

Diplomarbeit

**Das Vorkommen von *Actinobaculum spp.* in
Südostösterreich und dessen antimikrobielle
Empfindlichkeit**

eingereicht von

Leonhard Berger

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

unter der Anleitung von

Mag. Dr. Eva Leitner (Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin,
MUG)

Ao. Univ.-Prof. Dr. Andrea Grisold (Institut für Hygiene, Mikrobiologie und
Umweltmedizin, MUG)

Graz, am 05.03.2015

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 05.03.2015

Leonhard Berger e.h.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich vor allem meinen beiden Betreuerinnen *Mag. Dr. Eva Leitner* sowie *Ao. Univ.-Prof. Dr. Andrea Grisold* danken, die mir tatkräftig zur Seite standen und immer die Zeit gefunden haben mich zu unterstützen und mir bei der Erstellung dieser Arbeit zu helfen.

Ein besonderer Dank geht an meinen Vater *Walter Berger*, der das Lektorat meiner Diplomarbeit bereitwillig übernommen hat.

Des Weiteren danke ich noch meiner restlichen *Familie* und meinen *Freunden*, die mich durch das ganze Studium stets begleitet und motiviert haben.

Sprachliche Gleichstellung

Im weiteren Text wird zu Gunsten der Lesbarkeit auf die zeitgleiche Verwendung von männlichen und weiblichen Personenbegriffen verzichtet. Bezug genommen wird immer, sofern nicht anders angegeben, auf beide Geschlechter.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Danksagung..... | 4 |
| Sprachliche Gleichstellung..... | 5 |
| Inhaltsverzeichnis..... | 6 |
| Abkürzungen..... | 8 |
| Tabellen- & Bildverzeichnis..... | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| Zusammenfassung..... | 11 |
| 1 Einleitung..... | 13 |
| 2 Hypothesen bzw. Studienziele..... | 14 |
| 3 Hintergrund und Ätiologie..... | 15 |
| 3.1 <i>Actinobaculum</i> spp..... | 15 |
| 3.1.1 <i>Actinobaculum</i> <i>schaalii</i> | 15 |
| 3.1.2 <i>Actinobaculum</i> <i>urinale</i> | 18 |
| 3.1.3 <i>Actinobaculum</i> <i>massiliae</i> | 19 |
| 3.1.4 <i>Actinobaculum</i> <i>suis</i> | 20 |
| 3.1.5 <i>Actinobaculum</i> <i>timonae</i> | 20 |
| 3.2 Beschreibung assoziierter Krankheitsbilder..... | 21 |
| 3.2.1 Harnwegsinfekt..... | 21 |
| 3.2.2 Abszess..... | 22 |
| 3.2.3 Pilonidalsinus..... | 23 |
| 3.2.4 Wundinfektion..... | 24 |
| 3.2.5 Epididymitis..... | 25 |
| 3.2.6 Prostatitis..... | 26 |
| 3.3 Nachweismethoden..... | 27 |
| 3.3.1 API/ID32 und Vitek 2..... | 27 |
| 3.3.2 16S-rRNA-Gensequenzierung..... | 29 |
| 3.3.3 MALDI-TOF MS..... | 30 |
| 3.4 Antimikrobielle Empfindlichkeit bzw. Antibiotikaresistenzen..... | 31 |
| 4 Methoden & Material..... | 35 |

| | |
|-------------------------------------|----|
| 4.1 Studienaufbau..... | 35 |
| 4.2 Ein- & Ausschlusskriterien..... | 35 |
| 4.3 Statistische Analyse..... | 36 |
| 5 Statistische Analyse..... | 37 |
| 5.1 <i>Actinobaculum spp.</i> | 37 |
| 5.2 Geschlecht..... | 37 |
| 5.3 Alter..... | 38 |
| 5.3 Probenherkunft..... | 39 |
| 5.4 Probenmaterialien..... | 39 |
| 5.5 Begleitflora..... | 41 |
| 6 Diskussion..... | 43 |
| 7 Conclusio..... | 47 |
| 7.1 Limitierungen der Studie | 47 |
| Literaturverzeichnis..... | 48 |

Abkürzungen

| | |
|---------------------|--|
| <i>A. massiliae</i> | <i>Actinobaculum massiliae</i> |
| <i>A. schaali</i> | <i>Actinobaculum schaalii</i> |
| <i>A. suis</i> | <i>Actinobaculum suis</i> |
| <i>A. urinale</i> | <i>Actinobaculum urinale</i> |
| AB | Antibiotika |
| ABA | Anaerobic basal agar (anaerober Grundagar) |
| BPH | Benigne Prostata Hyperplasie |
| BSG | Blutsenkungsgeschwindigkeit |
| CRI | Chronic renal insufficiency (chronisches Nierenversagen) |
| CRP | C-reaktives Protein |
| ddNTP | Didesoxynukleosid-Triphosphat |
| ESWL | Extrakorporale Stoßwellenlithotripsie |
| HWI | Harnwegsinfekt |
| MIC | Minimum inhibitory concentration (Minimale Hemm-Konzentration) |
| MLS | Makrolide, Lincosamide & Streptogramine |
| NIH | National Institute of Health |
| PCR | Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion) |
| QRDR | Quinolone resistance determining region |
| rRNA | Ribosomale Ribonukleinsäure |
| sp. nov. | Species nova |
| spp. | Species pluralis |
| WI | Wundinfektion |

Tabellen- & Bildverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Empirische Therapie urologischer Erkrankungen..... | 32 |
| Tabelle 2: Antibiotische Empfindlichkeiten der <i>Actinomyces spp.</i> | 33 |
| Tabelle 3: Häufigkeiten der Gattung <i>Actinobaculum</i> | 37 |
| Tabelle 4: Geschlechterverteilung der drei Spezies..... | 38 |
| Tabelle 5: Probenherkunft..... | 39 |
| Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Probenmaterialien..... | 40 |
| Tabelle 7: Kreuztabelle mit den Häufigkeiten der Einsendematerialien und mit den drei Spezies.... | 40 |
| Tabelle 8: Eine Übersicht über alle gefundenen Kommensalen und deren Häufigkeiten..... | 41 |
| | |
| Abbildung 1: <i>A. schaalii</i> auf Schädleragar..... | 15 |
| Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von <i>A. schaalii</i> | 17 |
| Abbildung 3: Kolonien von <i>A. urinale</i> auf Schädleragar..... | 18 |
| Abbildung 4: <i>A. urinale</i> unter dem Mikroskop..... | 19 |
| Abbildung 5: <i>A. massiliae</i> -Kolonien auf Schädleragar..... | 19 |
| Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von <i>A. massiliae</i> | 20 |
| Abbildung 7: Algorithmus zur <i>A. schaalii</i> -Identifikation..... | 28 |
| Abbildung 8: Funktionsprinzip der MALDI-TOF MS..... | 30 |
| Abbildung 9: Visuelle Darstellung der Geschlechterverteilung der einzelnen Spezies..... | 37 |
| Abbildung 10: Boxplots der Altersverteilung aller drei analysierten Spezies..... | 38 |

Abstract

Introduction: The genus *Actinobaculum spp.* was first described in 1997 and represents the following species: *A. schaalii*, *A. urinale* and *A. massiliae*.

Mostly the genus was found in genuritary sites colonizing the local skin or mucosa.

Actinobaculum spp. have been mainly associated with chronic urinary tract infections but there are possibilities of dangerous septic complications as well.

First part of this study was to gather the available international information about this emerging pathogen and to present inter alia the associated diseases and treatment options.

The second part was to investigate the occurrence of *Actinobaculum spp.* in samples sent in by clinics or practitioners over the last eight years at the Institute of Hygiene, Medical University of Graz and perform a statistic analysis of the retrieved data.

Methods: With the introduction of 16S rRNA gene sequencing for identification of bacteria the first *Actinobaculum spp.* could be identified in 2005 at the Institute of Hygiene in Graz. Therefore, all reports from 2005 to 2014, positive for *Actinobaculum spp.* were evaluated regarding species distribution, isolation site, accompanying flora and patient's age as well as gender.

Results: From the 132 *Actinobaculum spp.* identified, *A. schaalii* could be detected most frequently with 56.8% (75/132) followed by *A. massiliae* (32.6%; 43/132) and *A. urinale* (9.10%; 12/132). The 75 *A. schaalii* were mainly found in abscesses (25), wounds (18) and ejaculate (12); whereas the 43 *A. massiliae* were mainly found in ejaculate (11), genital- (10) and urethra-samples (9). *A. schaalii* was the only species detected in blood cultures. The high diverse accompanying flora was leaded by *Staphylococcus spp.* (13.8%; 44/318) followed by *Streptococcus spp.* (11.90%; 38/318) and *Enterococci* (9.4%; 30/318). The median age of patients was found to be 46 years (range; <1 to 89 years) and 64.9% (85/331) of the samples were derived from man and 35.1% (46/331) from women.

Conclusion: *Actinobaculum spp.* are emerging pathogens specifically *A. schaalii* and should be considered especially in chronic urogenital infections which are resistant to the empiric antibiotic treatment. Samples which are suspicious to be found positive for *Acintobaculum spp.* should be gram-stained and analysed by PCR-based methods. According to international literature treatment can be performed with β -lactam antibiotics.

Zusammenfassung

Einleitung: Die Gattung *Actinobaculum* wurde 1997 erstbeschrieben und repräsentiert die folgenden drei Spezies: *A. schaalii*, *A. urinale* und *A. massiliae*.

Am häufigsten wurde die Gattung im Urogenitaltrakt nachgewiesen, wo sie die Haut und/oder Schleimhäute kolonisiert.

Actinobaculum spp. wird vor allem mit chronischen Harnwegsinfektion, aber auch mit gefährlichen septischen Krankheitsverläufen assoziiert.

Der erste Teil der Studie beschäftigt sich mit der Ausarbeitung der verfügbaren internationalen Literatur um, u.a., die ausgelösten Erkrankungen und die möglichen Therapieoptionen aufzuzeigen. Der zweite Teil hatte zum Ziel das Vorkommen von *Actinobaculum spp.* in den Proben, die am Hygiene Institut Graz/Medizinische Universität Graz von Spitälern und niedergelassenen Ärzten eingegangen sind, zu untersuchen, und eine statistischen Analyse mit den gewonnenen Daten durchzuführen.

Methoden: Mit der Einführung der 16S-rRNA-Gensequenzierung konnte 2005 der erste Vertreter der Gattung *Actinobaculum* am Institut für Hygiene/Medizinische Universität Graz identifiziert werden. Somit wurden alle Befunde, die zwischen 2005 und 2014 positiv auf *Actinobaculum spp.* identifiziert wurden hinsichtlich ihrer Häufigkeitsverteilung, Isolationsmaterial, Begleitflora, Alter und Geschlecht der Patienten und Probeneinsender evaluiert.

Resultate: Von den 132 identifizierten *Actinobaculum*-Stämmen, konnte *A. schaalii* mit 56.8% (75/132), gefolgt von *A. massiliae* mit 32.6% (43/132) und *A. urinale* mit 9.10% (12/132) am häufigsten gefunden werden. Die 75 *A. schaalii* wurden hauptsächlich in Abszessen (25), Wunden (18) und Ejakulaten (12) gefunden, wohingegen die 43 *A. massiliae* auf Ejakulate (11), Genitalabstriche (10) und Urethraabstriche (9) verteilten. *A. schaalii* war die einzige Spezies die in Blutkulturen nachgewiesen wurde. In der mannigfaltigen Begleitflora wurde am häufigsten *Staphylococcus spp.* (13.8%; 44/318), gefolgt von *Streptococcus spp.* (11.90%; 38/318) und *Enterococci* (9.4%; 30/318) gefunden. Desweiteren ergab die Analyse ein mittleres Alter der Patienten von 46 Jahren, wobei der jüngste Patient fünf Tage und der älteste Patient 89 Jahre alt war. 64.9% (85/331) der Proben stammten von Männern und 35.1% (46/331) von Frauen.

Conclusio: *Actinobaculum spp.* (vorwiegend *A. schaalii*) bezeichnet eine Gattung von pathogenen Erregern die immer mehr an Bedeutung gewinnt. Vor allem bei chronischen urogenitalen Infektionen, die therapieresistent gegen die empirische Antibiotikatherapie sind, sollte *Actinobaculum spp.* als Auslöser in Betracht gezogen werden. Besteht ein Verdacht auf eine Actinobaculum-Infektion sollte eine Gram-Färbung durchgeführt und die Identifizierung mit PCR-basierten Methoden durchgeführt werden. In der internationalen Literatur werden β -Lactam Antibiotika zur Therapie empfohlen.

