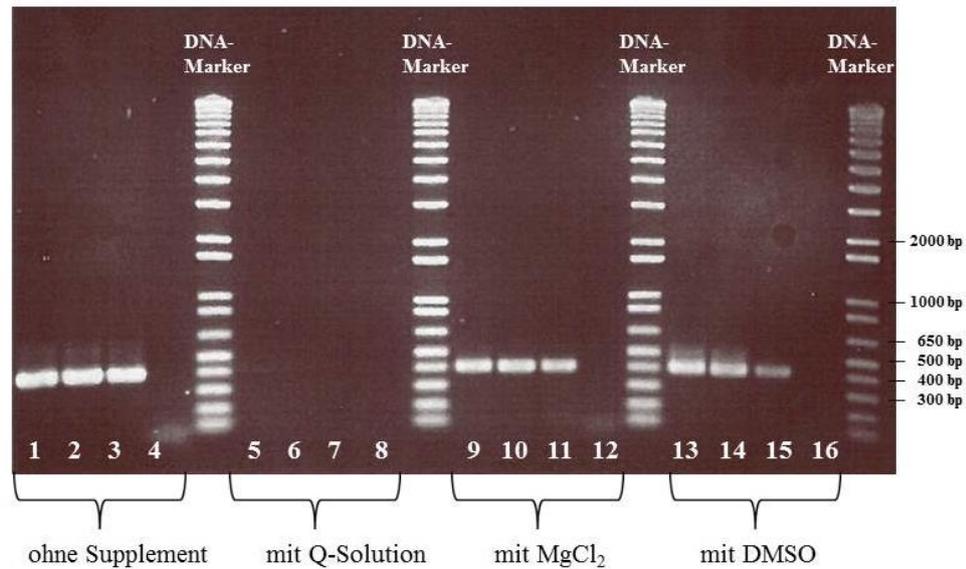


Abbildung 3-20: PCR-Ergebnisse auf 1%igem Agarosegel nach Verwendung des PCR SuperMix High Fidelity.

Spur 1, 5, 9 und 13: Isolat Probe 65; **Spur 2, 6, 10 und 14:** Isolat Probe 202; **Spur 3, 7, 11 und 15:** ATCC 17978; **Spur 4, 8, 12 und 16:** Negativkontrolle; DMSO, Dimethylsulfoxid; MgCl₂, Magnesiumchlorid.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die besten PCR-Ergebnisse mit dem HotStarTaq[®] Plus Master Mix Kit ohne Supplementzugabe, mit dem High-Fidelity PCR Enzyme Mix unter MgCl₂-Zugabe und mit dem PCR SuperMix High Fidelity ebenfalls unter Zugabe von MgCl₂ erzielt wurden. Die PCR-Produkte aller Isolate erschienen hierbei im Agarosegel als intensive Bande bei der richtigen Amplifikatgröße von ca. 400 bp und ohne unerwünschte PCR-Nebenprodukte im Gegensatz zu den anderen Reaktionsansätzen.

Vergleicht man diese drei Ansätze untereinander, so wurde mit dem HotStarTaq[®] Plus Master Mix und dem PCR SuperMix High Fidelity die intensivsten DNA-Banden erhalten. Die beiden ausschlaggebenden Kriterien für die letztendliche Wahl des HotStarTaq[®] Plus Master Mix waren zum einen der wesentlich günstigere Preis von 565 € pro 1000 Reaktionen im Vergleich zum PCR SuperMix High Fidelity, der in etwa das 4-fache kostete (Kapitel 2.1.3) und zum anderen die Vereinfachung des Reaktionsansatzes durch das Weglassen von Supplementen.

3.4.1.3 Bestimmung der Elongationszeit

Anschließend wurde versucht, die Elongationszeit der bisher entwickelten AB_UNI-PCR zu optimieren. Dies erfolgte nach Kapitel 2.2.8.5 wieder mit den drei bereits zuvor verwendeten *A. baumannii*-Isolaten aus Tabelle 7-6. Da das PCR-Amplifikat nur eine Größe von etwa 400 bp aufweist, wurde die PCR für kürzere Elongationszeiten getestet als in den

Ausgangsbedingungen (Tabelle 2-8) angegeben. Zum direkten Vergleich wurden die PCR-Produkte, die bei der Ausgangs-Elongationszeit von 45 sec unter sonst gleichen Bedingungen erhalten wurden, auch auf das Agarosegel aufgetragen. Die Ergebnisse der einzelnen PCRs mit unterschiedlichen Elongationszeiten sind in Abbildung 3-21 dargestellt.

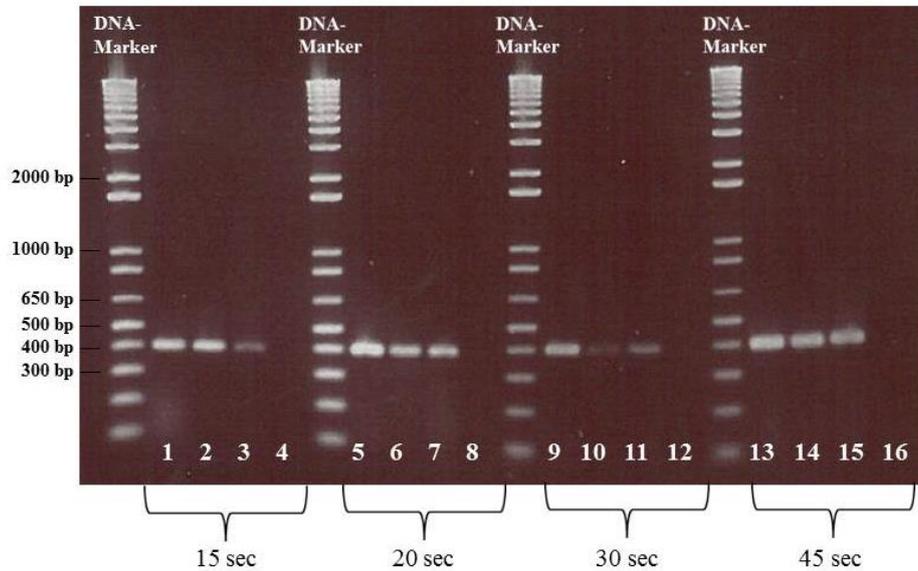


Abbildung 3-21: PCR-Ergebnisse zur Optimierung der Elongationszeit auf 1 %igem Agarosegel. **Spur 1, 5, 9 und 13:** Isolat Probe 65; **Spur 2, 6, 10 und 14:** Isolat Probe 202; **Spur 3, 7, 11 und 15:** ATCC 17978; **Spur 4, 8, 12 und 16:** Negativkontrolle; die Sekundenangaben (sec) kennzeichnen die verschiedenen Elongationszeiten.

In Abbildung 3-21 ist zu erkennen, dass bei der Anfangs-Elongationszeit von 45 sec genauso wie bei einer Elongationszeit von 20 sec ein sehr gutes Ergebnis erzielt wurde. Hingegen nahm die Intensität bei den anderen beiden Elongationszeiten (15 sec und 30 sec) für ein Isolat bzw. zwei Isolate etwas ab. Bei einer Elongationszeit von 20 sec hat man allerdings gegenüber der Elongationszeit von 45 sec den Vorteil, dass die Gesamtzeit der PCR verkürzt wird. Dieses Zeitersparnis ist gerade in klinischen Laboratorien von Vorteil, da dadurch ein schnellerer Nachweis von *A. baumannii* erfolgen kann. Daher wurde eine Elongationszeit von 20 sec für die PCR mit den AB_UNI-Primern verwendet.

3.4.1.4 Endergebnis

Das Temperaturprogramm und Pipettierschema für die fertig entwickelte AB_UNI-PCR sind in Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5 dargestellt. Abbildung 3-22 liefert zudem das Endergebnis der entwickelten PCR auf 1 %igem Agarosegel am Beispiel der drei *A. baumannii*-Isolate ATCC 17978, Isolat Probe 65 und Isolat Probe 202 (Tabelle 7-6).

Tabelle 3-4: Temperaturprogramm der entwickelten Nachweis-PCR.

	Temperatur	Zeit	
Anfangsdenaturierung	94 °C	5 min	
Denaturierung	94 °C	30 sec	} 30 Zyklen
Annealing	55 °C	30 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
finale Elongation	72 °C	7 min	
Abkühlung	4 °C	∞	

Tabelle 3-5: Pipettierschema für die entwickelte Nachweis-PCR.

	Menge [µL]
ddH ₂ O	ad 10
AB_UNI-for	1
AB_UNI-rev	1
HotStarTaq [®] Plus Master Mix	4,5
10x CoralLoad-Konzentrat	0,5
Template-DNA	1

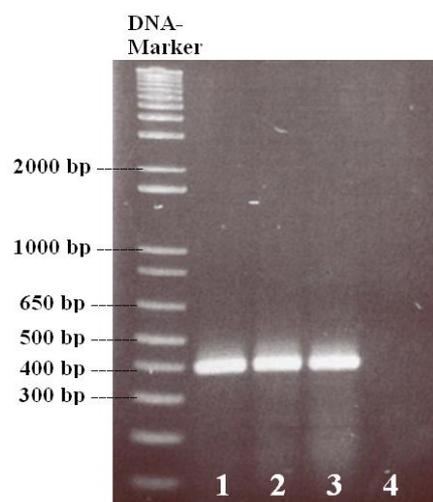


Abbildung 3-22: Ergebnis der entwickelten AB_UNI-PCR auf 1 %igem Agarosegel.
Spur 1: Isolat Probe 65; **Spur 2:** Isolat Probe 202; **Spur 3:** ATCC 17978; **Spur 4:** Negativkontrolle.

3.4.2 Evaluierung der entwickelten PCR

Zur Evaluierung der entwickelten PCR (Tabelle 3-4 und Tabelle 3-5) hinsichtlich Spezifität und Sensitivität wurden insgesamt 102 *Acinetobacter*-Isolate aus Tabelle 7-6 auf das *A. baumannii* spezifische Gen ABAYE1332 getestet. Von den 102 *Acinetobacter*-Isolaten handelte es sich bei 71 Isolaten um *A. baumannii* und bei 31 Isolaten um andere *Acinetobacter* spp.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse liefert Tabelle 7-6. Mit der entwickelten AB_UNI-PCR wurden von den 71 *A. baumannii*-Isolaten 68 Isolate auch als tatsächlich positiv erkannt. Damit wurde für die entwickelte AB_UNI-PCR eine Sensitivität von 95,8 % erreicht. Bei den drei nicht erkannten *A. baumannii*-Isolaten handelte es sich um die Isolat-Nr. 9, 40 und 77 aus Deutschland und Südkorea (Tabelle 7-6). Alle anderen *Acinetobacter*-Isolate, die keine *A. baumannii*-Isolate darstellten, wurden hingegen mit der entwickelten PCR auch als richtig negativ identifiziert (Spezifität von 100%).

Zum Vergleich und zur Absicherung wurden dieselben Isolate zusätzlich einer weiteren *A. baumannii*-spezifischen PCR mit den Primern für die *bla*_{OXA-51-like}-Gene unterzogen (Kapitel 2.2.8.2), die bisher die PCR-basierte Standardmethode zur Identifikation von *A. baumannii* darstellt. Hiermit wurden alle *A. baumannii*-Isolate auch als solche identifiziert und alle anderen *Acinetobacter* spp. wurden auch als *A. baumannii*-negativ erkannt (Spezifität und Sensitivität von 100%).

4 Diskussion

4.1 Identifizierung natürlicher Reservoirs von *A. baumannii*

Die natürlichen Reservoirs von *A. baumannii* konnten im Gegensatz zu anderen Vertretern der Gattung *Acinetobacter* bisher noch nicht eindeutig identifiziert werden.^[4,19] Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung von insgesamt 387 Tier- und Umweltproben (inkl. Zeckenproben) auf *Acinetobacter* konnten sechs *A. baumannii*-Isolate gewonnen und mittels PCR, Sequenzierung, API-Tests und Wachstumstest bei 44 °C eindeutig als solche identifiziert werden (Kapitel 3.1). Auffällig ist hier vor allem, dass die sechs *A. baumannii*-Isolate alle aus Geflügelproben (Huhn und Küken) erhalten wurden, während hingegen die anderen *Acinetobacter*-Isolate sowohl aus verschiedenen Tierproben (80 %) als auch aus Umweltproben (20 %) gewonnen wurden (Tabelle 7-1). Dies würde die Anfangsvermutung, dass *A. baumannii* ein potenzielles Reservoir in Vögeln besitzen könnte, unterstützen. Die Beobachtung von *A. baumannii* speziell in Geflügel ist zudem in Übereinstimmung mit einigen anderen Studien. So wurde *A. baumannii* in der Luft verschiedener Brutstätten, die unterschiedliche Geflügelarten beherbergten, von Chmielowiec-Korzeniowska *et al.* und Martin *et al.* gefunden.^[121,152] In einer der Brutstätten konnten frisch geschlüpfte Entenküken als Träger der Bakterien identifiziert werden, wodurch der Zusammenhang zwischen den Tieren der Brutstätte und der Luftkontamination verdeutlicht wird.^[153] Die verschiedenen Geflügelarten kommen daher als Reservoir von *A. baumannii* in Frage. Da in dieser Arbeit allerdings von den insgesamt 175 untersuchten Vogelproben nur aus sechs Proben *A. baumannii* isoliert werden konnte ($\cong 3,4\%$), ist eine repräsentative Aussage über das natürliche Reservoir von *A. baumannii* auf Grundlage der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht möglich. Die Funde sind hier möglicherweise als sporadisch zu betrachten. Zudem wurden mehrere der *A. baumannii*-Isolate aus Proben derselben Geflügelherde gewonnen. Dies ist wahrscheinlich auf die Übertragung von *A. baumannii* zwischen den Tieren innerhalb der Herde zurückzuführen. Die sporadische Erscheinung von *A. baumannii* in den Geflügelproben könnte möglicherweise auch durch einen gelegentlichen Kontakt der Tiere mit Wildvögeln bzw. mit deren Fäzes begründet sein. So konnte in der Studie von Ahmed *et al.* *A. baumannii* im Fäzes eines Wildvogels gefunden werden.^[41] Allerdings ist aufgrund der Schwierigkeit der Probenbeschaffung und der darauf begründeten geringen Datenlage nicht klar, in welchem Ausmaß wilde Vögel mit *A. baumannii* infiziert sind. In dieser Arbeit konnte beispielsweise auch nur eine Probe (Proben Nr. 35, Tabelle 7-1) von

einem Wildvogel erhalten werden, in der allerdings *A. baumannii* nicht gefunden werden konnte. Zudem gibt es keine Hinweise darauf, wie wahrscheinlich eine Übertragung zwischen den Wildvögeln und dem Geflügel ist.

Im Allgemeinen kann das Auftreten von *A. baumannii* in Geflügel eine Gefährdung für die Gesundheit des Menschen darstellen, da dieses zur Nahrungsgewinnung des Menschen in Form von Fleisch und Eiern herangezogen wird. Über die Nahrungsmittel könnte der Keim somit auf den Menschen übertragen werden und bei entsprechender Prädisposition zu schweren Infektionen führen. Außerdem ist auch eine Übertragung von *A. baumannii* auf den Menschen durch direkten Kontakt mit den Tieren denkbar. Über entsprechend kontaminierte Nahrungsmittel bzw. Menschen könnte *A. baumannii* dann auch in die Krankenhausumgebung eingetragen werden.

In den Zeckenproben wurde *A. baumannii* durch Untersuchung mittels PCR auf den *A. baumannii* spezifischen Marker *bla*_{OXA-51-like} nicht detektiert, obwohl die Vermutung nahe lag, dass neben den Kopf- und Kleiderläusen auch andere Parasiten, wie Zecken von *A. baumannii* befallen sind.^[44] Ein Grund für das erhaltene negative Ergebnis könnte allerdings eine zu verdünnte Probe gewesen sein, sodass die *A. baumannii*-DNA mittels PCR nicht erfasst werden konnte.

