

Abschlussbericht

Berichtszeitraum 01.04.2012 – 30.09.2015

Aktenzeichen 514-06.01

des Forschungsverbundes

FKZ 2811HS010: Teilprojekt 1, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit

FKZ 2811HS020: Teilprojekt 2, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Lebensmittel- und Veterinärinstitut Oldenburg, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee

FKZ 2811HS021: Teilprojekt 3, Freie Universität Berlin, Institut für Geflügelkrankheiten, in Zusammenarbeit mit dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Berlin, Referat 505: Antibiotikaresistenzmonitoring

Thema:

**„Standardisierung der Antibiotikaresistenzdiagnostik;
Empfehlungen der Deutschen Veterinärmedizinischen
Gesellschaft“**

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Das Forschungsvorhaben sollte in der Gesamtheit einen Beitrag zum Erreichen der Ziele der Deutschen Antibiotikaresistenzstrategie (DART), getragen vom BMEL, leisten. DART soll den Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung insgesamt vermindern und einen rationalen Einsatz von Antibiotika ermöglichen. Dadurch soll ein erheblicher Beitrag zu einer Verringerung von Antibiotikaresistenzen geleistet werden, um Therapiemöglichkeiten in der Human- und Veterinärmedizin zu erhalten. Ein wichtiger Teil von DART ist die Verbesserung der Resistenzdiagnostik. Für wichtige Erreger in der Veterinärmedizin fehlten solche international anerkannten Standards. Diese sind die Voraussetzung für eine sichere Bestimmung der Empfindlichkeit und daraus abgeleitete Therapieempfehlungen.

Daher sollten im Rahmen des Projektvorhabens Protokolle erarbeitet werden, die eine Standardisierung der Resistenzprüfung von wichtigen Erregern aus der Nutztierhaltung ermöglichen. Folgende Erreger wurden in die Studien einbezogen:

- *Bordetella bronchiseptica* von Schweinen und Hunden,
- *Haemophilus parasuis* von Schweinen
- *Rhodococcus equi* von Pferden und anderen Tierarten,
- *Arcobacter* spp. von Geflügel, Rindern und Schweinen, sowie vom Menschen,
- *Trueperella* (früher *Arcanobacterium*) *pyogenes* von Rindern und Schweinen,
- *Riemerella anatipestifer* vom Geflügel,
- *Ornithobacterium rhinotracheale* vom Geflügel.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Im Rahmen des Projektes sollten Methoden erarbeitet werden, die eine quantitative Empfindlichkeitsbestimmung (Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration, MHK) der unter Punkt 1 angegebenen Bakterienspezies bzw. -genera ermöglichen. Dazu wurde eine Aufteilung der zu bearbeitenden Erreger auf die Teilprojekte vorgenommen. Die folgende Aufteilung der zu bearbeitenden Bakterienspezies wurde dabei gewählt:

Teilprojekt 1, Mittelempfänger TiHo Hannover:

Bearbeitung der Erreger *Haemophilus parasuis* und *Bordetella bronchiseptica*

Teilprojekt 2, Mittelempfänger LAVES (LVI Oldenburg):

Bearbeitung der Erreger *Rhodococcus equi*, *Arcobacter* spp. und *Trueperella pyogenes*

Teilprojekt 3, Mittelempfänger FU Berlin:

Bearbeitung der Erreger *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale*

Für jedes Teilprojekt wurde eine Doktorandin eingestellt. Die Betreuung der Doktorandinnen wurde über die an einer veterinärmedizinischen Bildungsstätte habilitierten Mitglieder sichergestellt, welche die Betreuung der Doktoranden übernahmen.

Die nachstehenden Arbeitspakete waren (mit Einschränkung für *Trueperella pyogenes*) für jeden der zu bearbeitenden Erreger geplant. Die Arbeitspakete 1 bis 3 umfassten die Erarbeitung einer grundsätzlich geeigneten Testmethode, die Arbeitspakete 4 bis 6 die Etablierung von QC-Stämmen und die Überprüfung der erarbeiteten Methode und die Arbeitspakete 7 und 8 die Präsentation und Publikation der erarbeiteten Methode. Die Arbeitspakete wurden möglichst in der beschriebenen Reihenfolge durchgeführt, je nach aktuellen Gegebenheiten wurden allerdings Anpassungen im zeitlichen Ablauf der Arbeitspakete vorgenommen.

Die Arbeitspakete mit jeweiligen Meilensteinen umfassten:

- 1 Literaturrecherche zu den bisher für die Empfindlichkeitsbestimmung verwendeten Methoden; Feststellung zu überprüfender Testparameter und möglicher Verfahren
- 2 Beschaffung von Referenzstämmen und Feldisolaten der jeweiligen Spezies, Etablierung von Methoden zur Kultivierung, Asservierung, Identifizierung und Typisierung; Generierung definierter Stämme für die folgenden Arbeitspakete
- 3 Versuche zur Auswahl eines geeigneten Testmediums und geeigneter Testbedingungen anhand einer begrenzten Anzahl von Stämmen; Einigung auf eine geeignete Methode

⇒ **Meilenstein 1: Erarbeitung einer prinzipiell geeigneten Testmethode**

- 4 Überprüfen des Verhaltens anerkannter QC-Stämme unter den erarbeiteten Bedingungen, Erarbeitung von QC-Kriterien zu der neu erarbeiteten Methode, falls notwendig

- 5 Testung von 50-100 möglichst aktuellen Feldisolaten mit der erarbeiteten Methode und unter Verwendung definierter QC-Stämme; Eignung der neu erarbeiteten Methode für die Testung aktueller Feldisolate
- 6 Überprüfen der erarbeiteten Methode im Rahmen von Ringversuchen

⇒ **Meilenstein 2: Eignung der neu erarbeiteten Methode für die Durchführung in verschiedenen Laboratorien mit Qualitätskontrollen**
- 7 Präsentation der erarbeiteten Testverfahren bei VAST-CLSI
- 8 Erstellung von wissenschaftlichen Publikationen und Dissertationen

⇒ **Meilenstein 3: Übernahme der neu erarbeiteten Methode in Teststandards und Publikation**

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Die Erarbeitung verlässlicher Daten zur Empfindlichkeitsprüfung in der veterinärmedizinischen Routinediagnostik setzt voraus, dass für die entsprechenden Erregergruppen international anerkannte Durchführungsvorschriften, wie bspw. in den Dokumenten M31-A3 und den Folgedokumenten VET01-A4, VET01-S2 und VET01S (2015) des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) niedergelegt, existieren. Diese Durchführungsvorschriften enthalten wichtige Informationen zu den für die Empfindlichkeitsprüfung zu verwendenden Medien, Inokulumsdichten, Bebrütungszeiten und -bedingungen sowie zu den zur Qualitätskontrolle zu verwendenden Referenzstämmen. Nur anhand anerkannter Durchführungsvorschriften erarbeitete Daten zur Erregerempfindlichkeit stellen verlässliche Informationen für den behandelnden Tierarzt im Hinblick auf die Auswahl des sinnvollsten antimikrobiellen Wirkstoffes dar.

Zu Projektbeginn gab es keine international anerkannten Durchführungsvorschriften für die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung einer Vielzahl wirtschaftlich relevanter Erreger von Tieren, so auch für die im beantragten Projekt zu untersuchenden Erreger: *Haemophilus parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Rhodococcus equi*, *Arcobacter* spp., *Trueperella pyogenes*, *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale*.

In der Routinediagnostik kommen für die Empfindlichkeitsbestimmung dieser Erreger daher meist hauseigene, nicht standardisierte Verfahren zum Einsatz. Eine Literaturrecherche in

PubMed ergab, dass jedoch für diese Erreger bereits In-Vitro-Empfindlichkeitsverfahren eingesetzt und die damit erhaltenen Ergebnisse publiziert wurden: *B. bronchiseptica* (1,2), *H. parasuis* (3,4), *R. equi* (5,6), *Arcobacter* spp. (7,8), *T. pyogenes* (9,10), *R. anatipestifer* (11,12) und *O. rhinotracheale* (13,14). Ein systematischer Vergleich und eine Validierung der Verfahren sowie eine Überprüfung hinsichtlich ihrer Gebrauchstauglichkeit („Fitness for use“) in der Routinediagnostik fehlten jedoch. Dennoch enthielten die vorab genannten Publikationen wertvolle Hinweise im Hinblick auf die zu Beginn der Arbeiten noch zu definierenden optimalen Testparameter für die verschiedenen Erreger.

Der interdisziplinäre DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ hat im Rahmen seiner Tätigkeit bislang eine Reihe von Publikationen erstellt, die sich mit Verfahren der Empfindlichkeitsprüfung (15), pharmakologischen Grundlagen (16), Kreuzresistenzen (17), der Auswahl von Leitsubstanzen für die Empfindlichkeitsprüfung, den Ergebnissen eines Ringversuches unter Verwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode (18,19) sowie Therapieversagen in der tierärztlichen Praxis (20) beschäftigten. Weiterhin hat der DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ Standardlayouts für die Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Erregern aus Mastitisfällen (21), von Großtieren (21) und von Kleintieren (22) mittels Bouillon-Mikrodilution erarbeitet, die regelmäßig überarbeitet werden und derzeit in der Routinediagnostik deutschlandweit zum Einsatz kommen. Weiterhin ist es dem DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ gelungen, klinische Grenzwerte für Amoxicillin und porcine Atemwegsinfektionserreger zu erarbeiten (23), die vom CLSI anerkannt wurden und in das 2013 erschienene Dokument VET01-A4 aufgenommen wurden und auch in den nachfolgenden Dokumenten wie dem derzeit aktuellen Dokument VET01S (2015) enthalten sind. Die Mitglieder des Arbeitskreises „Antibiotikaresistenz“ waren bereit, die Forschungsvorhaben durch ihr Fachwissen und ihre weitreichende Erfahrung auf dem Gebiet der Antibiotikaresistenz (z.B. in Vorträgen und Diskussionen über Projektergebnisse) zu unterstützen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Qualitätskontrollstämmen für die Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration mittels Bouillon-Mikrodilution und Referenzstämmen für die Methodenetablierung

In allen Projekten wurden die Stämme *Escherichia coli* ATCC® 25922 und *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 als Qualitätskontrollstämmen (QC-Stämme) für die Empfindlichkeitsbestimmung eingesetzt. Für *H. parasuis* wurden zusätzlich *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC® 27090 und *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 als QC-Stämme eingesetzt. Diese und alle im Folgenden aufgeführten Kontroll-, Typ- und sonstige Referenzstämmen wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

Referenzstämmen wurden sowohl für die Etablierung von Methoden zur Identifizierung und Typisierung der untersuchten Spezies als auch für die Etablierung der Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung eingesetzt. Die verwendeten Stämme werden in tabellarischer Form dargestellt (Tab. 2.1.1).

Tabelle 2.1.1 Verwendete Referenzstämme

Spezies	Stammname
Projekt 2811HS010	
<i>B. bronchiseptica</i>	DSM 10303
<i>B. bronchiseptica</i>	DSM 13414
<i>B. avium</i>	DSM 11332
<i>B. hinzii</i>	DSM 11333
<i>H. parasuis</i>	DSM 21448
<i>H. somni</i>	ATCC® 700025
<i>A. pleuropneumoniae</i>	ATCC® 27090
Projekt 2811HS020	
<i>R. equi</i>	DSM 20307 (ATCC® 25729)
<i>A. butzleri</i>	ATCC® 49616
<i>A. butzleri</i>	DSM 7301
<i>A. skirrowii</i>	DSM 7302
<i>A. cryaerophilus</i>	ATCC® 43158
<i>A. cibarius</i>	DSM 17680
<i>A. thereius</i>	DSM 23385
<i>T. pyogenes</i>	DSM 20594
<i>T. pyogenes</i>	DSM 20630 (ATCC® 19411)
Projekt 2811HS021	
<i>R. anatipestifer</i>	DSM 15868
<i>O. rhinotracheale</i>	DSM 15997

2.1.2 Stammsammlungen (Feldstämme), Anzuchtbedingungen, Asservierung

In allen Projekten wurden aktuelle Isolate für die Etablierung der Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung sowie für die Anwendung der entwickelten Methoden gesammelt.

In **Teilprojekt 1 (2811HS010)** wurden 146 Feldisolate der Spezies *B. bronchiseptica* aus den Jahren 2010 bis 2012 in die Stammsammlung aufgenommen (103 Isolate von Schweinen sowie 43 Isolate anderer Tierarten). *B. bronchiseptica* wurde auf Columbia-Schafblutagar-Platten (BAP) aerob bei 35-37 °C angezüchtet. Die Asservierung erfolgte mittels Kryokonservierung.

Für die Untersuchungen zu *H. parasuis* wurden insgesamt 48 Feldstämme aus den Jahren 2010 bis 2013 eingesetzt. Die Kultivierung erfolgte auf Kochblutagar-Platten mit defibriniertem Pferdeblut mikroaerophil bei 35-37 °C. Die Asservierung erfolgte ebenfalls mittels Kryokonservierung.

In **Teilprojekt 2 (2811HS020)** wurden 200 Feldisolate (davon 155 Isolate von Pferden) von *R. equi* in die Studie einbezogen. Es wurden sowohl aktuelle Isolate als auch ältere Isolate (für Vergleichszwecke) verwendet. *R.-equi*-Isolate wurden auf BAP aerob bei 35-37 °C angezüchtet; die Asservierung erfolgte auch hier mittels Kryokonservierung.

An Isolaten für die Untersuchungen zu *Arcobacter* spezieen standen 77 Feldisolate aus den Jahren 1995 bis 2015, davon 65 *A. butzleri*, zur Verfügung. Die Anzucht der *Arcobacter*-Isolate erfolgte auf BAP aerob bei 35-37 °C für 24-28 Stunden. Eine Asservierung erfolgte entweder mittels Kryokonservierung oder mittels Lyophilisieren.

Für die Untersuchungen zu *T. pyogenes* standen insgesamt 320 Feldisolate überwiegend bovinen Ursprungs zur Verfügung, von denen 206 Isolate für die Empfindlichkeitsbestimmung ausgewählt wurden. Alle Isolate wurden auf BAP mikroaerophil bei 35-37 °C angezüchtet und mittels Kryoasservierung oder Lyophilisieren aufbewahrt.

In **Teilprojekt 3 (2811HS021)** wurden 109 Isolate von *R. anatipestifer* aus Puten-, Enten- und Hühnerbeständen untersucht. Alle Isolate wurden ebenfalls auf BAP angezüchtet und mittels Kryokonservierung asserviert.

Ebenfalls 100 Isolate wurden von *O. rhinotracheale* einbezogen; die Isolate stammten aus den Jahren 2009 bis 2012. Auch Isolate dieser Spezies wurden auf BAP angezüchtet und mittels Kryokonservierung asserviert.

2.1.3 Verwendete Mikrotiterplatten

Es wurden im Laufe des Projektes acht verschiedene Mikrotiterplattenbelegungen (Layouts) eingesetzt. Die eingesetzten Layouts stammen aus den Routineuntersuchungen des Bundesamtes für Verbraucherschutz (BVL), Berlin, und wurden entsprechend den Anforderungen des BVL dabei im Verlaufe der Jahre entweder in einzelnen Wirkstoffen oder aber in einzelnen Konzentrationsstufen verändert. Alle Platten wurden in allen drei Projekten verwendet und sowohl für die Methodenetablierung, die Untersuchung der Stammsammlungsisolate als auch die Ringversuche genutzt. Alle Mikrotiterplatten wurden vom BVL, Berlin, gesammelt von Firma TREK bezogen und den Projektpartnern weitergeleitet. Jede Mikrotiterplatte war mit acht verschiedenen Wirkstoffen oder Wirkstoffkombinationen in 10-12 Konzentrationsstufen beschickt. Die Wirkstoffe lagen in lyophilisierter Form vor. Qualitätskontrollen wurden vom Hersteller durchgeführt; die Haltbarkeit der Platten wurde in jedem Fall vor Anwendung geprüft. Ergänzend wurden in jedem Durchgang der Untersuchungen Kontrollstämme mitgeführt.

Eine Übersicht zu den Layouts ist im Folgenden dargestellt (Abbildungen 2.1.3 a bis 2.1.3 d).

Abbildung 2.1.3 a: Layout NLVE1 (NLVET9: Linezolid anstelle Lincomycin, Quinupristin/Dalfopristin anstelle Cefazolin)

ERY 0,015	ERY 0,03	ERY 0,06	ERY 0,13	ERY 0,25	ERY 0,5	ERY 1	ERY 2	ERY 4	ERY 8	ERY 16	ERY 32
CLI 0,03	CLI 0,06	CLI 0,13	CLI 0,25	CLI 0,5	CLI 1	CLI 2	CLI 4	CLI 8	CLI 16	CLI 32	CLI 64
LIN 0,03	LIN 0,06	LIN 0,13	LIN 0,25	LIN 0,5	LIN 1	LIN 2	LIN 4	LIN 8	LIN 16	LIN 32	LIN 64
VAN 0,015	VAN 0,03	VAN 0,06	VAN 0,13	VAN 0,25	VAN 0,5	VAN 1	VAN 2	VAN 4	VAN 8	VAN 16	VAN 32
PIRL 0,03	PIRL 0,06	PIRL 0,13	PIRL 0,25	PIRL 0,5	PIRL 1	PIRL 2	PIRL 4	PIRL 8	PIRL 16	PIRL 32	PIRL 64
FAZ 0,03	FAZ 0,06	FAZ 0,13	FAZ 0,25	FAZ 0,5	FAZ 1	FAZ 2	FAZ 4	FAZ 8	FAZ 16	FAZ 32	FAZ 64
TYLT 0,06	TYLT 0,13	TYLT 0,25	TYLT 0,5	TYLT 1	TYLT 2	TYLT 4	TYLT 8	TYLT 16	TYLT 32	TYLT 64	TYLT 128
OXA+ 0,015	OXA+ 0,03	OXA+ 0,06	OXA+ 0,13	OXA+ 0,25	OXA+ 0,5	OXA+ 1	OXA+ 2	OXA+ 4	OXA+ 8	POS CON	POS CON

ERY=Erythromycin, CLI=Clindamycin, LIN=Lincomycin, VAN=Vancomycin, PIRL=Pirlimycin, FAZ=Cefazolin, TYLT= Tylosin Tartrat, OXA+=Oxacillin+2 % NaCl, POS CON= Positionen ohne Wirkstoff (Positivkontrolle, Wachstumskontrolle).

Abbildung 2.1.3 b: Layout NLVE2 (NLVE5: Konzentrationsstufen Neomycin und Colistin verändert).

FFN 0,13	FFN 0,25	FFN 0,5	FFN 1	FFN 2	FFN 4	FFN 8	FFN 16	FFN 32	FFN 64	FFN 128	FFN 256
IMI 0,015	IMI 0,03	IMI 0,06	IMI 0,13	IMI 0,25	IMI 0,5	IMI 1	IMI 2	IMI 4	IMI 8	IMI 16	IMI 32
TIA 0,03	TIA 0,06	TIA 0,13	TIA 0,25	TIA 0,5	TIA 1	TIA 2	TIA 4	TIA 8	TIA 16	TIA 32	TIA 64
NEO 0,03	NEO 0,06	NEO 0,13	NEO 0,25	NEO 0,5	NEO 1	NEO 2	NEO 4	NEO 8	NEO 16	NEO 32	NEO 64
NAL 0,06	NAL 0,13	NAL 0,25	NAL 0,5	NAL 1	NAL 2	NAL 4	NAL 8	NAL 16	NAL 32	NAL 64	NAL 128
STR 0,25	STR 0,5	STR 1	STR 2	STR 4	STR 8	STR 16	STR 32	STR 64	STR 128	STR 256	STR 512
DOX 0,06	DOX 0,13	DOX 0,25	DOX 0,5	DOX 1	DOX 2	DOX 4	DOX 8	DOX 16	DOX 32	DOX 64	DOX 128
COL 0,03	COL 0,06	COL 0,13	COL 0,25	COL 0,5	COL 1	COL 2	COL 4	COL 8	COL 16	POS CON	POS CON

FFN=Florfenicol, IMI=Imipenem, TIA=Tiamulin, NEO=Neomycin, NAL=Nalidixinsäure, STR=Streptomycin, DOX= Doxyzyklin, COL=Colistin, POS CON= Positionen ohne Wirkstoff (Positivkontrolle, Wachstumskontrolle).