1 Einleitung

Neue technische Entwicklungen und deren Verwendung hatten zur Folge, dass wir immer mehr Informationen über Erreger und deren Eigenschaften bekommen.

So wurde auch 1982 von Ludig W. et al. durch die Sequenzanalyse von bakteriellen 16S-rRNA-Genen entdeckt, dass *Eubacterium suis*, zuvor *Corynebacterium suis* (1), große Ähnlichkeit mit Vertretern der Bakteriengattung *Actinomyces* aufweist und sie haben daher vorgeschlagen es in diese Gattung aufzunehmen und in *Actinomyces suis comb. nov* umzubenennen (2).

1997 wurden von Lawson P. et al. neue Actinomyces-ähnliche Stämme entdeckt.

Der engste Verwandte war *Actinomyces suis*, aber dessen biochemische Eigenschaften waren so unterschiedlich zu anderen *Actinomyces*-Spezies, dass erstmals die Gattung *Actinobaculum* vorgestellt wurde.

So wurde *Actinomyces suis* in *Actinobaculum suis* umbenannt und eine neue Spezies, *Actinobaculum schaalii* (nach einem deutschen Mikrobiologen) vorgestellt (3).

2002 wurde in Marseille erstmals *Actinobaculum massiliae* aus dem Urin einer 81-jährigen Patientin mit wiederkehrender Blasenentzündung isoliert (4).

2003 folgte ein weiterer Vertreter dieser Gattung: *Actinobaculum urinale*. Es wurde im eitrigen Urin einer Patientin in Worthing/Vereinigtes Königreich entdeckt (5).

Die Gattung *Actinobaculum* gehört zur Familie der *Actinomycetaceae*.

Sie zeigt große Ähnlichkeiten in der rRNA-Sequenzanalyse mit anderen Gattungen dieser Familie: *Arcanobacterium* (92–93%), *Mobiluncus* (88–89%) und *Actinomyces* (85–90%) (6).

2 Hypothesen bzw. Studienziele

Im Vorfeld wurden für diese Diplomarbeit zwei Hauptziele festgelegt.

Einerseits wurde eine Literaturrecherche zum Thema *Actinobaculum* durchgeführt, um die Charakteristika der seit 2007 bekannten Spezies (3) zusammenzutragen, die pathogenen Eigenschaften und assoziierten Erkrankungen festzustellen, Antibiotikaresistenzen und mögliche Therapieoptionen aufzuzeigen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der retrospektiven Erfassung der Gattung *Actinobaculum* in den seit 2005 bis 2014 am Hygiene-Institut Graz eingegangenen Proben, inklusive der Auswertung der Speziesverteilung der *Actinobaculum spp.* in Südostösterreich (Großraum Graz), um eventuelle Parallelen festzustellen und mit der internationalen Literatur zu vergleichen. Bei den Nebenzielen handelt es sich um die Erfassung von Zusammenhängen zwischen Alter, Geschlecht, Zuweiser, Begleitflora und Erkrankung.

So ergaben sich folgende Fragestellungen, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollten:

- Literaturrecherche
 1. Was ist bisher an Hintergrundinformationen vorhanden?
 2. Wie sehen mögliche Nachweismethoden aus?
 3. Welche Krankheitsbilder sind mit *Actinobaculum spp.* assoziiert?
 4. Wie sehen mögliche Therapieoptionen aus?
- Retrospektive Datenanalyse zur lokalen Situation am Hygiene-Institut Graz
 1. Welche der 3 Gattungen (*A. schaalii*, *A. urinale*, *A. massiliae*) wurde am häufigsten in Südostösterreich (Großraum Graz) nachgewiesen?
 2. Kommen die 3 Gattungen als alleinige pathogene Erreger in Frage?
 3. Mit welchen begleitenden, anderen Erregern wurde *Actinobaculum* gefunden?
 4. In welchem Probenmaterial wurde es am häufigsten gefunden?
 5. Spielen Alter und/oder Geschlecht bei der Besiedelung/Infektion eine Rolle?
 6. Gibt es Gemeinsamkeiten und/oder Unterschiede mit unseren Ergebnissen und der internationalen Literatur?

3 Hintergrund und Ätiologie

3.1 *Actinobaculum* spp.

3.1.1 *Actinobaculum schaalii*

Nach der Erstbeschreibung 1997 von Lawson et al. wurde es nach dem deutschen Mikrobiologen Klaus P. Schaal benannt (3).

Nach Bebrütung über 48h bei 37°C in anaerober Atmosphäre zeigen sich runde, gräuliche Kolonien mit einem Durchmesser von <1 Millimeter (7).

Die Keime zeigen sich als kokkoide, gram-positive und leicht gekrümmte Stäbchen. Einige weisen Ramifikationen (Verzweigungen) auf. Die Bakterien sind nicht sporenbildend, nicht säurefest, können sich nicht frei bewegen, sind Katalase negativ und weisen ein fakultativ anaerobes Sauerstoffverhalten auf. Keine bis leichte Hämolyse wurde beobachtet. Eine Reduktion von Nitrat zu Nitrit kann nicht festgestellt werden (3,7).



Abbildung 1: *A. schaalii* auf Schädleragar

A. schaalii wird in der internationalen Literatur vor allem mit dem Urogenitaltrakt in Verbindung gebracht. Infektionen mit dieser Gattung werden häufiger übersehen als zuerst angenommen, denn viele Labore machen bei Urinproben keine Gram-Färbung und wenn doch werden gram-positive Bakterien als Corynebakterien oder Lactobazillen gedeutet. Das langsame Wachstum spielt hierbei auch eine Rolle, denn so werden die Kolonien von anderen pathogenen oder begleitenden Bakterien überwuchert (8).

Kristiansen et al. haben 2014 zum ersten Mal das komplette Genom von *A. schaalii* sequenziert und entdeckt, dass die vorhandene Codierung für Haftpili ein wichtiger Faktor für Kolonisation des

Urogenitaltrakts und somit der Virulenz ist (9).

A. schaalii wird vor allem mit über 60-jährigen Patienten mit HWI oder urogenital-pathologischer Prädisposition, wie zum Beispiel BPH, Prostatakrebs, Harnverhalten oder Harnröhrenstriktur, die bis zur Urosepsis führen können, assoziiert (8,10,11).

Der bisher älteste Patient war eine 101 Jahre alte Frau mit wiederkehrenden Harnwegsinfektionen (12).

2010 wurde die erste *A. schaalii*-Infektion außerhalb von Europa beobachtet. Hierbei handelte es sich um eine 76-jährige Patientin, die über 50 Jahre wiederholt gegen einen HWI behandelt wurde und unter pyelonephritis-ähnlicher Nierenveränderung litt. Trotz eitrigem Harn waren die aeroben Kulturen negativ und die, nicht routinemäßige, Gram-Färbung und die anaerobe Kultur waren auf *A. schaalii* positiv (13).

Mittlerweile sind noch vier weitere Fälle aus Argentinien bekannt, bei denen eine *A. schaalii*-Infektion bei männlichen Patienten zwischen 17 und 95 Jahren nachgewiesen wurden. Zwei Patienten litten unter Pyelonephritis und waren dialysepflichtig, einer litt unter benigner Prostatahyperplasie und bei einem Patienten fehlten urologische Risikofaktoren ganz (14).

Bis 2003 wurde nur ein Fall einer Infektion bei einem Kind beobachtet, aber eine Studie von 2011 hat herausgefunden, dass vor allem Kleinkinder infiziert sein können, besonders wenn sie Windeln tragen oder unter unwillkürlichem Einnässen leiden (15); diese Schlussfolgerung wird auch durch den Case-Report von Zimmermann P. et al. untermauert, die über den bis dato jüngsten Patienten (8 Monate) mit nachgewiesener *A. schaalii*-Infektion bei einer neurogenen Blasenentleerungsstörung, bedingt durch eine Myelomenigozele, berichteten (16).

Eine kleine Studie aus Dänemark legt nahe, dass *A. schaalii* zur Normalflora von Haut, genitaler Schleimhaut und Urin gehört und dass ältere Patienten das größte Risiko einer Kolonisierung aufweisen (17).

In der bis 2011 größten Fallstudie wurde gezeigt, dass die zwei am häufigsten ausgelösten Pathologien Sepsen und Abszesse waren (7).

Ein Fall wurde bis jetzt bekannt, bei dem *A. schaalii* der Grund für eine Nebenhodenentzündung eines 85-jährigen Patienten war (18).

Im Januar 2014 wurde der erste Bericht über einen 72-jährigen Patienten mit Blasenwandnekrose veröffentlicht, bei dem eine *A. schaalii*-Infektion nachgewiesen wurde. Allerdings ist hierbei zu

beachten, dass der Patient mehrere transurethrale Blasenresektionen (TUR), eine Zytostatika-Therapie mit Mitomycin C (MMC), eine Immuntherapie mit Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aufgrund eines nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinoms und des Weiteren wegen Psoriasis-Arthritis eine Methotrexat-Therapie erhielt. Die Autoren nehmen an, dass bei diesem Patienten die Immunschwäche, verursacht durch die TURs und durch die Medikation, die Virulenz von *A. schaalii* erhöht hat (19).

Es wurde auch bereits von Patienten ohne urogenitale Pathologie berichtet. Ein Patient litt, im Gegensatz zu den restlichen Patienten, untypischerweise unter einer von *A. schaalii* ausgelösten Endokarditis (20).

Zwei weitere Fälle beschreiben diesen Mikroorganismus als Auslöser eines Fournier-Gangräs, also einer Form von nekrotisierender Faszitis in der Leistengegend (21) und einer Spondylodiszitis (22).

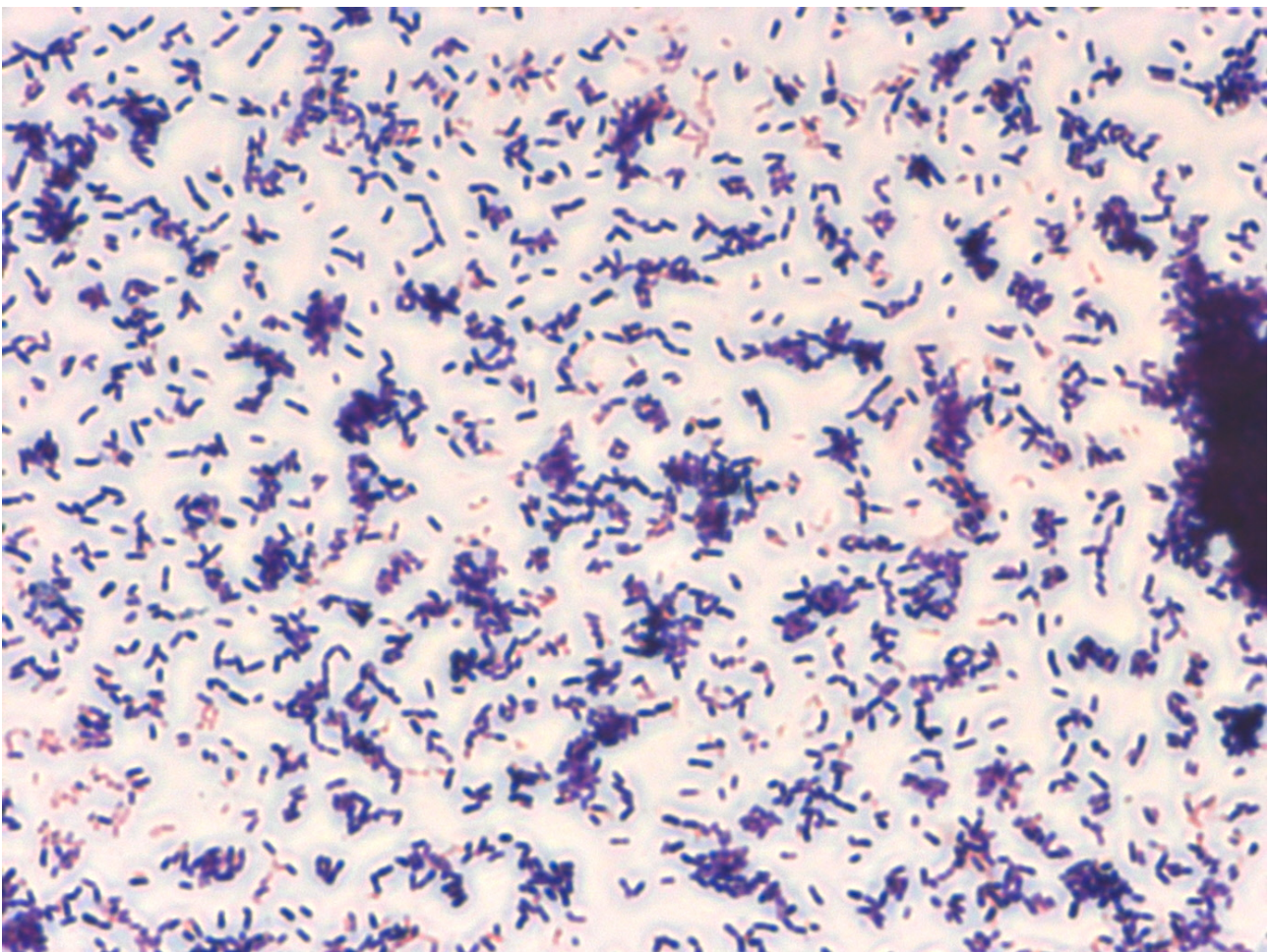


Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von *A. schaalii*

3.1.2 *Actinobaculum urinale*

Erstbeschrieben wurde das Bakterium von Hall V. et al. im Jahre 2002. Ähnlich wie bei *A. schaalii* handelt es sich um ein gram-positives, nicht sporenbildendes, nicht säurefestes, gerades bis leicht gebogenes Stäbchen, das nach 48h Inkubation in anaerober Kultur graue oder weiße Kolonien mit < 1mm Durchmesser bildet. Es wird eine schwache Beta-Hämolyse beobachtet.