4.2 Bewertung der Selektivnährmedien zur Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben

Für die Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben wurden drei verschiedene Selektivnährmedien getestet: ChromAgar *Acinetobacter* (CA), Simmons-Citrat-Agar (SC-Agar) und Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM). Bei dem Vergleich der Selektivnährmedien SC-Agar und CA bezüglich der Erkennung von *Acinetobacter* spp. kann festgestellt werden, dass sich mit beiden Medien die meisten relevanten *Acinetobacter* spp. erfassen lassen. So wuchsen von den elf als *Acinetobacter* zugehörig identifizierten Isolaten, die aus den ersten 110 Proben gewonnen werden konnten, neun auf beiden Medien (Kapitel 3.1.4). Nur die beiden Isolate aus Proben-Nr. 11 und 107 (Tabelle 7-1) konnten auf CA nicht detektiert werden. In beiden Fällen ergab die Sequenzierung des 16S rRNA-Gens, dass es sich um die Spezies *A. lwoffii* handelte. Da allerdings andere *A. lwoffii*-Stämme auf CA erfasst werden konnten, scheint dies kein grundlegendes Problem bezüglich der Erkennung dieser Spezies zu sein. Eine Ursache könnte jedoch sein, dass die Probe zuerst auf SC-Agar

ausgestrichen wurde, sodass möglicherweise an dem Probenutpfer nicht mehr genügend Material für die CA-Platte vorhanden war. Im Allgemeinen kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Wachstum von einigen Vertretern der Gattung generell auf beiden Medien nicht möglich ist. Ein Beispiel hierfür könnte die Spezies *A. radioresistens* sein, die in den Proben nicht identifiziert wurde, obwohl ihre Anwesenheit in den Bodenproben möglich wäre.^[154] Zudem kann diese Spezies die einzige Kohlenstoffquelle des SC-Agars, Citrat, nicht verwerten.^[122] Bei dem Vergleich der beiden Nährmedien ist zudem aufgefallen, dass CA wesentlich selektiver ist als SC-Agar bezüglich der Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben, da bei CA das Wachstum der meisten anderen Bakterien unterdrückt wurde (Kapitel 3.1.4). Die höhere Selektivität von CA bei der Isolierung von *Acinetobacter* spp. im Vergleich zu anderen Selektivnährmedien wurde auch in einer Untersuchung von Ajao *et al.* erkannt, in der ähnlich wie in dieser Arbeit CA mit verschiedenen Selektivnährmedien verglichen wurde. Im Gegensatz zu dieser Arbeit wurde allerdings von Ajao *et al.* klinisches Probenmaterial untersucht und CA nicht mit SC-Agar, sondern mit MacConkey-Agar verglichen.^[123] Dennoch wurden ähnliche Ergebnisse bezüglich der Selektivität von CA erhalten. Sowohl auf SC-Agar als auch auf CA konnten Kolonien von *Acinetobacter* spp. optisch gut erfasst werden (Kapitel 3.1.4). Dies ist bei CA auf den chromogenen Mix zurückzuführen, durch den *Acinetobacter* spp. als auffällig rot bzw. blassrot gefärbte Kolonien erschienen. Diese lassen sich zudem gut von einigen anderen gram-negativen Bakterien abgrenzen, die auf dem Medium als blaue Kolonien wuchsen. Auf SC-Agar konnten zwar *Acinetobacter* spp. durch das Wachstum farbloser Kolonien mit einer mehr oder weniger starken Blaufärbung des Mediums gut erkannt werden, jedoch war die Differenzierung zu anderen Bakterien erschwert, da alle Bakterien eine nahezu identische Koloniemorphologie auf diesem Medium aufwiesen.

Aufgrund der hohen Selektivität und leichten Erfassung von *Acinetobacter* spp. auf CA kann eine schnelle Detektion und Isolation von *Acinetobacter* spp. mit CA gewährleistet werden. Dies ist v.a. in der klinischen Diagnostik von Vorteil, da dadurch die Effizienz der Maßnahmen für Infektionskontrollen gesteigert werden kann, indem die Zeit bis zum Erhalt sachgemäßer Therapien verkürzt wird. Allerdings konnte in dieser Arbeit auch gezeigt werden, dass auf CA neben *Acinetobacter* spp. eine begrenzte Zahl anderer Bakterien aus den Tier- und Umweltproben als *Acinetobacter* spp. verdächtige Kolonien wachsen können (Kapitel 3.1.4). Während Vertreter der Gattungen *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Chryseobacterium* und *Enterococcus* bereits in einigen Publikationen als rote Kolonien auf CA identifiziert wurden, konnten Bakterien der Gattung

Paenochrobactrum, *Myroides* und *Alcaligenes* hier erstmals als rot erscheinende Kolonien auf diesem Medium identifiziert werden.^[123,155–157] Allerdings konnten *Acinetobacter* spp. von den meisten dieser Bakterien durch den einfachen Oxidase-Test abgegrenzt werden (Kapitel 3.1.5). Nur Vertreter der Gattungen *Enterococcus* und *Stenotrophomonas* waren neben *Acinetobacter* spp. oxidase-negativ und damit nicht über diesen Test zu unterscheiden. Jedoch ließen sich *Enterococcus* spp. durch Bildung von gelb gefärbten Kolonien auf GCG-Agar von den *Acinetobacter* spp. differenzieren. Auf dem CA selbst konnten nur die Gattungen *Paenochrobactrum* und *Alcaligenes* durch eine Färbung des Mediums eindeutig abgegrenzt werden (Kapitel 3.1.5). Durch die Tatsache, dass nicht nur *Acinetobacter* spp. als rote Kolonien auf CA wuchsen, wird wiederum verdeutlicht, dass dieses Selektivnährmedium auch nicht 100 %ig selektiv ist bezüglich der Isolierung von *Acinetobacter* spp. Allerdings ist es dennoch wesentlich selektiver als SC-Agar, da das Wachstum anderer Bakterien nur gering und zudem auf wenige Bakteriengattungen beschränkt blieb.

Im Vergleich zwischen CA und LAM zeigte sich, dass auch in diesem Fall CA zur Isolation von *Acinetobacter* spp. besser geeignet ist (Kapitel 3.1.4). So konnten relevante *Acinetobacter* spp. (*A. baylyi* und *A. baumannii* Stamm *SDF*) nur unzureichend mit LAM erfasst werden, während hingegen einige andere Bakteriengattungen auf LAM Kolonien bildeten, die sich nur schwer von Kolonien der *Acinetobacter* spp. unterscheiden ließen (Abbildung 7-2). Da es sich bei den anderen Bakteriengattungen um dieselben Gattungen handelte, die sich auch auf CA als *Acinetobacter* spp. verdächtige Kolonien zeigten, bringt LAM diesbezüglich also keinen Vorteil bei der Isolierung von *Acinetobacter* spp. Darunter befand sich auch die Spezies *Pseudomonas aeruginosa*, die im Gegensatz zu der Publikation von Jawad *et al.*^[6] Wachstum auf LAM bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C zeigte. Möglicherweise ist dies auf die geringfügig andere Zusammensetzung des Nährmediums oder auf die Verwendung anderer *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme zurückzuführen. Da LAM im direkten Vergleich nicht so selektiv wie CA ist und zudem Einzelkolonien von *Acinetobacter* spp. durch Ausbleiben der Färbung nicht als solche erkannt werden konnten, ist LAM für die Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben nicht geeignet. So herrschen in Tier- und Umweltproben häufig geringe Konzentrationen von *Acinetobacter* spp. neben einer großen Anzahl anderer Bakterien vor, sodass *Acinetobacter* spp. mit LAM kaum erfasst werden können (Abbildung 7-3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CA für die Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben am besten geeignet ist. Dies liegt zum einen darin begründet, dass dieses Medium eine sehr hohe Selektivität besitzt, wodurch nur das Wachstum einer

begrenzten Zahl anderer Bakterien gewährleistet wird. Diese lassen sich zudem größtenteils mit einfachen Methoden von *Acinetobacter* spp. abgrenzen. Zum anderen können die Kolonien von *Acinetobacter* spp. auf CA optisch am besten erfasst werden. Allerdings bleibt die Frage offen, wie groß der Anteil an *Acinetobacter* spp. ist, der mit diesem Medium bei der Untersuchung der 211 Tier- und Umweltpollen nicht erfasst werden konnte, zumal ab Proben-Nr. 110 ausschließlich CA zur Isolierung verwendet wurde. Auch wäre interessant zu wissen, ob beispielsweise mit PCR-basierten Methoden die *Acinetobacter* spp. aus dem Probenmaterial besser erfasst werden können als mit kulturellen Methoden.

4.3 Charakterisierung der isolierten *Acinetobacter* spp.

Neben den sechs *A. baumannii* Isolaten konnten aus den 211 Tier- und Umweltpollen zusätzlich 15 weitere *Acinetobacter* spp. gewonnen werden, deren Zugehörigkeit zur Gattung *Acinetobacter* durch PCR und Sequenzierung des 16S rRNA-Gens bestätigt wurde (Tabelle 7-1). Diese konnten sowohl aus Tierproben (80 %) als auch aus Umweltpollen (20 %) isoliert werden, wodurch das ubiquitäre Vorkommen der *Acinetobacter* spp. im Gegensatz zu den *A. baumannii*-Stämmen verdeutlicht wird. Die gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate wurden in dieser Arbeit weiterhin charakterisiert.

Im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell konnten unter den 21 Isolaten sowohl hoch virulente als auch geringer virulente Stämme identifiziert werden (Kapitel 3.2.6). So zeigten vor allem die sechs *A. baumannii*-Isolate Virulenzeigenschaften, die vergleichbar mit klinischen Isolaten von *A. baumannii* wie etwa dem Stamm ATCC 17978 sind. Wie in den Publikationen von Skiebe *et al.* und Peleg *et al.* ersichtlich, zählt der *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell zu einem der virulentesten Vertreter der Gattung *Acinetobacter*.^[64,138] Daher wird vor allem durch die Tatsache, dass die aus den Geflügelproben isolierten *A. baumannii*-Stämme ein ähnliches Verhalten wie *A. baumannii* ATCC 17978 in diesem Modell zeigten, die potenzielle Gefährdung für den Menschen deutlich. Gelangen diese Keime über Geflügel in die Nahrungskette des Menschen, so können bei entsprechender Prädisposition schwere Infektionen hervorgerufen werden, die im schlimmsten Fall sogar lebensbedrohlich sein können. Die anderen im Infektionsmodell untersuchten *Acinetobacter*-Isolate zeigten gegenüber dem *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 geringere Virulenzeigenschaften. Die Ergebnisse verdeutlichen somit die Beobachtung, dass es sich bei *A. baumannii* um die Spezies mit der höchsten klinischen Relevanz in der Gattung *Acinetobacter* handelt.^[4] So ist es auch nicht verwunderlich, dass *A. baumannii* häufiger an

schweren nosokomialen Infektionen beteiligt ist als andere *Acinetobacter* spp. Des Weiteren wurden speziell von den *A. baumannii*-Isolaten und dem *Acinetobacter*-Isolat aus Probe 4 (Tabelle 7-1) die Fähigkeit zur Biofilmbildung überprüft (Kapitel 3.2.5). Diese konnte bei den sechs *A. baumannii*-Isolaten beobachtet werden, allerdings nur in einem geringen Ausmaß. Da die Biofilmbildung von den Umgebungsbedingungen wie Temperatur und Licht beeinflusst wird, ist es möglich, dass diese bei den Isolaten unter anderen Bedingungen verstärkt wird.^[74,97] Das Isolat aus Probe 4 zeigte hingegen keinen Ansatz zur Biofilmbildung, jedoch auch ein wesentlich schwächeres Wachstum im Medium. Möglicherweise könnte es bei diesem Isolat einige Zeit später zur Biofilmbildung kommen, wenn eine genügend hohe Zelldichte erreicht ist. Die allgemein stärkere Bildung von Biofilmen bei Vertretern des ACB-Komplexes, wie *A. baumannii*, im Vergleich zu anderen *Acinetobacter* spp. wurde bereits beschrieben.^[97] Die Biofilmbildung kann den Bakterien zum einen Schutz gegenüber der Immunabwehr des Wirtsorganismus, zum anderen aber auch als Penetrationsbarriere Resistenz gegenüber Antibiotika verleihen.^[65,95] Die Ergebnisse der Biofilm-Assays korrelieren mit den Ergebnissen des *Galleria mellonella*-Infektionsmodells. So zeigten die Biofilm-bildenden *A. baumannii*-Isolate auch die höchste Virulenz im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell, was eventuell z.T. auf die Fähigkeit zur Biofilmbildung zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte in keinem der *Acinetobacter*-Isolate eines der Verotoxin kodierenden Gene *vtx1* und *vtx2*, die die Virulenz eines Erregers stark erhöhen können, identifiziert werden (Kapitel 3.2.1).

Die epidemiologische Typisierung der sechs *A. baumannii*-Isolate erfolgte mit dem DiversiLabTM-System, der PFGE und der Multiplex-PCR (Kapitel 3.2.7 und 3.2.8.). Mit dem DiversiLabTM-System und der PFGE wurde festgestellt, dass die Isolate aus Probe 65, 66, 117 und 202 sehr eng miteinander verwandt sind und daher identische bzw. nahezu identische Stämme darstellen. Zudem grenzten sie sich von den anderen beiden Isolaten aus Probe 62 und 124 ab. Mit der PFGE konnte zusätzlich die nahe Verwandtschaft zwischen den Isolaten aus Probe 62 und 124 aufgedeckt werden. Da jeweils die Isolate aus Probe 65, 66 und 117 sowie die Isolate aus Probe 62 und 124 aus Proben derselben Geflügelherde stammten, wird die Vermutung bestätigt, dass die Keime zwischen den Tieren innerhalb der Herde übertragen wurden (Kapitel 4.1). Das Isolat aus Probe 202 wurde hingegen aus der Probe einer anderen Geflügelherde gewonnen. Die genetische Verwandtschaft zu den Isolaten aus den Proben 65, 66 und 117 könnte evtl. dadurch erklärt werden, dass die Tiere der verschiedenen Geflügelherden von demselben Züchter erhalten wurden und daher bereits miteinander in Kontakt standen. Durch die Multiplex-PCR und die PFGE wurden alle *A. baumannii*-Isolate

zudem als dem europäischen Klon II (= IC 2) zugehörig identifiziert. Diese klonale Linie stellt die am weitesten verbreitete und am häufigsten vorkommende klonale Linie dar, die mit nosokomialen Infektionen beim Menschen verbunden ist.^[145,158] Durch das Auftreten von Vertretern der klonalen Linie in Tieren stellt sich die Frage, ob die Erreger von dem Menschen auf die Tiere übergegangen sind oder ob die Tiere die Isolate vom Menschen erhalten haben. Allerdings konnte die Zuordnung der Isolate zur IC 2 mit dem DiversiLabTM-System nicht bestätigt werden. Hier konnte keine Verbindung zu den internationalen Klonen festgestellt werden. Die höchste Übereinstimmung wurde zwischen den Stämmen aus Probe 65, 66, 117 und 202 und dem internationalen Klon 8 erreicht. Die nicht einheitliche Zuordnung der Isolate lässt sich auf die unterschiedliche Genauigkeit der einzelnen Methoden zurückführen. So kann z.B. mit der Multiplex-PCR die IC 8 nicht von der IC 2 (= EU II) unterschieden werden. Da mit dem DiversiLabTM-System die einzelnen klonalen Linien am besten untereinander differenziert werden können, ist daher eine enge Verwandtschaft zwischen den *A. baumannii*-Isolaten und den internationalen klonalen Linien nicht anzunehmen. Des Weiteren konnte durch den Vergleich der Plasmidprofile die enge Verwandtschaft der Isolate, die durch die epidemiologische Typisierungen als identisch bzw. nahezu identisch identifiziert wurden, ebenfalls erkannt werden. Somit lässt sich auch mit einer sehr einfachen und schnellen Methode eine Aussage über die nahen Verwandtschaftsbeziehungen einzelner Isolate treffen.

Bezüglich der Untersuchung auf Motilität konnten bei 18 von den 21 untersuchten *Acinetobacter*-Isolaten Bewegung auf der Agaroseoberfläche beobachtet werden (Kapitel 3.2.3). Von diesen 18 Isolaten zeigten wiederum 15 zusätzliche Bewegungen an der Interphase. Daher scheint die Fähigkeit zur Motilität eine allgemeine Eigenschaft von *Acinetobacter* spp. zu sein, die häufiger auf der Agaroseoberfläche als an der Interphase verzeichnet werden kann. Bei den Isolaten, die weder Motilität auf der Agaroseoberfläche noch an der Interphase zeigten, handelte es sich wahrscheinlich in allen Fällen auf Grundlage der 16S rRNA-Sequenzierung um die Spezies *A. lwoffii* (siehe Tabelle 7-1). Möglicherweise ist die Fähigkeit zur Motilität auf bestimmte Spezies der Gattung begrenzt. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass sich *A. baumannii* an der Interphase mithilfe von Typ IV-Pili bewegt.[Wilharm & Skiebe, zur Veröffentlichung eingereicht] Ein Zusammenhang zwischen der Typ IV-Pili vermittelten *twitching*-Motilität und der natürlichen Fähigkeit zur Aufnahme freier DNA, der natürlichen Kompetenz, wurde ebenfalls für *A. baumannii* demonstriert.[Wilharm & Skiebe, zur Veröffentlichung eingereicht] So konnte auch bei allen vier Kanamycin-sensitiven *A. baumannii*-Isolaten, die Bewegung an der Interphase zeigten,

die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz im Transformations-Experiment festgestellt werden (Kapitel 3.2.4). Da die anderen beiden *A. baumannii*-Isolate (aus Probe 62 und 124) aufgrund ihrer Kanamycin-Resistenz nicht auf natürliche Kompetenz getestet werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese auch natürlich kompetent sind, zumal sie ebenfalls Motilität an der Interphase zeigten. Die *A. baumannii*-Isolate sind durch die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz somit in der Lage, genetische Austauschgemeinschaften mit nahe verwandten Spezies zu bilden, sodass sie ständig neue Gene, v.a. für Antibiotika-Resistenzen, erwerben können. Alle übrigen Isolate konnten mit der verwendeten DNA unabhängig von der Fähigkeit zur Interphasen-Motilität nicht transformiert werden. Allerdings muss dies nicht zwingend bedeuten, dass diese Isolate nicht natürlich kompetent sind. Es könnte z.B. sein, dass die Transformations-DNA, die aus einem *A. baumannii*-Stamm erhalten wurde, eine zu geringe Sequenzhomologie zu dem bakteriellen Chromosom der anderen *Acinetobacter*-Isolate besitzt, sodass eine homologe Rekombination nicht möglich ist. Daher wäre es interessant zu wissen, ob die Isolate möglicherweise mit anderem DNA-Material auf natürlichem Wege transformiert werden können.