Abbildung 2.1.3 c: Layout NLVE3 (NLVET3/NLVET7: Marbofloxacin anstelle Spiramycin, Tulathromycin anstelle Chloramphenicol)

CIP 0,008	CIP 0,015	CIP 0,03	CIP 0,06	CIP 0,13	CIP 0,25	CIP 0,5	CIP 1	CIP 2	CIP 4	CIP 8	CIP 16
GEN 0,13	GEN 0,25	GEN 0,5	GEN 1	GEN 2	GEN 4	GEN 8	GEN 16	GEN 32	GEN 64	GEN 128	GEN 256
ENRO 0,008	ENRO 0,015	ENRO 0,03	ENRO 0,06	ENRO 0,13	ENRO 0,25	ENRO 0,5	ENRO 1	ENRO 2	ENRO 4	ENRO 8	ENRO 16
SXT 0,015/ 0,3	SXT 0,03/ 0,6	SXT 0,06/ 1,19	SXT 0,13/ 2,38	SXT 0,25/ 4,75	SXT 0,5/ 9,5	SXT 1/ 19	SXT 2/ 38	SXT 4/ 76	SXT 8/ 152	SXT 16/ 304	SXT 32/ 608
SPI 0,06	SPI 0,13	SPI 0,25	SPI 0,5	SPI 1	SPI 2	SPI 4	SPI 8	SPI 16	SPI 32	SPI 64	SPI 128
TET 0,13	TET 0,25	TET 0,5	TET 1	TET 2	TET 4	TET 8	TET 16	TET 32	TET 64	TET 128	TET 256
TIL 0,06	TIL 0,13	TIL 0,25	TIL 0,5	TIL 1	TIL 2	TIL 4	TIL 8	TIL 16	TIL 32	TIL 64	TIL 128
CHL 0,5	CHL 1	CHL 2	CHL 4	CHL 8	CHL 16	CHL 32	CHL 64	CHL 128	CHL 256	POS CON	POS CON

CIP=Ciprofloxacin, GEN=Gentamicin, ENRO=Enrofloxacin, SXT=Trimethoprim/Sulfamethoxazol, SPI=Spiramycin, TET=Tetrazyklin, TIL=Tilmicosin, CHL=Chloramphenicol, POS CON= Positionen ohne Wirkstoff (Positivkontrolle, Wachstumskontrolle).

Abbildung 2.1.3 d: Layout NLVE4 (NLVET4/NLVET8: Cephalothin anstelle Marbofloxacin)

AMP 0,03	AMP 0,06	AMP 0,13	AMP 0,25	AMP 0,5	AMP 1	AMP 2	AMP 4	AMP 8	AMP 16	AMP 32	AMP 64
AUG2 0,03/ 0,015	AUG2 0,06/ 0,03	AUG2 0,13/ 0,06	AUG2 0,25/ 0,12	AUG2 0,5/ 0,25	AUG2 1/ 0,5	AUG2 2/ 1	AUG2 4/ 2	AUG2 8/ 4	AUG2 16/ 8	AUG2 32/ 16	AUG2 64/ 32
PEN 0,015	PEN 0,03	PEN 0,06	PEN 0,13	PEN 0,25	PEN 0,5	PEN 1	PEN 2	PEN 4	PEN 8	PEN 16	PEN 32
XNL 0,03	XNL 0,06	XNL 0,13	XNL 0,25	XNL 0,5	XNL 1	XNL 2	XNL 4	XNL 8	XNL 16	XNL 32	XNL 64
CEQ 0,015	CEQ 0,03	CEQ 0,06	CEQ 0,13	CEQ 0,25	CEQ 0,5	CEQ 1	CEQ 2	CEQ 4	CEQ 8	CEQ 16	CEQ 32
MAR 0,008	MAR 0,015	MAR 0,03	MAR 0,06	MAR 0,13	MAR 0,25	MAR 0,5	MAR 1	MAR 2	MAR 4	MAR 8	MAR 16
FOT 0,015	FOT 0,03	FOT 0,06	FOT 0,13	FOT 0,25	FOT 0,5	FOT 1	FOT 2	FOT 4	FOT 8	FOT 16	FOT 32
FOP 0,06	FOP 0,13	FOP 0,25	FOP 0,5	FOP 1	FOP 2	FOP 4	FOP 8	FOP 16	FOP 32	POS CON	POS CON

AMP=Ampicillin, AUG2=Amoxicillin/Clavulansäure, PEN=Penicillin G, XNL=Ceftiofur, CEQ=Cefquinom, MAR=Marbofloxacin, FOT=Cefotaxim, FOP=Cefoperazon, POS CON= Positionen ohne Wirkstoff (Positivkontrolle, Wachstumskontrolle).

2.2 Methoden

Prinzipiell wurden in allen drei Projekten und für alle sieben untersuchten Bakterienspezies analoge Methoden eingesetzt. Es waren jedoch speziesspezifische Eigenheiten der untersuchten Bakterien zu berücksichtigen, aus denen sich Unterschiede, z.B. in den Methoden zur Identifizierung und Typisierung, ergaben. Wachstumskurven zur ersten Bestimmung des Verhaltens der Bakterien in bestimmten Nährmedien, bei bestimmten Temperatur- und atmosphärischen Bedingungen sowie über die Zeit wurden (mit Ausnahme von *T. pyogenes*) in allen Fällen durchgeführt. Da sich die Etablierung von Bouillon-Mikrodilutions-Methoden bei den verschiedenen Bakterienspezies als unterschiedlich schwierig erwies, wurden hierfür verschiedene Verfahren angewandt und es wurde, wo notwendig auch auf andere Methoden ausgewichen. Darüber hinaus wurden bei einigen Erregern weitere molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt (z.B. Makrorestriktionsanalysen oder die Charakterisierung von Resistenzdeterminanten). Aus diesen Gründen werden die Methoden für die einzelnen Erreger getrennt dargestellt.

2.2.1 Teilprojekt 1 – *Bordetella bronchiseptica*

2.2.1.1 Identifizierung mittels PCR, Typisierung

Es wurde eine Genus- und Spezies-spezifische, in der Literatur beschriebene PCR-Methode etabliert (24). Alle in die Studie einbezogenen Isolate wurden mittels dieser PCR überprüft. Für einige Isolate wurde zusätzlich eine biochemische Identifizierung mittels API® 20 NE Testkit (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) und der Software apiweb™ vorgenommen.

Eine Typisierung erfolgte anhand einer Makrorestriktionsanalyse mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese. Es wurden geeignete Enzyme, eine geeignete Restriktionsendonuklease sowie geeignete Pulszeiten ermittelt.

2.2.1.2 Wachstumskurven, Qualitätskontrollstämme

Es wurde das Wachstum von *B.-bronchiseptica*-Isolaten in kationen-angepasster Mueller-Hinton-Bouillon (CAMHB), CAMHB plus 2 % lysiertes Pferdeblut (CAMHB + 2 % lys. Pb), Hirn-Herz-Glucose-Bouillon (BHI) und Caso-Bouillon vergleichend untersucht. Mit den Referenzstämmen DSM 10303 und DSM 13414 sowie zwei Feldisolaten wurden verschiedene Versuche zu den Inkubationsbedingungen in jeweils drei unabhängigen Versuchsreihen durchgeführt mit anschließender statistischer Auswertung der Ergebnisse.

Auf Grundlage von Wachstumskurven können die in den CLSI-Dokumenten für die Qualitätskontrollstämme angegebenen Werte mit Ausnahme der Inkubationszeit übernommen werden. Auswirkungen einer verlängerten Inkubationszeit wurden im Rahmen von Ringversuchen ermittelt.

2.2.1.3 Vergleiche verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution einschließlich statistischer Auswertungen

Eine erste ermittelte mögliche Methode wurde unter Verwendung von zwei *B. bronchiseptica*-Referenzstämmen sowie acht Feldisolaten auf ihre Eignung untersucht. Alle Testungen wurden in drei unabhängigen Wiederholungen durchgeführt. Um die Homogenität der ermittelten MHK-Werte nach 20 und 24 Stunden zu untersuchen, wurden Empfindlichkeitstestungen aller zehn Stämme/Isolate in fünf Wiederholungen durchgeführt und die erhaltenen Werte statistisch ausgewertet.

2.2.1.4 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Mit der nach den Vorversuchen geeignetsten Methode wurden 146 Feldisolate getestet. Ein abschließender Ringversuch zur weiteren Validierung der modifizierten Methode wurde vom BVL, Berlin, analog zu den jährlich durchgeführten etablierten Ringversuchen durchgeführt.

2.2.1.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Isolate mit auffallend erhöhten MHK-Werten wurden auf das Vorliegen von Resistenzdeterminanten molekularbiologisch untersucht.

2.2.2 Teilprojekt 1 – *Haemophilus parasuis*

2.2.2.1 Identifizierung mittels PCR, Typisierung

Auch für diese Spezies wurde eine in der Literatur beschriebene PCR-Methode etabliert (25). Die Methode basiert auf der Amplifikation der 16S rDNA. Die Serotypisierung von 25 *H. parasuis*-Isolaten wurde von der IVD GmbH, Hannover mittels Indirekter Haemagglutination (IHA) durchgeführt.

2.2.2.2 Wachstumskurven, Qualitätskontrollstämmen

Versuche zur Wachstumsbestimmung über die optische Dichte (OD600) erbrachten keine validen Ergebnisse. Daher wurde mittels weiterer Vorversuche mit verschiedenen Feldisolaten das Keimzahlverfahren zur Erstellung von Wachstumskurven für *H. parasuis* etabliert. Anschließend wurde das Wachstum von *H. parasuis* in vier verschiedenen Medien untersucht. Es wurden Wachstumskurven in den Medien Haemophilus Test Medium (HTM), Veterinary Fastidious Medium (VFM), CAMHB + 2 % lys. Pb und Test Medium Bouillon (TMB) für den Stamm DSM 21448, ein gut kultivierbares Feldisolat sowie zwei schwer kultivierbare Feldisolate erstellt.

2.2.2.3 Vergleiche verschiedener Medien für die Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis* im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren

Da die Feldisolate nur ein Wachstum in VFM und TMB Medium zeigten, wurden diese Medien zur Empfindlichkeitstestung im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren verwendet. Hierbei wurden der *H. parasuis* Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolate getestet. Anschließend wurden fünf Wiederholungen der Testungen mit den vier Isolaten in TMB Medium durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle wurden die QC-Stämme *E. coli* ATCC® 25922, *S. aureus* ATCC® 29213, *A. pleuropneumoniae* ATCC® 27090 und *E. faecalis* ATCC® 29212 verwendet.

2.2.2.4 E-Test zur Empfindlichkeitsbestimmung von *Haemophilus parasuis*

Da sich die Mikrodilutionsmethode zunächst als für *H. parasuis* nicht geeignet darstellte, wurden als alternative Verfahren zur Bestimmung von MHK-Werten der E-Test sowie die Agardilution eingesetzt. Es wurden der Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolate von *H. parasuis* gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Cephalothin, Cefotaxim, Enrofloxacin, Tetrazyklin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol in fünf Wiederholungen auf Kochblutagar im E-Test Verfahren getestet. Das Ablesen der Ergebnisse wurde nach 24 Stunden Inkubation durchgeführt. Aufgrund der hohen Kosten für den E-Teststreifen (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) wurde nur für eine Auswahl von vier Isolaten die Empfindlichkeit mit dem E-Test bestimmt.

2.2.2.5 Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis* mittels Agardilution

Der Typstamm DSM 21448 und 3 Feldisolate von *H. parasuis* wurden gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Cephalothin, Florfenicol, Tetrazyklin und Trimethoprim/Sulfamethoxazole in jeweils fünf Wiederholungen auf Kochblutagar mit dem Agardilutionsverfahren getestet. Dabei wurde ein Agardilutionsverfahren eingesetzt, welches laut CLSI-Standard VET01-A4 für einige anspruchsvolle Erreger, wie beispielsweise *A. pleuropneumoniae* und *Histophilus somni* anzuwenden ist. Im Anschluss wurden alle weiteren 45 Feldisolate von *H. parasuis* mit derselben Methode untersucht. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 48 Stunden Inkubation.

2.2.2.6 Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis* im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren in einem neuen Medium

Nach Etablierung eines neu entwickelten Mediums wurde die Empfindlichkeitstestung mit dem *H. parasuis* Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolaten in fünf unabhängigen Versuchen in diesem Medium durchgeführt. Für das neu entwickelte Medium wurde CAMHB als Basismedium verwendet und es wurde in Versuchsreihen getestet, welche der Supplemente des TMB Mediums essentiell für das Wachstum des Erregers sind. Dafür

wurden 15 *H. parasuis*-Isolate verwendet. Eine Überprüfung der Methode mit dem neuen Medium ist im kommenden Ringversuch geplant.

2.2.3 Teilprojekt 2 – *Rhodococcus equi*

2.2.3.1 Identifizierung mittels PCR, MALDI TOF-MS und biochemischer Untersuchungen

Alle *R. equi*-Isolate wurden hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Wachstumsverhaltens beurteilt. Alle verwendeten Isolate wurden mit Hilfe einer in der Literatur beschriebenen *R. equi*-spezifischen PCR getestet (26).

2.2.3.2 Wachstumskurven, Qualitätskontrollstämme

Für die Erstellung von Wachstumskurven wurden der *R. equi*-Typstamm DSM 20307 sowie sechs unverwandte Feldisolate in drei verschiedenen Medien (BHI, CAMHB und CAMHB+2 % lys. Pb) untersucht. Zur Absicherung der Ergebnisse wurden alle Wachstumskurven drei Mal durchgeführt und die Mittelwerte zur Auswertung verwendet. Da die erarbeitete Methode nicht von anderen in den CLSI-Dokumenten empfohlenen Methoden abwich, war eine Etablierung spezieller Qualitätskontrollstämme nicht notwendig.

2.2.3.3 Vergleiche verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution einschließlich statistischer Auswertungen

Für die Methodenetablierung in der Mikrotiterplatte wurden wiederum der Referenzstamm und die sechs unverwandten Feldisolate vergleichend untersucht. Es wurde CAMHB mit und ohne Zusatz von 2 % lys. Pb getestet. Alle Platten wurden bei 35 °C +/- 2 °C inkubiert und jeweils nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Die Testung wurde für alle Isolate sechs Mal durchgeführt und das Ergebnis statistisch bewertet. Das Inokulum wurde nach Vorgaben der CLSI-Dokumente M24-A2 und M07-A9 hergestellt. Es wurden der Referenzstamm und die sechs bereits für die Wachstumskurven verwendeten Feldisolate mittels Koloniezählverfahren (Anfertigung einer Verdünnungsreihe und darauf folgendes Ausspateln auf Blutagarplatten) getestet.

2.2.3.4 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Die erarbeitete Methode (Testung in CAMHB + 2 % lys. Pb, aerobe Bebrütung über 24 h) wurde für die Testung der 200 *R. equi*-Feldisolate eingesetzt. Alle Isolate wurden gegenüber 32 Wirkstoffen bzw. Kombinationen getestet. Für Rifampicin, Azithromycin und Clarithromycin, die für die Behandlung von *R. equi*-Infektionen von großer Bedeutung sind, wurde das Bouillon-Makrodilutionsverfahren eingesetzt, da die Stoffe auf den Mikrotiterplatten nicht vorhanden waren.

Die neu erarbeitete Methode wurde im Rahmen des Ringversuchs 2013 des BVL, Berlin, überprüft.

2.2.3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Sechs Isolate von Pferden mit erhöhten MHK-Werten für Rifampicin wurden molekularbiologisch auf Mutationen in der Region 1 des Gens für die β -Untereinheit der RNA-Polymerase (*rpoB*) untersucht.

2.2.4 Teilprojekt 2 – *Arcobacter butzleri*

2.2.4.1 Identifizierung mittels MALDI TOF-MS und PCR

Die Identifizierung der *Arcobacter*-spp.-Isolate erfolgte neben der Koloniemorphologie und ggf. Mikroskopie zunächst mittels MALDI TOF-MS (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). Zur Absicherung der Speziesidentifizierung wurde zusätzlich eine speziesspezifische PCR durchgeführt (27).

2.2.4.2 Wachstumskurven, Qualitätskontrollstämme

Wachstumsversuche wurden zu Beginn basierend auf Angaben in der Literatur sowie auf Angaben für *Campylobacter* sp. in den CLSI-Dokumenten durchgeführt. Es wurden verschiedene Wachstumsmedien, Temperaturen und Inkubationsbedingungen überprüft. Da sich die unterschiedlichen *Arcobacter*-Spezies hinsichtlich ihres Wachstums teilweise deutlich unterschieden, wurden die weiteren Arbeiten auf *A. butzleri* beschränkt. Für diese Spezies wurden Wachstumskurven in CAMHB sowie in CAMHB + 2 % lys. Pb erstellt. Eine Etablierung spezieller Qualitätskontrollstämme war für die erarbeitete Methode (siehe unten) nicht notwendig.

2.2.4.3 Vergleich verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution einschließlich statistischer Auswertungen

Bei den Versuchen mit *A. butzleri* in Mikrotiterplatten wurden diverse Anzuchtmedien und Zusätze, verschiedene Inokulummengen und Inkubationsbedingungen mit Referenzstämmen und Feldisolaten überprüft. Die erhaltenen Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet. Da sich als beste Methode der Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) herausstellte, wurden zusätzlich Versuche zum Vergleich verschiedener Hersteller von FKS durchgeführt.

2.2.4.4 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Mit der erarbeiteten Methode wurde die Testung der Stammsammlung durchgeführt. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Standardisierung der Bakteriendichte im Inokulum

wurden alle Stämme mit zwei verschiedenen Inokulummengen getestet. Ein Ringversuch zur erarbeiteten Methode wird durch das BVL, Berlin, abschließend erfolgen.

2.2.5 Teilprojekt 2 – *Trueperella pyogenes*

2.2.5.1 Identifizierung mittels biochemischer Verfahren und MALDI TOF-MS

Alle verfügbaren Isolate wurden makroskopisch auf ihre Koloniemorphologie und ihre Fähigkeit zur Verflüssigung von Rinderserum (Serolyse nach Loeffler) untersucht. Zusätzlich wurde von etwa jedem zehnten Stamm eine biochemische Identifizierung mittels VITEK II compact (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) durchgeführt. Außerdem wurden alle Stämme im MALDI Biotyper untersucht.

2.2.5.2 Methode der Empfindlichkeitsbestimmung, Qualitätskontrollstämme

Eine Methode der Testung in der Mikrotiterplatte war schon in früheren Arbeiten etabliert und vom VAST-Komitee des CLSI anerkannt worden. Die verfügbaren Qualitätskontrollstämme können bei dieser Methode eingesetzt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten erfolgte eine vergleichende Kontrolle der früher vorgeschlagenen Methode anhand alter und neuer Isolate sowie unter zum Teil geänderten Laborbedingungen.

2.2.5.3 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Mit der vorhandenen, überprüften Methode wurde eine Sammlung aktueller Stämme getestet, teilweise vergleichend mit schon in früheren Arbeiten untersuchten Isolaten. Die Methode wurde mittels Ringversuch des BVL auf ihre Routinetauglichkeit zum Einsatz in verschiedenen Laboratorien überprüft.

2.2.6 Teilprojekt 3 – *Riemerella anatipestifer*

2.2.6.1 Identifizierung mittels PCR und biochemischer Untersuchungen, Typisierung

Die Identifizierung der Isolate erfolgte zunächst mit dem biochemischen Testverfahren API 20NE (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen). Eine Bestätigung der Identifizierung erfolgte mit speziesspezifischen PCR-Methoden, die für die Diagnostik am Institut für Geflügelkrankheiten validiert sind (28). Die Daten zur Serotypisierung waren für 92 Isolate vorhanden. 17 Isolate wurden nicht serotypisiert.