In der Sequenzanalyse findet sich eine Ähnlichkeit zu *A. schaalii* von 93.3% und zu *A. suis* von 92%.



Abbildung 3: Kolonien von *A. urinale* auf Schädleragar

Isoliert wurde es erstmals bei einer Patientin mit eitrigem Harn (5).

Fendukly F. und Osterman B. berichten 2004 von einem Fall, bei dem sie *A. urinale* mit *A. schaalii* von einem männlichen Patienten mit CRI und begleitenden Diarrhoe-Episoden isoliert haben. (23).

Mittlerweile gibt es noch einen bestätigten Fall von einem 70-jährigen männlichen Patienten, der unter BPH, CRI und Diabetes litt; bei ihm wurde in der Blutkultur *A. urinale* während einer Urosepsis nachgewiesen (10).

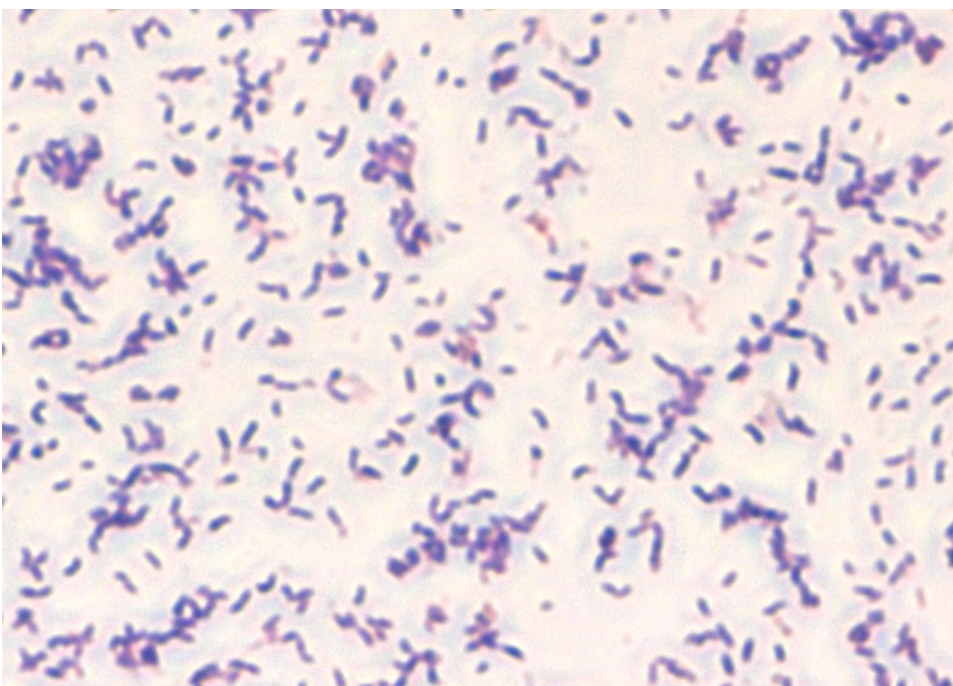


Abbildung 4: *A. urinale* unter dem Mikroskop

3.1.3 *Actinobaculum massiliae*

In einem Artikel haben 2001 Greub G. und Raoult D. zum ersten Mal *A. massiliae* vorgestellt. Benannt wurde es nach dem lateinischen Namen für Marseille, wo es isoliert wurde.

Es handelt sich um einen geraden bis leicht kurvigen, manchmal verzweigten Organismus. Er ist gram-positiv, nicht beweglich, nicht säurefest und imponiert nach 72 Stunden Inkubation als kleine gräuliche Kolonien ohne Hämolyse.



Abbildung 5: *A. massiliae*-Kolonien auf Schädleragar

Eine 81-jährige Patientin erhielt nach einem Insult einen Blasenkatheter und dieser wurde mit einer immer wiederkehrenden Blasenentzündung assoziiert. Bei der Keimanalyse stellte sich heraus, dass der bis dato unbekannte Erreger klar von dem engsten Verwandten, *A. suis*, abzugrenzen sei (4).

Eine weitere Dokumentation handelt von einer 53-jährigen Frau, die von ihrem Allgemeinmediziner gegen einen Abszess in der Brustregion behandelt wurde. Weitere Untersuchungen ergaben, dass es sich beim Erreger um *A. massiliae* handelte. Dies war der, bis dato, erst zweite Bericht einer Infektion dieser Spezies (24).

Im Bericht von Gomez E. et al. wurde *A. massiliae* (dort als *A. massiliense* bezeichnet) bei einem männlichen 77-jährigen Patienten mit Harnverhalt gefunden, allerdings haben es die behandelnden Ärzte als klinisch nicht signifikant befunden (10).

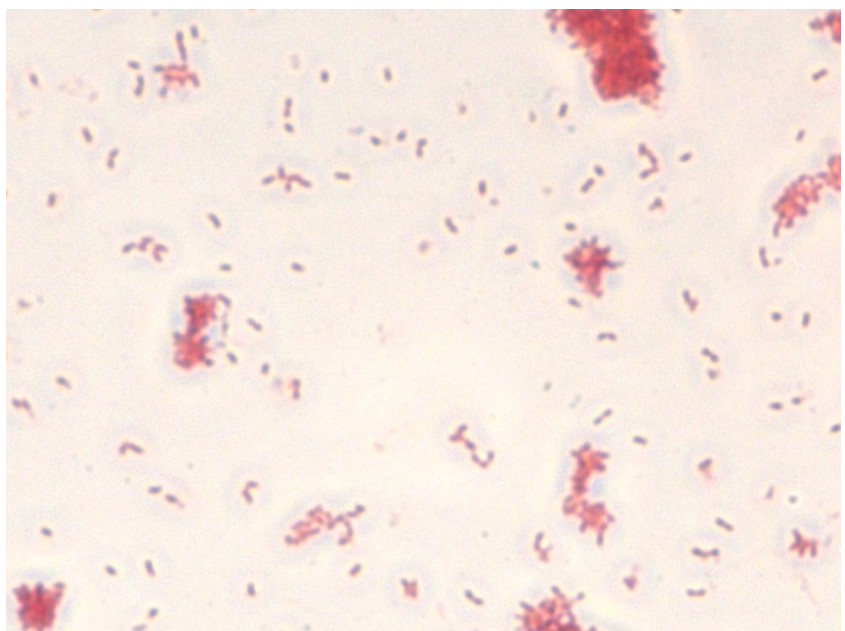


Abbildung 6: Mikroskopische Aufnahme von *A. massiliae*

3.1.4 *Actinobaculum suis*

A. suis spielt in der Veterinärmedizin eine wichtige Rolle, wo es bei weiblichen Schweinen urogenitale Pathologien, wie akute und chronische Blasenentzündungen und Pyelonephritiden, auslösen kann (3,25).

Da es bis jetzt keinen Fallbericht einer Infektion beim Menschen gibt, wird auf *A. suis* in dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

3.1.5 *Actinobaculum timonae*

Als *Candidatus Actinobaculum timonae* bezeichnet, wurde es 2003 in einer fünf Jahre langen Studie über bisher nicht identifizierte Bakterien in Marseille erwähnt. Danach taucht *A. timonae* nie wieder in der Literatur auf (26).

3.2 Beschreibung assoziierter Krankheitsbilder

3.2.1 Harnwegsinfekt

Definition

Ein HWI ist eine Entzündung der Harnwege, die selten durch Pilze, Protozoen oder Viren, aber sehr oft durch Bakterien verursacht wird (27).

Diese Keime gelangen vom eigenen Enddarm über den Damm in die Harnröhre und steigen über die Blase und eventuell bis in die Nieren auf (28).

Zu den häufigsten Erregern zählen *E. coli*, *Proteus* und *Klebsiellen* (29).

Die Einteilung erfolgt in untere Harnwegsinfekte, ohne klinischen Befall der Nieren, wie bei einer Urethritis, Prostatitis oder Zystitis, und in obere Harnwegsinfekte, die mit Befall des Nierenparenchyms einhergehen (27).

Ätiologie

Es wurde früher angenommen, dass anatomische Verhältnisse wie Anomalien und eine kürzere oder zu enge Harnröhre oder auch vesikoureteraler Reflux und Harnstauung für Infektionen verantwortlich sind, aber diese Vorstellungen spielen heute eine geringere Rolle als angenommen.

Heutzutage wird angenommen, dass immunologisch-biologische Defekte für die Infektanfälligkeit, vor allem bei Frauen (95% der Patienten mit HWI in der Urologie sind Frauen mit rezidivierender Bakteriurie), verantwortlich sind:

Unterschiede in der Rezeptordichte und eine fragliche Beeinflussung durch Östrogene steigern die Adhärenz (Anhaftungsfähigkeit) von Bakterien am Uroepithel.

Symptome

Schmerzhafes, erschwertes Wasserlassen und ein gesteigerter Harndrang bis zur Nykturie (nächtliches Wasserlassen) zählen hier zu den Symptomen eines unteren HWI. Bei normal „trockenen Kleinkindern“ kann Bettnässen ein Hinweis auf einen HWI sein (27,29).

Bei Beteiligung der Niere in Form einer Pyelonephritis finden sich weiters schmerzhaftes Nierenlager bzw. Flankenschmerz mit Ausstrahlung in die Leiste und Allgemeinsymptome wie Übelkeit, Erbrechen, eventuell diffuse abdominale Schmerzen und Fieber über 38°C (30).

Diagnose

Vor allem bei jungen Patientinnen sind die klinischen Zeichen eindeutig und somit werden bis auf einen Urinteststreifen oder ein Urinsediment keine weiteren Untersuchungen empfohlen (30).

Eine weiterführende Diagnostik ist bei Kindern, Männern, rezidivierenden HWIs, stationären Patienten und bei Schwangeren nötig: Eine Urinkultur muss angelegt werden. Bei hochfieberhaften Patienten liegt der Verdacht einer hämatogenen Streuung, einer Urosepsis, nahe und somit ist die Anlage einer Blutkultur mit Antibiotika-Resistenztestung empfohlen (27).

Therapie

Eine gezielte Antibiotika-Therapie nach einem Antibiogramm ist indiziert. Das Spektrum der Antibiotika umfasst Fluorchinolone, Co-Trimoxazol, Amoxicillin/Clavulansäure oder Cefpodoxim-Proxetil. Bei einer Blasenentzündung erfolgt eine Kurzzeittherapie von höchstens drei Tagen und bei Nierenbeteiligung wird 7-14 Tage therapiert (30, 31).

Vor allem bei rezidivierenden HWIs steht die Prävention und Vermeidung von Risikofaktoren, wie Erhöhung der Trinkmenge und Miktion nach dem Geschlechtsverkehr, im Vordergrund (30).

3.2.2 Abszess

Definition

Ein Abszess ist eine Eiteransammlung in einem Hohlraum, welcher von einer Membran von der umliegenden Umgebung abgegrenzt wird (32).

Ätiologie

Meist wird ein Abszess durch den Erreger *Staphylococcus aureus* verursacht, welcher über das Blut verschleppt wird und entweder so oder direkt durch eine Verletzung an die entsprechende Stelle kommt. Durch die Bakterienenzyme wird eine Einschmelzung des Gewebes bewirkt.

Abszesse können an inneren Organen oder an der Haut auftreten (32).

Symptome

Zu den Symptomen zählen die klassischen fünf Entzündungszeichen: *tumor, dolor, rubor, calor, functio laesa*; die Haut über dem Abszess ist geschwollen, schmerzhaft, rötlich gefärbt und überwärmt. Die umliegenden Strukturen, wie Gelenke und Muskeln, können

funktionseingeschränkt sein (32).