Bei der Untersuchung der sechs *A. baumannii*-Isolate auf Antibiotika-Resistenzen und auf die Anwesenheit von Antibiotika-Resistenz-vermittelnden Enzymen wurde deutlich, dass die sechs Isolate nahezu identische Ergebnisse erzielten, v.a. die Isolate aus Probe 62 und 124 sowie aus Probe 65, 66, 117 und 202, wodurch wieder die nahe Verwandtschaft dieser Isolate bestätigt wird (Kapitel 3.2.9). Die Isolate aus Probe 62 und 124 grenzten sich von den anderen Isolaten nur dadurch ab, dass sie gegenüber Gentamycin und Kanamycin resistent waren. Die Kanamycin-Resistenz dieser Isolate konnte bereits bei dem Transformations-Experiment beobachtet werden. Bei allen sechs *A. baumannii*-Isolaten wurden Resistenzen gegenüber Cefoxitin und Ertapenem beobachtet. Diese sind natürlich für die Spezies *A. baumannii*. Die Werte des Mikrobouillonverdünnungstests für Penicilline (AMP) und Cephalosporine (CTX und CTM) (Tabelle 3-2) können durch die geringe AmpC-Expression, die in den *A. baumannii*-Isolaten festgestellt wurde, erklärt werden.^[159] Zudem zeigten alle Isolate zusätzliche Resistenzen gegenüber Mezlocillin und Chloramphenicol. Möglicherweise sind die Resistenzen auf die Aufnahme der entsprechenden Resistenzgene über natürliche Kompetenz zurückzuführen. In der Viehwirtschaft, v.a. bei Geflügel, werden außerhalb der EU noch immer häufig Antibiotika als Wachstumsförderer sowie weltweit zur Kontrolle und Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt.^[160] Da die sechs *A. baumannii*-Isolate alle aus Geflügel gewonnen wurden, ist anzunehmen, dass die Isolate entsprechendem Selektionsdruck durch Antibiotika ausgesetzt waren. Dadurch kann die Aufnahme von

Resistenzgenen begünstigt werden. Die fehlende Resistenz gegenüber Kanamycin und Gentamycin bei den Isolaten aus Probe 65, 66 und 117 könnte dadurch erklärt werden, dass diese Isolate aus Bio-Geflügel gewonnen wurden, wo auf den Einsatz von Antibiotika weitestgehend verzichtet wird. Auf Grund der geringen Fallzahlen ist dies jedoch keine gesicherte Schlussfolgerung. Im Allgemeinen erschweren zunehmende Antibiotika-Resistenzen die Behandlung von Infektionen, die durch die resistenten Erreger hervorgerufen werden. Natürlich kompetente Erreger stellen deshalb in einer von hohem Selektionsdruck geprägten Umwelt ein besonderes Risiko dar.

4.4 Vorarbeiten zur Beschreibung einer neuen Spezies

Eines der aus Pferdekot gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate (Probe 4, Tabelle 7-1) zeigte nur eine geringe 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit von $\leq 98\%$ zu allen anderen bereits bekannten *Acinetobacter* spp. Da die in der Literatur neu beschriebenen *Acinetobacter* spp. i.d.R. eine 16S rRNA-Sequenzähnlichkeit von $\leq 98\%$ zu anderen *Acinetobacter* spp. aufwiesen, wurde vermutet, dass es sich bei diesem Isolat möglicherweise um eine neue Spezies der Gattung *Acinetobacter* handeln könnte. In jüngsten Artbeschreibungen innerhalb der Gattung *Acinetobacter* konnten sogar bereits Spezies mit einer 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit über 98 % neu beschrieben werden.^[17]

Durch weitere Untersuchungen konnten zusätzliche Informationen erhalten werden, die diese Vermutung unterstützten (Kapitel 3.1.2 und 3.3). So wurden durch die beiden API-Tests für dieses Isolat sehr widersprüchliche Ergebnisse erhalten: Während bei dem API 20 NE-Testsystem das Isolat der Gattung *Pasteurella* zugeordnet wurde, ergab das API 20 E-Testsystem, dass es sich um ein Isolat der Gattung *Pseudomonas* handelte. Allerdings waren sowohl die T-Werte (0,13 und 0,84) als auch die ID-Werte (62,1 % und 81,2 %) in beiden Fällen sehr niedrig, wodurch die Ergebnisse nicht als sehr zuverlässig angesehen werden können. Da die durch die API-Testsysteme erhaltenen Reaktionsprofile zur Identifizierung mit einer Datenbank von Referenzstämmen verglichen werden, können folglich auch nur Organismen, die in der Datenbank enthalten sind, nachgewiesen werden. Daher könnte das Ergebnis den Verdacht bestätigen, dass es sich um eine bisher unbekannte Spezies handelt, die in der Datenbank noch nicht erfasst ist und somit nicht nachgewiesen werden kann. Jedoch sollten weitere Fehlermöglichkeiten nicht ausgeschlossen werden. Z.B. können je nach Ablese- und Auswertungsfehler der einzelnen biochemischen Reaktionen von der *apiweb*TM-Software ganz unterschiedliche Ergebnisse angegeben werden. Durch die

biochemischen Reaktionen der API-Testsysteme konnte festgestellt werden, dass das Isolat in der Lage ist, Adipat und Malat zu assimilieren, Nitrat zu reduzieren sowie Glucose und L-Arabinose zu fermentieren (Tabelle 7-2 und Tabelle 7-3). Auf Grundlage der Daten von Nemeč *et al.* und der Daten aus den Identifizierungstabellen der API-Testsysteme lässt sich die Kombination der biochemischen Reaktionen bezüglich der Verwertung von L-Arabinose, Adipat und Malat in der Gattung *Acinetobacter* nur bei den Vertretern des ACB-Komplexes beobachten.^[122] Zudem zeigen 2 % bzw. 8 % der Referenzstämme von *A. baumannii/A. calcoaceticus* auch Nitratreduktion und Glucose-Fermentation im API 20 NE-Testsystem (Tabelle 7-2). Für eine Zuordnung des Isolats zu dem ACB-Komplex fehlen allerdings einige wesentliche Reaktionen, sodass dies hiernach nicht möglich ist.

Die 16S rRNA-Resequenzierung genauso wie die Sequenzierungen anderer Gene des Isolats zeigten zwar, dass die höchsten Sequenz-Übereinstimmungen in allen Fällen zu verschiedenen Spezies der Gattung *Acinetobacter* verzeichnet wurden, sodass das Isolat höchstwahrscheinlich auch in die Gattung *Acinetobacter* einzuordnen ist, jedoch wurde auch hier eine maximale Gen-Sequenzähnlichkeit von nur 98 % zu bereits bekannten Spezies mit gültiger Speziesbezeichnung erreicht. Diese Ergebnisse bestätigen daher das zuvor erhaltene Sequenzierungsergebnis bezüglich des 16S rRNA-Gens (Tabelle 7-1) und somit die Abgrenzung zu nahe verwandten Spezies der Gattung *Acinetobacter*. Für eine zusätzliche Absicherung der Ergebnisse wäre noch die Sequenzierung des *gyrB*-Gens möglich.^[161] Die Ergebnisse der 16S rRNA-Sequenzanalyse durch die DSMZ zeigten genauso wie die Ergebnisse der 16S rRNA-Resequenzierung, dass das Isolat die höchste Gen-Sequenzähnlichkeit mit ca. 98 % zur Spezies *A. lwoffii* aufwies. Zu anderen nahe verwandten Spezies der Gattung *Acinetobacter* wurde wiederum eine Gen-Sequenzähnlichkeit von ≤ 98 % erhalten. Auch der phylogenetische Baum, der auf Grundlage von 16S rRNA-Gensequenzen erstellt wurde, verdeutlicht die distinkte Stellung des Isolats zu nahe verwandten Spezies der Gattung *Acinetobacter*. Die Ergebnisse unterstützen somit die Annahme, dass es sich um eine neue Spezies der Gattung *Acinetobacter* handeln könnte. Allerdings sollte beachtet werden, dass, obwohl der Vergleich von 16S rRNA-Sequenzen für die Ableitung von phylogenetischen und evolutionären Beziehungen zwischen Bakterien die Methode der Wahl darstellt, die eindeutige Identität einer Spezies auf Grundlage der 16S rRNA-Gensequenzen nicht garantiert werden kann.^[162,163]

Durch die Gram-Färbung konnte das Isolat eindeutig als gram-negativ eingestuft werden. Die anschließende mikroskopische Untersuchung sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen legen zudem nahe, dass es sich um ein Bakterium der Gattung *Acinetobacter*

handelt. So konnte die für *Acinetobacter* typische kokkoide Stäbchenform bei den Bakterienzellen beobachtet werden, sowie in einzelnen Aufnahmen Pili-ähnliche Strukturen, die bereits bei der Gattung *Acinetobacter* beschrieben wurden.^[4,55,151]

4.5 PCR-Etablierung

Die Identifizierung und gleichzeitige Abgrenzung von *A. baumannii* zu anderen Spezies der Gattung *Acinetobacter*, besonders zu den Spezies des ACB-Komplexes, bereitet häufig große Probleme. Vor allem in routinierten mikrobiologischen Laboratorien, in denen schnelle und einfache Methoden verwendet werden, kommt es oftmals zu Fehlern bei der Spezies-Identifizierung. In dieser Arbeit wurde daher eine Nachweis-PCR für das von Sahl *et al.* beschriebene *A. baumannii*-spezifische Gen (ABAYE1332) mit dem AB_UNI-Primerpaar entwickelt (Kapitel 3.4.1.4). Für die entwickelte Nachweis-PCR konnte eine Spezifität von 100 % und eine Sensitivität von 95,8 % erreicht werden (Kapitel 3.4.2). Im Vergleich dazu haben Sahl *et al.* mit ihrer verwendeten PCR für die Identifizierung des *A. baumannii* spezifischen Gens ABAYE1332 eine Sensitivität von 98,6 % erhalten.^[78] Die geringen Unterschiede in den Sensitivitäten lassen sich durch die Verwendung anderer PCR-Bedingungen, anderer *A. baumannii*-Isolate und durch eine geringfügig höherer Anzahl von getesteten *A. baumannii*-Isolaten (74 statt 71) bei Sahl *et al.* erklären. Mit der in dieser Arbeit entwickelten Nachweis-PCR konnten drei *A. baumannii*-Isolate (Isolat-Nr. 9, 40 und 77, Tabelle 7-6) nicht erkannt werden. Da von den drei Isolaten nur bei Isolat-Nr. 77 die klonale Linie bekannt ist, können keine Rückschlüsse darauf gezogen werden, ob die entwickelte PCR nur bei einigen Isolaten aus der klonalen Linie 8 Probleme bei der Identifizierung bereitet oder ob auch andere Isolate betroffen sein können. Auch lässt sich nicht ableiten, ob sich die Schwierigkeiten bei der Identifikation von *A. baumannii*-Isolaten auf Isolate bestimmter Herkunftsländer beschränken, da zum einen nur 71 *A. baumannii*-Isolate getestet wurden und zum andern der überwiegende Anteil der getesteten *A. baumannii*-Isolate aus Deutschland stammte. Dadurch waren Isolate aus anderen Ländern wie z.B. Südkorea eher unter- bzw. Isolate einiger anderer Länder gar nicht repräsentiert. Um diesbezüglich eine genauere Aussage treffen zu können, müsste daher die PCR an einem größeren Umfang von *A. baumannii*-Isolaten diverserer Herkunft getestet werden. Die Ergebnisse bezüglich Sensitivität und Spezifität legen im Allgemeinen nahe, dass das beschriebene Gen ABAYE1332 als Biomarker zur positiven Identifizierung von *A. baumannii*-Isolaten mithilfe der etablierten PCR herangezogen werden kann.

Zum Vergleich konnte mit der *bla*_{OXA-51-like}-Gene-PCR für dieselben Isolate aus Tabelle 7-6 sowohl eine Spezifität als auch eine Sensitivität von 100 % erhalten werden. Dies bestätigt die Ergebnisse von Sahl *et al.* und Turton *et al.*, dass die *bla*_{OXA-51-like}-Gene in *Acinetobacter* spp. gut konserviert und zudem spezifisch für *A. baumannii* sind.^[51,120] Allerdings konnte vor kurzem durch Zander *et al.* gezeigt werden, dass in *A. baumannii* auch Varianten der *bla*_{OXA-51-like}-Gene existieren können, die untypische PCR-Produkte mit der *bla*_{OXA-51-like}-Gene-PCR ergeben. In diesen Fällen kann mit der PCR kein zuverlässiges Ergebnis erhalten werden.^[164] Die Beobachtung neuer Varianten der *bla*_{OXA-51-like}-Gene lässt auch vermuten, dass eventuell weitere, noch nicht bekannte Varianten der *bla*_{OXA-51-like}-Gene existieren, die bei der PCR gar keine Produkte liefern.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass die AB_UNI-PCR eine recht gute Alternative zur bereits etablierten *bla*_{OXA-51-like}-Gene-PCR darstellt, die eine schnelle, einfache und kostengünstige Identifizierung von *A. baumannii* ermöglicht. Allerdings sollten beide PCR-Methoden für eine zuverlässige Identifizierung mit weiteren Methoden zur Spezies Identifizierung, wie der Sequenzierung des *rpoB*-Gens oder der Untersuchung des *gyrB*-Gens mittels Multiplex-PCR, abgesichert werden.^[118,119]

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Identifizierung natürlicher Reservoirs des Krankenhausproblemkeims *Acinetobacter baumannii* zu liefern. Zu diesem Zweck wurden 387 Tier- und Umweltproben auf *A. baumannii* untersucht. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf Geflügel-assoziierte Proben gelegt, nachdem die Hypothese aufgestellt wurde, dass Vögel und deren Parasiten ein mögliches Reservoir darstellen. Die Hypothese lag unter anderem darin begründet, dass sich *A. baumannii* im Gegensatz zu vielen anderen Bakterien bei der im Vergleich zu Säugetieren höheren Körpertemperatur von Vögeln noch gut vermehren kann. Aus dem Probenmaterial konnten neben sechs *A. baumannii*-Isolaten 15 weitere *Acinetobacter*-Isolate anderer Spezies gewonnen werden. Die sechs *A. baumannii*-Isolate wurden alle aus Geflügelproben isoliert. Dies lässt vermuten, dass ein natürliches Reservoir von *A. baumannii*, wie postuliert, mit Vögeln in Zusammenhang stehen könnte. Um allerdings eine repräsentative Aussage bezüglich solcher Reservoirs treffen zu können, ist die Untersuchung weiterer Proben notwendig. Dabei sollten, wenn möglich, auch Proben von Geflügel-Parasiten berücksichtigt werden. Die Identifizierung solcher natürlichen Reservoirs könnte zur Prävention von Infektionen mit *A. baumannii* beitragen.

Die zur Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben verwendeten Selektivnährmedien ChromAgar *Acinetobacter*, Simmons-Citrat-Agar und Leeds *Acinetobacter* Medium wurden bezüglich ihrer Selektivität gegenüber *Acinetobacter* spp. und der Erkennung der von *Acinetobacter* spp. gebildeten Kolonien verglichen. Hierbei wurde das beste Ergebnis mit ChromAgar *Acinetobacter* erzielt. So wird mit ChromAgar *Acinetobacter* eine schnelle Detektion und Isolation von *Acinetobacter* spp. gewährleistet, was v.a. in der klinischen Diagnostik einen großen Vorteil mit sich bringt. In weiteren Arbeiten könnte überprüft werden, ob PCR-basierte Methoden zur Erfassung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben besser geeignet sind, als die kulturelle Methode mit dem Selektivnährmedium ChromAgar *Acinetobacter*.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate näher zu charakterisieren. Von den 21 *Acinetobacter*-Isolaten zeigten die sechs als *A. baumannii* identifizierten Isolate die höchste Virulenz im *Galleria mellonella*-Infektionsmodell, die vergleichbar zu dem hoch virulenten *A. baumannii* Stamm ATCC 17978 war. Auch wurden Ansätze zur Biofilmbildung bei allen sechs *A. baumannii*-Isolaten beobachtet, während hingegen das Verotoxin 1- und Verotoxin 2-Gen bei keinem der 21 Isolate entdeckt werden

konnten. Mit Ausnahme von drei Isolaten zeigten alle *Acinetobacter*-Isolate Motilität auf halbfesten Nährböden. Zudem wurden vier *A. baumannii*-Isolate im Transformations-Experiment als natürlich kompetent identifiziert. Zwei weitere *A. baumannii*-Isolate wurden aufgrund ihrer bereits vorhandenen Kanamycin-Resistenz nicht auf die Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz getestet. Alle übrigen *Acinetobacter*-Isolate konnten mit der verwendeten DNA nicht natürlich transformiert werden. In weiteren Arbeiten sollte daher untersucht werden, ob das Ergebnis auf die verwendete Transformations-DNA zurückzuführen ist, oder ob die Isolate generell keine Fähigkeit zur natürlichen Kompetenz besitzen. Des Weiteren wurde sowohl durch die Analyse von Plasmidprofilen als auch durch die von Dr. Higgins und Dr. Pfeifer durchgeführten molekularepidemiologischen Typisierungen herausgefunden, dass einmal vier und einmal zwei der sechs *A. baumannii*-Isolate untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad aufwiesen. Eine nähere Beziehung dieser Isolate zu den international verbreiteten klonalen Linien konnte nicht festgestellt werden. Außerdem konnten durch Dr. Pfeifer einige Antibiotika-Resistenzen bei den sechs *A. baumannii*-Isolaten ermittelt werden, die z.T. natürlich für *A. baumannii* sind, aber z.T. auch wahrscheinlich über natürliche Kompetenz erworben wurden. Die durchgeführte Charakterisierung der gewonnenen *Acinetobacter*-Isolate, vor allem der *A. baumannii*-Isolate, erlaubt eine Einschätzung der Pathogenität und somit der möglichen Gefährdung dieser Isolate für die Gesundheit des Menschen.