2.2.6.2 Wachstumskurven

Zur Bestimmung der Wachstumsbedingungen wurden für den *R.-anatipestifer*-Referenzstamm DSM 15868 und zwei *R.-anatipestifer*-Isolate mit unterschiedlichen Wachstumsintensitäten Wachstumskurven in CAMHB, CAMHB + 2 % lys. Pb und BHI angelegt. Die Messungen erfolgten alle 2 Stunden bis 10 Stunden nach der Inokulation und

danach alle 12 Stunden bis 56 Stunden nach der Inokulation. Inkubiert wurde aerob bei 35 – 37 °C. Alle Wachstumskurven wurden zur Absicherung der Ergebnisse drei Mal wiederholt. Zur Auswertung wurden die Mittelwerte verwendet.

Zur Bestimmung eines geeigneten Inkubationszeitraumes wurden nochmals Wachstumskurven mit einem enger angelegten Messpunktespektrum erstellt. Als Medium wurde CAMHB + 2 % lys. Pb verwendet, da bei diesem ein einheitlicheres Wachstum von Referenzstamm und Isolaten zu verzeichnen war. Hierfür wurden bis 24 Stunden nach der Inokulation alle 4 Stunden Messungen durchgeführt, von 24 Stunden bis 36 Stunden alle 2 Stunden und danach im 4 Stunden-Rhythmus bis 48 Stunden nach der Inokulation. Die Inkubation erfolgte aerob bei 35 – 37 °C. Zur Absicherung der Ergebnisse erfolgten auch hier drei voneinander unabhängige Versuchsdurchgänge.

2.2.6.3 Vergleich verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution

Nach Auswahl von CAMHB + 2 % lys. Pb als geeignetes Medium erfolgte eine Prüfung des Wachstums in wirkstofffreien 96-well Mikrotiterplatten mit dem *R.-anatipestifer* Referenzstamm DSM 15868 und zwölf nicht miteinander verwandten *R.-anatipestifer*-Isolaten. Die Inkubation der Platten fand aerob bei 35 – 37 °C statt. Alle Platten wurden nach 24 und 30 Stunden abgelesen.

Anschließend wurden wirkstoffbeschichtete Mikrotiterplatten verwendet und die oben genannten Isolate inklusive *R.-anatipestifer*-Referenzstamm DSM 15868, sowie *E. coli* ATCC® 25922 und *S. aureus* ATCC® 29213 überprüft. Die Testung wurde für alle Isolate dreimal durchgeführt. Die Herstellung des Inokulums erfolgte nach Vorgaben, die laut CLSI-Standard VET01-A4 (2013) für Bakterien von Tieren angewendet werden. Durch Keimzahlbestimmung wurde überprüft, ob die Konzentration der Bakterien des Inokulums den Vorgaben von 5×10^5 KBE/ml entsprach.

2.2.6.4 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Für die Testung der 109 *R.-anatipestifer*-Feldisolate wurde die erarbeitete Methode (Medium: CAMHB + 2 % lys. Pb, aerobe Inkubation über 24 Stunden bei 35-37 °C) eingesetzt. Im Rahmen eines Ringversuchs soll die Robustheit und die unabhängige Wiederholbarkeit der neu erarbeiteten Methode überprüft werden.

2.2.7 Teilprojekt 3 – *Ornithobacterium rhinotracheale*

2.2.7.1 Identifizierung mittels PCR und biochemischer Untersuchungen, Typisierung

Die Identifizierung der Isolate erfolgte wie für *R. anatipestifer* zunächst mit dem biochemischen Testverfahren API 20NE (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen). Eine Bestätigung der Identifizierung erfolgte auch hier mit speziesspezifischen PCR-Methoden,

die für die Diagnostik am Institut für Geflügelkrankheiten validiert sind (29). Zusätzlich wurden Makrorestriktionsanalysen durchgeführt.

2.2.7.2 Wachstumskurven, Qualitätskontrollstämme

Wachstumskurven wurden für das Wachstum in den Medien CAMHB und CAMHB mit unterschiedlichen Konzentrationen an lys. Pb (3 %, 5 % und 7,5 %) und BHI erstellt. Es wurden hierfür zwei Feldisolate mit unterschiedlichen Wachstumsintensitäten sowie der Referenzstamm DSM 15997 eingesetzt. Die Untersuchungen fanden über 56 Stunden unter mikroaerophilen Bedingungen statt. Die Anzahl der KBE/ml wurde mittels Plattenzählverfahren bestimmt.

2.2.7.3 Vergleiche verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution

Mit der anhand der Vorversuche ausgewählten Methode (CAMHB + 3 % lys. Pb, mikroaerophile Inkubation, 37 °C, 24-48 Stunden) wurden 20 *O.-rhinotracheale*-Isolate im Mikrodilutionstest untersucht. Einige Isolate, die dem häufig vorkommenden Serotyp A angehörten, zeigten ein rasenartiges Wachstum in der Mikrotiterplatte, das eine Auswertung unmöglich machte.

In weiteren Vorversuchen wurde die Supplementierung von Pferdeblut zum CAMHB auf 5 % und 7,5 % erhöht. Es wurden nochmals Wachstumskurven mit dem *O.-rhinotracheale*-Referenzstamm DSM 15997 und zwei Feldisolaten mit unterschiedlichen Wachstumseigenschaften in der Mikrotiterplatte (Rasenbildner, Knopfbildner) angefertigt.

Der *O.-rhinotracheale*-Referenzstamm und zwölf Feldisolate wurden mit diesen beiden supplementierten Medien in Mikrotiterplatten auf besseres Wachstum hin überprüft. Zusätzlich wurden verschiedene mikroaerophile Inkubationsbedingungen (5 %, 7,5 %, 10 % CO₂), anaerobe Bebrütung und unterschiedliche Inokulumsdichten von 2 x 10⁵ KBE/ml bis 8 x 10⁵ KBE/ml überprüft. Mit wenigen Feldisolaten und dem Referenzstamm wurde weiterhin das Veterinary Fastidious Medium (VFM) in Mikrotiterplatten getestet.

2.2.7.4 Testung der Stammsammlung

Da sich die Mikrodilution mit den untersuchten Medien und Inkubationskombinationen für *O. rhinotracheale* nicht als geeignet erwies, wurde stattdessen die Agardilution als Methode zur Empfindlichkeitstestung entwickelt. Es wurden der Typstamm und 31 Feldisolate von *O. rhinotracheale*, der Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922, sowie ein interner *S.-aureus*-Stamm 122028 getestet.

2.2.7.5. E-Test zur Empfindlichkeitstestung von *Ornithobacterium rhinotracheale*

Es wurden vier Feldisolate und der *O.-rhinotracheale*-Referenzstamm DSM 15997 gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Enrofloxacin, Tetrazyklin und Tiamulin in drei Wiederholungen auf MH-Agar mit 5 % lys. Pb mittels E-Test (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) überprüft. Die Inkubation erfolgte mikroaerophil bei 35-37 °C. Das Ablesen der Ergebnisse wurde nach 24 und nach 30 Stunden durchgeführt.

2.2.7.6. Empfindlichkeitstestung von *Ornithobacterium rhinotracheale* mittels Agardilution

Für die Agardilution wurden folgende antimikrobiellen Wirkstoffe verwendet: Enrofloxacin, Tiamulin und Tylosin. Es wurden Mueller Hinton-Agar Platten mit 5 % lys. Pb mit Wirkstoffkonzentrationen in einer Zweifach-Verdünnungsreihe von 0,12 mg/L bis 64 mg/L nach Vorgaben des CLSI (2013) hergestellt. In jeweils drei Wiederholungen wurden der Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922 und fünf Feldisolate von *O. rhinotracheale* gemäß CLSI-Vorgaben getestet. Im Anschluss wurden 26 weitere Isolate von *O. rhinotracheale* mit der gleichen Methode untersucht. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 30 Stunden Inkubation.

3. Ergebnisse

3.1 Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die Ergebnisse werden getrennt nach Teilprojekten dargestellt.

Teilprojekt 1:

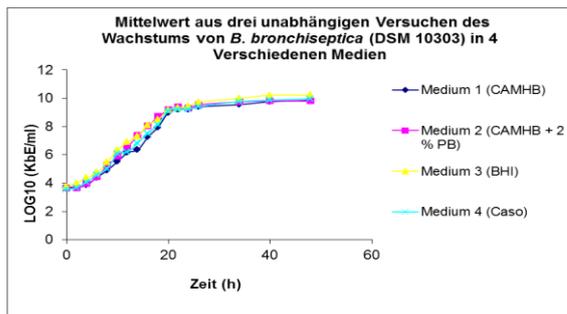
3.1.1 Identifizierung und Typisierung der *Bordetella-bronchiseptica*-Isolate

Die Spezieszuordnung aller akquirierten *B.-bronchiseptica*-Isolate konnte mittels PCR bestätigt werden. Eine Feindifferenzierung ließ sich mit Hilfe der Makrorestriktionsanalyse durchführen. Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich allerdings, dass viele der Isolate vom Schwein der gleichen klonalen Gruppe zuzuordnen sind, obgleich sie in unterschiedlichen geographischen Regionen gesammelt wurden. Es konnten insgesamt zehn epidemiologisch nicht bzw. wenig verwandte Isolate identifiziert werden, die für die weitere Methodenerarbeitung verwendet wurden.

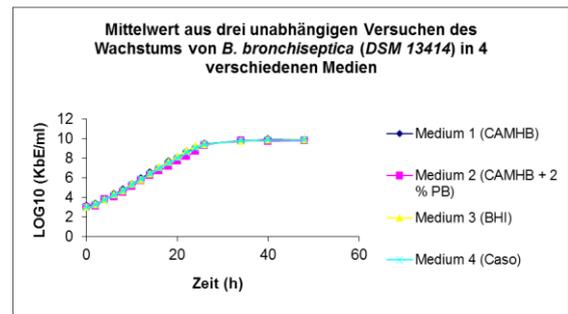
3.1.2 Ermittlung eines geeigneten Testmediums für *Bordetella bronchiseptica*

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens der Isolate in verschiedenen Testmedien wurden Wachstumskurven erstellt. Dazu wurden die Optische Dichte (OD) sowie die Anzahl der KbE/ml mittels Plate-Count Verfahren über eine Dauer von insgesamt 48 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse für die vier untersuchten Isolate des Plate-Count Verfahrens sind in den folgenden Abbildungen 3.1.2 a-d jeweils als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen dargestellt.

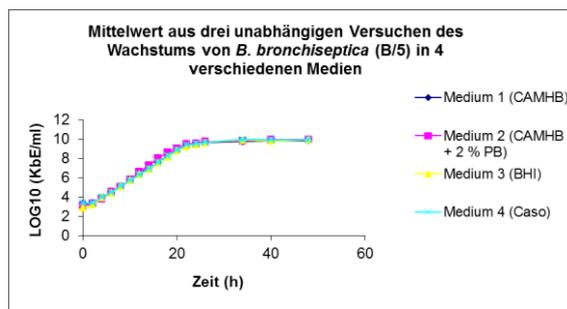
a)



b)



c)



d)

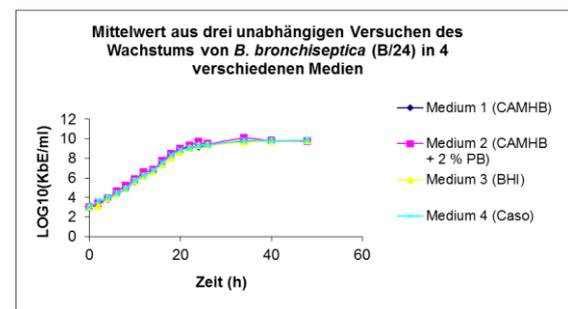


Abbildung 3.1.2 a-d: Wachstumskurven der *B. bronchiseptica*-Referenzstämmen DSM 10303 (a), DSM 13414 (b) und der Feldisolate B/5 (c) und B/24 (d) in vier verschiedenen Medien. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen dargestellt.

Die statistische Analyse aller getesteten unverwandten Isolate in den vier verwendeten Medien zeigt, dass sich die zum Teil in Einzelwerten ermittelten Signifikanzunterschiede aufheben. Das Wachstumsverhalten von *B. bronchiseptica*-Isolaten unterscheidet sich somit nicht signifikant zwischen den Testmedien. Eine Verwendung von CAMHB als Testmedium kann somit empfohlen werden. Auch bei den ermittelten Generationszeiten ließen sich im Mittel aller getesteten Stämme nur geringe Unterschiede zwischen den Medien feststellen (Müller-Hinton-Bouillon: 64,5 Minuten; CAMHB + 2 % Pferdeblut 64,5 Minuten; Hirn-Herz-Glucose Bouillon 61,5 Minuten; Caso Bouillon 60,5 Minuten). Zusammenfassend zeigte die Auswertung der Wachstumskurven, dass Mueller-Hinton-Bouillon im Vergleich zu den weiteren getesteten Standard-Anzuchtmedien ein geeignetes Testmedium für die Empfindlichkeitstestung darstellt. Somit kann das in der Durchführungsvorschrift des CLSI-Dokumentes VET01-A4 empfohlene Medium CAMHB auch für *B. bronchiseptica* angewendet werden.

3.1.3 Wiederholbarkeit der Ergebnisse aus der Empfindlichkeitsbestimmung von *Bordetella bronchiseptica*

Um die Eignung der Methode zu belegen und die Homogenität der mit der Methode zu erzielenden Ergebnisse zu überprüfen, wurde die Empfindlichkeitsbestimmung mit zwei Referenzstämmen und acht Feldisolaten in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt.

Dabei konnten nur geringe Abweichungen der MHK-Werte zwischen den einzelnen Versuchen festgestellt werden, so dass sich die Ergebnisse als gut reproduzierbar darstellten. Eine Auswertung der Mikrotiterplatten erfolgte nach 20 und 24 Stunden. In allen Versuchen lagen die Werte des *E. coli* Qualitätskontrollstammes (ATCC® 25922) im vorgegebenen Bereich.

3.1.4 Statistische Auswertung der Empfindlichkeitstestung der zehn unverwandten *Bordetella-bronchiseptica*-Isolate

Für diesen Projektteil wurden MHK-Werte von zehn Isolaten in jeweils fünf Wiederholungen untersucht. Dabei wurde die Empfindlichkeit der Isolate gegenüber 20 antimikrobiellen Chemotherapeutika getestet und eine Ablesung der Mikrotiterplatten nach 20 Stunden und 24 Stunden vorgenommen. Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde jede Kombination der fünf Wiederholungen dichotomisiert (0= heterogene MHK-Werte und 1=homogene MHK-Werte). Dabei zeigte sich, dass nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden die MHK-Werte von 63 der 200 Kombinationen (31,5 %) gleich waren, nach 24 Stunden Inkubationszeit waren die MHK-Werte von 97 der 200 Kombinationen (48,5 %) gleich.

Die Odds der multifaktoriellen logistischen Regressionsanalyse ergab eine signifikant höhere Stabilität ($p=0,0001$) der MHK-Werte nach 24 Stunden. Das geometrische Mittel der MHK-Werte ergab einen erhöhten MHK-Wert des 1,239-fachen nach 24 Stunden Inkubationszeit. Somit führt eine Ablesung der Mikrotiterplatten nach 24 Stunden zu homogeneren MHK-Werten. Daher sollte eine verlängerte Inkubationszeit der Platten für *B. bronchiseptica* empfohlen werden. Eine längere Inkubationszeit der Mikrotiterplatten wird auch schon für andere anspruchsvolle Erreger, wie *Campylobacter* spp. oder *Histophilus somni*, in den Standards des CLSI empfohlen. Eine Darstellung der Homogenität ist in Abbildungen 3.1.4 a und b abgebildet und wurde aus fünf Wiederholungen der Empfindlichkeitstestung ermittelt.

a)

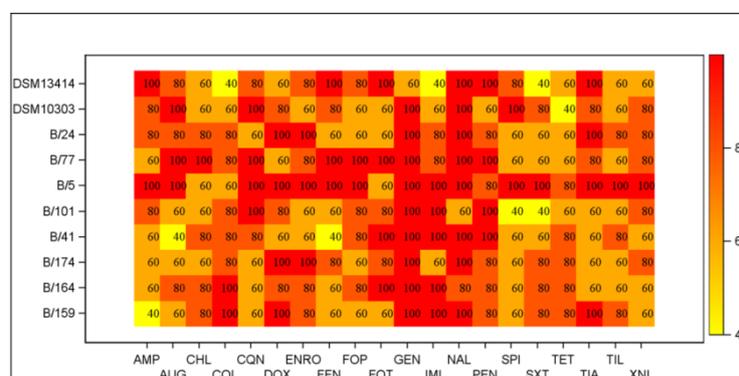


Abbildung 3.1.4 a: Relative Häufigkeit (%) des MHK-Wertes für jede Wirkstoff-Bakterienstamm Kombination nach 20 Stunden Inkubation.

b)

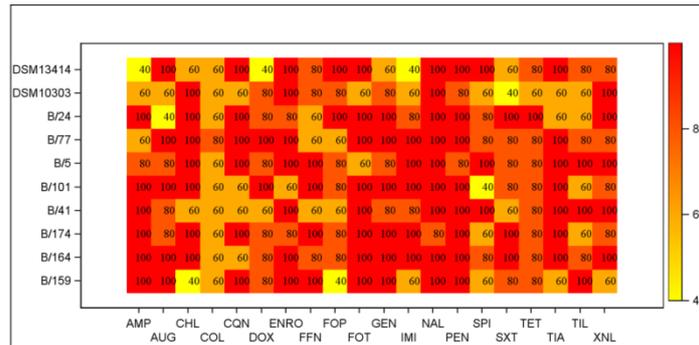


Abbildung 3.1.4 b: Relative Häufigkeit (%) des MHK-Wertes für jede Wirkstoff-Bakterienstamm Kombination nach 24 Stunden Inkubation.

3.1.5 Testung aller *Bordetella-bronchiseptica*-Isolate mit der Methode

Es wurden 103 *B. bronchiseptica*-Isolate von Schweinen und 43 *B. bronchiseptica*-Isolate von anderen Haustieren im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren mit der variierten Methode getestet. Es wurde CAMHB verwendet und die Auswertung der Mikrotiterplatten fand nach 24 Stunden Inkubationszeit statt. Für alle Feldisolate war eine Auswertung der Testungen ohne Probleme möglich, die Methode scheint somit für Feldisolate gut geeignet zu sein. Die MHK-Wert Verteilungen für die Isolate von Schweinen und von anderen Haustieren sind diesem Bericht als Anlage beigefügt. Zeigten Isolate auffällig erhöhte MHK-Werte gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika (z.B. bei einer bimodalen Verteilung) oder wurden sie als resistent eingestuft, so wurden diese Isolate auf das Vorkommen von Resistenzdeterminanten weiterführend untersucht.

3.1.6 Überprüfung der Methode anhand eines Ringversuches für *Bordetella bronchiseptica*

In einem Ringversuch in Zusammenarbeit mit dem BVL Berlin wurde die erarbeitete Methode für *B. bronchiseptica* überprüft. Die Empfindlichkeitstestung des Typstammes DSM 10303 und eines Feldisolates wurde von neun Laboratorien in drei Wiederholungen durchgeführt und anschließend vom BVL ausgewertet. Der Ringversuch lieferte zuverlässige Ergebnisse für die Bouillon-Mikrodilutions-Methode von *B. bronchiseptica* mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden in CAMHB. Zwischen den teilnehmenden Laboratorien wurden nur sehr geringe Abweichungen festgestellt. Damit wurden die Methodik zur Empfindlichkeitstestung und die Stabilität der MHK-Werte nach 24 Stunden Inkubationszeit auch durch den Ringversuch bestätigt.

3.1.7 Identifizierung der *Haemophilus-parasuis*-Isolate

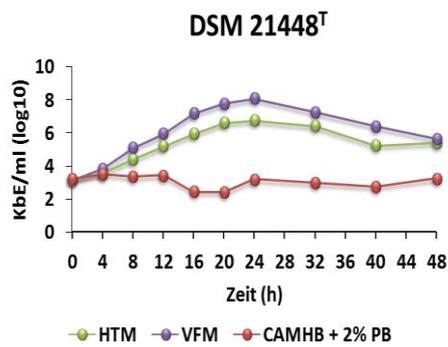
Die Spezieszuordnung aller *H. parasuis*-Isolate, die zunächst zur Ermittlung eines geeigneten Testmediums sowie später für weitere Versuchsreihen verwendet wurden, konnten mittels PCR bestätigt werden. Es wurden insgesamt zehn epidemiologisch nicht

bzw. wenig verwandte Isolate identifiziert, die für die weitere Methodenerarbeitung verwendet wurden.