Diagnose

Hautabszesse werden anhand der Klinik diagnostiziert. Im Gegensatz zu den Abszessen der inneren Organe ist hier die Laboruntersuchung unauffällig. Bei Letztgenannter beobachtet man eine Erhöhung der Entzündungszeichen (Leukozyten, CRP, BSG).

Des Weiteren bedarf es zur Abklärung viszeraler Abszesse oft einer Ultraschall-, MR- oder CT-Untersuchung (32).

Therapie

Die Therapie besteht in chirurgischer Revision und Antibiotikagabe (32).

3.2.3 Pilonidalsinus

Definition

Der Pilonidalsinus, auch Sinus pilonidalis oder Steißbeinfistel genannt, ist eine chronische Entzündung über dem Steißbein (33).

Von einer Fistel spricht man dann, wenn ein Abszess chronisch wird, zuerst eine fibrinöse Kapsel ausbildet und danach an die Oberfläche durchbricht.

Der Perforationskanal wird hierbei auch als Fistelgang bezeichnet und durch mögliche Verbindungen zu Hohlorganen und weiteren Abszessen kann so eine fistelnde Entzündung entstehen (29).

Ätiologie

Als Ursache nimmt man an, dass abgebrochene Haare im Bereich der Gesäßspalte einwachsen und dort eine chronische Entzündung auslösen. Die Haare wachsen danach immer weiter ein, wodurch dann Fisteln entstehen. Eine sekundäre Entzündung ist möglich (34).

Eine weitere Theorie ist die des angeborenen Sinus pilonidalis, die davon ausgeht, dass aus der Embryonalzeit eine Öffnung des Neuralrohres als Verbindung von der Steißbeinspitze zum Analrand verblieben ist (33).

Symptome

Meistens sind junge und stark behaarte Männer betroffen. Die Steißbeinfistel manifestiert sich als druckdolente, rötliche Schwellung und auf Druck kann sich Blut oder Eiter entleeren (33).

Therapie

Die Therapie kann konservativ mit Sitzbädern, Salben und Eisbeuteln erfolgen, allerdings wird allgemein, um Rezidive zu verhindern, die chirurgische radikale Excision empfohlen (33).

3.2.4 Wundinfektion

Definition

Durch Epitheldefekte wird das Eindringen von Bakterien und Pilzen begünstigt, wodurch sekundär Infektionen auftreten. Je nach Vorschädigung unterscheidet sich die Ausdehnung (35).

Ätiologie

Als Erreger kommen körperinterne (z.B.: *Staphylococcus aureus/epidermidis*, Korynebakterien, Enterokokken, *Streptococcus pyogenes* etc.) oder körperexterne Erreger (*E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium perfringens*, Schimmelpilze etc.) in Frage (35).

Symptome

Die zwei Hauptsymptome sind Rötung und Eiterung (35).

Diagnose

Durch Konsistenz, Verfärbung und Geruch des Eiters kann man Erreger vermuten, allerdings sollten Abstriche zur mikrobiologischen Untersuchung abgenommen werden (35).

Therapie

Eine chirurgische Wundsäuberung mit lokaler Desinfektion sollte erfolgen. Weiters ist gegebenenfalls eine systemische Antibiotikagabe indiziert (35).

3.2.5 Epididymitis

Definition

Hierbei handelt es sich um eine Entzündung der Nebenhoden, welche häufig von Bakterien ausgelöst wird. Im Gegensatz dazu steht die Orchitis, die Hodenentzündung, die nahezu immer von Viren ausgelöst wird (35).

Ätiologie

Meist treten einseitige Infektionen im Rahmen von häufig wechselnden Sexualpartnern auf. Oft sind Hoden und Prostata mitbetroffen. Die häufigsten Erreger sind *Neisserien* und *Chlamydien*, aber auch die Infektion mit Darmkeimen und uropathogenen Erregern ist möglich (35).

Symptome

Vor allem ist die Epididymitis durch eine schmerzhafte Schwellung des Hodens mit einer eitrigen Entzündung und eventuell begleitendem Fieber gekennzeichnet (35).

Diagnose

Eine Diagnose ist schwierig; aber man kann gegebenenfalls versuchen die Erreger aus dem Ejakulat zu züchten (35).

Die Untersuchung des Ejakulats erfolgt nach drei- bis fünftägiger sexueller Karenz mit anschließender Masturbation. Allerdings ist der Hoden mit nur zirka 5% am Ejakulat beteiligt. Der Rest ergibt sich aus der Prostata (30%), den Bläschendrüssen (60%) und den paraurethralen Drüsen (5%) (28).

Therapie

Eine sofortige Therapie ist unerlässlich, da es sich hierbei um einen Notfall handelt. Verwendete Antibiotika sind unter anderen Ceftriaxon oder Fluorchinolone (35).

3.2.6 Prostatitis

Definition

Das NIH sieht eine Klassifikation nach Symptomatik, Erregernachweis und Leukozytenbefund vor und daraus ergeben sich folgende Formen: Akute bakterielle Prostatitis, chronisch-bakterielle Prostatitis, chronische Prostatitis/Chronisches Schmerzsyndrom des Beckens, entzündliches chronisches Schmerzsyndrom des Beckens, Nichtentzündliches chronisches Schmerzsyndrom des Beckens und asymptomatische entzündliche Prostatitis (28).

3.3 Nachweismethoden

Der Nachweis der *Actinobaculum*-Gattung im Harn stellt sich oft als schwierig heraus, da jene Bakterien der Normalflora von Haut und Schleimhaut sehr ähneln und sie oft von schneller wachsenden Kommensalen oder pathogenen Erregern überwuchert werden. Meist werden die Einsendungen auch nur über Nacht bebrütet, was dazu führt, dass das Vorkommen oft übersehen oder fehlinterpretiert wird. Des Weiteren führen einige Labore keine Gram-Färbung der Urinproben durch, was die Detektion zusätzlich erschwert (36,37,38).

Prinzipiell stehen, um Bakterien zu identifizieren, biochemische Methoden (API/ID32), Genbasierte Identifizierung (16S-rRNA-Gensequenzierung) oder die MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight Massenspektrometrie) zur Verfügung.

Um eine definitive Identifizierung zu ermöglichen, ist die 16S rRNA-Gensequenzierung die Methode der Wahl. Alternativ kann man eine Bestimmung auch durch die MALDI-TOF MS anstreben. Durch biochemische Methoden kann man *Actinobaculum spp.* (noch) nicht eindeutig bestimmen (39,40).

Im Folgenden werden alle drei Methoden genauer vorgestellt.

3.3.1 API/ID32 und Vitek 2

API steht für „Analytical Profile Index“ und man versteht darunter eine Erweiterung der Bunten Reihe, die mit standardisierten biochemischen Reaktionen eine Bestimmung bestimmter Bakterien ermöglicht. Die Firma „bioMérieux“ bietet mit ihrem API®/ID 32 die größte Identifizierungsreichweite inklusive Softwareunterstützung. Rapid ID 32 A und API Coryne sind die Bezeichnung für Teststreifen, mit denen man Anaerobier und coryneformen Bakterien bestimmen kann. Mit dem Vitek 2 ist es der Firma außerdem gelungen die API-Technologie zu automatisieren (41,42,43).

Die Autoren Reinhard M. et al. empfehlen, zumindest bis die Herstellerdatenbanken der Biochemischenanalyse-Geräte ergänzt wurden, unbedingt Untersuchungen mit Rapid ID 32 A und API Coryne durchzuführen (36).

Das Problem bei dieser Methode besteht darin, dass man zweifelhafte Ergebnisse bekommt und die Isolate, vor allem *A. schaalii*, fälschlicherweise als *Arcanobacterium*, *Capnocytophaga*, *Micromonas micros* oder *Actinomyces meyeri* identifiziert werden (36,40).

Tuuminen T. et al. haben einen Algorithmus (Abb.7) entwickelt, um die Wahrscheinlichkeit der richtigen Identifizierung von *A.schaalii* mit biochemischen Methoden zu erhöhen.

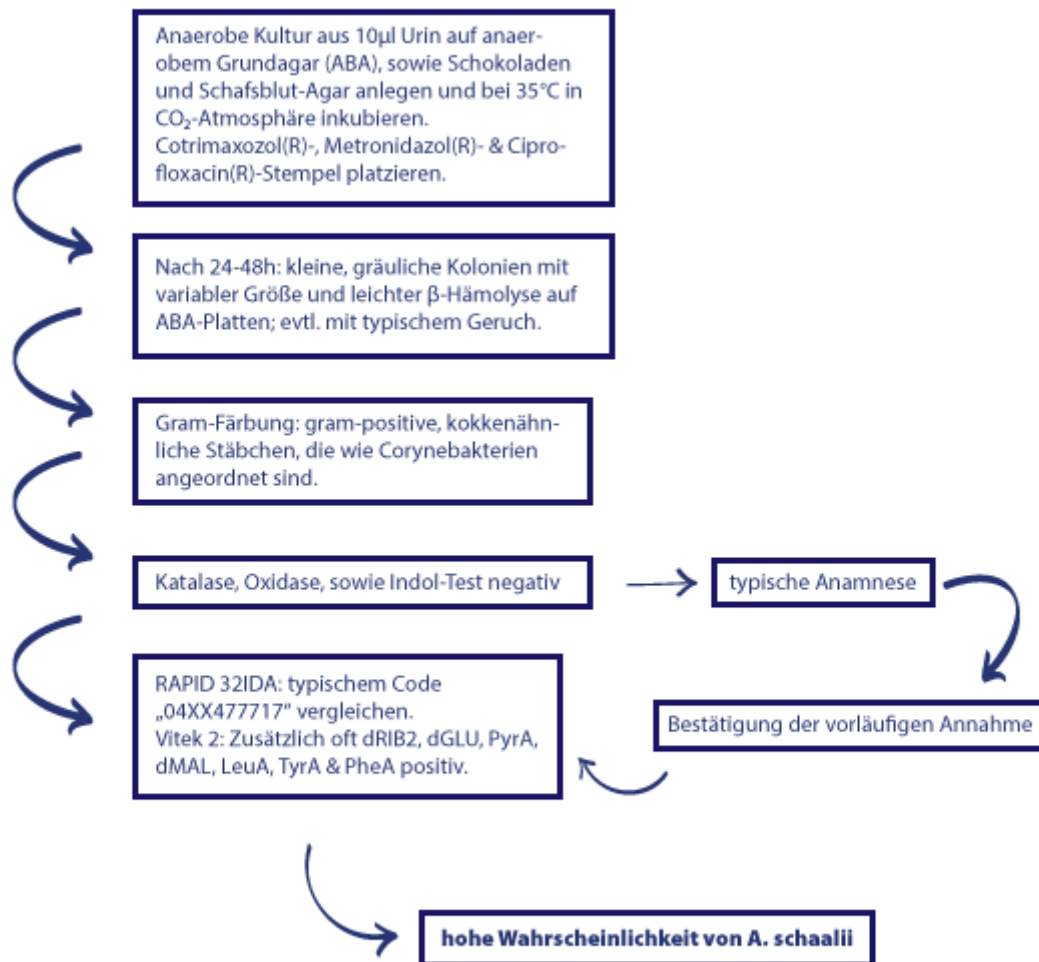


Abbildung 7: Algorithmus zur *A. schaalii*-Identifikation; entwickelt von Tuuminen et al.

3.3.2 16S-rRNA-Gensequenzierung

Diese Methode beschreibt ein Verfahren, das auf der PCR beruht.

Das Grundprinzip der **PCR** besteht im Wesentlichen aus drei großen Schritten:

- 1) Denaturierung: Hier wird bei 94°C die Ausgangs-DNA, die sogenannte Template-DNA, getrennt.
- 2) Annealing: Wenn die Temperatur auf 55°C abgekühlt wurde, erfolgt die Hybridisierung der Primer (Oligonucleotidprimer) an die DNA.
- 3) Elongation: In diesem Schritt wird auf das Temperaturoptimum (72°C) der (Taq-)Polymerase erhitzt und diese verlängert den Primer so lange, bis eine exakte Kopie der Template-DNA vorliegt. Folglich hat sich die DNA-Menge am Ende dieses Zyklus verdoppelt (44).

16S-rRNA-Gensequenzierung bezeichnet eine Methode, bei der man einen Teil der genetischen Information der 16S-rRNA aus Bakterien mittels PCR vermehrt und anschließend eine Sequenzierungsreaktion anschließt (45).