Des Weiteren waren Vorarbeiten zur Beschreibung einer potenziell neuen *Acinetobacter*-Spezies ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit, da eines der *Acinetobacter*-Isolate nur eine geringe 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeit zu allen anderen *Acinetobacter* spp. aufwies. Die dazu durchgeführten Sequenzierungen und auch die von der DSMZ durchgeführte Analyse der 16S rRNA-Sequenz verdeutlichen die distinkte Stellung des Isolates zu anderen Vertretern der Gattung *Acinetobacter*. Auch mit den API-Tests konnte das Isolat keiner bereits bekannten Bakterien-Spezies eindeutig zugeordnet werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Dr. Laue sowie die Gramfärbung und die Sequenzierungsergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass das Bakterium der Gattung *Acinetobacter* zugehörig ist. Somit unterstützen die Ergebnisse die Annahme, dass es sich um den Vertreter einer neuen Spezies der Gattung *Acinetobacter* handelt. Zur weiteren Spezies-Beschreibung und eindeutigen Abgrenzung zu anderen *Acinetobacter* spp. werden nun neben der Durchführung von DNA-DNA-Hybridisierungen gegen die am nächsten verwandten

Spezies der Gattung *Acinetobacter* auch chemotaxonomische Eigenschaften des Isolates bestimmt.

Darüber hinaus konnte mithilfe der von Sahl *et al.* entworfenen AB_UNI-Primer erfolgreich eine Nachweis-PCR zur Identifizierung des *A. baumannii* spezifischen Gens ABAYE1332 entwickelt und evaluiert werden. Für die entwickelte Nachweis-PCR wurde eine Sensitivität von 95,8 % und eine Spezifität von 100 % erreicht, sodass diese eine relativ gute Alternative zur bereits etablierten *bla*_{OXA-51-like}-Gene-PCR darstellt. Hiermit kann eine schnelle, einfache und kostengünstige Identifizierung von *A. baumannii* gewährleistet werden. In weiteren Arbeiten könnten zusätzliche Isolate mit der etablierten AB_UNI-PCR getestet werden, um genauere Aussagen über die Isolate zu erhalten, die nicht mit dieser PCR erfasst werden können. Zudem wäre es auch gerade im Hinblick auf die Probleme bei der Unterscheidung von *A. baumannii* zu den anderen Spezies des ACB-Komplexes sinnvoll zu überprüfen, wie gut die Spezifität der PCR speziell bei der Untersuchung von Vertretern des ACB-Komplexes ist.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Howard, A., O'Donoghue, M., Feeney, A., Sleator, R. D., 2012. *Acinetobacter baumannii*: An emerging opportunistic pathogen. *Virulence* 3(3):243–250.
- [2] Muller, M. G., George, A. R., Walochnik, J., 2010. *Acinetobacter baumannii* in Localised Cutaneous Mycobacteriosis in Falcons. *Veterinary Medicine International* 2010(7):1–7.
- [3] Beijerinck, M., 1911. Über Pigmentbildung bei Essigbakterien. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 29:167–176.
- [4] Peleg, A. Y., Seifert, H., Paterson, D. L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21(3):538–582.
- [5] Brisou, J., Prevot, A. R., 1954. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Achromobacter* group. *Annales de l'Institut Pasteur* 86:722–728.
- [6] Jawad, A., Hawkey, P. M., Heritage, J., Snelling, A. M., 1994. Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *Journal of Clinical Microbiology* 32(10):2353–2358.
- [7] Lautrop, H., 1961. *Bacterium anitratum* transferred to the genus *Cytophaga*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 11:107–108.
- [8] Henrichsen, J., Blom, J., 1975. Correlation between twitching motility and possession of polar fimbriae in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology* 83B(2):103–115.
- [9] Barker, J., Moxted, H., 1975. Observations on the growth and movement of *Acinetobacter* on semi-solid media. *Journal of Medical Microbiology* 8(3):443–446.
- [10] Eijkelkamp, B. A., Stroehel, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., Brown, M. H., Lo, R., 2011. Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiology Letters* 323(1):44–51.
- [11] Nishimura, Y., Ino, T., Iizuka, H., 1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. Isolated from Cotton and Soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38(2):209–211.

- [12] Baumann, P., 1968. Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *Journal of Bacteriology* 96(1):39–42.
- [13] Lee, H.-J., Lee, S.-S., 2010. *Acinetobacter kyonggiensis* sp. nov., a β -glucosidase-producing bacterium, isolated from sewage treatment plant. *The Journal of Microbiology* 48(6):754–759.
- [14] Anandham, R., Weon, H.-Y., Kim, S.-J., Kim, Y.-S., Kim, B.-Y., Kwon, S.-W., 2010. *Acinetobacter brisouii* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. *The Journal of Microbiology* 48(1):36–39.
- [15] Vaz-Moreira, I., Novo, A., Hantsis-Zacharov, E., Lopes, A. R., Gomila, M., Nunes, O. C., Manaia, C. M., Halpern, M., 2011. *Acinetobacter rudis* sp. nov., isolated from raw milk and raw wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61(12):2837–2843.
- [16] Narciso-da-Rocha, C., Vaz-Moreira, I., Svensson-Stadler, L., Moore E. R. B., Manaia, C. M., 2013. Diversity and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. in water from the source to the tap. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:329–340.
- [17] Nemec, A., Musilek, M., Maixnerova, M., Baere, T. de, van der Reijden, T. J. K., Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., 2009. *Acinetobacter beijerinckii* sp. nov. and *Acinetobacter gyllenbergii* sp. nov., haemolytic organisms isolated from humans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59(1):118–124.
- [18] Gennari, M., Stegagno, F., 1986. Isolation and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* from raw, washed and frozen vegetables. *Archivio Veterinario Italiano* 37:131–137.
- [19] Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., Amyes, S. G., 2011. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38(4):314–318.
- [20] Olivier, M., Veary, C. M., Cloete, T. E., Holy, A. von, 1995. Microbiological status of selected chicken carcasses from a non-automated poultry processing plant. *Journal of Basic Microbiology* 36(1):41–49.
- [21] Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., 1997. Distribution of *Acinetobacter* Species on Human Skin: Comparison of

- Phenotypic and Genotypic Identification Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 35(11):2819–2825.
- [22] Gennari, M., Stegagno, F., 1985. Isolation and characterization of *Acinetobacter calcoaceticus* from fresh, frozen and ice stored fish products. *Microbiologie-Aliments-Nutrition* 3:247–259.
- [23] Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M., 2007. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73(22):7162–7168.
- [24] Patterson, J. E., Vecchio, J., Pantelick, E., Farrel, P., Mazon, D., Zervos, M. J., Hierholzer, W. J., 1991. Association of Contaminated Gloves with Transmission of *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratius* in an Intensive Care Unit. *The American Journal of Medicine* 91:479–483.
- [25] Bergogne-Berezin, E., Joly-Guillou, M. L., Vieu, J. F., 1987. Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Hospital Infection* 10:105–113.
- [26] Bergogne-Berezin, E., Towner, K. J., 1996. *Acinetobacter* spp. as Nosocomial Pathogens: Microbiological, Clinical, and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews* 9(2):148–165.
- [27] Seifert, H., Baginski, R., Schulze, A., Pulverer, G., 1993. Antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(4):750–753.
- [28] Baumann, P., Doudoroff, M., Stanier, R. Y., 1968. A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology* 95(5):1520–1541.
- [29] Lessel, E. F., 1971. International Committee on Nomenclature of Bacteria Subcommittee on the Taxonomy of *Moraxella* and Allied Bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 21(3):213–214.
- [30] Peleg, A. Y., Breij, A. de, Adams, M. D., Cerqueira, G. M., Mocali, S., Galardini, M., Nibbering, P. H., Earl, A. M., Ward, D. V., Paterson, D. L. et al., 2012. The Success of *Acinetobacter* Species; Genetic, Metabolic and Virulence Attributes. *PLoS ONE* 7(10):e46984.

- [31] Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H., 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology* 5(12):939–951.
- [32] Bouvet, P. J. M., Grimont, P. A. D., 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36(2):228–240.
- [33] Tjernberg, I., Ursing, J., 1989. Clinical strains of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. *APMIS* 97(7-12):595–605.
- [34] Chuang, Y.-C., Sheng, W.-H., Li, S.-Y., Lin, Y.-C., Wang, J.-T., Chen, Y.-C., Chang, S.-C., 2011. Influence of Genospecies of *Acinetobacter baumannii* Complex on Clinical Outcomes of Patients with *Acinetobacter* Bacteremia. *Clinical Infectious Diseases* 52(3):352–360.
- [35] Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, P. G., Edmond, M. B., Wenzel, R. P., Seifert, H., 2012. Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection* 64(3):282–290.
- [36] Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., Ursing, J., 1991. Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology* 29(2):277–282.
- [37] van den Broek, P. J., van der Reijden, T. J. K., van Strijen, E., Helmig-Schurter, A. V., Bernards, A. T., Dijkshoorn, L., 2009. Endemic and Epidemic *Acinetobacter* Species in a University Hospital: an 8-Year Survey. *Journal of Clinical Microbiology* 47(11):3593–3599.
- [38] Perez, F., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Decker, B. K., Rather, P. N., Bonomo, R. A., 2007. Global Challenge of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(10):3471–3484.
- [39] Villegas, M. V., Hartstein, A. I., 2003. *Acinetobacter* Outbreaks, 1977-2000. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24(4):284–295.

- [40] Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., Pitt, T. L., 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection* 42:201–204.
- [41] Ahmed, A. M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., Shimamoto, T., 2007. Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrins and Antimicrobial Resistance Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 73(20):6686–6690.
- [42] Houang, E. T. S., Chu, Y. W., Leung, C. M., Chu, K. Y., Berlau, J., Ng, K. C., Cheng, A. F. B., 2001. Epidemiology and Infection Control Implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology* 39(1):228–234.
- [43] Berlau, J., Aucken, H., Malnick, H., Pitt, T., 1999. Distribution of *Acinetobacter* Species on Skin of Healthy Humans. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18:179–183.
- [44] Kempf, M., Abdissa, A., Diatta, G., Trape, J.-F., Angelakis, E., Mediannikov, O., La Scola, B., Raoult, D., 2012. Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *International Journal of Infectious Diseases* 16(9):e680–e683.
- [45] La Scola, B., Raoult, D., 2004. *Acinetobacter baumannii* in Human Body Louse. *Emerging Infectious Diseases* 10(9):1671–1673.
- [46] Faulde, M., Spiesberger, M., 2013. Role of the moth fly *Clogmia albipunctata* (Diptera: Psychodinae) as a mechanical vector of bacterial pathogens in German hospitals. *Journal of Hospital Infection* 83(1):51–60.
- [47] Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., Rüdén, H., 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *Journal of Clinical Microbiology* 35(6):1394–1397.
- [48] Jawad, A., Seifert, H., Snelling, A. M., Heritage, J., Hawkey, P. M., 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on Dry Surfaces: Comparison of Outbreak and Sporadic Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 36(7):1938–1941.
- [49] Gaddy, J. A., Actis, L. A., 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiology* 4(3):273–278.

- [50] Zeana, C., Larson, E., Sahni, J., Bayuga, S. J., Wu, F., Della-Latta, P., 2003. The Epidemiology of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*: Does the Community Represent a Reservoir? *Infection Control and Hospital Epidemiology* 24(4):275–279.
- [51] Sahl, J. W., Gillece, J. D., Schupp, J. M., Waddell, V. G., Driebe, E. M., Engelthaler, D. M., Keim, P., Fitzgerald, J. R., 2013. Evolution of a Pathogen: A Comparative Genomics Analysis Identifies a Genetic Pathway to Pathogenesis in *Acinetobacter*. *PLoS ONE* 8(1):e54287.
- [52] Beachey, E. H., 1981. Bacterial Adherence: Adhesin-Receptor Interactions Mediating the Attachment of Bacteria to Mucosal Surfaces. *The Journal of Infectious Diseases* 143(3):325–345.
- [53] Niemann, H. H., Schubert, W.-D., Heinz, D. W., 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes and Infection* 6(1):101–112.
- [54] Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I., Lee, J. C., 2008. *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiology* 8(1):216.
- [55] Lee, J. C., Koerten, H., van den Broek, P., Beekhuizen, H., Wolterbeek, R., van den Barselaar, M., van der Reijden, T., van der Meer, J., van de Gevel, J., Dijkshoorn, L., 2006. Adherence of *Acinetobacter baumannii* strains to human bronchial epithelial cells. *Research in Microbiology* 157(4):360–366.
- [56] Beachey, E. H., Giampapa, C. S., Abraham, S. N., 1988. Bacterial Adherence: Adhesin Receptor-mediated Attachment of Pathogenic Bacteria to Mucosal Surfaces. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 138(6):S45-S48.
- [57] Knapp, S., Wieland, C. W., Florquin, S., Pantophlet, R., Dijkshoorn, L., Tshimbalanga, N., Akira, S., van der Poll, T., 2006. Differential Roles of CD14 and Toll-like Receptors 4 and 2 in Murine *Acinetobacter* Pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173(1):122–129.
- [58] Choi, C. H., Lee, E. Y., Lee, Y. C., Park, T. I., Kim, H. J., Hyun, S. H., Kim, S. A., Lee, S.-K., Lee, J. C., 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cellular Microbiology* 7(8):1127–1138.

- [59] Dorsey, C. W., Beglin, M. S., Actis, L. A., 2003. Detection and Analysis of Iron Uptake Components Expressed by *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 41(9):4188–4193.
- [60] Dorsey, C. W., Tolmasky, M. E., Crosa, J. H., Actis, L. A., 2003. Genetic organization of an *Acinetobacter baumannii* chromosomal region harbouring genes related to siderophore biosynthesis and transport. *Microbiology* 149(5):1227–1238.
- [61] Mihara, K., Tanabe, T., Yamakawa, Y., Funahashi, T., Nakao, H., Narimatsu, S., Yamamoto, S., 2004. Identification and transcriptional organization of a gene cluster involved in biosynthesis and transport of acinetobactin, a siderophore produced by *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606T. *Microbiology* 150(8):2587–2597.
- [62] Zimblér, D. L., Penwell, W. F., Gaddy, J. A., Menke, S. M., Tomaras, A. P., Connerly, P. L., Actis, L. A., 2009. Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *BioMetals* 22(1):23–32.
- [63] Jankowski, S., Grzybek-Hryncewicz, K., Fleischer, M., Walczuk, M., 1992. Susceptibility of isolates of *Acinetobacter anitratus* and *Acinetobacter lwoffii* to the bactericidal activity of normal human serum. *FEMS Microbiology Immunology* 89(5):255–260.
- [64] Skiebe, E., Berardinis, V. de, Morczinek, P., Kerrinnes, T., Faber, F., Lepka, D., Hammer, B., Zimmermann, O., Ziesing, S., Wichelhaus, T. A. et al., 2012. Surface-associated motility, a common trait of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, depends on 1,3-diaminopropane. *International Journal of Medical Microbiology* 302(3):117–128.
- [65] Donlan, R. M., Costerton, J. W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):167–193.
- [66] Mukerji, S., Ghopale, N., 1983. Gliding motility of *Acinetobacter anitratus*. *Journal of Clinical Pathology* 36:484.
- [67] Lautrop, H., 1965. Gliding motility in bacteria as a taxonomic criterion. *Spisy Přírodovědecké Fakulty University JE Purkyne K* 35:322–327.
- [68] Henrichsen, J., 1984. Not gliding but twitching motility of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Clinical Pathology* 37(1):102–103.
- [69] Henrichsen, J., 1983. Twitching Motility. *Annual Reviews in Microbiology* 37:81–93.

- [70] Smith, M. G., Gianoulis, T. A., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J., Ornston, L. N., Gerstein, M., Snyder, M., 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development* 21(5):601–614.
- [71] Clemmer, K. M., Bonomo, R. A., Rather, P. N., 2011. Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* 157(9):2534–2544.
- [72] Eijkelkamp, B. A., Hassan, K. A., Paulsen, I. T., Brown, M. H., 2011. Investigation of the human pathogen *Acinetobacter baumannii* under iron limiting conditions. *BMC Genomics* 12(1):126.
- [73] Mattick, J. S., 2002. Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Reviews in Microbiology* 56(1):289–314.
- [74] Mussi, M. A., Gaddy, J. A., Cabruja, M., Arivett, B. A., Viale, A. M., Rasia, R., Actis, L. A., 2010. The Opportunistic Human Pathogen *Acinetobacter baumannii* Senses and Responds to Light. *Journal of Bacteriology* 192(24):6336–6345.
- [75] Baur, B., Hanselmann, K., Schlimme, W., Jenni, W., 1996. Genetic transformation in freshwater: *Escherichia coli* is able to develop natural competence. *Applied and Environmental Microbiology* 62(10):3673–3678.
- [76] Davison, J., 1999. Genetic Exchange between Bacteria in the Environment. *Plasmid* 42(2):73–91.
- [77] Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C. et al., 2006. Comparative Genomics of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genetics* 2(1):e7.
- [78] Sahl, J. W., Johnson, J. K., Harris, A. D., Phillippy, A. M., Hsiao, W. W., Thom, K. A., Rasko, D. A., 2011. Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. *BMC Genomics* 12(1):291.
- [79] Snitkin, E. S., Zelazny, A. M., Montero, C. I., Stock, F., Mijares, L., Murray, P. R., Segre, J. A., Mullikin, J., Blakesley, R., Young, A. et al., 2011. Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(33):13758–13763.