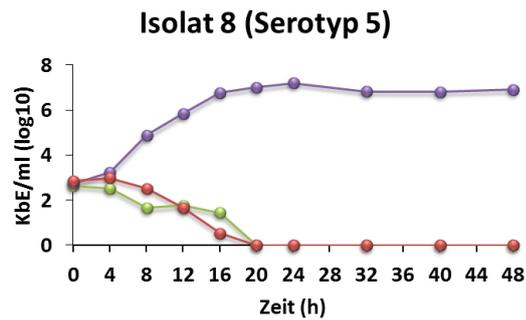
3.1.8 Ermittlung eines geeigneten Testmediums für *Haemophilus parasuis*

Für die Analyse des Wachstumsverhaltens der Isolate wurden zunächst in drei verschiedenen Testmedien Wachstumskurven erstellt. Dazu wurde die Anzahl der KbE/ml mittels Plate-Count Verfahren über eine Dauer von insgesamt 48 Stunden bestimmt. Die Ergebnisse für die vier untersuchten Isolate des Plate-Count Verfahrens sind in den folgenden Abbildungen 3.1.8 a-d dargestellt.

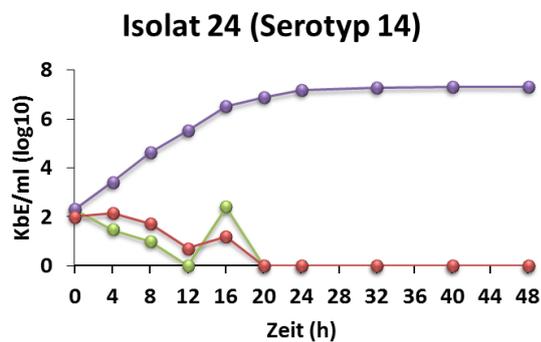
a)



b)



c)



d)

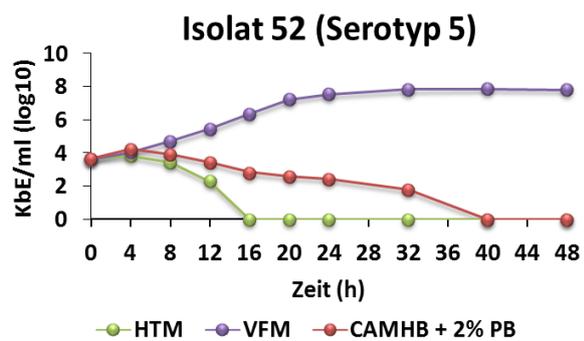


Abbildung 3.1.8 a-d: Wachstumskurven von *H. parasuis*-Typstamm DSM21448 (a) und den Feldisolaten H/8 (b), H/24 (c) und H/52 (d) in drei verschiedenen Medien (HTM = Haemophilus Testmedium, VFM = Veterinary Fastidious Medium, CAMHB + 2 % PB = Kationen-supplementierte Mueller-Hinton Bouillon + 2 % Pferdeblut)

Durch die Keimzahlbestimmung über das Plattenzählverfahren konnten für den *H. parasuis*-Typstamm DSM21448 Wachstumskurven in HTM und VFM erstellt werden. Die drei Feldisolate zeigten nur in VFM ein ausreichendes Wachstum. Das Ende der exponentiellen Phase der Wachstumskurve konnte etwa nach 24-28 Stunden bestimmt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das VTM-Medium für die weiteren Untersuchungen zur Empfindlichkeitstestung ausgewählt.

3.1.9 Ergebnisse aus Untersuchungen zur Empfindlichkeitsbestimmung von *Haemophilus parasuis*

Obwohl über das Plattenzählverfahren ein Wachstum des Erregers in VFM mit einer Keimzahl von etwa 10^7 KbE/ml nachgewiesen wurde, konnte ein optisch erkennbares Wachstum in Form einer „Knopfbildung“ in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten nur für den *H. parasuis*-Typstamm DSM 21448 ermittelt werden (Abbildung 3.1.9).

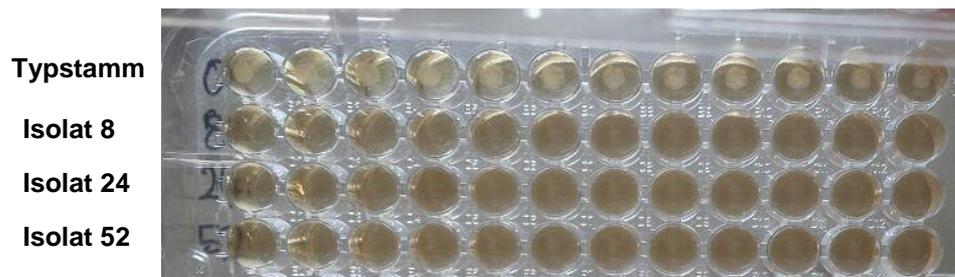


Abbildung 3.1.9: Empfindlichkeitstestung von *H. parasuis* in Veterinary Fastidious Medium

In einem Screening-Verfahren wurde daraufhin eine Auswahl von 28 *H.-parasuis*-Feldisolaten unterschiedlicher Serovare mit verschiedenen Inkubationsbedingungen und Inokulationsvolumina in VFM getestet. Trotz Variation in den Testbedingungen zeigten, abhängig von den Inkubationsbedingungen und Inokulationsvolumina, nur 5 bis 8 Isolate ein sichtbares Wachstum in den Mikrotiterplatten. Aufgrund dieser Ergebnisse (Mangel eines geeigneten Testmediums) wurde zu diesem Zeitpunkt die weitere Entwicklung einer Methode der Bouillon-Mikrodilution für *H. parasuis* als nicht sinnvoll angesehen. Daher wurde der Ansatz verfolgt, eine MHK-Wertbestimmung für den Erreger mittels Agardilutionsmethode oder mittels E-Test-Verfahren zu ermöglichen.

3.1.10 Überprüfung des E-Test-Verfahrens für *Haemophilus parasuis* als Alternativmethode

Da für *H. parasuis* bisher kein geeignetes Medium für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode gefunden werden konnte, wurde als alternatives Verfahren die E-Test Methode überprüft. Es wurden der Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolate von *H. parasuis* gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Cephalothin, Cefotaxim, Enrofloxacin, Tetrazyklin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol in fünf Wiederholungen auf Kochblutagar getestet. Die Auswertung zeigte trotz schwachen Wachstums der Isolate homogene MHK-Werte in fünf Wiederholungen. Viele veterinärmedizinisch relevante Wirkstoffe sind allerdings nicht kommerziell als E-Test-Streifen erhältlich. Somit ist diese Methode nur für bestimmte Wirkstoffe anwendbar und für die Routinediagnostik auch aufgrund der anfallenden Kosten nur bedingt geeignet.

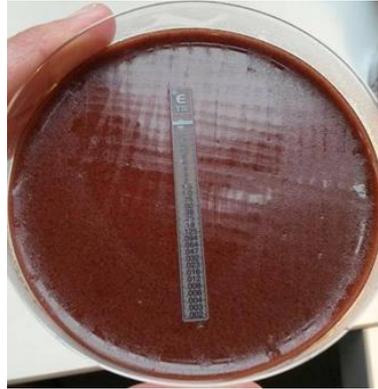


Abbildung 3.1.10: E-Test-Streifen beschickt mit der Wirkstoffkombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol zur Testung der Empfindlichkeit von *H. parasuis*

3.1.11 Überprüfung der Agardilutionsmethode für *Haemophilus parasuis* als Alternativmethode

Es wurden der Typstamm DSM 21448 und 3 Feldisolate von *H. parasuis* gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Cephalothin, Florfenicol, Tetrazyklin und der Kombination Trimethoprim/Sulfamethoxazol in jeweils fünf Wiederholungen getestet. In den fünf Wiederholungen zeigten die Isolate homogene MHK-Werte. Anschließend wurden alle weiteren 45 Feldisolate von *H. parasuis* mit derselben Methode untersucht. Bei der Auswertung der 45 Feldisolate konnte bei einigen anspruchsvollen Serotypen eine Auswertung erst nach 48 Stunden vorgenommen werden, da das Wachstum teilweise sehr schwach und nach 24 Stunden noch nicht vollständig sichtbar war. Es zeigte sich insgesamt, dass diese Methode (Abbildung 3.1.11) im Vergleich zu anderen Methoden der Empfindlichkeitstestung extrem arbeits- und zeitintensiv ist. Daher wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, um eine routinetaugliche MHK-Bestimmung des Erregers durchführen zu können.



Abbildung 3.1.11: Wachstum von *H.-parasuis*-Isolaten nach 48 Stunden Inkubation beim Agardilutionsverfahren. Unten rechts der Qualitätskontrollstamm *A. pleuropneumoniae*.

3.1.12 Erstellung von Wachstumskurven für *Haemophilus parasuis* in Test Medium Bouillon

Durch einen internationalen Kongress konnte Kontakt zu einer australischen Arbeitsgruppe der University of Queensland, Ecoscience Precinct, Brisbane, hergestellt werden, welche Test Medium Bouillon (TMB) für die Empfindlichkeitstestung von *H. parasuis* entwickelt hat. Dieses Medium konnte im Rahmen des Projektes durch eine Zusammenarbeit mit der Gruppe etabliert werden. Erste Testungen mit deutschen *H.-parasuis*-Isolaten wurden durchgeführt. In Wachstumsversuchen stellte sich das Medium dabei als sehr vorteilhaft dar und es konnte in diesen ersten Versuchen auch für anspruchsvolle Serotypen ein sehr gutes Wachstum in dem Medium beobachtet werden (Abbildung 3.1.12).

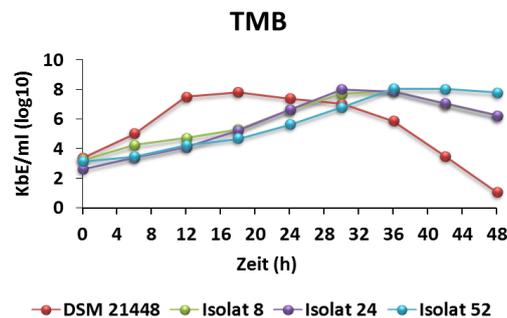


Abbildung 3.1.12: Wachstumskurven von *H.-parasuis*-Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolaten H/8, H/24 und H/52 in TMB Medium

3.1.13 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von *Haemophilus-parasuis*-Isolaten im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren mit Test Medium Bouillon

Aufgrund der guten Vorergebnisse des Wachstumsversuches mit TMB-Medium wurden Testungen mit dem Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolaten in fünf Wiederholungen mit der Bouillon-Mikrodilutionsmethode in TMB-Medium durchgeführt. Die Ablesung der Werte erfolgte nach 20, 24 und 48 Stunden. Die MHK-Werte stellten sich dabei in den fünf Wiederholungen als sehr homogen dar. Eine Auswertung der verschiedenen Inkubationszeiten zeigte, dass die homogensten Werte nach 24 Stunden Inkubation erreicht wurden.

3.1.14 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration aller *Haemophilus-parasuis*-Isolate in der Bouillon-Mikrodilution mit Test Medium Bouillon

Anschließend wurden alle 45 *H. parasuis*-Feldisolate mit dieser Methode getestet. Es konnten für alle Isolate MHK-Werte erhoben werden. Da es sich um ein Medium handelt, dass nicht in internationalen Standards empfohlen wird und aus mehreren Bestandteilen besteht, müsste allerdings noch eine Untersuchung zur Eignung des Mediums erfolgen. Daher wurde die Eignung des Mediums mit Hilfe von Qualitätskontrollstämmen bestimmt, indem die mit dem Medium ermittelten MHK-Werte der QC-Stämme mit den Referenzwerten verglichen wurden. Dabei zeigte sich, dass die MHK-Werte der vier Qualitätskontrollstämme

mit Ausnahme der Kombination des Qualitätskontrollstammes *A. pleuropneumoniae* und dem Wirkstoff Gentamicin innerhalb des angegebenen Referenzbereiches lagen.

3.1.15 Entwicklung eines neuen Mediums zur Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis*

Das TMB Medium ist kommerziell nicht erhältlich und sehr aufwändig in der Herstellung. Zudem ist eine Beeinflussung der antimikrobiellen Chemotherapeutika durch die Einzelkomponenten des Mediums nicht auszuschließen. Um ein einfacher herzustellendes und leichter zu standardisierendes Medium zu entwickeln, wurde daher CAMHB als Basismedium verwendet und an 15 *H.-parasuis*-Isolaten getestet, welche der Supplemente des TMB Mediums essentiell für das Wachstum des Erregers sind (Abbildung 3.1.15 a). Ein Wachstum konnte erreicht werden, wenn zu dem Coenzym Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid in der reduzierten Form (NADH) zusätzlich noch inaktiviertes Hühnerserum oder O-A Komplex (Ölsäure und Bovines Serum Albumin) hinzugefügt wurden. Da der O-A Komplex sehr aufwändig in der Herstellung ist und wiederum aus zwei Komponenten besteht, die einen Einfluss auf die antimikrobiellen Wirkstoffe hervorrufen können, wurden NADH und inaktiviertes Hühnerserum als Supplemente für die Empfindlichkeitstestung dem CAMHB Medium hinzugefügt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein komplett neues Medium für eine Empfindlichkeitstestung von *H. parasuis* entwickelt, welches ein sichtbares Wachstum in Mikrotiterplatten ermöglicht (Abbildung 3.1.15 b).

Kombination	NADH	Hühner Serum	Thiamin	O-A Komplex	Wachstum
1.	+	+	+	+	↑
2.	+	+	+	-	↑
3.	+	+	-	+	↑
4.	+	-	+	+	↑
5.	-	+	+	+	↓
6.	+	+	-	-	↑
7.	+	-	-	+	↑
8.	+	-	+	-	↓
9.	-	+	+	-	↓
10.	-	+	-	+	↓
11.	-	-	+	+	↓

Abbildung 3.1.15 a: Essentielle Supplemente für die Empfindlichkeitstestung von *H. parasuis* und Auswahl der Supplemente für das neu entwickelte Medium

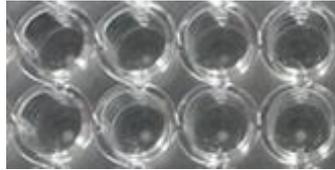


Abbildung 3.1.15 b: Sichtbares Wachstum von *H. parasuis* in CAMHB supplementiert mit NADH und inaktiviertem Hühnerserum

3.1.16 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von *Haemophilus-parasuis*-Isolaten im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren in dem neu entwickelten Medium

Anschließend wurden erste Testungen mit dem Typstamm DSM 21448 und drei Feldisolaten in fünf Wiederholungen mit der Bouillon-Mikrodilutionsmethode in dem neu entwickelten Medium durchgeführt. Die Ablesung der Werte erfolgte auch in diesem Medium nach 20, 24 und 48 Stunden. Die MHK-Werte stellten sich in den fünf Wiederholungen nach 24 Stunden Inkubation als sehr homogen dar. Ein Isolat zeigte ein besonders langsames Wachstum, die MHK-Werte konnte aber nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Stunden ausgewertet werden. Zusätzlich wurde überprüft, ob Medienbestandteile die Wirksamkeit von Antibiotika beeinflussen, indem MHK-Werte mehrerer Qualitätskontrollstämme in drei unabhängigen Wiederholungen bestimmt wurden. Die MHK-Werte der vier Qualitätskontrollstämme lagen (mit der einzigen Ausnahme der Wirkstoffe Gentamicin und Penicillin beim Qualitätskontrollstamm *A. pleuropneumoniae*) innerhalb des angegebenen Referenzbereiches.

3.1.17 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration aller *Haemophilus-parasuis*-Stämme in der Bouillon-Mikrodilution mit dem neu entwickelten Medium

Auch mit dem neu entwickelten Medium wurden alle 45 *H.-parasuis*-Feldisolate getestet und es konnten für alle Isolate mit Ausnahme eines Isolates MHK-Werte erhoben werden. Die MHK-Wert-Verteilungen für die *H.-parasuis*-Isolate sind diesem Bericht als Anlage beigefügt. Die Ergebnisse wurden mit den MHK-Werten verglichen, welche mit TMB-Medium erhoben wurden. Dabei zeigte sich eine sehr gute Übereinstimmung der Ergebnisse (Abbildung 3.1.17).

Abweichung MHK-Werte	Isolat-Wirkstoff-Kombinationen in %
100 % (identisch)	67 %
1 Verdünnungsstufe	26,3 %
2 Verdünnungsstufen	5,2 %
≥ 2 Verdünnungsstufen	1,5 %
Gesamt	100 %

Abbildung 3.1.17: Identische bzw. maximal um 1-2 Verdünnungsstufen abweichende MHK-Werte wurden für 98,5 % der Isolat-Wirkstoff-Kombinationen erreicht

Teilprojekt 2:

3.1.18 *Rhodococcus equi*: Identifizierung

Die Identifizierung der *Rhodococcus*-(*R.*)-*equi*-Isolate erfolgte sowohl morphologisch als auch mittels einer speziesspezifischen PCR, die 2003 von Ladrón et al. publiziert wurde und deren Ziel das *choE*-Gen ist (26). Mit dieser PCR konnten alle in die Untersuchung einbezogenen Isolate als *R. equi* identifiziert werden.

3.1.19 Stammsammlung

Insgesamt wurden 200 *R. equi*-Isolate akquiriert. Die Mehrheit dieser Isolate stammte vom Pferd (n=160), es waren aber auch Isolate von Hunden (n=13), Katzen (n=13), Rindern (n=5), Reptilien (n=4), Ziegen (n=2) sowie einzelne Isolate von einem Wellensittich, einem Lama und dem Fußboden einer Tierklinik enthalten. Die eine Hälfte der Isolate stammte aus den USA, die andere Hälfte war europäischen Ursprungs (Deutschland n=90, Dänemark n=9, Frankreich n=1).

3.1.20 Wachstumskurven

Für insgesamt sechs *R. equi*-Isolate verschiedenen Ursprungs wurden Wachstumskurven in drei verschiedenen Medien (BHI, CAMHB und CAMHB+2 % lys. Pb) erstellt. Da die Ergebnisse für alle sechs Isolate ähnlich waren, werden in Abbildung 3.1.20 exemplarisch die Ergebnisse für *R. equi*-Typstamm ATCC® 25729 dargestellt.

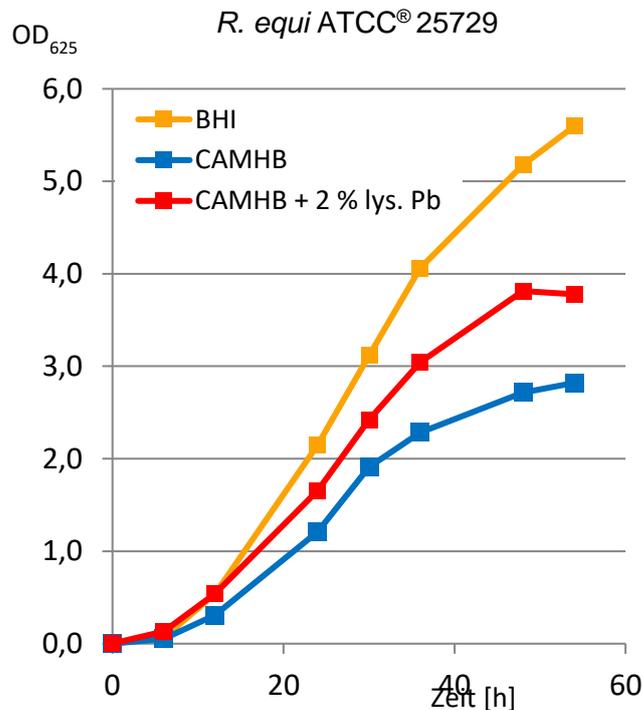


Abbildung 3.1.20: Wachstumskurve für *R. equi* ATCC® 25729 in drei verschiedenen Medien

Das beste Wachstum konnte mit BHI erreicht werden; dieses Medium ist jedoch für die Empfindlichkeitstestung nicht anerkannt. Weiterhin wurde beobachtet, dass *R. equi* in CAMHB mit 2 % lys. Pb ein besseres Wachstum zeigte als in nicht supplementierter CAMHB.