Bei der **Sequenzierung** wird zusätzlich bei der Vervielfältigung noch ein weiteres Nukleotid verwendet, das durch statistischen Syntheseabbruch dafür sorgt, dass bei der Vervielfältigung Stücke mit verschiedener Länge entstehen. Durch Markieren mit speziellen Substanzen und Auftrennen mittels Gelelektrophorese kann man dann die verschiedenen Nukleotid-Sequenzen ablesen (44).

Generell hat sich eine spezielle Methode der Sequenzierung durchgesetzt:

Kettenabbruchmethode nach Sanger

Bei dieser Methode verwendet man ein Didesoxyribonukleosid-Triphosphat (ddNTP), um die Kettensynthese abubrechen. Diese Methode wird deshalb auch als Didesoxy-Methode bezeichnet.

Jedes verwendete ddNTP wird mit einem einem Fluoreszenzfarbstoff versehen und dann in einer mit Elektrophorese-Gel gefüllten Kapillare aufgetragen und aufgetrennt. Ein Detektor erkennt mittels Laser alle Fragmente mit einer bestimmten Länge und gibt diese in der entsprechenden Reihenfolge als eine farbige Kurve wieder. Pro ddNTP wird eine eigene Farbe verwendet und so kann dann die entsprechende Sequenz ermittelt werden (46).

3.3.3 MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS bezeichnet ein besonderes Verfahren der Massenspektrometrie mit dem besonders schnell Identifizierungsergebnisse erreicht werden können.

Hierbei wird die Probe erst mit der sogenannten Matrix, einer niedermolekularen Komponente, gemischt und anschließend mit einem Laser beschossen. Die Matrix absorbiert das Laserlicht und wird inklusive der Probe vaporisiert. So zerfällt die Probe in Fragment-Ionen, die, beschleunigt durch ein elektrisches Feld, in den Flugzeit-Massenspektrometer geleitet werden.

Am Detektor erfolgt die Auftrennung des Ionengemisches - anhand ihrer Flugzeit - in ihr Masse/Ladungs-Verhältnis (kleinere und leichtere Teilchen treffen schneller auf), welches dann in ein grafisch dargestelltes „Fingerprint“-Massenspektrum umgeschrieben wird.

Da sich Mikroorganismen durch ihr Massenspektrum unterscheiden, lassen sie sich schlussendlich durch eine Datenbankabfrage identifizieren (47,48).

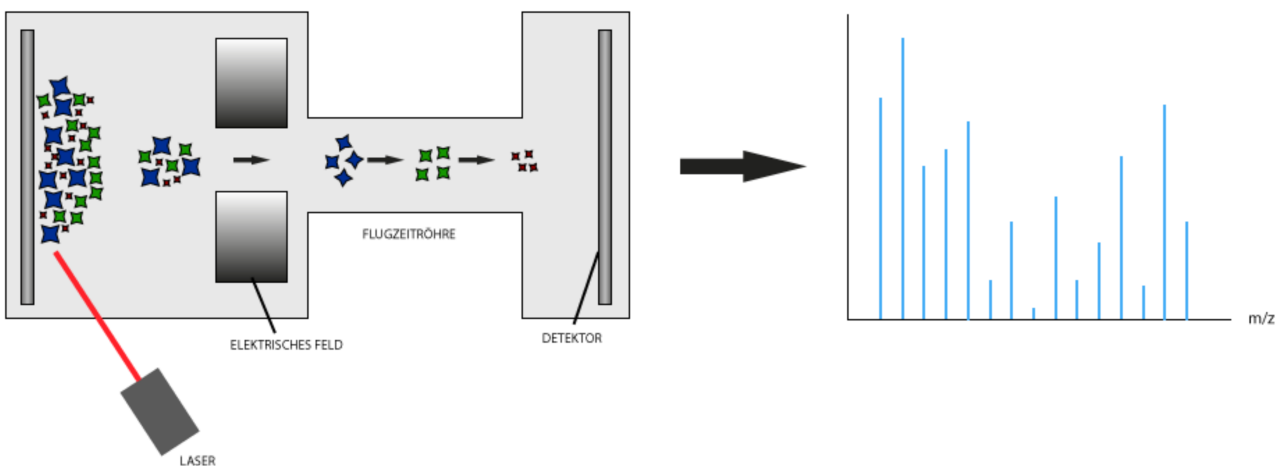


Abbildung 8: Funktionsprinzip der MALDI-TOF MS (in Anlehnung an eine Grafik von www.sigmaaldrich.com)

3.4 Antimikrobielle Empfindlichkeit bzw. Antibiotikaresistenzen

Da in den bereits erwähnten Fallberichten und Studien die urogenitalen Erkrankungen mit *Actinobaculum spp.* im Vordergrund stehen, möchte ich noch auf deren Therapie sowie auf die der gram-positiven, anaeroben bzw. fakultativ anaeroben Stäbchen, im Speziellen die der Gattung *Actinomyces*, eingehen.

Die „European Association of Urology“ empfiehlt die in folgender Tabelle dargestellten Substanzen zur empirischen Therapie:

Tabelle 1: Empirische Therapie urologischer Erkrankungen (54)

| UTI | | Pyelonephritis | |
|--|-----------|----------------|---|
| Substanz | Dauer | Substanz | Dauer |
| Nitrofurantoin | 5-7 Tage | Fluroquinolone | akut: 2-4 Tage |
| Fosfomycin-Trometamol | 1 Dosis | Cephalosporine | chronisch: 4-6 Wochen, bei Bedarf evtl. länger |
| Pivamecillinam | 3-5 Tage | Doxycyclin | |
| Trimethoprim/Sulfamethaxazol | 3 Tage | Makrolide | |
| Fluroquinolone | 1-3 Tage | | |
| Cephalosporine | 7-10 Tage | | |
| Aminopenicillin/Beta-Lactamase Inhibitoren | 7-10 Tage | | |
| Aminoglycoside | 7-10 Tage | | |

Die Tabelle 1 zeigt die Therapieoptionen gegen Vertreter der Gattung *Actinomyces*, beziehungsweise welche Antibiotika grundsätzlich gegen gram-positive, (fakultativ) anaerobe Bakterien verwendet werden können.

Tabelle 2: Antibiotische Empfindlichkeiten der *Actinomyces* spp. Über nicht genannte Substanzen waren keine Informationen vorhanden (55).

| Antibiotikagruppen | Substanzen | für gewöhnlich klinisch effektiv oder > 60% sensibel | 30-60% sensibel oder Mangel an klinischen Studien | < 30% sensibel |
|--|------------------------------|---|---|-------------------|
| Penicillin G & V | - | x | | |
| Antistaphylokokken- Penicilline | alle Substanzen | | | x |
| Aminopenicilline | alle Substanzen | x | | |
| Anti-Pseudomonas- Penicilline | Piperacillin | x | | |
| Carbapeneme | Ertapenem | x | | |
| | Imipenem | x | | |
| | Atreonam | | | x |
| Fluoroquinolone | Ciprofloxacin | | | x |
| | Ofloxacin | | x | |
| | Moxifloxacin | x | | |
| | Gatifloxacin | x | | |
| Cephalosporin 3./4. Gen. | Ceftizoxime | x | | |
| | Ceftriaxone | x | | |
| Aminoglykoside | alle Substanzen | | | x |
| | Chloramphenicol | x | | |
| | Clindamycin | x | | |
| Makrolide | alle Substanzen | x | | |
| Tetracycline | alle Substanzen | x | | |
| Glyco/Lipoglykopeptide | Vancomycin | x | | |
| | Telavancin | x | | |
| | Fusidinsäure | x | | |
| urogenitaltraktspezifische Substanzen | Nitrofurantoin Fosfomycin | keine Daten vorhanden | | |

Die von Cattoir V. et al. mittels E-Tests durchgeführten Antibiotogramme zeigen, dass von 48 *A. schaalii*-Isolaten alle auf Amoxicillin, Ceftriaxon, Gentamicin, Vancomycin, Linezolid und Nitrofurantoin sensibel sind. Bis auf 3 von 48 Stämmen waren alle sensibel gegenüber Clindamycin; 96% der Proben waren empfindlich auf Moxifloxacin und 90% auf Levofloxacin. Außerdem beschreiben die Autoren 85% Resistenz gegen Cotrimoxazole und 100% Resistenz gegen Metronidazol (49).

Reinhard et al. haben neun Stämme isoliert und getestet. Die Ergebnisse waren sensibel gegen Penicilline, Cefuroxime, Mecillinam, Nitrofurantoin, Tetracycline und Clindamycin.

Verminderte Sensibilität wurde für Ciprofloxacin und Gentamicin festgestellt (36).

Tests an weiteren 20 Stämmen zeigen eine vollständige Empfindlichkeit gegen Beta-Laktam-Antibiotika mit einer MIC von ≤ 0.19 mg/dl.

Allerdings sind die am meisten verschriebenen Antibiotika gegen urogenitale Infektionen, vor allem Fluoroquinolone oder Trimethoprim/Sulfamethoxazole (Cotrimoxazole), in vitro wirkungslos (37).

A. massiliae ist sensibel gegen Penicillin, Erythromycin, Tetracycline (insbesondere Doxycyclin) und Clindamycin. Resistenzen wurden von Metronidazole berichtet (4,10,24).

A. urinale wurde nach zugänglichen Berichten und Studien nur einmal getestet und dabei stellte sich eine Sensibilität gegen Penicillin heraus (10).

Folglich sind Penicilline, wie zum Beispiel Amoxicillin, oder Cephalosporine, wie Cefuroxime, Ceftriaxone, vor allem bei *A. schaalii*-Infektionen die Substanzen der Wahl (6,49).

Der Grund der Fluoroquinolone-Resistenz einiger *A. schaalii*-Stämme ist bereits bekannt (49):

Cattoir V. et al. haben gezeigt, dass alle Isolate, die hoch resistent gegen Levofloxacin und Moxifloxacin waren, eine einzigartige Mutation im GyrA-Gen (DNA-Gyrase) zeigten, wobei die sensiblen oder nur leicht resistenten Stämme identische QRDR- bzw. ParC- (Topoisomerase IV-) Sequenzen aufwiesen (49).

Auch Resistenzen gegen MLS (steht für Makrolide/Lincosamide/Streptogramine und bezeichnet eine spezielle Gruppe von Antibiotika, die zum Beispiel Erythromycin, Clindamycin, Quinupristin-Dalfopristin u.a. beinhalten) wurden aufgeklärt.

So besitzen die gegen genannte Antibiotika resistenten Stämme das erm(x)-Gen, das vor allem der bestimmende Faktor der MLS-Resistenz in *Corynebakterium spp.* ist, wo hingegen es den sensiblen Stämmen fehlt. Nichtsdestotrotz sind die Nieren nicht die primären Wirkorte für MLS, und jene sind somit normalerweise nicht in Verwendung gegen Harnwegsinfektionen, könnten allerdings gegen andere Arten von Infektionen nützlich sein (50).

4 Methoden & Material

4.1 Studienaufbau

Ein Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Recherche nach internationaler Literatur zum Thema *Actinobaculum spp.*.

Der zweite Teil ist eine statistische Analyse retrospektiv erhobener Daten der am Hygiene-Institut Graz untersuchten Proben aus dem Klinikums- und niedergelassenen Bereich.

4.2 Ein- & Ausschlusskriterien

Eingeschlossen wurden alle Patienten, deren Proben von 2005 bis 2014 aus dem Universitätsklinikum Graz oder aus dem niedergelassenem Bereich im Raum Graz zur Diagnostik an das Institut für Hygiene zur Infektionsabklärung eingeschickt wurden und positiv auf *Actinobaculum spp.* waren.

4.3 Statistische Analyse

Die Erstellung des Datensatzes erfolgte mit Microsoft Excel™ 2010. Zur statistischen Analyse wurde das Programm IBM SPSS™ Version 22 eingesetzt.

Falls nicht explizit darauf hingewiesen, erfolgt die Angabe von Ergebnissen bei metrischen Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung. Fallweise werden zusätzlich die Maxima und Minima in eckigen Klammern angegeben.

Alle erhobenen metrischen Daten wurden mittels Histogramm und Shapiro-Wilks-Test auf Normalverteilung geprüft. Zum Test auf Signifikanz von Unterschieden wurde der T-Test für unabhängige Stichproben und die einfaktorielle ANOVA eingesetzt.

Nominale Daten wurden mit dem Chi²-Test analysiert und die Überprüfung auf Kontingenz erfolgte durch Ermittlung des Cramérs V - Kontingenzkoeffizienten.

Ein Kontingenzkoeffizient (V) von 0.1-0.3 wurde als schwacher, von 0.4-0.5 als mittlerer und von > 0.5 als starker Zusammenhang gewertet.

Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt; somit wurden alle Ergebnisse mit p-Werten < 0.05 als statistisch signifikant gewertet.