- [80] Naiemi, N. A., Duim, B., Savelkoul, P. H. M., Spanjaard, L., Jonge, E. de, Bart, A., Vandembroucke-Grauls, C. M., Jong, M. D. de, 2005. Widespread Transfer of Resistance Genes between Bacterial Species in an Intensive Care Unit: Implications for Hospital Epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 43(9):4862–4864.
- [81] Skippington, E., Ragan, M. A., 2011. Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities. *FEMS Microbiology Reviews* 35(5):707–735.
- [82] Wadl, M., Heckenbach, K., Noll, I., Ziesing, S., Pfister, W., Beer, J., Schubert, S., Eckmanns, T., 2010. Increasing Occurrence of Multidrug-Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolates From Four German University Hospitals, 2002–2006. *Infection* 38(1):47–51.
- [83] Rice, L. B., 2008. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases* 197(8):1079–1081.
- [84] Hsueh, P.-R., Teng, L.-J., Chen, C.-Y., Chen, W.-H., Yu, C.-J., Ho, S.-W., Luh, K.-T., 2002. Pandrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Causing Nosocomial Infections in a University Hospital, Taiwan. *Emerging Infectious Diseases* 8(8):827–832.
- [85] Wang, S. H., Sheng, W., Chang, Y. Y., Wang, L. H., Lin, H. C., Chen, M. L., Pan, H. J., Ko, W. J., Chang, S. C., Lin, F. Y., 2003. Healthcare-associated outbreak due to pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a surgical intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 53(2):97–102.
- [86] Valencia, R., Arroyo, L. A., Conde, M., Aldana, J. M., Torres, M.-J., Fernández-Cuenca, F., Garnacho-Montero, J., Cisneros, J., Ortíz, C., Pachón, J. et al., 2009. Nosocomial Outbreak of Infection With Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in a Tertiary Care University Hospital. *Infection Control and Hospital Epidemiology* 30(3):275.
- [87] Munoz-Price, L. S., Weinstein, R. A., 2008. *Acinetobacter* Infection. *The New England Journal of Medicine* 358(12):1271–1281.
- [88] Corvec, S., Caroff, N., Espaze, E., Giraudeau, C., Drugeon, H., Reynaud, A., 2003. AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52(4):629–635.

- [89] Ruiz, M., Marti, S., Fernandez-Cuenca, F., Pascual, A., Vila, J., 2007. Prevalence of IS Aba1 in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *FEMS Microbiology Letters* 274(1):63–66.
- [90] Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., Pitt, T. L., 2006. The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters* 258(1):72–77.
- [91] Higgins, P. G., Poirel, L., Lehmann, M., Nordmann, P., Seifert, H., 2009. OXA-143, a Novel Carbapenem-Hydrolyzing Class D -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(12):5035–5038.
- [92] Vila, J., Ruiz, J., Goñi, P., Jimenes de Anta, T., 1997. Quinolone-resistance mutations in the topoisomerase IV parC gene of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 39(6):757–762.
- [93] Flemming, H.-C., Wingender, J. Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Mikroorganismen, in Faszination Lebenswissenschaften, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2008.
- [94] Flemming, H.-C., 2000. Biofilme-Das Leben am Rande der Wasserphase. *Nachrichten aus der Chemie* 48(4):442–447.
- [95] Flemming, H.-C., Wingender, J., 2002. Was Biofilme zusammenhält: Proteine, Polysaccharide. *Chemie in unserer Zeit* 36(1):30–42.
- [96] Schmitt, J., Flemming, H.-C., 1999. Water binding in biofilms. *Water science and technology* 39(7):77–82.
- [97] Martí, S., Rodríguez-Baño, J., Catel-Ferreira, M., Jouenne, T., Vila, J., Seifert, H., Dé, E., 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Research Notes* 4(1):5.
- [98] Lewandowski, Z., Stoodley, P., Altobelli, S., Fukushima, E., 1994. Hydrodynamics and kinetics in biofilm systems-recent advances and new problems. *Water science and technology* 29(10-11):223–229.
- [99] González, R. H., Nusblat, A., Nudel, B. C., 2001. Detection and characterization of quorum sensing signal molecules in *Acinetobacter* strains. *Microbiological Research* 155(4):271–277.

- [100] Montefour, K., Frieden, J., Hurst, S., Helmich, C., Headley, D., Martin, M., Boyle, D. A., 2008. *Acinetobacter baumannii*: An Emerging Multidrug-Resistant Pathogen in Critical Care. *Critical Care Nurse* 28(1):15–25.
- [101] Bernards, A. T., Frenay, H. M. E., Lim, B. T., Hendriks, W. D. H., Dijkshoorn, L., van Boven, C. P. A., 1998. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*: An unexpected difference in epidemiologic behaviour. *American Journal of Infection Control* 26(6):544–551.
- [102] McDonald, L. C., Banerjee, S., Jarvis, W. R., 1999. Seasonal Variation of *Acinetobacter* Infections: 1987–1996. *Clinical Infectious Diseases* 29(5):1133–1137.
- [103] Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y. et al., 2009. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* 302(21):2323–2329.
- [104] Chim, H., Tan, B. H., Song, C., 2007. Five-year review of infections in a burn intensive care unit: High incidence of *Acinetobacter baumannii* in a tropical climate. *Burns* 33(8):
- [105] Chen, M. Z., Hsueh, P. R., Lee, L. N., Yu, C. J., Yang, P. C., Luh, K. T., 2001. Severe Community-Acquired Pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. *CHEST Journal* 120(4):1072–1077.
- [106] Davis, K. A., Moran, K. A., McAllister, K., Gray, P. J., 2005. Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Extremity Infections in Soldiers. *Emerging Infectious Diseases* 11(8):1218–1224.
- [107] Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L. et al., 2007. An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases* 44(12):1577–1584.
- [108] Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., Dijkshoorn, L., 2011. Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Veterinary Clinics, Germany. *Emerging Infectious Diseases* 17(9):1751–1754.

- [109] Vaneechoutte, M., Devriese, L. A., Dijkshoorn, L., Lamote, B., Deprez, P., Verschraegen, G., Haesebrouck, F., 2000. *Acinetobacter baumannii*-Infected Vascular Catheters Collected from Horses in an Equine Clinic. *Journal of Clinical Microbiology* 38(11):4280–4281.
- [110] Francey, T., Gaschen, F., Nicolet, J., Burnens, A. P., 2000. The role of *Acinetobacter baumannii* as a nosocomial pathogen for dogs and cats in an intensive care unit. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14(2):177–183.
- [111] Boerlin, P., Eugster, S., Gaschen, F., Straub, R., Schawalder, P., 2001. Transmission of opportunistic pathogens in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology* 82(4):347–359.
- [112] Bernards, A. T., van der Toorn, J., van Boven, C. P. A., Dijkshoorn, L., 1996. Evaluation of the Ability of a Commercial System to Identify *Acinetobacter* Genomic Species. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 15(4):303–308.
- [113] Vaneechoutte, M., Dijkshoorn, L., Tjernberg, I., Elaichouni, A., Vos, P. de, Claeys, G., Verschraegen, G., 1995. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 33(1):11–15.
- [114] Janssen, P., Maquelin, K., Coopman, R., Tjernberg, I., Bouvet, P., Kersters, K., Dijkshoorn, L., 1997. Discrimination of *Acinetobacter* Genomic Species by AFLP Fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47(4):1179–1187.
- [115] Gerner-Smidt, P., 1992. Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 30(10):2680–2685.
- [116] Dolzani, L., Tonin, E., Lagatolla, C., Prandin, L., Monti-Bragadin, C., 1995. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic-spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology* 33(5):1108–1113.
- [117] Chang, H. C., Wei, Y. F., Dijkshoorn, L., Vaneechoutte, M., Tang, C. T., Chang, T. C., 2005. Species-Level Identification of Isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* Complex by Sequence Analysis of the 16S-23S rRNA Gene Spacer Region. *Journal of Clinical Microbiology* 43(4):1632–1639.

- [118] La Scola, B., Gundi, V. A. K. B., Khamis, A., Raoult, D., 2006. Sequencing of the *rpoB* Gene and Flanking Spacers for Molecular Identification of *Acinetobacter* Species. *Journal of Clinical Microbiology* 44(3):827–832.
- [119] Higgins, P. G., Lehmann, M., Wisplinghoff, H., Seifert, H., 2010. *gyrB* Multiplex PCR to Differentiate between *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Journal of Clinical Microbiology* 48(12):4592–4594.
- [120] Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., Pitt, T. L., 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the blaOXA-51-like Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal of Clinical Microbiology* 44(8):2974–2976.
- [121] Chmielowiec-Korzeniowska, A., Tymczyna, L., Skórska, C., Sitkowska, J., 2007. Efficacy of a novel Biofilter in hatchery sanitation: I. Removal of airborne bacteria, dust and Endotoxin. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 14:141–150.
- [122] Nemeč, A., Krizová, L., Maixnerová, M., van der Reijden, T. J., Deschaght, P., Passet, V., Vaneechoutte, M., Brisse, S., Dijkshoorn, L., 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*–*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Research in Microbiology* 162(4):393–404.
- [123] Ajao, A. O., Robinson, G., Lee, M. S., Ranke, T. D., Venezia, R. A., Furuno, J. P., Harris, A. D., Johnson, J. K., 2011. Comparison of culture media for detection of *Acinetobacter baumannii* in surveillance cultures of critically-ill patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 30(11):1425–1430.
- [124] Grotiuz, G., Sirok, A., Gadea, P., Varela, G., Schelotto, F., 2006. Shiga Toxin 2-Producing *Acinetobacter haemolyticus* Associated with a Case of Bloody Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology* 44(10):3838–3841.
- [125] Erlich, H., 1989. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology* 9(6):437–447.
- [126] Handbuch zum HotStarTaq® Plus Master Mix Kit der Firma Qiagen, <http://www.qiagen.com/hb/hotstartaqpluspcr>, 27.01.2013.

- [127] Handbuch zum High Fidelity PCR Enzyme Mix von der Firma Fermentas, <http://www.thermoscientificbio.com/uploadedFiles/Resources/prod-info-k0192-high-fidelity-pcr-enzyme-mix.pdf>, 27.01.2013.
- [128] Handbuch zum PCR SuperMix High Fidelity von der Firma Invitrogen, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pcr_supermix_hifi_man.pdf, 27.01.2013.
- [129] Handbuch zur AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase von der Firma Invitrogen, http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/accuprimepfx_man.pdf, 27.01.2013.
- [130] Handbuch zur HotStarTaq® DNA Polymerase von der Firma Qiagen, www.qiagen.com/hb/hotstartaqpcr, 27.01.2013.
- [131] Handbuch zum FastStart High Fidelity PCR System von der Firma Roche, https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/04738284001_en_01.pdf, 27.01.2013.
- [132] Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., White, T. J. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, San Diego, 1990.
- [133] BLAST: Basic Local Alignment Search Tool, blast.ncbi.nlm.nih.gov/, 11.03.2013.
- [134] <http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/home>, 11.03.2013.
- [135] apiweb™, <https://apiweb.biomerieux.com/>, 11.03.2013.
- [136] Ramirez, M. S., Don, M., Merkier, A. K., Bistue, A. J. S., Zorreguieta, A., Centron, D., Tolmasky, M. E., 2010. Naturally Competent *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate as a Convenient Model for Genetic Studies. *Journal of Clinical Microbiology* 48(4):1488–1490.
- [137] Young, D. M., Parke, D., Ornston, L. N., 2005. Opportunities for Genetic Investigation Afforded by *Acinetobacter baylyi*, A Nutritionally Versatile Bacterial Species that is Highly Competent for Natural Transformation. *Annual Reviews in Microbiology* 59:519–551.
- [138] Peleg, A. Y., Jara, S., Monga, D., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Mylonakis, E., 2009. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Acinetobacter baumannii* Pathogenesis and Therapeutics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(6):2605–2609.

- [139] Kavanagh, K., Reeves, E. P., 2004. Exploiting the potential of insects for in vivo pathogenicity testing of microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 28(1):101–112.
- [140] Jander, G., Rahme, L. G., Ausubel, F. M., 2000. Positive Correlation between Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* Mutants in Mice and Insects. *Journal of Bacteriology* 182(13):3843–3845.
- [141] Mylonakis, E., Moreno, R., El Khoury, J. B., Idnurm, A., Heitman, J., Calderwood, S. B., Ausubel, F. M., Diener, A., 2005. *Galleria mellonella* as a Model System To Study *Cryptococcus neoformans* Pathogenesis. *Infection and Immunity* 73(7):3842–3850.
- [142] Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., Igarashi, K., 2005. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. *European Journal of Biochemistry* 171(1-2):45–50.
- [143] Tarr, P. I., Gordon, C. A., Chandler, W. L., 2005. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet* 365(9464):1073–1086.
- [144] Bartlett, A. V., Prado, D., Cleary, T. G., Pickering, L. K., 1986. Production of Shiga toxin and other cytotoxins by serogroups of *Shigella*. *Journal of Infectious Diseases* 154(6):996–1002.
- [145] Higgins, P. G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65(2):233–238.
- [146] Nemeč, A., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T. J. K., 2004. Long-term predominance of two pan-European clones among multi-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in the Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology* 53(2):147–153.
- [147] Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M. E., Garaizar, J., Ursing, J., Pitt, T. L., 1996. Comparison of Outbreak and Nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* Strains by Genotypic and Phenotypic Methods. *Journal of Clinical Microbiology* 34(6):1519–1525.
- [148] van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P., Verhoef, J., Brisse, S., 2004. Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Research in Microbiology* 155(2):105–112.

- [149] Turton, J. F., Gabriel, S. N., Valderrey, C., Kaufmann, M. E., Pitt, T. L., 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection* 13(8):807–815.
- [150] Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4(4):406–425.
- [151] Tomaras, A. P., Dorsey, C. W., Edelman, R. E., Actis, L. A., 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149(12):3473–3484.
- [152] Martin, E., Jäckel, U., 2011. Characterization of bacterial contaminants in the air of a duck hatchery by cultivation based and molecular methods. *Journal of Environmental Monitoring* 13(2):464.
- [153] Martin, E., Ernst, S., Lotz, G., Linsel, G., Jäckel, U., 2013. Microbial exposure and respiratory dysfunction in poultry hatchery workers. *Environmental Science: Processes & Impacts* 15(2):478.
- [154] Nishimura, Y., Ino, T., Iizuka, H., 1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38(2):209–211.
- [155] Wareham, D. W., Gordon, N. C., 2011. Modifications to CHROMagar *Acinetobacter* for improved selective growth of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Pathology* 64(2):164–167.
- [156] Akers, K. S., Barsoumian, A., Beckius, M. L., Murray, C. K., Mende, K., 2010. CHROMagar *Acinetobacter* is not selective for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*–*calcoaceticus* complex. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 67(2):209–211.
- [157] Huntington, P. G., Gosling, D. A. Evaluation of CHROMagar *Acinetobacter*TM for detection of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* in clinical specimens,
- [158] Schleicher, X., Higgins, P. G., Wisplinghoff, H., Körber-Irrgang, B., Kresken, M., Seifert, H., 2012. Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clinical Microbiology and Infection*:no.

-
- [159] Morohoshi, T., Saito, T., 1977. Beta-Lactamase and beta-lactam antibiotics resistance in *Acinetobacter anitratum* (syn: *A. calcoaceticus*). *The Journal of antibiotics* 30(11):969–973.
- [160] Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., Groot, B. de, Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J., 2003. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 53(1):28–52.
- [161] Yamamoto, S., Bouvet, P. J. M., Harayama, S., 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences : comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49:87–95.
- [162] Fox, G. E., Wisotzkey, J. D., Jurtshuk, P., 1992. How Close Is Close: 16s rRNA Sequence Identity May Not Be Sufficient To Guarantee Species Identity. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42(1):166–170.
- [163] Chan, J. Z.-M., Halachev, M. R., Loman, N. J., Constantinidou, C., Pallen, M. J., 2012. Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BMC Microbiology* 12(1):302.
- [164] Zander, E., Higgins, P. G., Fernández-González, A., Seifert, H., 2013. Detection of intrinsic blaOXA-51-like by multiplex PCR on its own is not reliable for the identification of *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Medical Microbiology*.

7 Anhang

Tabelle 7-1: Zusammenfassung der Ergebnisse bezüglich der Untersuchung von Tier- und Umweltproben auf *Acinetobacter baumannii*.