3.1.21 Vergleich verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution, statistische Auswertung, Qualitätskontrollstämmen

Um eine Methode zur Empfindlichkeitsbestimmung in der Mikrotiterplatte zu etablieren, wurden der *R.-equi*-Referenzstamm ATCC® 25729 sowie sechs epidemiologisch unverwandte Feldisolate sechsmal vergleichend in CAMHB mit und ohne 2 % lys. Pb bei aerober Inkubation bei 35 ± 2 °C getestet. Alle Ansätze wurden nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden vergleichend statistisch bewertet. Hierzu erfolgte eine Auswertung von 203 Datenpunkten (29 Wirkstoffe und sieben *R.-equi*-Isolate) pro Medium-Inkubationszeit-Kombination mittels Dichotomisierung der Ergebnisse in homogene (1) und heterogene Ergebnisse (0). Im Anschluss wurde berechnet, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für ein homogenes MHK-Ergebnis ist.

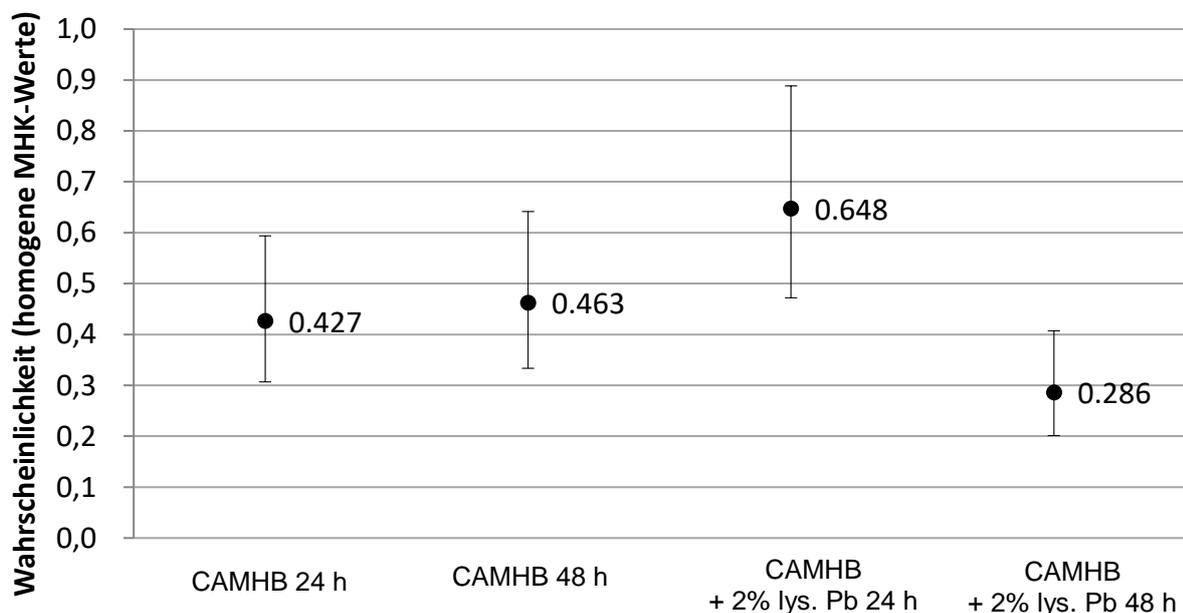


Abbildung 3.1.21: *R. equi*: Wahrscheinlichkeit für homogene MHK-Werte

Aus der in Abbildung 3.1.21 dargestellten Auswertung ließ sich erkennen, dass bei Verwendung von CAMHB mit 2 % lys. Pb (aerobe Inkubation bei 35 ± 2 °C) und einer Ablesung nach 24 Stunden die Wahrscheinlichkeit für ein homogenes MHK-Ergebnis am höchsten ist. Die Etablierung neuer QC-Stämme war aufgrund der Nutzbarkeit vorhandener QC-Stämme (*S. aureus* ATCC® 29213) nicht notwendig.

3.1.22 Anwendung der erarbeiteten Methode und Ringversuch

Die erarbeitete Methode wurde verwendet, um die meisten der MHK-Werte für die Isolate der *R.-equi*-Stammsammlung zu bestimmen (s. Anlage). Für Rifampicin, Azithromycin und Clarithromycin wurde jedoch das zur erarbeiteten Methode analoge Bouillon-Makrodilutionsverfahren eingesetzt, da diese Wirkstoffe auf den verfügbaren Mikrotiterplatten nicht vorhanden waren. Die MHK-Werte der meisten Substanzen waren normalverteilt und wiesen keine Isolate mit erhöhten MHK-Werten auf (s. Anlage).

Näher untersucht wurden sechs Isolate, die für Rifampicin erhöhte MHK-Werte aufwiesen (Tabelle 3.1.22 a). Fast alle dieser erhöhten MHK-Werte konnten auf Mutationen im *rpoB*-Gen (β -Untereinheit der RNA-abhängigen Polymerase) zurückgeführt werden. Es scheint jedoch neben diesen Mutationen einen weiteren Resistenzmechanismus zu geben, da dieselbe Mutation (Position 531 Ser \rightarrow Leu) bei Isolaten mit MHK-Werten von 8 mg/L und 128 mg/L nachgewiesen werden konnte. Zudem wurde bei einem weiteren Isolat keine Mutation im *rpoB*-Gen gefunden, obwohl der MHK-Wert des Isolates mit 8 mg/L deutlich über den Werten der Normalpopulation lag.

Tabelle 3.1.22 a: *R.-equi*-Isolate mit erhöhten MHK-Werten für Rifampicin

Stamm	Isoliert aus			Rifampicin MHK (mg/L)	Substitution	
	Tierart	Organsystem	Ort / Jahr		Codon	Austausch
1202381	Pferd	Tracheobronchiale Lavage	Deutschland / 2012	4	516	Asp (GAC) \rightarrow Val (GTC)
4132/05	Pferd	Lunge	Deutschland / 2005	8	Nicht nachgewiesen	
38621	Pferd	Lungenlymphknoten	USA / 1993	8	531	Ser (TCG) \rightarrow Leu (TTG)
36550	Pferd	Lunge	USA / 1995	64	513	Gln (CAG) \rightarrow Leu (CTG)
53761	Pferd	Lungenabszess	USA / 2005	256	526	His (CAC) \rightarrow Asp (GAC)
21151	Pferd	Abszess am Mesenterikum	USA / 2011	128	531	Ser (TCG) \rightarrow Leu (TTG)

Die erarbeitete Methode wurde abschließend im Rahmen des Ringversuches 2013 des BVL, Berlin, auf ihre Tauglichkeit für die Routinediagnostik überprüft. Am Ringversuch nahmen 18 deutsche Laboratorien teil. Sie führten die Empfindlichkeitstestung nach der erarbeiteten

Methode an zwei *R. equi* Isolaten durch. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die log₂-Stufen der MHK-Werte verwendet. Es wurde der Modalwert (= häufigster übermittelter MHK-Wert) berechnet und der erwartete Bereich als Modalwert \pm 1 Stufe definiert. In der Zusammenfassung zeigte sich, dass 93,8 % aller übermittelten MHK-Werte für *R. equi* im erwarteten Bereich lagen (Tabelle 3.1.22 b). Somit wurde festgestellt, dass die erarbeitete Methode für die Empfindlichkeitsbestimmung von *R. equi* praxistauglich ist.

Tabelle 3.1.22 b: *R. equi*: Ergebnisse des Ringversuches

Stamm	Abweichung vom erwarteten Bereich (log ₂ -Stufen)										n	% im Bereich
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5		
<i>E. coli</i> ATCC® 25922			2	93	551	205	10			3	864	98.3
<i>R. equi</i> ATCC® 25729	1	2	59	243	682	279	27	1	2		1296	92.9
<i>R. equi</i> Rh110		2	37	244	779	205	24	4	1		1296	94.8
<i>R. equi</i> zusammen	1	4	96	487	1461	484	51	5	3		2592	93.8

3.1.23 *Arcobacter butzleri*: Identifizierung mittels MALDI TOF-MS und PCR

Die Identifizierung der *Arcobacter*-spp.-Isolate erfolgte neben der Koloniemorphologie und der Matrix-assisted-laser-desorption-and-ionization time-of-flight-Massenspektrometrie (MALDI TOF-MS) mit einer Multiplex-PCR von Doudah et al. aus dem Jahr 2010 (27). Da die Koloniemorphologie eine eindeutige Zuordnung nicht erlaubte und in der MALDI TOF-MS nur für fünf Isolate Werte $>2,3$ erzielt werden konnten (laut Hersteller ist ab einem Wert von $>2,3$ die Diagnose auf Speziesebene als „sehr wahrscheinlich“ richtig anzusehen), wurde zur Diagnose der Spezies die Multiplex-PCR durchgeführt. Mit Hilfe dieser PCR konnten 65 der vorhandenen *Arcobacter*-Isolate als *Arcobacter* (*A.*) *butzleri* identifiziert werden, weitere 9 als *A. skirrowii* und 5 als *A. cryaerophilus*. Alle Referenzstämme (*A. butzleri* ATCC® 49616 und DSM 7301, *A. skirrowii* DSM 7302, *A. cryaerophilus* ATCC® 43158, *A. cibarius* DSM 17680 und *A. thereius* DSM 23385) wurden von der Multiplex-PCR korrekt identifiziert.

3.1.24 Wachstumskurven, Qualitätskontrollstämmen

Zu Beginn des Projektes wurden verschiedene in der Literatur beschriebene Wachstumsmedien, Temperaturen und Inkubationsbedingungen überprüft. Hierbei zeigte sich schnell, dass sich die *Arcobacter*-Spezies hinsichtlich ihres Wachstums sehr deutlich unterschieden (Abbildung 3.1.24). Daher wurden die Arbeiten im weiteren Verlauf auf die bedeutendste Spezies *A. butzleri* beschränkt.

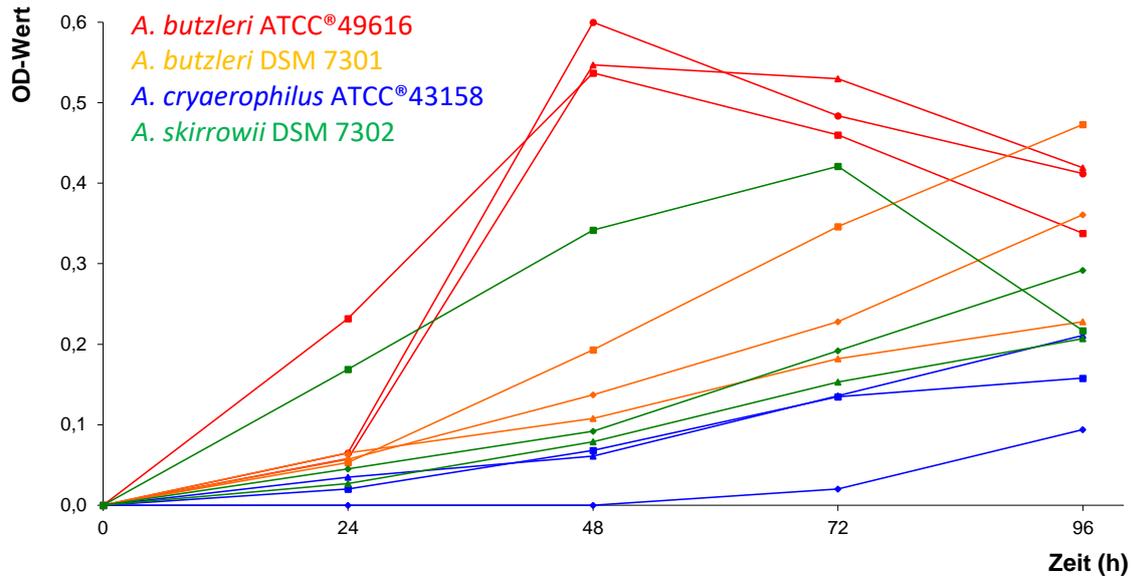


Abbildung 3.1.24: Wachstumskurven verschiedener *Arcobacter*-Spezies in BHI

3.1.25 Vergleich verschiedener Methoden der Bouillon-Mikrodilution, statistische Auswertung, Qualitätskontrollstäme

Für die Empfindlichkeitstestung von *A. butzleri* wurden zunächst verschiedene Inkubationsbedingungen überprüft. Da eine mikroaerobe Bebrütung der Mikrotiterplatten keinen Vorteil hinsichtlich der Ablesbarkeit der Platten erbrachte, wurden die Platten im weiteren Verlauf aerob bei 35 ± 2 °C bebrütet. Der Vergleich verschiedener Medien ergab, dass CAMHB ohne Zusatz nach 24 Stunden schwierig abzulesen war (Abbildung 3.1.25 a); nach 48 Stunden Bebrütung verbesserte sich die Ablesbarkeit deutlich (Abbildung 3.1.25 b). Der Zusatz von 2 % lys. Pb führte hingegen dazu, dass die Platten - vermutlich infolge der Verdunkelung des Mediums kombiniert mit einem schwachen Wachstum der *Arcobacter* - nicht mehr auswertbar waren (Abbildung 3.1.25 c, d). Der Zusatz von AlamarBlue als Wachstumsindikator konnte die Ablesbarkeit dieser beiden Medien nach 24 Stunden nicht deutlich verbessern (Abbildung 3.1.25 e, f).

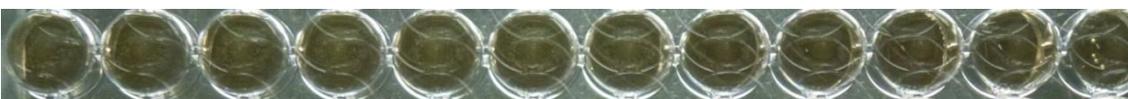
a. CAMHB nach 24 h



b. CAMHB nach 48 h



c. CAMHB + 2 % lys. Pb nach 24 h



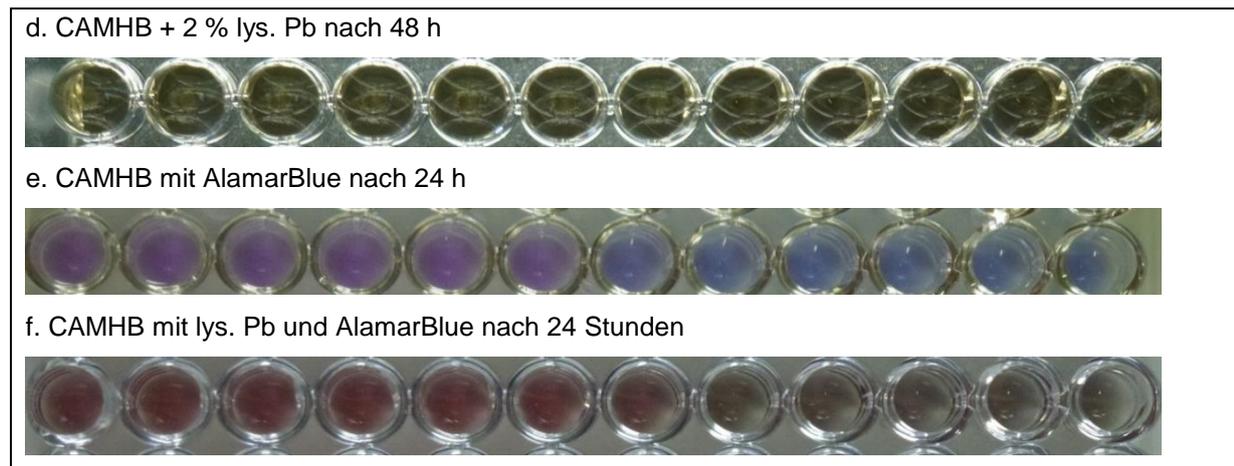


Abbildung 3.1.25 a-f: Wachstum von *A. butzleri* in verschiedenen Medien

Um die Ablesbarkeit weiter zu verbessern, wurde die CAMHB mit verschiedenen Konzentrationen an fetalem Kälberserum (FKS) angereichert. Mit diesen Zugaben waren die Mikrotiterplatten bereits nach 24 Stunden Inkubation gut ablesbar (Abbildung 3.1.25 g, h).

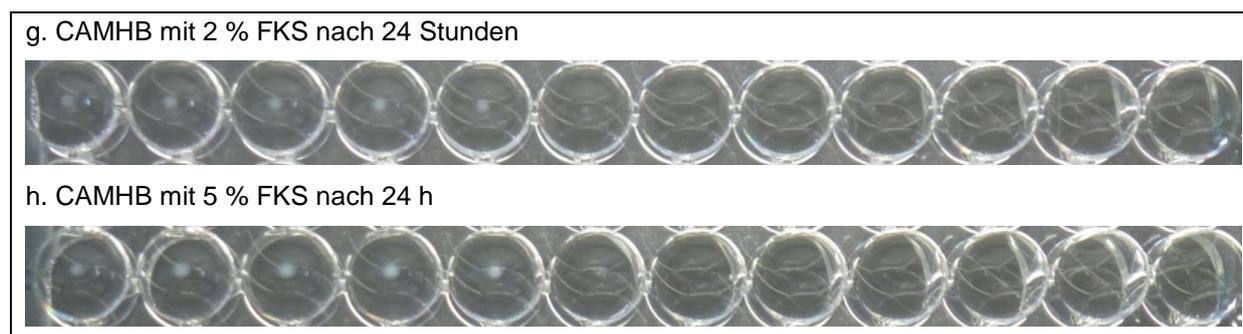


Abbildung 3.1.25 g, h: Wachstum von *A. butzleri* in CAMHB mit FKS

Für eine erweiterte Testung wurden zwei Referenz- und fünf Feldstämme mit CAMHB ohne Zusatz, mit 2 % FKS sowie mit 5 % FKS getestet. Alle Mikrotiterplatten wurden nach 24 und 48 Stunden abgelesen. Insgesamt wurde die Testung fünf Mal durchgeführt und die Ergebnisse im Anschluss statistisch ausgewertet. Die Statistik wurde in diesem Fall für zwei verschiedene Annahmen erhoben. Szenario A ging von der Annahme aus, dass die MHK in allen fünf Wiederholungen exakt dieselbe sein sollte, in Szenario B war eine Abweichung von \pm einer MHK-Stufe zulässig. In beiden Szenarien konnte die höchste Wahrscheinlichkeit für homogene MHK-Werte für CAMHB mit 5 % FKS (aerobe Inkubation) und einer Ablesung nach 24 Stunden erzielt werden (Abbildung 3.1.25 j).

Tabelle 3.1.25 j: *A. butzleri*: Wahrscheinlichkeit für homogene MHK-Werte

	Medium	Ablesung nach [h]	Wahrscheinlichkeit für homogene MHK-Werte
Szenario A (exakt gleiche MHK)	CAMHB	24	13.71
		48	16.94
	CAMHB + 2 % FKS	24	14.52
		48	17.74
	CAMHB + 5 % FKS	24	22.98
		48	21.77
Szenario B (± 1 MHK-Stufe)	CAMHB	24	42.34
		48	49.19
	CAMHB + 2 % FKS	24	47.18
		48	53.63
	CAMHB + 5 % FKS	24	71.37
		48	62.10

Da CAMHB mit Zusatz von FKS zur Empfindlichkeitstestung bisher selten beschrieben wurde, wurden ergänzende Versuche durchgeführt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass mit FKS verschiedener Hersteller keine Abweichung hinsichtlich der Ablesbarkeit oder der MHK-Werte von *A. butzleri* auftritt. Zum zweiten wurde der Einfluss von FKS auf die MHK-Werte des Qualitätskontroll- (QC-) Stammes *E. coli* ATCC® 25922 untersucht. Auch hier zeigte sich kein Einfluss auf die MHK-Werte; alle QC-Bereiche wurden eingehalten. Die Etablierung neuer QC-Stämme war aufgrund der Nutzbarkeit vorhandener QC-Stämme nicht notwendig.