Zur Analyse von Alter, Geschlecht, Probenherkunft und der nach Spezies aufgeteilten Untersuchung der Begleitflora wurden nur als *Actinobaculum spp.* identifizierte Daten (zwei) ausgeschlossen und der Fall, in dem *A. schaalii* und *A. urinale* gefunden wurde, aufgetrennt.

5 Statistische Analyse

5.1 *Actinobaculum* spp.

Es wurden 131 Proben am Hygiene-Institut aus klinischen und externen Einsendungen analysiert.

Nachgewiesen wurde *Actinobaculum* spp. 132 mal, wobei in einer Probe das gleichzeitige Vorkommen von *A. schaalii* und *A. urinale* bestätigt wurde.

Zwei der Proben konnten nur als *Actinobaculum* spp. identifiziert werden.

Tabelle 3: Häufigkeiten der Gattung *Actinobaculum*

| | Häufigkeit (n) | Häufigkeit (%) |
|---------------------------|----------------|----------------|
| <i>Actinobaculum</i> spp. | 2 | 1.50 |
| <i>A. schaalii</i> | 75 | 56.80 |
| <i>A. urinale</i> | 12 | 9.10 |
| <i>A. massiliae</i> | 43 | 32.60 |
| Gesamtsumme | 132 | 100.00 |

5.2 Geschlecht

Die eingesandten Proben stammen von 85 (64.9%) männlichen und 46 (35.1%) weiblichen Personen.

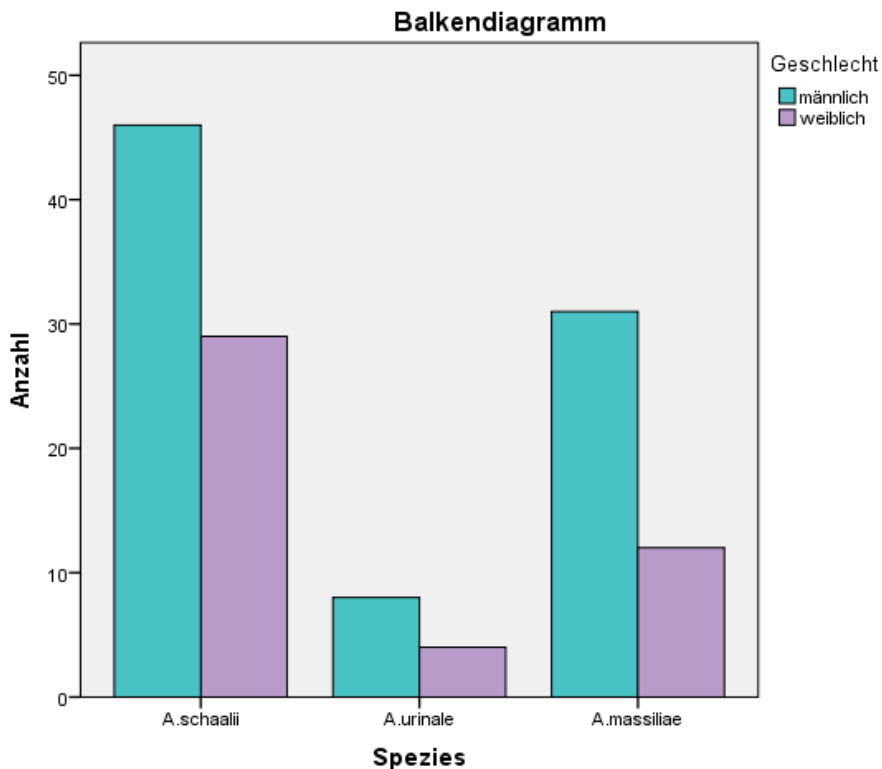


Abbildung 9: Visuelle Darstellung der Geschlechterverteilung der einzelnen Spezies

Tabelle 4 zeigt, die Verteilung des Geschlechts über die drei Actinobaculum-Spezies.

Tabelle 4: Geschlechterverteilung der drei Spezies

| | | Spezies | | | Gesamtsumme |
|-------------|----------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------|
| | | <i>A. schaalii</i> | <i>A. urinale</i> | <i>A. massiliae</i> | |
| Geschlecht | männlich | 46 | 8 | 31 | 85 |
| | weiblich | 29 | 4 | 12 | 45 |
| Gesamtsumme | | 75 | 12 | 43 | 130 |

Obwohl Actinobaculum vermehrt in den Proben von männlichen Patienten gefunden wurde, zeigte eine Chi²-Analyse, dass das Vorkommen einer bestimmten Spezies nicht geschlechtsabhängig ist ($p = 0.495$).

5.3 Alter

Das mittlere Alter aller Patienten beträgt 46.22 ± 19.53 [0 – 89]. In Spezies unterteilt zeigten sich die Altershäufigkeiten wie folgt:

Das mittlere Alter betrug für *A. schaalii* 46.45 ± 21.22 [0 – 88] Jahre, für *A. urinale* 45.67 ± 22.86 [2 – 81] Jahre und für *A. massiliae* 46.44 ± 17.67 [2 – 89] Jahre. Eine grafische Darstellung ist in Abbildung 10 zu sehen.

Frauen waren im Mittel 51.75 ± 24.51 Jahre und Männer 46.5 ± 15.71 Jahre alt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern ($p = 0.047$).

Innerhalb der, nach Spezies aufgeteilten, Gruppen gab es keine signifikante Altersdifferenz ($p = 0.991$).

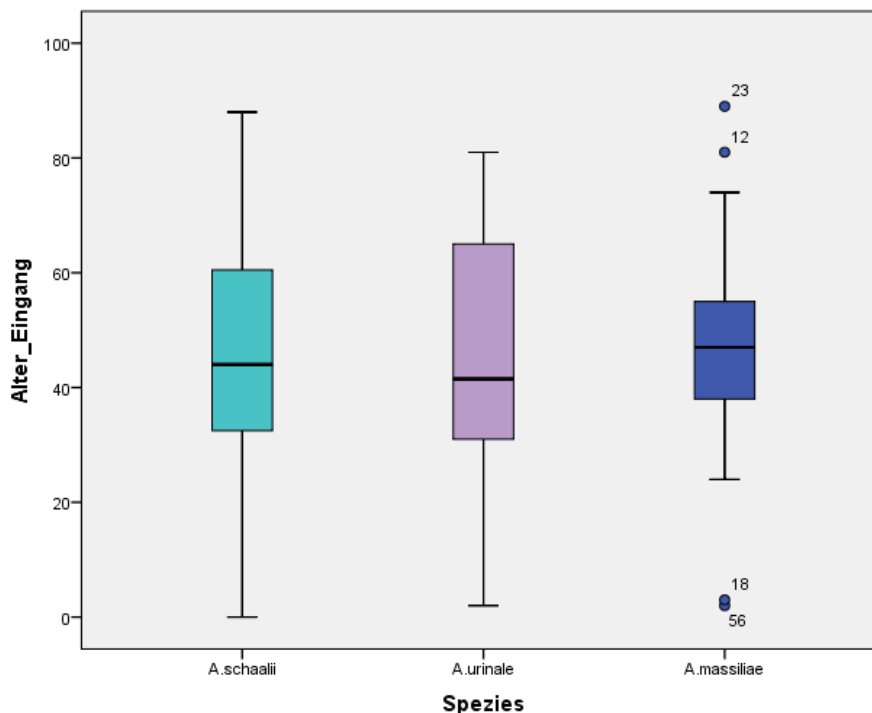


Abbildung 10: Boxplots der Altersverteilung aller drei analysierten Spezies

5.3 Probenherkunft

Die Herkunft der Patientenproben wurde geprüft, um zu sehen, ob es einen Unterschied zwischen *Actinobaculum*-positiven Einsendungen von externen Institutionen oder aus Spitälern gibt.

Es wurde bei den 130 Proben eine Mehrheit von Spitalsproben mit 75 (57.69%) gegenüber externen Proben mit 55 (42.31%) festgestellt.

Eine Aufteilung in die Spezies ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Probenherkunft

| | | Probenherkunft | | Gesamtsumme |
|-------------|---------------------|----------------|-----------------|-------------|
| | | externe Probe | klinische Probe | |
| Spezies | <i>A. schaalii</i> | 19 | 56 | 75 |
| | <i>A. urinale</i> | 7 | 5 | 12 |
| | <i>A. massiliae</i> | 29 | 14 | 43 |
| Gesamtsumme | | 55 | 75 | 130 |

Auffallend ist, dass *A. schaalii* in Proben, die aus Krankenhäusern stammen, deutlich öfter zu finden war als in den externen Proben. Bei *A. urinale* und *A. massiliae* verhält sich das genau umgekehrt.

In diesem Fall ist klar zu sehen, dass die Probenherkunft in mittelstarkem Zusammenhang mit der Spezies steht ($p= 0.00$; $V= 0.404$).

5.4 Probenmaterialien

Für die bessere statistische Analyse wurden die Untersuchungsmaterialien in Kategorien zusammengefasst.

Die Kategorie Abszess beinhaltet alle Abszesse, Pilonidalsini, Fisteln sowie Phlegmonen. In die Kategorie Wundabstrich wurden noch Serome inkludiert. Genitalabstriche beinhalten als Genitalabstrich eingereichte Proben sowie Cervix-, Vagina-, Vulva-, Penis- und Scroctum-Abstriche.

Die verbleibenden Begriffe wurden eins zu eins übernommen. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der jeweiligen Häufigkeiten.

Tabelle 6: Häufigkeitsverteilung der Probenmaterialien

| | Häufigkeit (n) | Häufigkeit (%) |
|------------------------|----------------|----------------|
| Ejakulat | 31 | 23.70 |
| Abszess | 29 | 22.10 |
| Wundabstrich | 23 | 17.60 |
| Genitalabstrich | 17 | 13.00 |
| Urethra | 13 | 9.90 |
| Ohr | 6 | 4.60 |
| Blutkultur | 4 | 3.10 |
| Atherom | 3 | 2.30 |
| Abdomen | 3 | 2.30 |
| Harn | 2 | 1.50 |
| Gesamtsumme | 131 | 100.00 |

Es ist zu sehen, dass Ejakulate die am häufigsten *Actinobaculum spp.* positiven Einsendungen waren. Den zweiten Rang belegen Abszesse, gefolgt von Genitalabstrichen.

Man sieht ein deutlich gehäuftes Vorkommen im Urogenitaltrakt (63/131; 48.09%).

Tabelle 7: Kreuztabelle mit den Häufigkeiten der Einsendematerialien und mit den drei Spezies

| | Spezies | | | Gesamtsumme |
|------------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------|
| | <i>A. schaalii</i> | <i>A. urinale</i> | <i>A. massiliae</i> | |
| Ejakulat | 12 | 8 | 11 | 31 |
| Ohr | 3 | 0 | 3 | 6 |
| Blutkultur | 4 | 0 | 0 | 4 |
| Abszess | 25 | 0 | 4 | 29 |
| Wundabstrich | 18 | 0 | 5 | 23 |
| Harn | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Atherom | 2 | 0 | 0 | 2 |
| Genitalabstrich | 3 | 4 | 10 | 17 |
| Urethra | 4 | 0 | 9 | 13 |
| Abdomen | 2 | 0 | 1 | 3 |
| Gesamtsumme | 75 | 12 | 43 | 130 |

Die Kreuztabelle zeigt, dass *A. schaalii* in allen Medien vertreten ist, hingegen wurde *A. urinale* ausschließlich im Urogenitaltrakt gefunden.

A. massiliae verhält sich ähnlich wie *A. schaalii* und ist somit vor allem im Harn- und Geschlechtstrakt präsent; auffallend ist ein deutlich geringeres Vorkommen in Abszessen und Wunden.

Auch zu beachten ist, dass Bakteriämien und somit gegebenenfalls uroseptische Verläufe nur bei *A. schaalii* beobachtet wurden.

5.5 Begleitflora

Die Analyse erfolgte nach der Gattung der gefundenen begleitenden Erreger.

Von den 132 Proben wurden 13 Monokulturen und 118 Kulturen, die polymikrobiell bewachsen waren, isoliert. Auffallend war, dass in den Monokulturen ausschließlich *A. schaalii* nachgewiesen werden konnten.

In Tabelle 8 befindet sich ein Überblick über alle 318 gefundenen bzw. identifizierten Erreger aus den Polykulturen.