16S rRNA-Sequenzierung															
Nr.	Probenbezeichnung ¹	Herkunft	Datum der Gewinnung	ChromAgar 37 °C ²	ChromAgar 42 °C ²	SC-Agar 37 °C ³	GCG-Agar ⁴ 37 °C	rhoB-PCR	bla _{OXA-51-like} -PCR	Isolat gewonnen von	1. Treffer	Max. Ident.	2. Treffer	Max. Ident.	
1	Erdprobe	W	01.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Tiergewöhle, Erde	W	01.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Brunnen	W	01.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	-	-	CA 37 °C	<i>Achromobacter piechaudii</i> Stamm PDLQ	99%	<i>Achromobacter piechaudii</i> Stamm JXXG23	99%	-
4	Pferd, Kot	M	03.10.2012	positiv	positiv	positiv	grün	positiv	negativ	CA 37 °C	<i>A. sp. Wuba39</i>	98%	<i>A. sp. S25</i>	98%	-
5	Wachtel, Achsel	M	03.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Wachtel, Kot	M	03.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-	-	-
7	Wachtel, Schnabel	M	03.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Hase, Maul	M	03.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Hase, Kot	M	03.10.2012	negativ	negativ	positiv	grün	negativ	-	-	-	-	-	-	-
10	Hase, Kot 2	M	03.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Erpel, Schnabel	D	07.10.2012	negativ	negativ	positiv	grün	positiv	negativ	SC-Agar 37 °C	<i>A. hwoffii</i> Stamm C1S7.4	99%	<i>A. sp. MIT8B22</i>	99%	-
12	Hahn, Achsel	D	07.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Erpel, Kloake	D	07.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-	-	-
14	Hahn, Kloake	D	07.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Huhn, Achsel	D	07.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Hahn, Schnabel	D	07.10.2012	negativ	negativ	negativ	gelb	negativ	-	-	-	-	-	-	-
17	Huhn, Kot	W	09.10.2012	negativ	negativ	positiv	schwarz	negativ	-	-	-	-	-	-	-

18	Flusszulauf	W	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	negativ	CA 37 °C	<i>Pseudomonas putida</i> Stamm WSH1002	99%	<i>Pseudomonas putida</i> Stamm PHAI	99%
19	Ente, Kot	W	09.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-
20	Teich	W	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	negativ	CA 37 °C	<i>Pseudomonas putida</i> Stamm WSH 1002	98%	<i>Pseudomonas putida</i> Stamm c161	97%
21	Maulwurfhügel	W	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	positiv	CA 37 °C	<i>A. calcoacetivus</i> Stamm Ulm20	99%	<i>A. sp. NCCP 233</i>	99%
22	Steine aus Bach	S	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	negativ	CA 37 °C	<i>Pseudomonas sp. WW9</i>	99%	<i>Pseudomonas sp. MI_o1</i>	99%
23	Schlamm	S	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	negativ	CA 37 °C	<i>Stenotrophomonas sp. Rep-tet_144</i>	99%	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> Stamm GL5	99%
24	Bach	S	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
25	morsches Holz	M	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
26	Gullideckel	S	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
27	Trecker Spuren Feldweg	M	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	positiv	CA 37 °C	<i>A. calcoacetivus</i> Stamm Ulm20	100%	<i>A. calcoacetivus</i> Stamm c140	100%
28	Gestein	M	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
29	Pferd, Maul	M	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
30	umgewühltes Feld	M	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
31	Pferd, Nüstern	M	09.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
32	Schlamm aus Bach	M	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	positiv	CA 37 °C	<i>A. calcoacetivus</i> Stamm Ulm20	100%	<i>A. calcoacetivus</i> Stamm c140	100%
33	Teich	NH	11.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
34	Wassergraben	NH	11.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	negativ	-	-	-	-	-
35	Vogel, Kot	NH	11.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-

52	1465-1/2 (Huhn, Rachen)	B	24.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
53	1217 (Huhn, Choane)	B	13.09.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
54	1164-1 (Ente, Kloake)	B	23.08.2012	positiv	negativ	negativ	gelb	negativ	-	CA 37 °C	Bacterium NLAE-ZI-H388	99%	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm 40.1	99%
55	1164-2 (Ente, Kloake)	B	23.08.2012	negativ	negativ	negativ	gelb	negativ	-	-	-	-	-	-
56	1182- Halle 1 (Huhn, Rachen)	B	28.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
57	1182- Halle 1 (Huhn, Rachen)	B	28.08.2012	positiv	negativ	positiv	grün	negativ	-	CA 37 °C	<i>Stenotrophomonas</i> sp. Rep-tet_144	99%	<i>Stenotrophomonas</i> sp. S169-III-5	99%
58	1182- Halle 2 (Huhn, Rachen)	B	28.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
59	1182- Halle 2 (Huhn, Rachen)	B	28.08.2012	negativ	negativ	positiv	grün	negativ	-	-	-	-	-	-
60	1182- Halle 3 (Huhn, Rachen)	B	28.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
61	1182- Halle 3 (Huhn, Rachen)	B	28.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
62	(Legehennen Eintagsküken, Rachen)	B	07.09.2012	positiv	positiv	positiv	grün	positiv	positiv	CA 37 °C, CA 42 °C	<i>A. baumannii</i> TYTH-1	100%	<i>A. baumannii</i> Stamm KVP106	100%
63	1466-6 (Bio-Broilerküken, Choane)	B	24.10.2012	positiv	positiv	negativ	grün	negativ	-	CA 37 °C	<i>Chryseobacterium</i> sp. I_B7	99%	<i>Chryseobacterium indologenes</i> Stamm H2S10	99%
							gelb	negativ	-	CA 42 °C	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm FMA604	99%	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm FMAMOB6	99%

79	1457-Halle6 -4 (Huhn, Choane)	B	23.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
80	1457-Halle6 -3 (Huhn, Choane)	B	23.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
81	1164-48 (Ente, Kloake)	B	23.08.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-
82	1164-41 (Ente, Kloake)	B	23.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
83	1164-57 (Ente, Kloake)	B	23.08.2012	negativ	negativ	positiv	grün	negativ	-	-	-	-	-
84	1164-31 (Ente, Kloake)	B	23.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
85	1399-7 Bereich 2a (Huhn, Choane)	B	09.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-
86	1399-8 Bereich 2a (Huhn, Choane)	B	09.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-
87	1399-9 Bereich 2b (Huhn, Choane)	B	09.10.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-
88	1399-11 Bereich 2b (Huhn, Choane)	B	09.10.2012	positiv	negativ	positiv	grün	negativ	-	CA 37 °C	Chryseo- bacterium sp. I_B7	99%	Chryseo- bacterium indologenes Stamm H2S10
89	Hahn, Achsel	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
90	Henne, Achsel	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
91	Hahn, Schnabel	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
92	Hahn, Kloake	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
93	Taube, Schnabel	SU	03.11.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-
94	Henne, Schnabel	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
95	Huhn, Kot	SU	03.11.2012	negativ	negativ	positiv	grün	negativ	-	-	-	-	-
96	Vogelnest	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
97	Taube, Kot	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-
98	Henne, Kloake	SU	03.11.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-

99	1424-2 (Huhn, Rachen)	B	15.10.2012	positiv	positiv	positiv	grün	negativ	-	CA 37 °C und 42 °C	<i>Chryseobacterium</i> sp. I_B7	99%	<i>Chryseobacterium indologenes</i> Stamm H2S10	98%
100	1424-3 (Huhn, Rachen)	B	15.10.2012	positiv	positiv	positiv	grün	negativ	-	CA 37 °C und 42 °C	<i>Chryseobacterium</i> sp. I_B7	99%	<i>Chryseobacterium indologenes</i> Stamm H2S10	98%
101	1424-4 (Huhn, Nase)	B	15.10.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
102	1285 (Huhn, Rachen)	B	13.09.2012	negativ	negativ	positiv	gelb	negativ	-	-	-	-	-	-
103	1312- Halle 2 (Huhn, Trachea)	B	19.09.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
104	1312- Halle 1 (Huhn, Trachea)	B	19.09.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
105	1296-1(Huhn, Rachen)	B	17.09.2012	negativ	negativ	positiv	grün	negativ	-	-	-	-	-	-
106	1296-2 (Huhn, Rachen)	B	17.09.2012	positiv	negativ	positiv	grün	positiv	negativ	CA 37 °C	<i>A. hwoffii</i> Stamm C1S7.4	99%	<i>A. sp.</i> MIT8B22	99%
107	1296-3 (Huhn, Rachen)	B	17.09.2012	negativ	negativ	positiv	grün	positiv	negativ	SC-Agar 37 °C	<i>A. hwoffii</i> Stamm 7-2	99%	<i>A. sp.</i> Sd-18	99%
108	1169-3 (Huhn, Rachen)	B	24.08.2012	negativ	negativ	positiv	grün	negativ	-	-	-	-	-	-
109	1169-8 (Huhn, Rachen)	B	24.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
110	1169-14 (Huhn, Rachen)	B	24.08.2012	negativ	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-
111	Taube, Achsel	W	07.11.2012	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
112	Taube, Kot	W	07.11.2012	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
113	Wellensittich, Kot	W	07.11.2012	positiv	negativ	-	gelb	negativ	-	CA 37 °C	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm FUA3372	99%	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm FMA721	99%

142	1561-3 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
143	1561-4 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
144	1561-5 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
145	1529 (Rassehuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
146	1555 (Legehennen, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
147	1563-1 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	positiv	-	grün	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
148	1563-2 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
149	1563-3 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
150	1563-4 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
151	1563-5 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
152	1563-6 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
153	1563-7 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
154	1563-8 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
155	1564-1 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	positiv	-	grün	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
156	1564-2 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	positiv	-	grün	positiv	negativ	CA 37 °C	<i>A. lwoffii</i> Stamm 7-2	99%	<i>A. sp.</i> TPR15	99%	-	-	-	-
157	1564-3 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
158	1564-4 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	positiv	-	grün	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
159	1564-5 (Biohuhn, Kot)	B	-	-	positiv	-	grün	positiv	negativ	CA 37 °C	<i>A. sp.</i> S25	99%	<i>A. lwoffii</i> Stamm W2-2	99%	-	-	-	-

190	1549 (Rassehuhn, Auge)	B	-	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
191	1451-4 (Rassehuhn, Rachen)	B	-	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 42°C	<i>Chryseobacterium</i> sp. I_B7	99%	<i>Chryseobacterium indologenes</i> Stamm H2S10	98%	-	-	-	-
192	1445 (Biohuhn, Leber)	B	-	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 42 °C	<i>Chryseobacterium</i> sp. I_B7	99%	<i>Chryseobacterium indologenes</i> Stamm H2S10	98%	-	-	-	-
193	1470-5 (Biohuhn, Choane)	B	-	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 37 °C	<i>Chryseobacterium</i> sp. I_B7	99%	<i>Chryseobacterium indologenes</i> Stamm H2S10	98%	-	-	-	-
194	1554-5 (Legehennen, Rachen)	B	-	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 37 °C	<i>Myroides odoratimimus</i> Stamm 1CK58	99%	<i>Myroides odoratimimus</i> Stamm YCT106	99%	-	-	-	-
195	1542 (Biohuhn, Bursa)	B	-	-	negativ	negativ	-	grün	negativ	-	CA 42 °C	<i>Pseudomonas</i> sp. VTAE184	99%	<i>Pseudomonas putida</i>	99%	-	-	-	-
196	1499 (Ente, Choane)	B	-	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 42°C	<i>Pseudomonas</i> sp. L-6(2012)	99%	<i>Pseudomonas mendocina</i> Stamm PMLR-1	99%	-	-	-	-
197	1456 (Wellensittich, Rachen)	B	-	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
198	1508 (Katze, After)	B	-	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
199	1452 (Rassehuhn, Choane)	B	-	-	positiv	positiv	-	gelb	negativ	-	CA 42 °C	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm FMA604	99%	<i>Enterococcus faecalis</i> Stamm FMAMOB6	99%	-	-	-	-

200	1548-6 (Biohuhn, Rachen)	B	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 42 °C	<i>Chryseo-bacterium</i> sp. I B7	<i>Chryseo-bacterium</i> sp. TFB	99%	99%
201	1494 (Biohuhn, Choane)	B	-	positiv	positiv	-	grün	negativ	-	CA 42°C	<i>Alcaligenes faecalis</i> Stamm SS-1	<i>Alcaligenes faecalis</i> Stamm MS11	99%	99%
202	1529 (Rassehuhn, Rachen)	B	-	negativ	positiv	-	grün	positiv	positiv	CA 42°C	<i>A. baumannii</i> Isolat 14	<i>A. baumannii</i> Stamm NBRAJG89	99%	99%
203	1559 (Katze, After)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
204	1448 (Pute, Choane)	B	-	positiv	negativ	-	grün	negativ	-	-	-	-	-	-
205	1444 (Huhn, Kot)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
206	1478-2 (Biohuhn, Bursa)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
207	1478-3 (Biohuhn, Luftsack)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
208	1478-7 (Biohuhn, Gelenk)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
209	1478-8 (Biohuhn, Synovia)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
210	1478-9 (Biohuhn, Knochenmark)	B	-	negativ	negativ	-	-	-	-	-	-	-	-	-
211	1478-Pool (Biohuhn, Rachen)	B	-	positiv	positiv	-	grün	positiv	negativ	CA 42°C	<i>A. sp.</i> MSG8	<i>A. calcoaceticus</i> Stamm EU99	99%	99%

A., *Acinetobacter*; B, Böhland; CA, ChromAgar *Acinetobacter*; D, Darlingerode; GCG-Agar, Galle-Chrysoidin-Glycerol-Agar; Ident., Identität; M, Minsleben; Max., Maximale; NH, Nationalpark Harz; Nr., Nummer; O, Obergurgl; PCR, Polymerase-Kettenreaktion; S, Silstedt; SC-Agar, Simmons-Citrat-Agar; sp., Spezies; SU, Rhein-Sieg-Kreis; W, Wernigerode.

¹Die Nummern bei den Probenbezeichnungen von Frau Dr. Böhland kennzeichnen die fortlaufende Eingangsnummer im *Lebensmittel-Qualitäts-Sicherungs-labor*. Proben, bei denen die Anfangsnummer identisch ist, stammen aus derselben Geflügelherde.

²Das Wachstum von roten bzw. rötlichen Kolonien wurde als positiv gewertet, während hingegen blaue Kolonien, die auf ChromAgar wuchsen, als negativ gewertet wurden

³Gewachsene Kolonien mit und ohne Blaufärbung des Mediums wurden als positiv gewertet.

⁴Farbe der auf GCG-Agar gewachsenen Kolonien.

Tabelle 7-2: Ergebnisse des API 20 NE Testsystems nach 48 h.

Tests	Aktiver Bestandteil im Testsubstrat	Reaktionen/ Enzyme	<i>A. baumannii</i> / <i>A. calcoaceticus</i> ¹	X ²	Y ³
NO ₃	Kaliumnitrat	Nitratreduktion	2 %	–	+
TRP	Tryptophan	Indolnachweis	0 %	–	–
GLU	Glucose	Fermentation	8 %	–	+
ADH	Arginin	Arginin- Dihydrolase	0 %	–	–
URE	Harnstoff	Urease	1 %	–	–
ESC	Äsculin	Hydrolyse (β- Glucosidase)	1 %	–	–
GEL	Gelatine und Tusche	Hydrolyse (Protease)	1 %	–	–
PNPG	p-Nitro-Phenyl-β-D- Galactopyranosid	B-Galactosidase	0 %	–	–
GLU	Glucose	Assimilation	67 %	+	–
ARA	Arabinose	Assimilation	70 %	+	–
MNE	Mannose	Assimilation	1 %	–	–
MAN	Mannit	Assimilation	1 %	–	–
NAG	N-Acetylglucosamin	Assimilation	1 %	–	–
MAL	Maltose	Assimilation	1 %	–	–
GNT	Gluconat	Assimilation	20 %	–	–
CAP	Caprat	Assimilation	98 %	+	–
ADI	Adipat	Assimilation	80 %	+	+
MLT	Malat	Assimilation	100 %	+	+
CIT	Citrat	Assimilation	99 %	+	–
PAC	Phenylacetat	Assimilation	87 %	+	–
OX	Tetramethyl-p- Phenylen-Diamin	Cytochrom-c- Oxidase	0 %	–	–
T-Wert ⁴	-	-	-	1,0	0,13
ID-Wert ⁵	-	-	-	99,9 %	62,1%
Spezies	-	-	-	<i>A.</i> <i>baumannii</i> / <i>A.</i> <i>calcoaceticus</i>	<i>Pasteurella</i> spp.

A., *Acinetobacter*; h, Stunden; +, positiv; –, negativ.

¹Prozentangaben der positiven Reaktionen von *A. baumannii*/*A. calcoaceticus*-Referenzstämmen. (erhalten aus der Identifizierungstabelle des API 20 NE-Testsystems).

²X steht für alle *A. baumannii*-Isolate, die aus den Proben 62, 65, 66, 117, 124 und 202 gewonnen wurden (siehe Tabelle 7-1).

³Y steht für das *Acinetobacter*-Isolat, das aus Probe 4 erhalten wurde (siehe Tabelle 7-1).

⁴ID-Wert bezeichnet die Identifizierungswahrscheinlichkeit. Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der das Reaktionsprofil einer in der Datenbank enthaltenen Bakterienspezies zugeordnet werden kann.

⁵T-Wert bezeichnet die Identifizierungssicherheit. Dieser Wert repräsentiert den Abstand zur nächstähnlichen Spezies.

Tabelle 7-3: Ergebnisse des API 20 E Testsystems nach 24 h.