3.1.26 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Bei der Testung der Stammsammlung (*A. butzleri*, n=65) ergaben sich bei Verwendung einer für andere Bakterien üblichen Verdünnung der Bakteriensuspension für das Mikrotiterplatten-Inokulum (50 µl auf 10 mL Medium) zunächst Probleme mit einer zu hohen Bakteriendichte des Inokulums. Alle Stämme wurden daher erneut mit einer geringeren Menge an Bakterien untersucht, um den von der CLSI geforderten Bereich von 2 bis 8 x 10⁵ CFU/mL einzuhalten. Die Ergebnisse zeigten für die meisten Wirkstoffe eine Normalverteilung der ermittelten MHK-Werte (siehe Anhang). Für Gentamicin, das eine therapeutische Relevanz besitzt, wurde bei einem Isolat ein deutlich erhöhter MHK-Wert nachgewiesen (32 mg/L). Dasselbe Isolat wies auch für das ebenfalls therapeutisch relevante Tetrazyklin (32 mg/L), sowie für Streptomycin (64 mg/L) und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (64 mg/L) erhöhte MHK-Werte auf. Der genetische Hintergrund dieser erhöhten Werte wurde noch nicht untersucht. Ein Ringversuch zur Testung der erarbeiteten Methode auf ihre Praxistauglichkeit im Routinelabor wird im Herbst/Winter 2015 erfolgen.

3.1.27 *Trueperella pyogenes*: Identifizierung mittels biochemischer Verfahren und MALDI TOF-MS

Die vorläufige Identifizierung der Isolate erfolgte makroskopisch mittels Beurteilung der Kolonimorphologie sowie der Serolyse nach Loeffler. Eine Absicherung erfolgte für alle Isolate mittels MALDI TOF-MS. Hierbei konnten für alle Isolate Werte >2,0 erreicht werden (richtige Gattungsidentifizierung als sicher anzunehmen), jedoch wurden nur für wenige Isolate Werte >2,3 erhalten. Da *Trueperella (T). pyogenes* jedoch die einzige Spezies der Gattungen *Trueperella* und *Arcanobacterium* ist, die zur Serolyse von Rinderserum in der Lage ist, war eine Diagnose der Spezies durch die Kombination von MALDI TOF-MS und Serolyse möglich. Zur weiteren Absicherung wurden etwa zehn Prozent der Stämme im VITEK II compact-System biochemisch untersucht und als *T. pyogenes* identifiziert.

3.1.28 Methode der Empfindlichkeitsbestimmung, Qualitätskontrollstämme

Die bereits in früheren Arbeiten etablierte und vom VAST-CLSI anerkannte Methode zur Empfindlichkeitstestung von *T. pyogenes* mittels Bouillonmikrodilution wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeiten überprüft. Trotz geringfügig geänderter Laborbedingungen (CO₂-Atmosphäre bei der Inkubation) war das Protokoll zur Testung der Isolate geeignet. Da die genutzte Methode (Testung in CAMHB + 2 % lys. Pb, mikroaerobe Inkubation, Ablesung nach 24 h, Verringerung der Inokulumsmenge auf 15 µL) in CLSI-Dokumenten analog auch für andere Bakterien angegeben wird und der mitgeführte Kontrollstamm keine Abweichungen von den erwarteten Werte zeigte, war eine Etablierung neuer QC-Stämme nicht notwendig.

3.1.29 Testung der Stammsammlung und Ringversuch

Es wurden etwas mehr als 200 Isolate von Rindern und Schweinen aus den Jahren 2008 bis 2015 auf ihre MHK-Werte untersucht (siehe Anhang). Dabei wurden keine Isolate mit erhöhten MHK-Werten gegenüber Betalaktam-Antibiotika beobachtet, jedoch wurden Isolate mit erhöhten MHK-Werten gegenüber Makroliden, Lincosamiden und/oder Tetrazyklinen gefunden. Eine geringere Anzahl an Isolaten wies erhöhte Werte gegenüber Trimethoprim/Sulfamethoxazol und Streptomycin auf, ebenso scheinen einige Isolate eine erhöhte Unempfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen zu besitzen.

Die eingesetzte Methode wurde mittels Ringversuch des BVL, Berlin, auf ihre Routinetauglichkeit zum Einsatz in verschiedenen Laboratorien untersucht. Am Ringversuch waren 20 deutsche Laboratorien beteiligt; die Empfindlichkeitsbestimmung wurde mit zwei *T.-pyogenes*-Isolaten durchgeführt. Für die Auswertung der Ergebnisse wurden wiederum die log₂-Stufen der MHK-Werte verwendet, es wurde der Modalwert berechnet und der

erwartete Bereich als Modalwert ± 1 Stufe definiert. Ein Labor übermittelte für einen Durchgang und den Stamm ATCC® 49616 keine verwertbaren Ergebnisse, wodurch sich unterschiedliche Datensätze für die beiden *T. pyogenes*-Stämme ergaben (siehe Tabelle 3.1.29). In der Zusammenfassung zeigte sich, dass 93,7 % aller übermittelten MHK-Werte für *T. pyogenes* im erwarteten Bereich lagen, so dass die durchgeführte, in dieser Arbeit überprüfte Methode für *T. pyogenes* als praxistauglich beurteilt werden konnte (Abbildung 3.1.29)

Tabelle 3.1.29: *T. pyogenes*: Ergebnisse des Ringversuches

	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	≥5	n	% im Bereich
<i>S. aureus</i> ATCC® 29213				4	102	769	477	76	8	4		1440	93,6
<i>T. pyogenes</i> ATCC® 49616	10	23	8	32	112	830	229	19	7		2	1272	92,1
<i>T. pyogenes</i> Feldstamm			7	9	191	866	178	30	7	2	6	1296	95,3
<i>T. pyogenes</i> zusammen	10	23	15	41	303	1696	407	49	14	2	8	2568	93,7

Teilprojekt 3:

3.1.30 Identifizierung und Typisierung der *Riemerella-anatipestifer*-Isolate

Bei der biochemischen Identifizierung der 109 *R. anatipestifer*-Isolate konnte mittels API 20NE die in der Literatur genannten Profile nachgewiesen werden. Mittels PCR wurde das erwartete Fragment von 662 Basenpaaren (bp) bei allen Isolaten nachgewiesen und die akquirierten Isolate konnten eindeutig der Spezies *R. anatipestifer* zugeordnet werden. Eine Feindifferenzierung erfolgte mittels Makrorestriktionsanalyse. Für 95 von 109 Isolaten konnten Restriktionsprofile ermittelt werden. Die übrigen Isolate konnten in der Makrorestriktion nicht geschnitten werden. Die Auswertung der Ergebnisse in der Advanced Cluster Analyse zeigte, dass Putenisolate häufig gemeinsame Cluster bildeten. Entenisolate zeigten hingegen eine große genetische Variabilität und waren nur vereinzelt in gemeinsamen Clustern zu finden. Innerhalb der Entenisolate gab es keine klonalen Isolate. Die Hühnerisolate waren weitgefächert zwischen Puten- und Entenisolaten verteilt.

3.1.31 Ermittlung eines geeigneten Testmediums für *Riemerella anatipestifer*

Zur Ermittlung eines geeigneten Testmediums für *R. anatipestifer* wurden Wachstumskurven mit zwei Feldisolaten und dem Referenzstamm DSM 15868 CAMHB und in CAMHB mit 2 % lys. Pb erstellt. Zur Validierung der Ergebnisse wurden der Referenzstamm und zwei Feldstämme in drei voneinander unabhängigen Durchgängen getestet und die Mittelwerte aus diesen ermittelt.

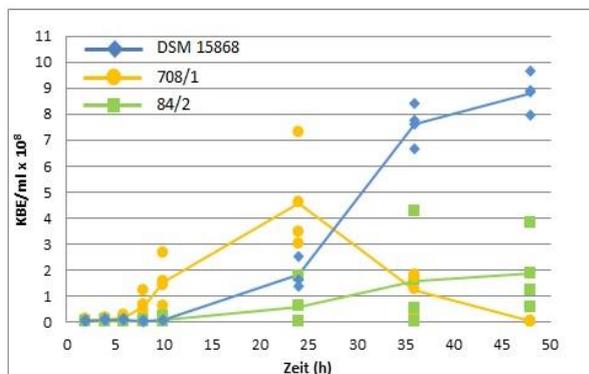


Abbildung 3.1.31 a: Wachstumskurven von *R. anatipestifer* DSM 15868 und den Feldisolaten 708/1 und 84/2 in CAMHB; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

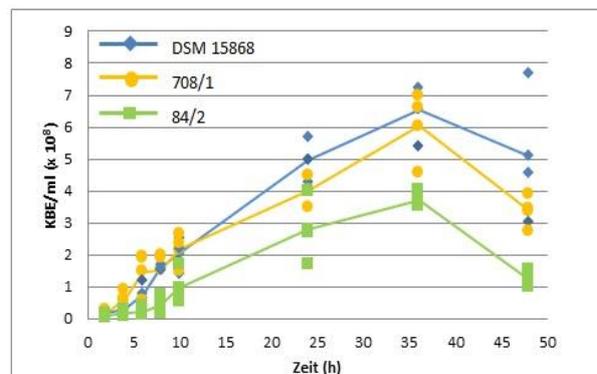


Abbildung 3.1.31 b: Wachstumskurven von *R. anatipestifer* DSM 15868 und den Feldisolaten 708/1 und 84/2 in CAMHB mit 2 % lys. Pb; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

In CAMHB wurde kein einheitliches Wachstum der Isolate und des Referenzstammes ermittelt (Abbildung 3.1.31 a). Aus diesem Grund wurde CAMHB mit 2 % lys. Pb für die weiteren Versuche verwendet (Abbildung 3.1.31 b). Zur Ermittlung der geeigneten Inkubationszeit wurden Wachstumskurven mit einem erweiterten Messpunktespektrum in dem ausgewählten Medium angefertigt.

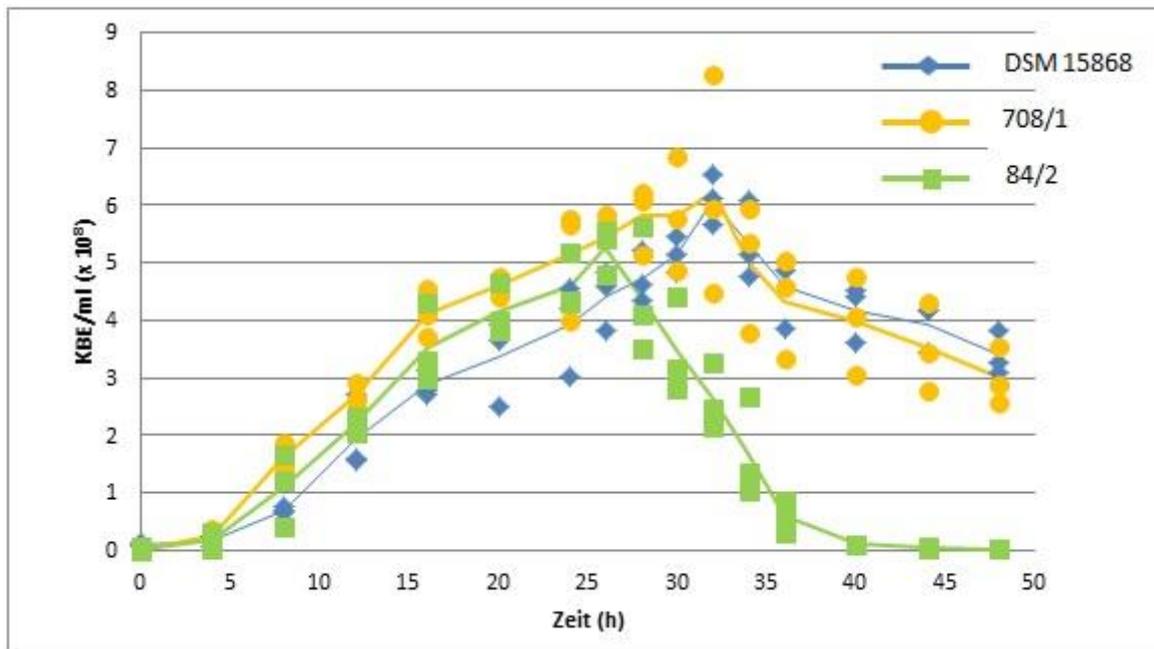


Abbildung 3.1.31 c: Wachstumskurven der *R. anatipestifer*-Feldstämme 708/1 und 84/2, sowie des Referenzstamms DSM 15868 in CAMHB mit 2 % lys. Pb; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

Die Ergebnisse zeigten, dass alle drei *R. anatipestifer*-Stämme in MHB II mit 2 % lys. Pb eine gleichmäßige exponentielle Wachstumsphase zeigten. Ein Anstieg der Keimzahlen war bei Isolat 84/2 bis 26 Stunden zu beobachten, während der Referenzstamm und das zweite Feldisolat 708/1 bis zu 32 Stunden Wachstum zeigten, bevor sie in die Absterbephase übergingen (Abbildung 3.1.31 c).

Die optimale Inkubationszeit liegt demnach zwischen 24 und 30 Stunden, da in diesem Zeitraum noch ein Anstieg der Keimzahlen zu beobachten war. Zur Bestätigung wurden Mikrotiterplatten ohne Antibiotika mit dem Inokulum dieser Isolate, die analog des Inokulums für die Bouillon-Mikrodilution hergestellt wurden, beimpft. Nach 24 Stunden aerober Inkubation wurde eine konstant gute Ablesbarkeit festgestellt. Nach 30 Stunden war die Ablesbarkeit geringfügig besser.

3.1.32 Wiederholbarkeit der Ergebnisse aus der Empfindlichkeitsbestimmung von

Riemerella anatipestifer

Anschließend wurde die Bouillon-Mikrodilution mit den zwei Feldstämmen und dem Typstamm DSM 15868 in Antibiotika-beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Zur Validierung der Ergebnisse erfolgten drei voneinander unabhängige Versuchsdurchgänge. Zwischen den einzelnen Versuchsdurchgängen wurden nur Abweichungen um maximal +/- eine Titerstufe vom ersten ermittelten MHK-Wert beobachtet. Dies ließ auf eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schließen. Die Auswertung der Mikrotiterplatten erfolgte

nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden bei 35-37 °C. Mit den QC-Stämmen *E. coli* ATCC® 25922 und *S. aureus* ATCC® 29213 wurde in gleicher Weise verfahren. Die MHK-Werte der Qualitätskontrollstämmen lagen in allen Versuchen im vorgegebenen Bereich.

3.1.33 Testung aller *Riemerella-anatipestifer*-Isolate mit der Methode

109 *R.-anatipestifer*-Isolate wurden in der Bouillon-Mikrodilution getestet. Als Testmedium wurde CAMHB mit 2 % lys. Pb verwendet. Die Ablesung der Mikrotiterplatten erfolgte nach 24 Stunden aerober Inkubation bei 35-37 °C.

Für 108 Isolate wurden MHK-Werte gegenüber 24 antimikrobiellen Wirkstoffen, aus 11 Antibiotikaklassen ermittelt. Bei einem Isolat waren in mehreren Versuchsdurchgängen keine Empfindlichkeitswerte ablesbar. Entsprechend wurde es von der Auswertung ausgeschlossen. Die Stammakquise erfolgte über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren. Innerhalb dieser Zeitspanne kam es zu einem Layout-Wechsel der Mikrotiterplatten. 52 Isolate wurden mit dem älteren Layout und 56 Isolate mit dem neueren Layout untersucht. Bei dem neueren Layout wurden Spiramycin und Chloramphenicol durch Tulathromycin und Cephalothin ersetzt. Für diese Wirkstoffe liegen demzufolge nur die Ergebnisse von 52 bzw. 56 getesteten Isolaten vor. Die Verteilung der MHK-Werte der 108 *R.-anatipestifer*-Isolate ist dem Abschlussbericht als Anlage beigelegt.

3.1.34 Überprüfung der Methode anhand eines Ringversuches für *Riemerella-anatipestifer*

Die Robustheit der erarbeiteten Methode soll in Zusammenarbeit mit dem BVL Berlin in einem Ringversuch überprüft werden.

3.1.35 Identifizierung der *Ornithobacterium-rhinotracheale*-Isolate

Die biochemische Identifizierung mittels API 20 NE ergab die für *O. rhinotracheale* typischen Reaktionsprofile. Von allen *O.-rhinotracheale*-Isolaten erfolgte eine Serotypisierung mit Antiseren gegen die Serotypen A bis L. Fünf Isolate konnten nicht typisiert werden. Die Spezieszuordnung der 100 Isolate wurde mittels PCR durch den Nachweis eines Fragments von 784 bp bestätigt. Für *O. rhinotracheale* wurde ebenfalls eine Feindifferenzierung mittels Makrorestriktionsanalyse durchgeführt. Ein speziesdifferenzierter Vergleich war hier allerdings nicht möglich, da es sich größtenteils um Putenisolate handelte. Es wurde aber deutlich, dass häufig Isolate bestimmter AGP-Serotypen gemeinsame Cluster bilden. Die Standardserotypen von *O. rhinotracheale* zeigten alle unterschiedlichen Fragmentmuster. Die genetische Ähnlichkeit der Standardserotypen A, B, C, D, E, F, G, H und I untereinander lag bei 39,8 %.

3.1.36 Ermittlung eines geeigneten Testmediums für *Ornithobacterium rhinotracheale*

Zur Auswahl eines geeigneten Mediums wurden in drei verschiedenen Testmedien (CAMHB, CAMHB + 3 % lys. Pb, BHI) Wachstumskurven mit zwei Feldisolaten und dem *O. rhinotracheale*-Typstamm DSM 15997 angelegt. Es erfolgten jeweils drei voneinander unabhängige Wiederholungen. Im BHI-Medium wurden insgesamt höhere Keimzahlen aller drei Stämme erreicht, im Vergleich zum Wachstum in den anderen beiden Medien (Abbildung 3.1.36 a). In CAMHB wurde bei allen drei Stämmen nur schwaches Wachstum beobachtet (Abbildung 3.1.36 b). In CAMHB mit 3 % lys. Pb wurde ein einheitlicheres Wachstum erzielt (Abbildung 3.1.36 c).

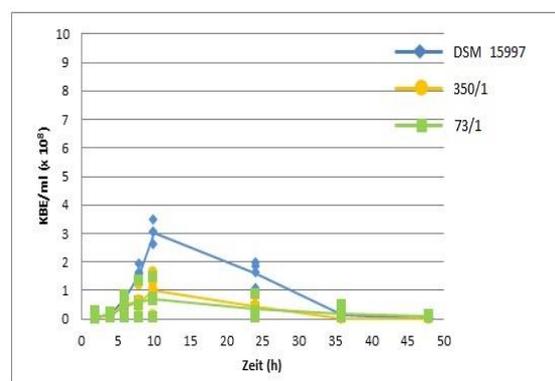
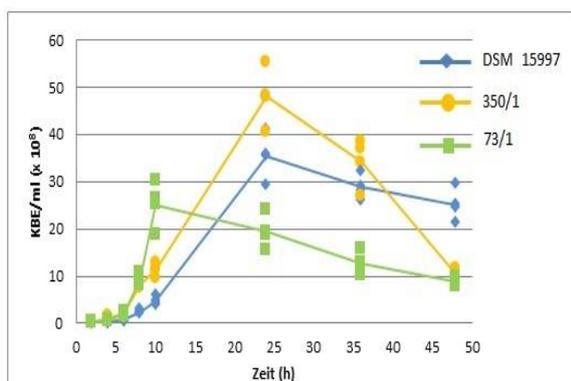


Abbildung 3.1.36 a: Wachstumskurven von *O. rhinotracheale* DSM 15997 und den Feldisolaten 350/1 und 73/1 in BHI; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

Abbildung 3.1.36 b: Wachstumskurven von *O. rhinotracheale* DSM 15997 und den Feldisolaten 350/1 und 73/2 in CAMHB; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

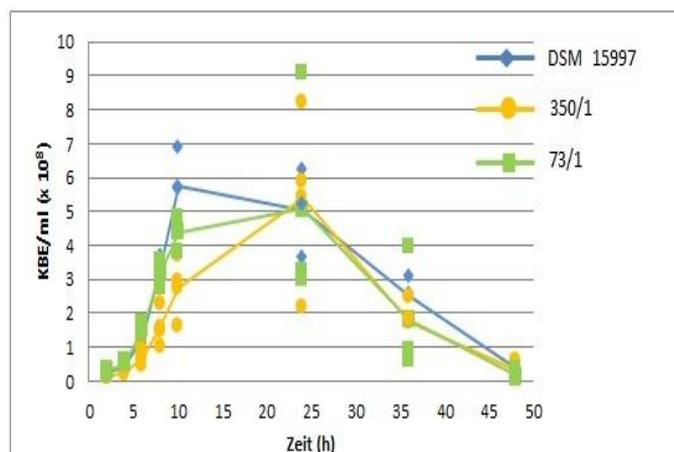


Abbildung 3.1.36 c: Wachstumskurven von *O. rhinotracheale* DSM 15997 und den Feldisolaten 350/1 und 73/2 in CAMHB + 3 % lysiertem Pferdeblut; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurde CAMHB + 3 % lys. Pb als Medium für die weiteren Versuche ausgewählt, da BHI als Medium für die Resistenztestung nicht eingesetzt werden

kann. Die Inkubation erfolgte mikroaerophil bei 35-37 °C für 24 Stunden. Zwanzig Isolate wurden mittels Bouillon-Mikrodilution auf antibiotika-beschichteten Mikrotiterplatten getestet. Von den untersuchten 20 Isolate waren zwölf Isolate wegen schlechten bzw. rasenartigen Wachstums in der Mikrotiterplatte nicht auswertbar. Die übrigen acht Isolate wiesen ein knopfartiges, gut ablesbares Wachstum auf. Die Abbildungen 3.1.36 d und 3.1.36 e zeigen je ein Wachstumsbeispiel eines rasenbildenden- und eines knopfbildenden Isolates.