Tabelle 8: Eine Übersicht über alle gefundenen Kommensalen und deren Häufigkeiten

| | Häufigkeit | Prozent | | Häufigkeit | Prozent |
|---------------------------|------------|---------|-----------------------------|------------|---------|
| Staphylococcus | 44 | 13.80% | Bifidobacterium | 2 | 0.60% |
| Streptococcus | 38 | 11.90% | Dermabacter | 2 | 0.60% |
| Enterococcus | 30 | 9.40% | Garnderella | 2 | 0.60% |
| Bacteroides | 27 | 8.50% | Haemophilus | 2 | 0.60% |
| Peptoniphilus | 24 | 7.50% | Proteus | 2 | 0.60% |
| Prevotella | 22 | 6.90% | Abiotrophia | 1 | 0.30% |
| Corynebacterium | 21 | 6.60% | aerobe Sporenbildner | 1 | 0.30% |
| Peptostreptococcus | 19 | 6.00% | Brevibacterium | 1 | 0.30% |
| Propionibacterium | 14 | 4.40% | Candida | 1 | 0.30% |
| Actinomyces | 11 | 3.50% | Capnocytophagia | 1 | 0.30% |
| Escherichia | 9 | 2.80% | Citrobacter | 1 | 0.30% |
| Finegoldia | 8 | 2.50% | Clostridium | 1 | 0.30% |
| Lactobacillus | 5 | 1.60% | Dialister | 1 | 0.30% |
| Porphyromonas | 5 | 1.60% | Enterobacter | 1 | 0.30% |
| Anaerococcus | 4 | 1.30% | Fusobacterium | 1 | 0.30% |
| Pseudomonas | 3 | 0.90% | Klebsiella | 1 | 0.30% |
| Varibaculum | 3 | 0.90% | Mobilungus | 1 | 0.30% |
| Acinetobacter | 2 | 0.60% | Pasteurella | 1 | 0.30% |
| Aerococcus | 2 | 0.60% | Stenotrophomonas | 1 | 0.30% |
| Atopobium | 2 | 0.60% | | | |

A. schaalii wurde 75 mal isoliert und war mit 146 verschiedenen Erregern vergesellschaftet, wobei Staphylokokken (13%), Streptokokken (11.6%), Bacteroides (9.6%), Peptoniphilus (8.9%), Prevotella (8.2%) sowie Enterokokken (5.5%) am häufigsten gefunden wurden.

A. urinale wurde 7 mal isoliert und war mit 36 anderen Erregern vergesellschaftet; davon waren am häufigsten: Peptoniphilus (22.2%), Streptokokken (13.9%), Bacteroides (8.3%), Propionibakterien (8.3%) und Staphylokokken (8.3%).

A. massilie wurde 29 mal isoliert und man fand 130 verschiedene vergesellschaftete Erreger. Oft vertreten waren: Staphylokokken (16.2%), Enterokokken (15.4%), Streptokokken (12.3%), Corynebakterien (9.2%), Peptostreptokokken (7.7%), Bacteroides (6.9%), Prevotella (6.2%), Actinomyces (4.6%), Escherichia (3.8%) und Propionibakterien (3.8%).

6 Diskussion

Die Literaturrecherche zeigt, dass vor allem *A. schaalii* ein neuartiges Pathogen des Urogenitaltrakts darstellt, das potentiell gefährliche Erkrankungen auslösen kann. Vor allem bei chronischen und mit empirischer Antibiotikatherapie nicht behandelbaren Harnwegsinfektion sollte eine *Actinobaculum spp.*-Infektion in Betracht gezogen und eine entsprechende Diagnostik bzw. Identifizierung eingeleitet werden.

Dies stellt aber schon eine kleine Hürde dar, da trotz innovativer Versuche und experimentellen Algorithmen die drei Spezien mit herkömmlichen, biochemischen Methoden nicht eindeutig zu identifizieren sind. Eine eindeutige Zuordnung gelingt allerdings mittels 16S-rRNA-Gensequenzierung oder der Massenspektrometrie (40).

Tuuminen et al. empfehlen die Verwendung der MALDI-TOF MS, wenn der Verdacht auf eine *Actinobaculum spp.*-Infektion besteht; diese ist allerdings limitiert auf *A. schaalii* und zu hinterfragen, da der Goldstandard der Identifizierung die 16S-rRNA-Genanalyse ist (40).

Nielson vertritt die Ansicht, alle Urinproben von über 60-jährigen mikroskopisch zu untersuchen, um ein sofortiges Entdecken von *Actinobaculum spp.* zu ermöglichen (51). Die eben genannte Vorgehensweise sollte man allerdings kritisch betrachten und eher bei begründetem Verdacht einer *Actinobaculum*-Infektion gezielt danach suchen. Dieser ist vor allem bei Vorhandensein eines chronischen und gegenüber empirischer Antibiotikatherapie refraktären HWI gegeben. Die Suche kann mittels Gram-Färbung, MALDI-TOF MS, 16S-rRNA-Gensequenzierung oder realtime quantitative PCR erfolgen (39).

In der retrospektiven Analyse von den am Hygiene-Institut Graz identifizierten Proben fiel auf, dass *A. schaalii* (75) am häufigsten nachgewiesen wurde, gefolgt von *A. massiliae* (43) und *A. urinale* (12).

Unsere Studienergebnisse (63/131; 48.09%) weisen auf ein primäres Vorkommen im Urogenitaltrakt hin und decken sich somit mit internationalen Ergebnissen (6,7,14,37).

Mit 39.7% fanden sich Vertreter der *Actinobaculum*-Gattung in Wunden und Abszessen wieder, was auf ein ebenso bedeutendes Vorkommen schließen lässt. Dies wird durch eine Studie bestätigt, bei der von 40 Isolaten 22.2% in Abszessen nachgewiesen wurden. 37% der *Actinobaculum*-Erreger

fanden sich im Blut wieder (7); von weiteren septischen Verläufen beziehungsweise septischen Komplikationen, wie Spondylodiszitis und Endocarditis, wurde ebenfalls bereits berichtet (10,11,20,22,36,52,53), allerdings fand sich in unserer Studie mit lediglich vier Isolaten aus Blutkulturen (ausschließlich *A. schaalii*) ein deutlich geringeres, potentiell (uro-)septisches, Vorkommen wieder.

Auffallend war, dass *A. schaalii* am häufigsten aus klinischen Proben (56/75) isoliert wurde, wohingegen *A. urinale* und *A. massiliae* vermehrt in den spitals-externen Proben gefunden wurden (7/12 und 29/43). Die statistische Analyse zeigte einen mittelstarken Zusammenhang zwischen dem Vorkommen und der Probenherkunft.

Bislang sind diese Studien, zusammen mit der Studie von Beguelin et al., die einzigen, die nicht nur Proben von hospitalisierten Patienten untersucht haben, allerdings wurde die Probenherkunft nur hier explizit untersucht. Folglich sind weitere Analysen erforderlich, um diesbezüglich eine generelle Aussage treffen zu können.

In einer größeren Fallstudie wurde gezeigt, dass das mittlere Alter von 27 Patientenproben mit einer positiven *A. schaalii*-Kultur bei 73 Jahren liegt. Ein vermehrtes Vorkommen bei Männern mit 59.3% wurde ebenfalls beobachtet (7).

Eine weitere Studie mit 55 Fällen zeigt, dass alle Patienten mit Cystitis und Urosepsis älter als 61 Jahre beziehungsweise 70 Jahre waren (51).

Beguelin et al. berichten von einem mittleren Alter von 65 Jahren und einem vermehrten Vorkommen bei Männern von 52% (37).

Olsen A. et al. zeigen, dass von 14 *A. schaalii*-Funden im Zuge einer Untersuchung für eine ESWL-Therapie 12 Patienten über 50 Jahre waren. Die positiven Genitalabstriche kamen vermehrt von Frauen, jedoch wurde kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *A. schaalii* und dem Alter gefunden (17). In unserer Studie fällt der Altersdurchschnitt einer *A. schaalii*-Infektion mit 46.45 Jahren wesentlich jünger aus als in zuvor genannten Studien.

Wenn man alle drei Spezies betrachtet, liegt das mittlere Alter aller Patienten bei 46.22 Jahren; Frauen waren mit 51.75 Jahren um 5.25 Jahre im Schnitt älter als Männer mit 46.5 Jahren.

Die Ergebnisse von Anderson zeigen, dass von 15 Kindern, alle jünger als vier Jahre, ebenfalls fünf mit *A. schaalii* kolonisiert waren (15). Unsere Analyse zeigt ebenfalls Patienten mit einem Alter

weit unter dem Durchschnitt. Das minimale Alter für *A. schaalii* lag bei 5 Tagen und für *A. urinale* und *A. massiliae* bei 2 Jahren.

Aufgrund dieser Ergebnisse lässt sich schließen, dass auch jüngere Patienten als bisher angenommen ein Risiko tragen, an einer *Actinobaculum*-Infektion zu erkranken.

Weiters konnten wir in dieser Studie ein eindeutiges Männer-dominiertes Vorkommen, mit 64.9% , feststellen. Dies konnte für alle drei *Actinobaculum*-Erreger bestätigt werden.

Wir konnten deutlich weniger Monokulturen (13 - alle mit *A. schaalii*) nachweisen als in der internationalen Literatur angegeben.

So wurde in den größeren Fallstudien 21/38, 18/21, 8/12 und 10/20 *A. schaalii* als einziger Erreger identifiziert (7,10,22,37).

Ebenso berichten Zimmermann P. et al. von vier Monokulturen und von mit *nicht-hämolisierenden Streptokokken* und *Klebsiella pneumoniae* besiedelten Polykulturen in pädiatrischen Patienten (16).

Weiters wurden noch folgende konkomitante Erreger in vier Polykulturen von Gomez et al. nachgewiesen: *Aerococcus urinae*, *E. coli*, *Enterokokken*, *koagulase negative Staphylokokken*, Hefepilze (10).

Tschudin-Sutter berichtet von *Pseudomonas aeruginosa*, *Fingoldia magna*, *Clostridium clostridioforme*, *Bacteroides fragilis* und *Veillonella* in 17 Kulturen (7).

Tuuminen et al. haben elf Isolate überprüft und fanden *Corynebakterien*, *Aerokokken*, *Peptoniphilus assacharolyticus*, *Oligella urethralis*, *Lactobacillus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Atopobium parvulum*, *Peptostreptococcus tetradius* (40).

Bei einem Fallbericht über eine vertebrale Osteomyelitis, die von *A. schaalii* ausgelöst wurde, fand sich in der selben Probe *Corynebacterium striatum* und in dem durch *Actinobaculum* verursachten Fournier's Gangrän wurden *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Bacteroides fragilis* und *Candida albicans* gefunden (22).

Bis auf *Oligella urethralis*, *Clostridium clostridioforme*, *Peptoniphilus assacharolyticus*, *Atopobium parvulum*, *Candida albicans* konnten alle genannten Erreger in unseren 131 Isolaten ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings erfolgte die Identifikation oft nur als entsprechende Gattung, und so fanden wir ebenfalls *Clostridium spp.*, *Peptoniphilus spp.* und *Klebsiella spp.*.

In einer Probe konnten wir einen Hefepilz (*Candida parapsilosis* und *A. schaalii*) identifizieren.

Die häufigsten von uns gefundenen Gattungen waren:

Staphylokokken (13.8%), *Streptokokken* (11.9%), *Enterokokken* (9.4%), *Bacteroides* (8.5%),
Peptoniphilus (7.5%), *Prevotella* (6.9%), *Corynebakterien* (6.6%) und *Peptostreptokokkus* 6%).

Alle anderen Erreger wurden in weniger als 5% der Fälle nachgewiesen.

7 Conclusio

Actinobaculum spp. ist eine neuartige Gattung, deren primäres Habitat der Urogenitaltrakt ist. Ärzte sollten über ihr Pathogenitäts-Potential Bescheid wissen, denn hierbei handelt es sich um Erreger mit potentiell pathogenen Charakter, der von einfachen Zystiden bis zu schweren systemischen und septischen Erkrankungen reicht.

Bisweilen nahm man an, dass vor allem ältere Menschen (70+) betroffen sind, allerdings zeigt die hier durchgeführte Studie eindeutig, dass ebenso Kinder und jüngere Personen davon betroffen sein können.

Wie aus der Literatur hervorgeht, sollte vor allem bei Harnwegsinfekten, die nicht auf empirische Therapien ansprechen und im Harnstreifen-Test eine Leukozytenerhöhung und negatives Nitrit zeigen, an eine *Actinobaculum*-Infektion gedacht werden und eine Gram-Färbung der Harnproben sowie eine Identifizierung mittels MALDI-TOF MS oder 16S-rRNA-Gensequenzierung angestrebt und eine Therapie mit Beta-Laktam-Antibiotika eingeleitet werden.

Nichtsdestotrotz ist über die Dauer der benötigten Behandlung noch wenig bekannt, wofür weitere Studien notwendig sind.