Tests	Aktiver Bestandteil im Testsubstrat	Reaktionen/ Enzyme	<i>A. baumannii</i> / <i>A. calcoaceticus</i> ¹	X ²	Y ³
ONPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	β-Galaktosidase	0 %	–	–
<u>ADH</u>	L-Arginin	Arginin-Dihydrolase	0 %	–	–
<u>LDC</u>	L-Lysin	Lysin-Decarboxylase	0 %	–	–
<u>ODC</u>	L-Ornithin	Ornithin-Decarboxylase	0 %	–	–
<u> CIT </u>	Trinatriumcitrat	Citratverwertung	51 %	–	–
<u>H₂S</u>	Natriumthio-sulfat	H ₂ S-Bildung	0 %	–	–
<u>URE</u>	Harnstoff	Urease	1 %	–	–
TDA	L-Tryptophan	Tryptophan-Desaminase	0 %	–	–
IND	L-Tryptophan	Indolbildung	0 %	–	–
<u> VP </u>	Natriumpyruvat	Acetoinbildung	5 %	–	–
<u> GEL </u>	Gelatine (bovin)	Gelatinase	5 %	–	–
GLU	D-Glucose	Fermentation/ Oxidation	99 %	+	–
MAN	D-Mannit	Fermentation/ Oxidation	0 %	–	–
INO	Inosit	Fermentation/ Oxidation	0 %	–	–
SOR	D-Sorbit	Fermentation/ Oxidation	0 %	–	–
RHA	L-Rhamnose	Fermentation/ Oxidation	0 %	–	–
SAC	D-Saccharose	Fermentation/ Oxidation	0 %	–	–
MEL	D-Melibiose	Fermentation/ Oxidation	99 %	+	–
AMY	Amygdalin	Fermentation/ Oxidation	1 %	–	–
ARA	L-Arabinose	Fermentation/ Oxidation	99 %	+	+
OX	Tetramethyl-p-Phenylen-Diamin	Cytochrom-c-Oxidase	0 %	–	–
T-Wert ⁴	-	-	-	1,0	0,84
ID-Wert ⁵	-	-	-	94,8 %	81,2 %
Spezies	-	-	-	<i>A. baumannii</i> / <i>A. calcoaceticus</i>	<i>Pseudo- monas oryzihabitans</i>

A., *Acinetobacter*; h, Stunden; +, positiv; –, negativ.

¹Prozentangaben der positiven Reaktionen von *A. baumannii*/*A. calcoaceticus*-Referenzstämmen (erhalten aus der Identifizierungstabelle des API 20 E-Testsystems).

²X steht für alle *A. baumannii*-Isolate, die aus den Proben 62, 65, 66, 117, 124 und 202 gewonnen wurden (siehe Tabelle 7-1).

³Y steht für das *Acinetobacter*-Isolat, das aus Probe 4 erhalten wurde (siehe Tabelle 7-1).

⁴ID-Wert bezeichnet die Identifizierungswahrscheinlichkeit. Dieser Wert gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der das Reaktionsprofil einer in der Datenbank enthaltenen Bakterienspezies zugeordnet werden kann.

⁵T-Wert bezeichnet die Identifizierungssicherheit. Dieser Wert repräsentiert den Abstand zur nächstähnlichen Spezies.

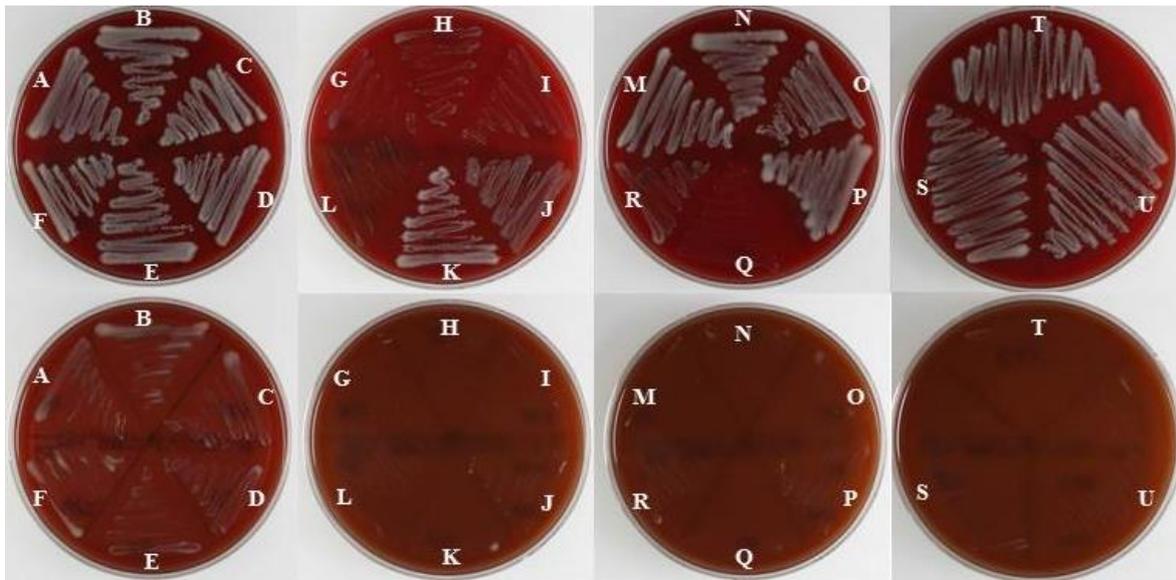


Abbildung 7-1: Wachstumsvergleich von *Acinetobacter*-Isolaten bei Inkubationstemperaturen von 37 °C und 44 °C.

A: Isolat Probe 202; **B:** Isolat Probe 124 (*A. baumannii*); **C:** Isolat Probe 117; **D:** Isolat Probe 66; **E:** Isolat Probe 65; **F:** Isolat Probe 62; **G:** Isolat Probe 159; **H:** Isolat Probe 156; **I:** Isolat Probe 139; **J:** Isolat Probe 124 (*A. calcoaceticus*); **K:** Isolat Probe 107; **L:** Isolat Probe 106; **M:** Isolat Probe 43; **N:** Isolat Probe 32; **O:** Isolat Probe 27; **P:** Isolat Probe 21; **Q:** Isolat Probe 11; **R:** Isolat Probe 4; **S:** Isolat Probe 187; **T:** Isolat Probe 211; **U:** Isolat Probe 188; oben Inkubationstemperatur von 37 °C; unten Inkuabtionstemperatur von 44 °C.

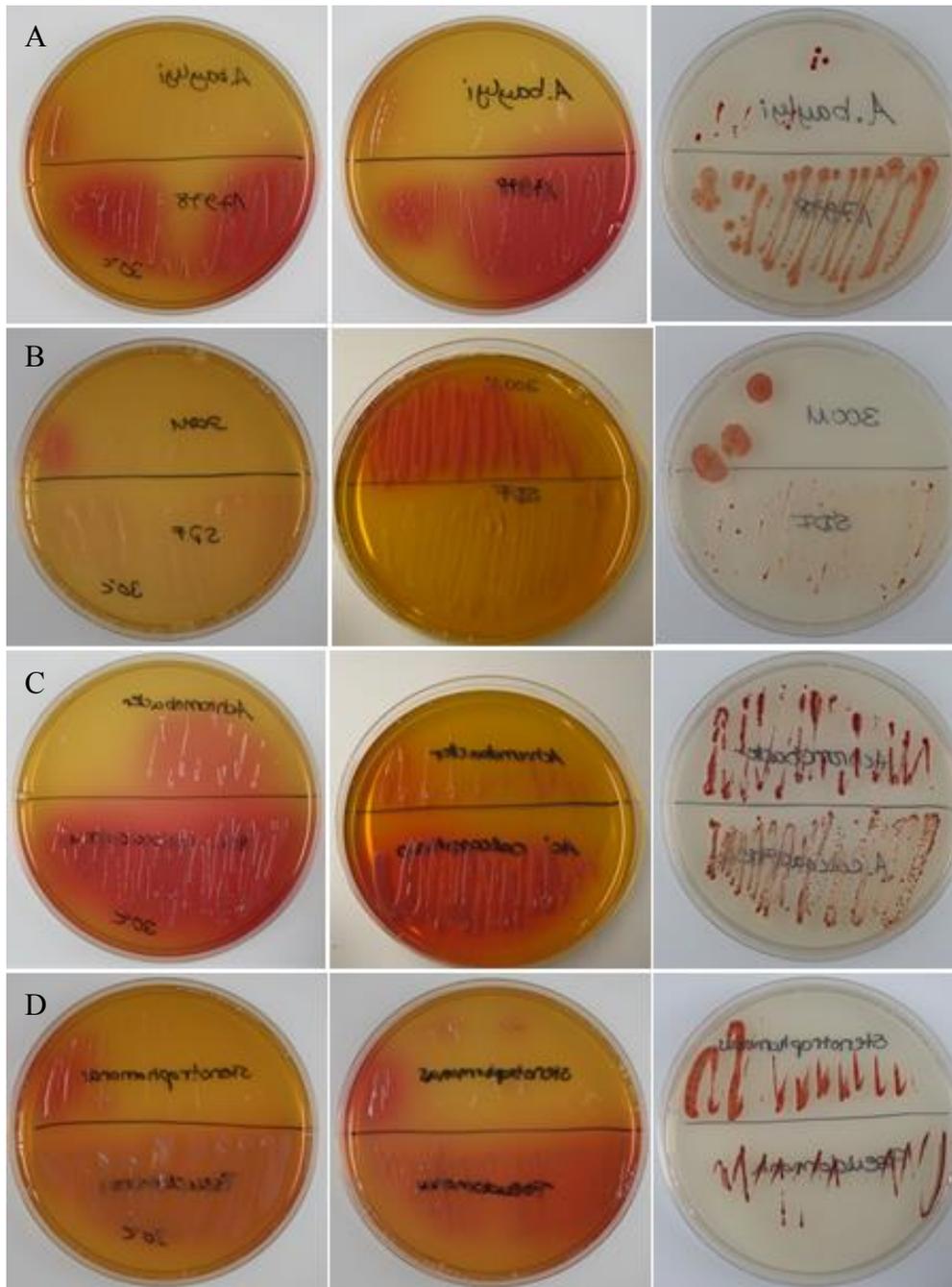


Abbildung 7-2: Kultivierung von Referenzstämmen auf Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) und ChromAgar *Acinetobacter* (CA).

A: links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, oben *A. baylyi*, unten *A. baumannii* ATCC 17978; **B:** links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, oben *A. baumannii* 30011, unten *A. baumannii* SDF; **C:** links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, oben *Achromobacter*, unten *A. calcoaceticus*; **D:** links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, oben *Stenotrophomonas maltophilia*, unten *Pseudomonas aeruginosa*.

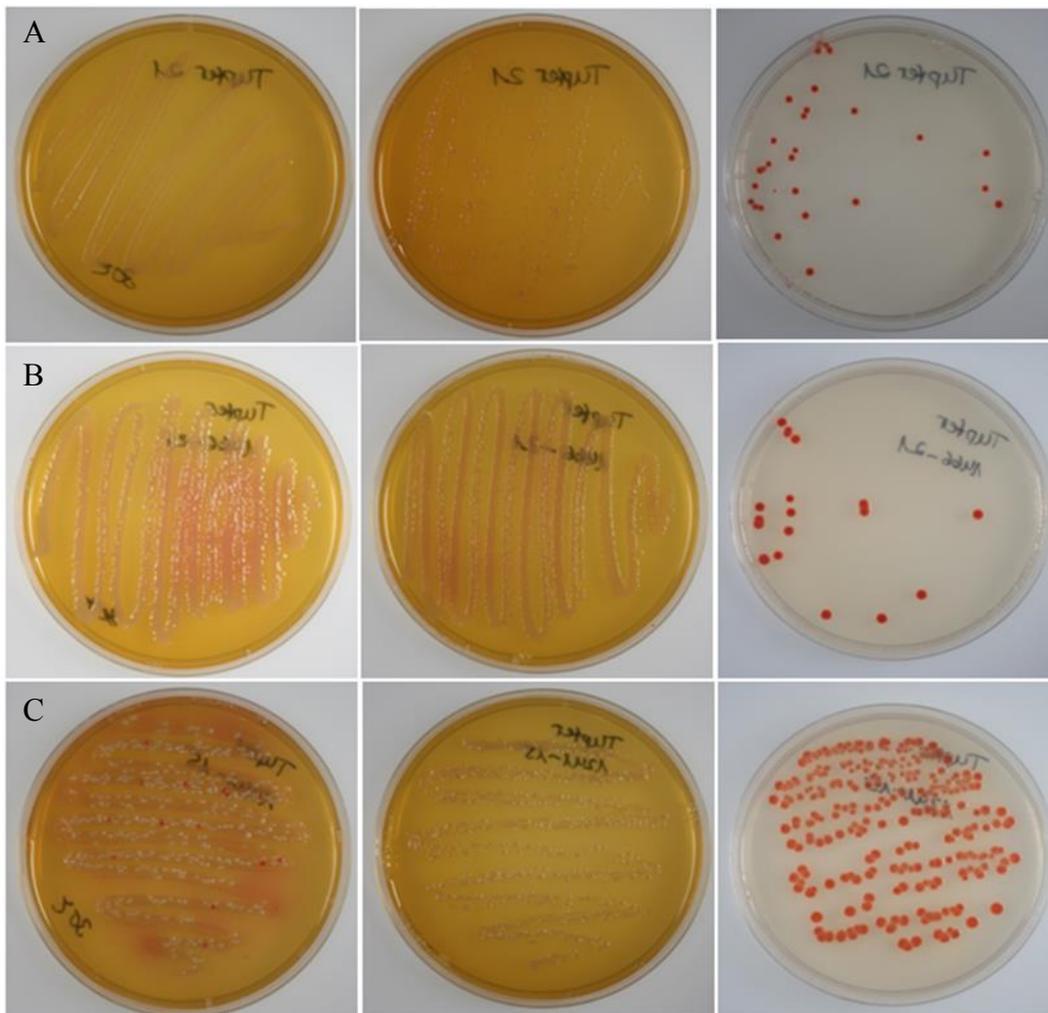


Abbildung 7-3: Isolierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben mittels Leeds *Acinetobacter* Medium (LAM) und ChromAgar *Acinetobacter* (CA).

A: links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, Probe 21; **B:** links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, Probe 65; **C:** links LAM bei Inkubation von 30 °C, mitte LAM bei Inkubation von 37 °C, rechts CA bei Inkubation von 37 °C, Probe 62.

Tabelle 7-4: Zusammenfassung der Ergebnisse des Motilitäts-Assays.

<i>Acinetobacter</i> -Isolat	Motilität auf der Agaroseoberfläche	Motilität an der Interphase
Probe 4	positiv	positiv
Probe 11	positiv	negativ
Probe 21	positiv	positiv
Probe 27	positiv	positiv
Probe 32	positiv	positiv
Probe 43	positiv	positiv
Probe 62	positiv	positiv
Probe 65	positiv	positiv
Probe 66	positiv	positiv
Probe 106	negativ	negativ
Probe 107	negativ	negativ
Probe 117	positiv	positiv
Probe 124 (<i>A. baumannii</i>)	positiv	positiv
Probe 124 (<i>A. calcoaceticus</i>)	positiv	positiv
Probe 139	negativ	negativ
Probe 156	positiv	negativ
Probe 159	positiv	negativ
Probe 187	positiv	positiv
Probe 188	positiv	positiv
Probe 202	positiv	positiv
Probe 211	positiv	positiv

Tabelle 7-5: 16S rRNA-Gen-Sequenzähnlichkeiten [%] für den *Acinetobacter* sp. nov. Stamm 114 und nahe verwandte Spezies (erhalten durch die DSMZ).