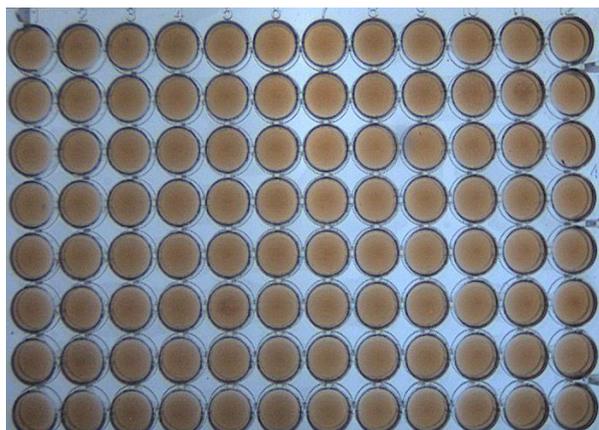


Abbildung 3.1.36 d: *O.-rhinotracheale*-Isolat 20/12, Rasenbildner

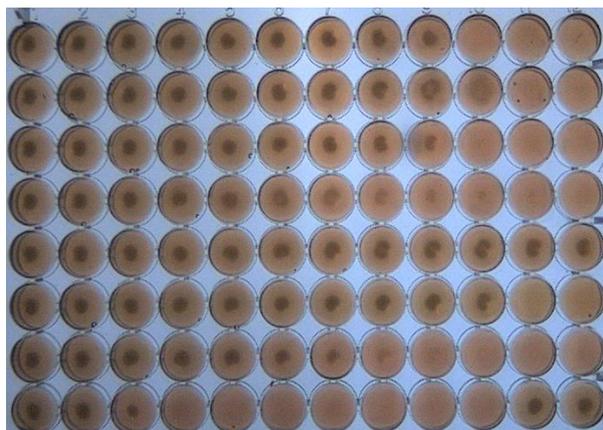


Abbildung 3.1.36 e: *O.-rhinotracheale*-Isolat 488, Knopfbildner

In weiteren Versuchen zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurden je sechs Isolate mit Knopf- und sechs Isolate mit Rasenwachstum ausgewählt. In 96-Well Mikrotiterplatten ohne Wirkstoff wurde das Wachstumsverhalten der zwölf *O.-rhinotracheale*-Isolate, sowie des Referenzstammes DSM 15997 getestet und mit den Daten der Serotypisierung und biochemischen Identifizierung verglichen. Durch die biochemischen Profile ließen sich keine Rückschlüsse über das Wachstum von Knopf- und Rasenbildnern ziehen. Die Rasenbildner waren ausschließlich vom Serotyp A, während andere Serotypen wie E, B und H Knöpfe in den Wells der Mikrotiterplatten bildeten (Tabelle 3.1.36).

Tabelle 3.1.36: Vergleich der sechs rasen- und sechs knopfbildenden Isolate von *O. rhinotracheale*

Rasenbildner	API 20NE	ST* ¹		Knopfbildner	API 20NE	ST* ¹
56	0020004	A		1573/16	0020004	NT* ²
350/1	0020004	A		455	0020000	E
566/7	0220004	A		2151/1	0020004	B
94/2	0220004	A		2525/1	0220004	H
20/12	0220004	A		462	0220004	H
2175	0020004	A		488	0220004	B

*¹ ST= Serotyp, *²= nicht typisierbar

Zur weiteren Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde zunächst das VFM getestet, welches vom CLSI als geeignetes Medium für die Resistenztestung von anspruchsvollen Erregern empfohlen wird. Bei der Wachstumsprüfung mit den o. g. zwölf Isolaten in einer 96-Well Mikrotiterplatte ohne Wirkstoff wurde kein Wachstum festgestellt.

In einem weiteren Versuchsdurchgang wurde der Anteil an lysiertem Pferdeblut in der CAMHB erhöht. Getestet wurden Konzentrationen von 5 %, 7,5 % bzw. 10 % lys. Pb. Die Prüfung erfolgte jeweils in einer 96-Well Mikrotiterplatte ohne Antibiotikazusatz. Das Wachstum war bei 5 % bzw. 7,5 % supplementierten Pferdeblut zur CAMHB bei den sechs rasenbildenden Isolaten etwas besser sichtbar, jedoch nicht zufriedenstellend. In CAMHB mit 10 % lys. Pb war das Wachstum wegen der hohen Blutkonzentration nicht zu beurteilen. Zudem erfolgte ein Nachdunkeln des Pferdeblutes nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden. Da ein Ablesen so nicht möglich war, wurde auf weitere Versuche mit einer 10 %igen Supplementierung mit lys. Pferdeblut verzichtet.

Das Wachstum der zwölf *O.-rhinotracheale*-Isolate wurde in 96-Well Mikrotiterplatten mit 5 % und 7,5 % Pferdeblutzusatz jeweils mit unterschiedlicher CO₂ Spannung getestet. Der CO₂ Anteil betrug jeweils 5 %, 7,5 % bzw. 10 %. In der Ablesbarkeit ergaben sich keine Veränderungen.

Ein weiterer Versuch die Ablesbarkeit zu verbessern bestand darin, die Inokulationsdosis im Rahmen der Vorgaben des CLSI von 2×10^5 KBE/ml auf 8×10^5 KBE/ml zu erhöhen. Dieser Versuch wurde mit dem Referenzstamm und einem rasenbildenden Stamm durchgeführt. Für die Ablesbarkeit ergab sich keine Verbesserung. In früheren Untersuchungen wurden Mikrotiterplatten verwendet, die mit 100 µl statt mit 50 µl wie bei den aktuellen Versuchen befüllt wurden. Entsprechend wurde in einem weiteren Versuch das Inokulationsvolumen auf 100 µl erhöht. Als Medium diente CAMHB supplementiert mit 5 % bzw. 7,5 % lys. Pb. Nach einer Inkubation von 24 Stunden ergab sich eine gute Ablesbarkeit aller knopfbildenden

Isolate und ebenfalls eine gute Ablesbarkeit bei drei der sechs rasenbildenden Isolate. Da die aktuellen Mikrotiterplatten jedoch nicht für ein Inokulationsvolumen von 50 µl hergestellt wurden, wurde von einer Erhöhung des Volumens abgesehen. Da die *O. rhinotracheale*-Isolate in CAMHB mit 5 % oder 7,5 % lys. Pb gutes Wachstum zeigten, wurden Wachstumskurven in diesen beiden Medien erstellt. Ausgewählt wurden von den Isolaten ein Knopfbildner und ein Rasenbildner. Als Kontrolle wurde der *O. rhinotracheale*-Referenzstamm DSM 15997 mitgeführt. Beim Wachstum in CAMHB mit Zusatz von 5 % lys. Pb wurde die Plateauphase bei den Feldstämmen nach 24 Stunden erreicht. Der Referenzstamm erreichte die Plateauphase erst nach 36 Stunden. Bei einer Supplementierung des CAMHB mit 7,5 % lys. Pb erreicht der Feldstamm 488 nach 24 Stunden, die Feldstamm 20 und der Referenzstamm erst nach ca. 36 Stunden die Plateauphase. Die ermittelten Keimzahlen der zwei Feldisolate und des Referenzstammes waren im Medium mit der höheren Supplementierung an Pferdeblut deutlich höher. In Abbildung 3.1.36 f und 3.1.36 g sind die Mittelwerte der drei Messungen je Stamm und Zeitpunkt durch Linien verbunden.

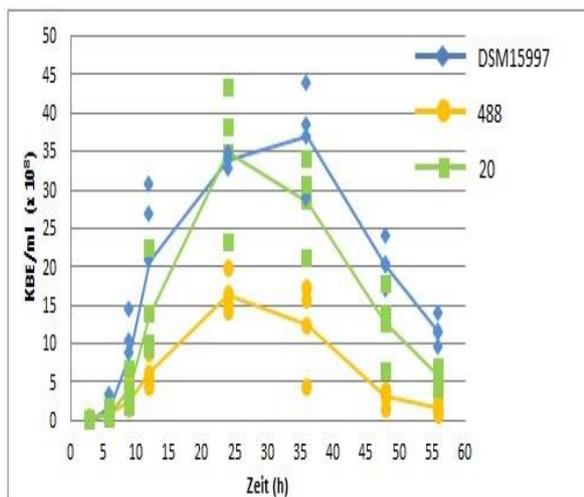


Abbildung 3.1.36 f: Wachstumskurven von *O. rhinotracheale* DSM 15997 und den Feldisolaten 488 und 20 in CAMHB + 5 % lys. Pb; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

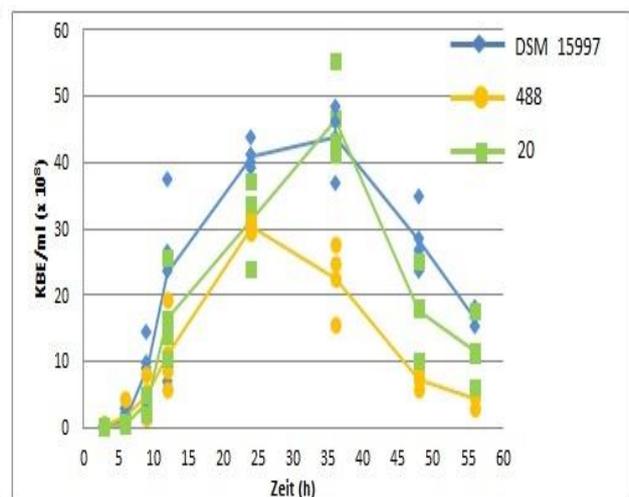


Abbildung 3.1.36 g: Wachstumskurven von *O. rhinotracheale* DSM 15997 und den Feldisolaten 488 und 20 in CAMHB + 7,5 % lys. Pb; die Einzelwerte sind als einzelne Punkte und die Mittelwerte als Linien dargestellt.

Auch die Verwendung des Farbstoffes Alamar Blue (Thermo Scientific), der bei Bakterienwachstum einen Farbumschlag in den Wells der Mikrotiterplatte von blau zu rosa bewirkt, führte hier nicht zu zufrieden stellenden Ergebnissen. Abbildung 3.1.36 h zeigt zwei Isolate von *O. rhinotracheale* [Isolat 350/2 (Rasenbildner), Isolat 488 (Knopfbildner)]. Die erste Reihe zeigt jeweils die Beimpfung von reinem CAMHB, in der zweiten Reihe wurde 5 % lys. Pb supplementiert. In CAMHB kann bei Isolat 488 ein leichter Farbumschlag im Vergleich mit der Negativkontrolle im letzten Well beobachtet werden. Bei Isolat 350/2 ist der Unterschied zur Kontrolle kaum sichtbar. In CAMHB mit Supplement ist ebenfalls kaum ein

Unterschied zur Negativkontrolle erkennbar. Die untere Reihe wurde mit dem *E.-coli*-Referenzstamm ATCC 25922 in CAMHB beimpft; hier war der Farbumschlag nach rosa nach 24 Stunden Inkubation im Vergleich mit der Negativkontrolle deutlich sichtbar (Abbildung 3.1.36 h).

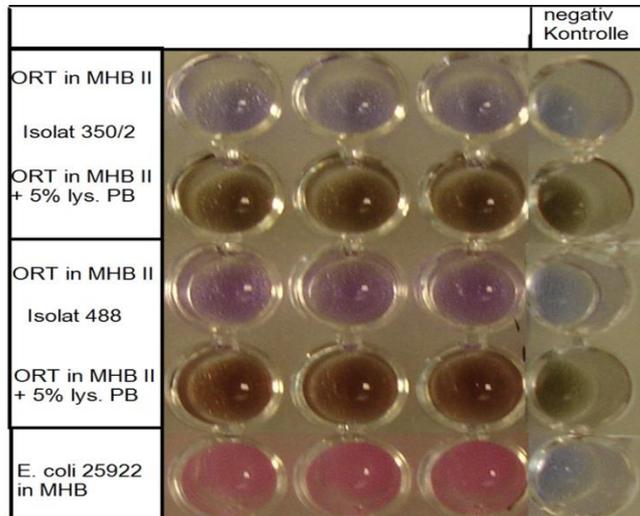


Abbildung 3.1.36 h: Ergebnisse der Mikrodilution nach Zusatz des Farbstoffes Alamar Blue zur besseren Beurteilung des Wachstums bei zwei *O.-rhinotracheale*-Isolaten und dem *E.-coli*-Referenzstamm ATCC® 25922

3.1.37 Überprüfung des E-Test Verfahrens für *Ornithobacterium rhinotracheale* als Alternativmethode

Da mit den untersuchten Medien und den unterschiedlichen Konzentrationen an lysiertem Pferdeblut, sowie Veränderungen in der Keimzahl und CO₂ Spannung keine zufriedenstellenden Ergebnisse für die Bouillon-Mikrodilution für *O. rhinotracheale* erzielt werden konnten, wurde der E-Test als alternative Methode herangezogen, um MHK-Werte zu ermitteln. Es wurden vier Feldisolate und der *O.-rhinotracheale*-Referenzstamm gegenüber den antimikrobiellen Wirkstoffen Ampicillin, Enrofloxacin, Tetrazyklin und Tiamulin in drei Wiederholungen auf MH-Agar mit 5 % lys. Pb mittels E-Test (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen) getestet. Nach 24 Stunden war bei allen Isolaten deutlich sichtbares Wachstum vorhanden und die Isolate wiesen innerhalb der drei Versuchsdurchgänge reproduzierbare MHK-Werte auf. In der Routinediagnostik könnte die Methode demnach angewendet werden. Die Problematik liegt jedoch darin, dass ein Großteil veterinärmedizinischer Wirkstoffe nicht als kommerziell erwerbbarer E-Test Streifen erhältlich ist.

3.1.38 Überprüfung der Agardilutionsmethode für *Ornithobacterium rhinotracheale* als Alternativmethode

31 von 100 *O.-rhinotracheale*-Isolaten wurden mittels Agardilution gegen Enrofloxacin, Tiamulin und Tylosin getestet. Die Auswahl der Stämme erfolgte nach dem Zufallsprinzip.

Die Isolate wurden in drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen getestet. Zur Kontrolle wurden die Referenzstämme *E. coli* ATCC® 25922, *O. rhinotracheale* DSM 15997 und der interne Kontrollstamm *S. aureus* 122028 mitgeführt. Als Testmedium wurde Mueller-Hinton Agar mit 5 % lys. Pb verwendet. Für die 31 *O.-rhinotracheale*-Stämme ergaben sich gegenüber den geprüften Antibiotika die in Tabelle 3.1.38 dargestellten MHK-Werte.

Tabelle 3.1.38: MHK-Werte von 31 *O.-rhinotracheale*-Isolaten in der Agardilution (drei voneinander unabhängige Prüfungen, 24 Stunden Inkubation)

Wirkstoff/ Wiederholung	Verteilung der MHK-Werte nach 24 h (mg/L)									
	≤ 0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	>64
Enrofloxacin										
1	1	2			18	7	3			
2	1	2		1	18	4	4	1		
3	1	2			16	6	6			
Tiamulin										
1	29	1				1				
2	26	4				1				
3	18	12				1				
Tylosin										
1	9		1	8	3	2	4	1	2	1
2	9		2	2	6	4	4		3	1
3	8	1	2	4	6	5	1		3	1

Innerhalb der drei Wiederholungen ergaben sich bei den 31 *O.-rhinotracheale*-Isolaten nach 24 Stunden Inkubation nur wenige Abweichungen, sodass die Methode sich zur MHK-Bestimmung des Erregers eignen würde. Allerdings zeigte sich, dass diese Methode mit einem hohen Zeit- und Arbeitsaufwand im Vergleich zu anderen Methoden verbunden ist. Mittels Agardilution lässt sich auch nur eine begrenzte Anzahl von Wirkstoffen testen, bei relativ hohem Arbeitsaufwand, sodass von einem Ringversuch abgesehen wurde.

3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Teilprojekt 1:

Für den Erreger *B. bronchiseptica* konnte bestätigt werden, dass der CLSI-Standard VET01-A4 für die Empfindlichkeitstestung angewendet werden kann, wobei eine verlängerte Inkubationszeit von 24 Stunden deutlich homogenere MHK-Daten liefert. Dies führt in der Routinediagnostik und im Interlaborvergleich zu stabileren MHK-Werten. Die Erhebung von Empfindlichkeitsdaten für den Erreger ist zudem relevant, um eine aktuelle Einschätzung der Resistenzlage zu erhalten und damit eine weitere Entwicklung der antimikrobiellen Resistenzen zu verhindern.

Für *H. parasuis* liegt bisher noch keine standardisierte Methode zur Empfindlichkeitstestung vor. Der Erreger ist aufgrund der besonderen Nährstoffansprüche schwer kultivierbar und zeigt in den Medien der standardisierten Methoden kein ausreichendes Wachstum aller Isolate. Mit der Entwicklung einer neuen Methode für *H. parasuis*, in einem für die Routinediagnostik einfach zu verwendenden Medium, scheint eine Methode gefunden, mit der auch anspruchsvolle *H.-parasuis*-Isolate getestet werden können. Mit dieser Methode konnten Empfindlichkeitsdaten von Isolat aus Deutschland erhoben werden. Da der Erreger zu Erkrankungen führt, die zu hohen ökonomischen Verlusten in Schweinebetrieben führt, ist eine Einschätzung der Resistenzlage besonders relevant. Eine weitere Validierung und Standardisierung der Methode muss aber noch durchgeführt werden.

Teilprojekt 2:

Für *R. equi* konnte ein standardisiertes Verfahren zur Empfindlichkeitstestung entwickelt werden, das in das Dokument VET06 des CLSI aufgenommen und damit weltweit zur Verfügung stehen wird. Bei Verwendung von CAMHB mit 2 % lys. Pb konnten nach 24 Stunden sowohl in Vorversuchen als auch in einer deutschlandweiten Laborvergleichsuntersuchung homogene MHK-Werte erhoben werden. Probleme bei der Durchführung der erarbeiteten Methode traten nicht auf. Bei der Testung der Stammsammlung von 200 Isolat wurden nur für wenige Isolate erhöhte MHK-Werte festgestellt; eine MHK-Verteilung für die Normalpopulation aktueller Isolat aus Deutschland und den USA konnte ermittelt werden. Die beobachteten erhöhten Werte gegenüber Rifampicin konnten mit einer Ausnahme bei den sechs betroffenen Isolat auf Mutationen im *rpoB*-Gen (β -Untereinheit der RNA-abhängigen Polymerase) zurückgeführt werden; das Vorliegen mindestens eines weiteren Resistenzmechanismus erscheint nach den vorliegenden Daten wahrscheinlich.