7.1 Limitierungen der Studie

- Am Hygiene Insitut Graz/Medizinische Universität Graz werden Harne nicht routinemäßig auf *Actinobaculum* untersucht, wohingegen die internationale Literatur ihre Isolate fast ausschließlich aus Harnen gewonnen hat, was zu einer möglichen Einschränkung der Studie führt.

- Über die klinische Signifikanz der *Actinobaculum*-positiven Proben lässt sich keine Aussage treffen, da dies nicht Ziel der Studie war und zudem auch keine Informationen über die Erkrankungen der Patienten und deren Verlauf vorhanden waren.

Literaturverzeichnis

1. Wegienek, J., and C. A. Reddy. Taxonomic study of "Corynebacterium suis" (Soltys and Spratling): proposal of *Eubacterium suis* (nom. rev.) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1982 23:218-228.
2. Ludwig, W., G. Kirchhof, M. Weizenegger, and N. Weiss. Phylogenetic evidence for transfer of *Eubacterium suis* to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces suis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1992 42:161-165.
3. Lawson PA, Falsen E, Akervall E, Vandamme P, Collins MD. Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1997 Jul;47(3):899-903.
4. Greub G, Raoult D. "Actinobaculum massiliae," a new species causing chronic urinary tract infection. *J Clin Microbiol* 2002 Nov;40(11):3938-3941.
5. Hall V, Collins MD, Hutson RA, Falsen E, Inganas E, Duerden BI. *Actinobaculum urinale* sp. nov., from human urine. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003 May;53(Pt 3):679-682.
6. Cattoir V. *Actinobaculum schaalii*: review of an emerging uropathogen. *J Infect* 2012 Mar;64(3):260-267.
7. Tschudin-Sutter S, Frei R, Weisser M, Goldenberger D, Widmer AF. *Actinobaculum schaalii* - invasive pathogen or innocent bystander? A retrospective observational study. *BMC Infect Dis* 2011 Oct 26;11:289-2334-11-289.
8. Cattoir V. *Actinobaculum schaalii*: review of an emerging uropathogen. *J Infect* 2012 Mar;64(3):260-267.
9. Kristiansen R, Dueholm MS, Bank S, Nielsen PH, Karst SM, Cattoir V, Lienhard R, Grisold AJ, Olsen AB, Reinhard M, Søby KM, Christensen JJ, Prag J, Thomsen TR. Complete Genome Sequence of *Actinobaculum schaalii* Strain CCUG 27420. *Genome Announc* 2014 Sep;4;2(5).
10. Gomez E, Gustafson DR, Rosenblatt JE, Patel R. *Actinobaculum* bacteremia: a report of 12 cases. *J Clin Microbiol* 2011 Dec;49(12):4311-4313.
11. Sturm PD, Van Eijk J, Veltman S et al. Urosepsis with *Actinobaculum schaalii* and *Aerococcus*

urinae. *J Clin Microbiol* 2006;44: 652–4.

12. Vasquez MA, Marne C, López-Calleja AI, Martín-Saco G, Revillo MJ. *Actinobaculum schaalii* recurrent urinary infection in a centenarian patient. *Geriatr Gerontol Int*. 2013 Jul;13(3):807-8.

13. Larios OE, Bernard KA, Manickam K, Ng B, Alfa M, Ronald A. First report of *Actinobaculum schaalii* urinary tract infection in North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010 Jul;67(3):282-285.

14. Barberis C, Cittadini R, del Castillo M, Acevedo P, García Roig C, Ramírez MS, Pérez S, Almuzara M, Vay C. *Actinobaculum schaalii* causing urinary tract infections: report of four cases from Argentina. *J Infect Dev Ctries* 2014 Feb 13;8(2):240-4

15. Andersen LB, Bank S, Hertz B, Søby KM, Prag J. *Actinobaculum schaalii*, a cause of urinary tract infections in children?. *Acta Paediatr* 2012 May;101(5):232-4.

16. Zimmermann P, Berlinger L, Liniger B, Grunt S, Agyeman P, Ritz N. *Actinobaculum schaalii* an emerging pediatric pathogen?. *BMC Infect Dis* 2012 Aug 28;12:201.

17. Olsen AB, Andersen PK, Bank S, Soby KM, Lund L, Prag J. *Actinobaculum schaalii*, a commensal of the urogenital area. *BJU Int* 2013 Aug;112(3):394-397.

18. van Aarle S, Arents NL, de Laet K. *Actinobaculum schaalii* causing epididymitis in an elderly patient. *J Med Microbiol* 2013 Jul;62(Pt 7):1092-3.

19. Lotte R, Durand M, Mbeutcha A, Ambrosetti D, Pulcini C, Degand N, Loeffler J, Ruimy R, Amiel J. A rare case of histopathological bladder necrosis associated with *Actinobaculum schaalii*: the incremental value of an accurate microbiological diagnosis using 16S rDNA sequencing. *Anaerobe* 2014 Apr;26:46-8.

20. Hoenigl M, Leitner E, Valentin T, Zarfel G, Salzer HJ, Krause R, et al. Endocarditis caused by *actinobaculum schaalii*, Austria. *Emerg Infect Dis* 2010 Jul;16(7):1171-1173.

21. Vanden Bempt I, Van Trappen S, Cleenwerck I, De Vos P, Camps K, Celens A, et al. *Actinobaculum schaalii* causing Fournier's gangrene. *J Clin Microbiol* 2011 Jun;49(6):2369-2371.

22. Haller P, Bruderer T, Schaeren S, Laifer G, Frei R, Battegay M, et al. Vertebral osteomyelitis caused by *Actinobaculum schaalii*: a difficult-to-diagnose and potentially invasive uropathogen. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007 Sep;26(9):667-670.

23. Fendukly F, Osterman B. Isolation of *Actinobaculum schaalii* and *Actinobaculum urinale* from a patient with chronic renal failure. *J Clin Microbiol* 2005 Jul;43(7):3567-3569.

24. Waghorn DJ. *Actinobaculum massiliae*: a new cause of superficial skin infection. *J Infect* 2004 Apr;48(3):276-277.
25. Biksi I, Major A, Fodor L, Szenci O, Vetesi F. In vitro sensitivity of Hungarian *Actinobaculum suis* strains to selected antimicrobials. *Acta Vet Hung* 2003;51(1):53-59.
26. Drancourt M, Berger P, Raoult D. Systematic 16S rRNA Gene Sequencing of Atypical Clinical Isolates Identified 27 New Bacterial Species Associated with Humans. *J Clin Microbiol* 2004 May; 42(5): 2197–2202.
27. Herbert R, Krautzig S: *Basislehrbuch Innere Medizin*. 4. Auflage. München: Urban & Fischer; 2008.
28. Hauptmann R: *Urologie*. 4. Auflage. Heidelberg: Springer; 2010.
29. Böcker W, Denk H, Heitz U, Höfler G, Kreipe H, Moch H: *Pathologie*. 5. Auflage. München: Urban & Fischer; 2012.
30. Suerbaum S, Hahn H, Burchard G, Kaufmann S, Schulz T, u.a.: *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer; 2012.
31. Kayser F, Böttger E, Zinkernagel R, Haller O, Eckert J, Deplazes P: *Medizinische Mikrobiologie*. 12. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2010.
32. Adreae S: *Lexikon der Krankheiten und Untersuchungen*. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2008. S. 5.
33. Szombath M: Steißbeinfistel (*Sinus pilonidalis*, “Haarnestgrübchen”) [Internet]. [zitiert am 26.07.2014]. 2006. Verfügbar unter <http://www.medizin-netz.de/umfassende-berichte/steissbeinfistel-sinus-pilonidalis-haarnestgruebchen/>
34. UniversitätsSpital Zürich: Steißbeinfistel [Internet]. [zitiert am 26.07.2014]. Verfügbar unter [http://www.vis.usz.ch/PATIENTENUNDBESUCHER/PROKTOLOGIE/ERKRANKUNGEN/Seite n/Steissbeinfistel.aspx](http://www.vis.usz.ch/PATIENTENUNDBESUCHER/PROKTOLOGIE/ERKRANKUNGEN/Seite%20n/Steissbeinfistel.aspx)
35. Hof H, Dörries R, u.a.: *Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie*. 5. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2014.
36. Reinhard M, Prag J, Kemp M et al. Ten cases of *Actinobaculum schaalii* infection: clinical relevance, bacterial identification, and antibiotic susceptibility. *J Clin Microbiol* 2005; 43:5305–8
37. Beguelin, C., Genne, D., Varca, A., Tritten, M. L., Siegrist, H. H., Jaton, K. & Lienhard, R. . *Actinobaculum schaalii*: clinical observation of 20 cases. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1027–

1031.

38. Bank S, Jensen A, Hansen TM et al. Actinobaculum schaalii, a common uropathogen in elderly patients. Emerg Infect Dis 2010; 16:76–80

39. Bank S, Cattoir V, Lienhard R, Grisold AJ, Thomsen TR, Reinhard M, Olsen AB, Christensen JJ, Søby KM, Prag J. Recommendations for optimal detection and identification of Actinobaculum schaalii in urine. APMIS 2014 Oct;122(10):1043-4.

40. Tuuminen T, Suomala P, Harju I. Actinobaculum schaalii: identification with MALDI-TOF. New Microbes New Infect 2014 Mar; 2(2): 38–41.

41. Wikipedia: Bunte Reihe (Labor) [Internet]. [zitiert am 03.02.2015]. Verfügbar unter: http://de.wikipedia.org/wiki/Bunte_Reihe_%28Labor%29

42. bioMérieux: API® biochemische Identifizierung [Internet]. [zitiert am 03.02.2015]. Verfügbar unter: http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_4&pubparams.sform=0&lang=de%20+%20http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_IND_BPA_PRD&doc=GRM_IND_BPA_PRD_G_PRD_NDY_20&pubparams.sform=6&lang=de

43. bioMérieux: VITEK® 2 [Internet]. [zitiert am 03.02.2015]. Verfügbar unter: http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_11&pubparams.sform=1&lang=de%20+%20http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_4&pubparams.sform=9&lang=de

44. Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics. 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum; 2009.

45. Microbe World®: 6S rRNA [Internet]. [zitiert am 04.02.2015]. Verfügbar unter: <http://www.microbeworld.org/careers/tools-of-the-trade/genetic-tools-and-techniques/16s-rrna>

46. Nelson D, Cox M: Lehninger Biochemie. 3. Auflage. Heidelberg: Springer; 2001.

47. Engelmann E, Kugler F. MALDI-TOF Massenspektrometrie. Labor L+S AG [Internet]. [zitiert am 05.02.2015]. Verfügbar unter: http://www.labor-ls.de/de-downloads-publikationen.html?file=tl_files/l_s_download/publikationen/TP0201_0104_sd_engelmann.pdf

48. bioMérieux: VITEK® MS [Internet]. [zitiert am 05.02.2015]. Verfügbar unter:

http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_80&pubparams.sform=1&lang=de

49. Cattoir V, Varca A, Greub G, Prod'hom G, Legrand P, Lienhard R. In vitro susceptibility of *Actinobaculum schaalii* to 12 antimicrobial agents and molecular analysis of fluoroquinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 2010 Dec;65(12):2514-7.
50. Hays C, Lienhard R, Auzou M, Barraud O, Guérin F, Ploy MC, Cattoir V. Erm(X)-mediated resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins in *Actinobaculum schaalii*. *J Antimicrob Chemother* 2014 Aug;69(8):2056-60.
51. Nielsen HL, Søby KM, Christensen JJ, Prag J. *Actinobaculum schaalii*: a common cause of urinary tract infection in the elderly population. Bacteriological and clinical characteristics. *Scand J Infect Dis* 2010;42(1):43-7.
52. Hesstvedt L, Hasseltvedt V, Aandahl E, Caugant D, Høiby EA. Septicaemia due to *Actinobaculum schalii*. *Scand J Infect Dis* 2006;38(8):735-7.
53. Martinaud C, Gaillard T, Maslin J, Rivière P, Fournier R, Trueba F, Brisou P: *Actinobaculum schaalii* bacteria in an aged male patient. *Med Mal Infect* 2008, 38:617-619.
54. Grabe M, Bartoletti R, Bjerklund-Johansen TE, Çek M, Naber KG, Pickard RS, Tenke P, Wagenlehner F, Wullt B. Guidelines on urological infections. European Association of Urology [Internet]. [zitiert am 27.03.2015]. Verfügbar unter: http://uroweb.org/wp-content/uploads/PCUrological-Infections_LR.pdf
55. Gilbert D, Moellering R, Eliopoulos G, Chambers H, Saag M. *The Sanford Guide to Antibicrobial Therapy* 2010. 40. Auflage. Sperryville: Antimicrobial Therapy, Inc; 2010.