Stämme	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.			
<i>A. sp</i> nov strain 114 (ID 13-72) (=Isolat aus Probe 4)	-																															
1. <i>A. calcoaceticus</i> NCCB 22016 ^T	97.4	-																														
2. <i>A. beijerinckii</i> NIPH 838 ^T	97.6	97.7	-																													
3. <i>A. baylyi</i> B2 ^T	95.9	97.0	96.2	-																												
4. <i>A. baumannii</i> DSM 30007 ^T	96.5	97.3	97.4	97.3	-																											
5. <i>A. bouvetii</i> 4B02 ^T	97.1	96.8	98.0	95.7	96.6	-																										
6. <i>A. bereziniae</i> ATCC 17924 ^T	96.3	96.8	97.6	97.0	97.8	97.1	-																									
7. <i>A. brisonii</i> SYN5-8 ^T	97.9	98.4	97.4	96.5	97.2	96.8	97.2	-																								
8. <i>A. gerneri</i> 9A01 ^T	94.1	94.5	95.2	95.2	95.4	95.2	96.4	94.5	-																							
9. <i>A. guillouiae</i> DSM 590 ^T	96.5	96.9	97.7	96.9	97.6	97.3	99.5	97.0	97.0	-																						
10. <i>A. gyllenbergii</i> RUH 422 ^T	96.9	97.7	98.7	95.7	97.0	97.8	97.6	97.5	95.2	97.7	-																					
11. <i>A. haemolyticus</i> DSM 6962 ^T	98.0	98.1	99.3	96.2	97.7	98.0	97.5	97.8	95.2	97.6	98.4	-																				
12. <i>A. indicus</i> A648 ^T	97.2	96.9	96.7	96.5	97.3	95.9	97.0	97.0	94.2	97.0	96.3	96.6	-																			
13. <i>A. junii</i> DSM 6964 ^T	96.2	97.0	97.4	97.0	99.0	96.9	97.8	97.0	95.2	97.6	97.6	97.2	97.7	-																		
14. <i>A. johnsonii</i> ATCC 17909 ^T	97.9	97.7	99.0	96.1	97.3	98.4	98.0	97.7	95.4	98.1	98.8	99.1	96.8	97.7	-																	
15. <i>A. hwoffii</i> DSM 2403 ^T	98.3	98.0	98.3	97.1	96.8	97.0	97.1	97.4	94.7	97.3	97.4	97.9	97.3	96.8	98.0	-																
16. <i>A. nosocomialis</i> RUH 2376 ^T	97.2	99.1	97.3	97.0	98.0	96.6	96.8	98.0	94.5	96.9	97.5	98.0	97.2	97.1	97.4	97.7	-															
17. <i>A. parvus</i> LUH4616 ^T	96.5	96.9	97.7	97.0	97.8	96.6	97.3	96.9	94.8	97.3	97.6	97.7	97.0	98.0	97.8	96.7	96.4	-														
18. <i>A. pittii</i> LMG 1035 ^T	97.6	99.7	97.7	97.3	97.6	96.9	97.0	98.6	94.8	97.1	97.8	98.4	97.0	97.0	97.8	97.9	99.5	97.0	-													
19. <i>A. radioresistens</i> DSM 6976 ^T	97.3	96.9	97.0	96.6	97.4	96.1	96.4	97.3	94.3	96.7	96.4	96.7	98.0	97.5	96.8	97.1	97.0	96.8	97.0	-												
20. <i>A. radis</i> G30 ^T	96.3	95.9	96.5	96.5	97.0	96.2	97.3	97.1	94.8	97.5	96.3	96.3	96.6	97.4	96.9	96.4	95.6	97.2	96.0	97.0	-											
21. <i>A. schindleri</i> LUH5832 ^T	97.7	97.2	97.7	95.2	97.1	97.5	96.9	97.7	94.6	97.1	97.6	98.3	96.3	96.9	98.3	96.8	97.0	96.9	97.4	96.5	96.6	-										
22. <i>A. soli</i> B1 ^T	96.5	97.8	96.9	98.7	98.0	95.9	98.0	97.3	95.0	97.8	96.4	96.8	97.5	97.7	96.9	97.7	97.7	97.7	98.0	97.0	97.2	96.1	-									
23. <i>A. tandoii</i> 4N13 ^T	96.4	96.3	97.6	96.0	96.4	97.0	97.0	96.4	95.7	97.3	97.0	97.6	96.2	96.6	97.5	96.3	95.9	97.2	96.3	96.0	96.2	96.5	96.4	-								
24. <i>A. ijernbergiae</i> 7N16 ^T	95.9	96.6	97.0	95.9	96.0	96.4	95.9	96.6	94.1	95.9	97.3	97.4	95.0	95.6	97.0	95.9	96.6	96.8	97.0	95.6	94.8	96.3	95.5	96.5	96.5	-						

26. <i>A.townieri</i> AB1110 ^T	94.1	94.8	94.7	96.3	95.9	93.9	94.9	94.7	92.8	94.7	94.2	94.8	95.9	95.9	94.5	95.2	95.2	95.3	95.0	95.5	94.7	94.3	96.0	94.3	93.8	-	
27. <i>A. ursingii</i> LUH 3792 ^T	96.4	97.7	97.9	96.4	97.1	96.5	97.4	97.1	95.2	97.5	97.3	97.7	96.3	97.0	97.3	97.1	97.1	96.6	97.7	96.4	96.6	96.3	97.0	96.3	95.6	94.3	-
28. <i>A. venetianus</i> ATCC 31012 ^T	96.8	97.3	98.0	97.6	98.4	96.5	97.5	97.2	94.9	97.3	97.6	97.3	97.1	98.6	97.3	97.5	97.0	97.7	97.3	97.6	97.7	96.9	98.3	96.6	95.6	95.8	97.2
29. <i>P. immobilis</i> ATCC 43116 ^T	89.0	88.4	89.1	88.1	88.7	88.3	88.5	88.8	86.6	88.8	88.4	88.9	89.0	88.6	88.9	89.5	88.7	87.9	88.4	88.8	88.6	88.1	88.2	87.9	87.4	87.4	88.1

A. Acinetobacter; P., Psychrobacter.

1	TTTGATCCTG	GTCAGATTG	AACGCTGGCG	GCAGGCTTAA	CACATGCAAG	TCGAGCGGGG
61	GAAGGTAGCT	TGCTACTGGA	CCTAGCGGCG	GACGGGTGAG	TAATGCTTAG	GAATCTGCCT
121	ATTAGTGGGG	GACAAAGTIT	CGAAAGGGAC	GCTAATACCG	CATACGCCCT	ACGGGGGAAA
181	GCAGGGGATC	TTCGGACCTT	GCCTAATAG	ATGAGCCTAA	GTCGGATTAG	CTAGTTGGTG
241	GGGTAAGGC	CTACCAAGGC	GACGATCTGT	AGCGGGTCTG	AGAGGATGAT	CCGCCACACT
301	GGGACTGAGA	CACGGCCCGAG	ACTCCTACGG	GAGGCAGCAG	TGGGGAATAT	TGGACAATGG
361	CGCAAAGCCT	GATCCAGCCA	TGCCCGCTGT	GTAAGAAGG	CCTTTTGGTT	GTAAGACACT
421	TTAAGCGGAG	AGGAGGCTAC	TTGGATTAAT	ACTCTGAGAT	AGTGGACGTT	ACTCCAGAAA
481	TAAGCACCCG	CTAACTCTGT	GCCAGCAGCC	CGCGTAATAC	AGAGGGTGCA	AGCGTTAATC
541	GGAITTACTG	GGCGTAAAGC	GTGGTAGGT	GGCCAAITTA	GTCAAATGTG	AAATCCCTGA
601	GCITTAACITTA	GGAAITGCAT	TCGATACTGG	TTGGCTAGAG	TATGGGAGAG	GATGGTAGAA
661	TTCCAGGTGT	AGCGTGAAA	TGCGTAGAGA	TCTGGAGGAA	TACCGATGGC	GAAGGCAGCC
721	ATCTGGCCTA	ATACTGACAC	TGAGGTACGA	AAGCATGGGG	AGCAAACAGG	ATTAGATACC
781	CTGGTAGTCC	ATGCCGTAAA	CGATGTCTAC	TAGCCGTTGG	GGCCTTTGAG	GCTTTAGTGG
841	CGCAGCTAAC	CGGATAAGTA	GACCGCCTGG	GGAGTACGGT	CGCAAGACTA	AAACTCAAAT
901	GAATTGACCG	GGGCCCCGAC	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	TAAATTCGATG	CAACGGGAAAG
961	AACCTTACCT	GGTCTTGACA	TACAGAGAAC	TTTCCAGAGA	TGGATTGGTG	CCTTCGGGAA
1021	CTCTGATACA	GGTGTGCAT	GGCTGTGTC	AGCTCGTGTG	GTGAGATGTT	GGGTTAAGTC
1081	CCGCAACGAG	CGCAACCCTT	TTCTTATTT	GCCAGCGGGT	TATGCCGGGA	ACTTTAAGGA
1141	TACTGCCAGT	GACAAACTGG	AGGAAAGGCG	GGACGACGTC	AAGTCATCAT	GGCCCTTACG
1201	ACCAGGGCTA	CACACGTGCT	ACAATGGTGC	GTACAAAAGG	TTGCTACCTC	CGCAGAGGAT
1261	GCTAATCTCA	AAAAGCCGAT	CGTAGTCCGG	ATTGGAGTCT	GCAACTCGAC	TCCATGAAGT
1321	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGAAATG	CCGCGGTGAA	TACGTTCCCG	GGCCTTGTAC
1381	ACACGCCCGG	TCACACCATG	GGAGTTTGT	GCACCAAGAG	TAGGTAGTCT	AACCCAAAGG
1441	AGGACGCTTA	CCACGGTGTG	GCCGATGACT	GGGGTGAAGT	CGTAACAAGG	TAGCCGTAGG
1501	GGAACTGCG	GCTGGATCAC	CTC			

Abbildung 7-4: Vollständige Nukleotidsequenz des 16S rRNA-Gens von *Acinetobacter* sp. nov. Stamm 114 (erhalten durch die DSMZ).

Tabelle 7-6: Übersicht über die für die PCR-Etablierung verwendeten Bakterienstämme mit ihrer Herkunft, epidemiologischen Gruppe (sofern verfügbar) und ihren PCR-Ergebnissen.

Nr.	Bakterienstamm ¹	Herkunft (Land)	Epidemiologische Gruppe ²	AB_UNI-PCR	bla _{OXA-51-like} -PCR
1	ATCC 17978 (<i>A. b.</i>)	ATCC	-	positiv	positiv
2	<i>A. baylyi</i> ADP1 (<i>A.</i>)	ATCC	-	negativ	negativ
3	ATCC 19606 ^T (<i>A. b.</i>)	ATCC	-	positiv	positiv
4	07-016 (<i>A. b.</i>)	Deutschland	-	positiv	positiv
5	07-028 (<i>A. b.</i>)	Deutschland	-	positiv	positiv
6	07-029 (<i>A. b.</i>)	Deutschland	-	positiv	positiv
7	07-032 (<i>A. b.</i>)	Deutschland, wahrscheinlich aus Rumänien importiert	-	positiv	positiv
8	07-034 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
9	07-037 (<i>A. b.</i>)	Deutschland, wahrscheinlich aus Kroatien importiert	-	negativ	positiv
10	07-038 (<i>A. b.</i>)	Deutschland, wahrscheinlich aus Kamerun importiert	-	positiv	positiv
11	07-095 (<i>A. b.</i>)	Deutschland	-	positiv	positiv
12	07-097 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
13	07-099 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
14	07-100 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
15	07-101 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
16	07-102 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
17	07-103 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
18	07-104 (<i>A. b.</i>)	Deutschland	-	positiv	positiv
19	07-105 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
20	07-107 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
21	07-108 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
22	07-110 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
23	07-111 (<i>A. b.</i>)	Deutschland	-	positiv	positiv
24	07-112 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
25	07-113 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
26	07-114 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ
27	07-116 (<i>A.</i>)	Deutschland	-	negativ	negativ

28	07-156 (A. b.)	Deutschland, wahrscheinlich aus Ägypten importiert	-	positiv	positiv
29	07-161 (A. b.)	Deutschland, wahrscheinlich aus Serbien importiert	-	positiv	positiv
30	09-013 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
31	09-015 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
32	09-018 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
33	09-022 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
34	09-023 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
35	09-024 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
36	09-025 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
37	09-039 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
38	09-046 (A. b.)	Deutschland, wahrscheinlich aus Ägypten importiert	-	positiv	positiv
39	10-092 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
40	10-095 (A. b.)	Deutschland	-	negativ	positiv
41	10-096 (A. b.)	Deutschland	-	positiv	positiv
42	BMBF 18 (A. b.)	USA	IC 3	positiv	positiv
43	BMBF 28 (A. b.)	Polen	IC 4	positiv	positiv
44	BMBF 34 (A. b.)	Deutschland	IC 1	positiv	positiv
45	BMBF 40 (A. b.)	Lettland	IC 7	positiv	positiv
46	BMBF 49 (A. b.)	Pakistan	IC 1	positiv	positiv
47	BMBF 59 (A. b.)	Spanien	IC 3	positiv	positiv
48	BMBF 60 (A. b.)	Spanien	IC 8	positiv	positiv
49	BMBF 83 (A. b.)	Spanien	IC 1	positiv	positiv
50	BMBF 93 (A. b.)	Spanien	IC 5	positiv	positiv
51	BMBF 134 (A. b.)	Türkei	IC 4	positiv	positiv
52	BMBF 139 (A. b.)	Türkei	IC 8	positiv	positiv
53	BMBF 142 (A. b.)	Türkei	IC 8	positiv	positiv
54	BMBF 206 (A. b.)	USA	IC 3	positiv	positiv
55	BMBF 232 (A. b.)	Argentinien	IC 5	positiv	positiv
56	BMBF 247 (A. b.)	Argentinien	IC 4	positiv	positiv
57	BMBF 258 (A. b.)	Südafrika	IC 3	positiv	positiv
58	BMBF 262 (A. b.)	USA	IC 5	positiv	positiv
59	BMBF 320 (A. b.)	Chile	IC 4	positiv	positiv
60	BMBF 342 (A. b.)	Frankreich	IC 8	positiv	positiv

61	BMBF 344 (A. b.)	Indien	IC 4	positiv	positiv
62	BMBF 345 (A. b.)	Indien	IC 1	positiv	positiv
63	BMBF 355 (A. b.)	Schweiz	IC 7	positiv	positiv
64	BMBF 384 (A. b.)	USA	IC 2	positiv	positiv
65	BMBF 394 (A. b.)	Griechenland	IC 1	positiv	positiv
66	BMBF 399 (A. b.)	Südafrika	IC 2	positiv	positiv
67	BMBF 417 (A. b.)	Mexico	IC 7	positiv	positiv
68	BMBF 425 (A. b.)	Kolumbien	IC 7	positiv	positiv
69	BMBF 437 (A. b.)	Kolumbien	IC 5	positiv	positiv
70	BMBF 440 (A. b.)	Deutschland	IC 5	positiv	positiv
71	BMBF 441 (A. b.)	Taiwan	IC 2	positiv	positiv
72	BMBF 446 (A. b.)	Honduras	IC 6	positiv	positiv
73	BMBF 448 (A. b.)	Honduras	IC 6	positiv	positiv
74	BMBF 449 (A. b.)	Honduras	IC 6	positiv	positiv
75	BMBF 450 (A. b.)	Honduras	IC 6	positiv	positiv
76	BMBF 456 (A. b.)	Australien	IC 2	positiv	positiv
77	BMBF 459 (A. b.)	Südkorea	IC 8	negativ	positiv
78	BMBF 468 (A. b.)	Italien	IC 6	positiv	positiv
79	BMBF 483 (A. b.)	USA	IC 3	positiv	positiv
80	BMBF 509 (A. b.)	Spanien	IC 2	positiv	positiv
81	BMBF 368I (A. b.)	Venezuela	IC 7	positiv	positiv
82	Isolat Probe 4 (A.)	Deutschland, Pferdekot	-	negativ	negativ
83	Isolat Probe 11 (A.)	Deutschland, Schnabel von Erpel	-	negativ	negativ
84	Isolat Probe 21 (A.)	Deutschland, Maulwurfhügel	-	negativ	negativ
85	Isolat Probe 27 (A.)	Deutschland, Treckerspuren auf einem Feldweg	-	negativ	negativ
86	Isolat Probe 32 (A.)	Deutschland, Schlamm aus einem Bach	-	negativ	negativ
87	Isolat Probe 43 (A.)	Österreich, Pferdekot	-	negativ	negativ
88	Isolat Probe 62 (A. b.)	Deutschland, Rachen von Legehennen-Eintagsküken	-	positiv	positiv
89	Isolat Probe 65 (A. b.)	Deutschland, Choane von Bio-Broilerküken	-	positiv	positiv
90	Isolat Probe 66 (A. b.)	Deutschland, Choane von Bio-Broilerküken	-	positiv	positiv

91	Isolat Probe 106 (A.)	Deutschland, Rachen von Huhn	-	negativ	negativ
92	Isolat Probe 107 (A.)	Deutschland, Rachen von Huhn	-	negativ	negativ
93	Isolat Probe 117 (A. b.)	Deutschland, Choane von Bio-Broilerküken	-	positiv	positiv
94	Isolat Probe 124 (A. b.)	Deutschland, Rachen von Legehennen-Eintagsküken	-	positiv	positiv
95	Isolat Probe 124 (A.)	Deutschland, Rachen von Legehennen-Eintagsküken	-	negativ	negativ
96	Isolat Probe 139 (A.)	Deutschland, Kot von Biohuhn	-	negativ	negativ
97	Isolat Probe 156 (A.)	Deutschland, Kot von Biohuhn	-	negativ	negativ
98	Isolat Probe 159 (A.)	Deutschland, Kot von Biohuhn	-	negativ	negativ
99	Isolat Probe 187 (A.)	Deutschland, Blutkuchen von Legehennen	-	negativ	negativ
100	Isolat Probe 188 (A.)	Deutschland, Blutkuchen von Legehennen	-	negativ	negativ
101	Isolat Probe 202 (A. b.)	Deutschland, Rachen von Huhn	-	positiv	positiv
102	Isolat Probe 211 (A.)	Deutschland, Rachen von Biohuhn	-	negativ	negativ

A., *Acinetobacter*-Isolat (aber kein *A. baumannii*); *A. b.*, *Acinetobacter baumannii*-Isolat; *ATCC*, American Type Culture Collection; *BMBF*, Bundesministerium für Bildung und Forschung; *Nr.*, Nummer; *PCR*, Polymerase-Kettenreaktion; *IC*, internationale klonale Linie.

¹Bakterienstämme von Nr. 4-41 sind Patientenisolat, die durch das Robert Koch-Institut zur Verfügung gestellt wurden. Die Stammbezeichnung entspricht hierbei dem Jahr der Einsendung und der laufenden Eingangsnummer im Labor. Bakterienstämme von Nr. 42-81 sind weitere Patientenisolat, die durch Dr. Higgins (*Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Universität Köln*) bereitgestellt wurden. Bakterienstämme von Nr. 82-102 wurden in der vorliegenden Arbeit aus Tier- und Umweltproben isoliert. (siehe Tabelle 7-1)

²Die angegebenen epidemiologischen Gruppen sind in Übereinstimmung mit den weltweiten klonalen Linien (WW 1 – WW 8) von Higgins *et al.*^[145] In den IC 1 – IC 3 sind entsprechend die Vertreter der europäischen Klone I – III mit inbegriffen.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit

Isolierung und Charakterisierung von *Acinetobacter* spp. aus Tier- und Umweltproben

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Wernigerode, 2. April 2013