Die vergleichende Empfindlichkeitstestung von *A. butzleri* in verschiedenen Medien lieferte die homogensten Ergebnisse bei Verwendung von CAMHB mit Zusatz von 5 % FKS nach 24

Stunden Inkubation bei 35 ± 2 °C aerob; die einzusetzende Bakterienmenge konnte an die CLSI-Vorgaben angepasst werden. Die erarbeitete Methode wurde vom VAST-Unterausschuss anerkannt und wird in das Dokument VET06 des CLSI aufgenommen werden. Eine allgemein einsetzbare Methode zur Empfindlichkeitstestung dieser Spezies steht somit zur Verfügung. Bei der Testung der Stammsammlung wies nur ein einziges Isolat eine verminderte Empfindlichkeit gegenüber den therapeutisch relevanten Gruppen der Aminoglycoside und Tetrazykline auf. MHK-Werte der Normalpopulation von *A.-butzleri*-Isolaten aus Deutschland stehen durch die vorliegende Arbeit für Vergleichszwecke zur Verfügung.

Das zuvor erarbeitete Protokoll zur Empfindlichkeitstestung von *T. pyogenes* wurde im Verlauf des Projektes vom VAST-Unterausschuss des CLSI anerkannt und konnte sowohl in unserem Labor als auch in einer Laborvergleichsuntersuchung als für die Routinediagnostik problemlos anwendbar bestätigt werden. Die Testung der Stammsammlung zeigte, dass *T. pyogenes* nach wie vor eine sehr gute Empfindlichkeit gegenüber Betalaktamantibiotika aufweist, dass jedoch viele Isolate gegenüber anderen Wirkstoffklassen (zum Beispiel Tetrazyklinen, Makroliden, Fluorchinolonen) erhöhte MHK-Werte entwickelt haben.

Teilprojekt 3:

Für den Erreger *R. anatipestifer* konnte die Empfindlichkeitstestung für anspruchsvolle Bakterien nach CLSI-Standard VET01-A4 angewendet werden. Die Verwendung von CAMHB mit 2 % lys. Pb lieferte eine konstant gute Ablesbarkeit der Empfindlichkeitsergebnisse in den Mikrotiterplatten bei einer Inkubationstemperatur von 35-37 °C über 24 Stunden. *R. anatipestifer* hat große wirtschaftliche Bedeutung beim Nutzgeflügel, insbesondere bei Enten und Gänsen. Aber auch in Puten- und Hühnerbeständen wurde der Erreger bereits häufig als Krankheitsursache mit schweren ökonomischen Verlusten diagnostiziert. Die Erhebung von Empfindlichkeitsdaten durch die entwickelte Methode legt damit den Grundstein zur Entstehung bzw. Vermeidung der Ausbreitung weiterer Resistenzen.

O. rhinotracheale ist der Erreger einer infektiösen Atemwegserkrankung bei Hühnervögeln und ist hoch ansteckend für Hühner und Puten. *O. rhinotracheale* ist schwer kultivierbar und besitzt besondere Nährstoffansprüche. In den Medien der standardisierten Methoden zeigte der Erreger nur unzureichendes Wachstum. Bei Testungen mit einem erhöhten Inokulationsvolumen ergaben sich in der Bouillon Mikrodilution deutlich besser ablesbare Ergebnisse. Entsprechende Mikrotiterplatten für ein Inokulationsvolumen von 100 µl mussten hergestellt werden.

Alternativ wurde die Agardilution für *O. rhinotracheale* etabliert. Mit Hilfe dieser Methode konnten auch für anspruchsvolle *O.-rhinotracheale*-Isolate stabile MHK-Werte ermittelt

werden. Der Zeit- und Arbeitsaufwand ist sehr hoch und die Anzahl der zu prüfenden Wirkstoffe kann bedingt durch den hohen Aufwand nur begrenzt sein.

4. Zusammenfassung

Während des Projektzeitraumes konnten für alle Teilprojekte die meisten Arbeitspakete vollständig abgeschlossen werden und die Etablierung einer Methode zur Empfindlichkeitstestung der Erreger im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren oder in einem alternativen Verfahren erreicht werden.

Die prinzipielle Vorgehensweise war dabei wie folgt: Nach Auswahl geeigneter Testmedien anhand der Literatur und der Akquise von Isolaten, wurde zunächst die Spezieszuordnung der Isolate bestätigt. Anschließend wurden für alle Erreger (mit Ausnahme von *T. pyogenes*) Wachstumskurven erstellt, um die Eignung der ausgewählten Medien zu überprüfen. Die Eignung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode zur Empfindlichkeitsprüfung der Erreger wurde dann anhand einer geringen Anzahl aktueller Feldisolate unter Verwendung eines als geeignet erscheinenden Mediums (ggf. mit Zugabe von Supplementen) getestet, wobei in den CLSI-Standards definierte Qualitätskontrollstämme zur Überprüfung eingesetzt wurden. Die Erarbeitung neuer QC-Kriterien für die Qualitätskontrollstämme stellte sich als nicht notwendig dar. Die Ergebnisse der Empfindlichkeitstestungen wurden in mehreren Wiederholungen geprüft und statistisch ausgewertet. Weiterhin erfolgte eine Testung einer größeren Anzahl an Isolaten mit den erarbeiteten Methoden. Durch die Durchführung von Ringversuchen konnten diese Methoden für *B. bronchiseptica*, *R. equi* und *T. pyogenes* bereits auf Reproduzierbarkeit und Durchführbarkeit in der Routinediagnostik überprüft werden. Für einige der untersuchten Erreger wurden die Ergebnisse bereits publiziert sowie beim VAST-Unterausschuss des CLSI vorgestellt und von diesem anerkannt. Die Eignung der Methoden zur Empfindlichkeitstestung für die Erreger *H. parasuis*, *Arcobacter* spp. und *R. anapestifer* soll durch einen Ringversuch in Zusammenarbeit mit dem BVL, Berlin, im November 2015 bestätigt werden. Damit kann das Arbeitspaket 6 für diese Erreger ebenfalls abgeschlossen werden. Zudem sind eine Präsentation der Methoden bei VAST-CLSI (sofern noch nicht geschehen) und die Publikationen der Ergebnisse im Anschluss an den Ringversuch geplant. Stellte sich die Bouillon-Mikrodilution als nicht geeignet für einen Erreger dar (*O. rhinotracheale*, anfänglich auch *H. parasuis*), so wurden alternative Verfahren für die Empfindlichkeitsbestimmung geprüft. Die Dissertationen aller in den Teilprojekten eingestellten Doktorandinnen befinden sich im Abschluss. In dem Projektzeitraum konnten somit die Ziele der Teilprojekte in fast allen Arbeitspaketen erreicht werden.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen

Teilprojekt 1:

Die Arbeitspakete 1 – 8 inklusive des geplanten Meilensteins konnten im Berichtszeitraum für den Erreger *B. bronchiseptica* abgeschlossen werden. Das erarbeitete Testverfahren für *B. bronchiseptica* wurde zudem veröffentlicht (siehe Publikationsverzeichnis) und der CLSI zur Begutachtung vorgelegt. Durch die schwierige und langwierige Entwicklung einer Methode für diesen äußerst anspruchsvollen Erreger konnten nur die Arbeitspakete 1 – 5 für *H. parasuis* im Berichtszeitraum abgeschlossen werden. Durch die Entwicklung eines komplett neuen und sehr vielversprechenden Mediums für die Bouillon-Mikrodilutionsmethode für *H. parasuis* wurde das Arbeitspaket 5 in diesem Medium wiederholt. Die Methode soll in einem Ringversuch in Zusammenarbeit mit dem BVL validiert werden. Die Planung des Ringversuches und somit des Arbeitspaketes 6 hat bereits begonnen. Im Anschluss daran soll die Methode publiziert und nach weiterer Validierung, da es sich um ein komplett neues Medium für *H. parasuis* handelt, der CLSI vorgelegt werden.

Teilprojekt 2:

Im Berichtszeitraum wurden die Arbeiten zu dem Erreger *R. equi* in allen Arbeitspaketen wie vorgesehen abgeschlossen. Die Arbeiten sind erfolgreich verlaufen und es wurden Publikationen (s. Literaturverzeichnis) zu den Ergebnissen angefertigt. Die angewendete Methode wurde vom VAST-Unterausschuss des CLSI anerkannt und wird in das Dokument VET06 des CLSI aufgenommen werden.

Die Arbeiten zu *Arcobacter* spp. wurden im Berichtszeitraum fast vollständig abgeschlossen. Eine Methode zur Empfindlichkeitstestung wurde erfolgreich etabliert, deren Eignung muss jedoch noch in dem für Oktober/November 2015 vorgesehenen Ringversuch in Zusammenarbeit mit dem BVL bestätigt werden. Die erarbeitete Methode wurde vom VAST-Unterausschuss des CLSI angenommen und wird ebenfalls in das zukünftige Dokument VET06 aufgenommen werden. Die angestrebte Zahl von 50-100 aktuellen Isolaten konnte erreicht werden; die Testung der vorhandenen Isolate wurde erfolgreich durchgeführt. Eine Publikation der Ergebnisse ist in Vorbereitung.

Für den Erreger *T. pyogenes* konnten ebenfalls alle vorgesehenen Arbeitspakete im Projektrahmen abgeschlossen werden. Die verwendete Methode zur Empfindlichkeitstestung von *T. pyogenes* mittels Bouillonmikrodilution wurde vom VAST-Unterausschuss des CLSI anerkannt und in das Dokument VET06 aufgenommen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeiten wurde die Methode als geeignet bestätigt und im Ringversuch auf ihre Eignung

überprüft. Die Testung einer umfangreichen Sammlung aktueller Isolate wurde durchgeführt. Die Publikation der Ergebnisse ist in Vorbereitung.

Teilprojekt 3:

Die Arbeitspakete 1 – 5 zu *R. anatipestifer* wurden vollständig abgeschlossen. Eine Empfindlichkeitstestung in der Mikrodilution konnte etabliert und an *R.-anatipestifer*-Feldisolaten getestet werden. Ein geplanter Ringversuch im Oktober/November 2015 soll zur weiteren Validierung der Methode beitragen.

Für *O. rhinotracheale* sind die Arbeitspakete 1 - 5 vollständig abgeschlossen. Da die Bouillon-Mikrodilution mit den aktuell verfügbaren Mikrotiterplatten keine zufriedenstellenden Ergebnisse bei der Testung von *O.-rhinotracheale*-Referenzstamm DSM 15997 und einem Großteil der Feldisolate lieferte, wurde auf die Agardilution als Alternativmethode ausgewichen. Mittels Agardilution konnten bei dem Referenzstamm DSM 15997, sowie bei 1/3 der Feldisolate stabile MHK-Werte ermittelt werden. Auf Grund des hohen Zeit- und Arbeitsaufwandes wurde von einer Laborvergleichsuntersuchung abgesehen. Eine Veröffentlichung der Ergebnisse zu beiden Erregerspezies ist bis Ende 2015 in einer Dissertation vorgesehen.

6. Literaturverzeichnis

6.1. Publikationen und Präsentationen aus den Projekten

Publikationen

1. PRÜLLER, S., FRÖMKE, C., KASPAR, H., KLEIN, G., KREIENBROCK, L. and KEHRENBERG, C. (2015). Recommendation for a Standardised Method of Broth Microdilution Susceptibility Testing for porcine *Bordetella bronchiseptica*. PLoS One. DOI: 10.1371/journal.pone.0123883
2. PRÜLLER, S., RENSCH, U., MEEMKEN, D., KASPAR, H., KOPP, P.A. KLEIN, G. and KEHRENBERG, C. (2015). Broth Microdilution Susceptibility Testing and identification of antibiotic resistance genes of *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs and companion animals. PLoS One. DOI: 10.1371/journal.pone.0135703.
3. RIESENBERG A., FEßLER A.T., FRÖMKE C., KADLEC K., KLARMANN D., KREIENBROCK L., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Harmonization of antimicrobial susceptibility testing by broth microdilution for *Rhodococcus equi* of animal origin. J Antimicrob Chemother 68, 2173-2175.

4. RIESENBERG A., FEßLER A.T., EROL E., PRENGER-BERNINGHOFF E., STAMM I., BÖSE R., HEUSINGER A., KLARMANN D., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2014). MICs of 32 antimicrobial agents for *Rhodococcus equi* isolates of animal origin. J Antimicrob Chemother 69, 1045-1049.

Vorträge:

1. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (Nov 2012). Erarbeitung einer Testmethode für *Bordetella bronchiseptica*. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 05.11.2012.
2. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2013). Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica*. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 25.03.2013.
3. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2013). Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica*. Wahlpflichtveranstaltung im Institut für Lebensmittelqualität und –sicherheit, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover am 27.11.2013.
4. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2013). Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica* und *Haemophilus parasuis*. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 14.10.2013.
5. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2014). Erarbeitung einer Methode zur Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis*. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 10.03.2014.
6. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2014). Ringversuch *Bordetella bronchiseptica* und Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis*. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 17.11.2014.
7. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2015). Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis*. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 16.03.2015.
8. PRÜLLER, S., TURNI, C., BLACKALL, P.J., STRUTZBERG-MINDER, K., KASPAR, H., MEEMKEN, D., KLEIN, G. und KEHRENBURG, C. (2015). Standardisierung der Antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Haemophilus parasuis*. 34. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe „AVID“, 09.-11.09.2015, Bad Staffelstein, Kloster Banz.
9. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2012). Development of guidelines for the susceptibility testing of veterinary pathogens. Junior Scientist Symposium, Friedrich-Loeffler-Institut, Vilm.

10. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2012). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. Sitzung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 05.11.2012.
11. RIESENBERG A., FEßLER A.T., FRÖMKE C., KADLEC K., KLARMANN D., KREIENBROCK L., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Empfehlung für die Empfindlichkeitsprüfung von *Rhodococcus equi*-Isolaten tierischer Herkunft mittels Bouillon-Mikrodilution. Institutsrat des Instituts für Nutztiergenetik, Neustadt-Mariensee, 15.03.2013
12. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. Sitzung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 25.03.2013.
13. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. Sitzung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 14.10.2013.
14. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Arcobacter* spp. und *Trueperella pyogenes*. Fachgespräche des Lebensmittel- und Veterinärinstituts Oldenburg des LAVES Niedersachsen, 10.12.2013.
15. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2014). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. Sitzung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 10.03.2014.
16. RIESENBERG A, FEßLER AT, EROL E, PRENGER-BERNINGHOFF E, STAMM I, BÖSE R, HEUSINGER A, KLARMANN D, WERCKENTHIN C, SCHWARZ S (2014). Susceptibility of 200 *Rhodococcus equi* isolates from North America and Europe to 32 antimicrobial agents. Seventh Conferences on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine (AAVM), Berlin, 16.-19.09.2014.
17. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2014). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 17.11.2014.

18. RIESENBERG A., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2015). Erarbeitung eines standardisierten Verfahrens zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. Sitzung des DVG Arbeitskreises Antibiotikaresistenz am 16.03.2015.
19. RIESENBERG A., WERCKENTHIN C., FEßLER A.T., FRÖMKE C., KASPAR H., KREIENBROCK L., SCHWARZ S. (2015). Erarbeitung standardisierter Verfahren zur Empfindlichkeitsbestimmung von *Rhodococcus equi*, *Trueperella pyogenes* und *Arcobacter* spp. 34. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe „AVID“ 09.-11.11.2015, Bad Staffelstein, Kloster Banz.
20. GASCHE, S., HAUCK, R., Hafez, H. M. (Nov 2012). Untersuchung von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009 – 2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz am 05.11.2012.
21. GASCHE, S., HAUCK, R., KASPAR, H., MANKERTZ, J., HAFEZ, H. M. (April 2013) Untersuchung von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009 – 2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz am 25.03.2013.
22. GASCHE, S., HAUCK, R., KASPAR, H., WALLMANN, J., MANKERTZ, J., HAFEZ, H. M. (Okt. 2013) Untersuchung von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009 – 2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz am 14.10.2013.
23. GASCHE, S., HAUCK, R., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H. M. (März 2014) Untersuchung von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009 – 2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz am 10.03.2014.
24. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H. M. (Mai 2014) Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009-2012) von *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale* beim Nutzgeflügel. Arbeitstreffen der Länderlabore; GERM VET-Monitoring im Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin
25. GASCHE, S., HAUCK, R., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H. M. (Nov. 2014) Untersuchung von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009 – 2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz am 17.11.2014.

26. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H. M. (März 2015) Untersuchung des Resistenzverhaltens von *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz am 16.03.2015.
27. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H. M. (2015) Resistenzverhalten von *R. anatipestifer*- und *O. rhinotracheale*-Isolaten beim Nutzgeflügel. 34. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe „AVID“ 09.-11.11.2015, Bad Staffelstein, Kloster Banz.

Poster:

1. PRÜLLER, S., KLEIN, G., KRISCHEK, C., MEEMKEN, D., BLAHA, T., KOPP, P.A., KASPAR, H., KEHRENBURG, C. (2013). Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica*. 54. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen.
2. PRÜLLER, S., FRÖMKE, C., KLEIN, G., KREIENBROCK, L., MEEMKEN, D., BLAHA, T., KOPP, P., KASPAR, H., KEHRENBURG, C. (2013). Standardisierung der Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica*, einem bedeutenden Erreger in der Schweine-Primärproduktion. Symposium "Antibiotika Resistenzen in der Lebensmittelkette" des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR), Berlin.
3. PRÜLLER, S., KLEIN, G., MEEMKEN, D., BLAHA, T., KOPP, P.A., KASPAR, H., KEHRENBURG, C. (2014). Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica*-Isolaten von Schweinen und Liebhabertieren aus den Jahren 2010 – 2012 sowie Identifizierung von Resistenzgenen. 55. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen.
4. PRÜLLER, S., FRÖMKE, C., KLEIN, G., KREIENBROCK, L., KEHRENBURG, C. (2014). Recommendation for a Standardised Method of Broth Microdilution Susceptibility Testing for porcine *Bordetella bronchiseptica*. 3rd European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD) Congress, Pisa, Italy.
5. PRÜLLER, S., FRÖMKE, C., KASPAR, H., KLEIN, G., KREIENBROCK, L., KEHRENBURG, C. (2015). *Bordetella bronchiseptica*: Proposal for a Modification of the Broth Microdilution Susceptibility Testing Method. First International Symposium on Veterinary Medicine (ISVM 2015) Vrdnik, Serbia.

6. PRÜLLER, S., TURNI, C., BLACKALL, P.J., STRUTZBERG-MINDER, K., KASPAR, H., MEEMKEN, D., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2015). Comparison of Agardilution and Broth Microdilution Susceptibility Testing of 48 *Haemophilus parasuis* Isolates from Germany. „One Health – New Challenges“, First International Symposium on Veterinary Medicine (ISVM2015); Novi Sad, Serbia.
7. PRÜLLER, S., FRÖMKE, C., KASPAR, H., KLEIN, G., KREIENBROCK, L. und KEHRENBURG, C. (2015). *Bordetella bronchiseptica*: Vorschlag für eine Modifikation der Empfindlichkeitstestung im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren. 34. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe „AVID“, Kloster Banz.
8. PRÜLLER, S., TURNI, C., BLACKALL, P.J., STRUTZBERG-MINDER, K., KASPAR, H., MEEMKEN, D., KLEIN, G., KEHRENBURG, C. (2015). Vergleich der Agardilution und Bouillon Mikrodilution Empfindlichkeitstestung von 48 *Haemophilus parasuis* Isolaten aus Deutschland. 56. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Garmisch-Partenkirchen.
9. RIESENBERG A., FEßLER A.T., KADLEC K., KLARMANN D., SCHWARZ S., WERCKENTHIN C. (2013). Revised recommendation for susceptibility testing of *Rhodococcus equi*. 16. Internationales Symposium der "World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians", Berlin.
10. RIESENBERG A., FEßLER A.T., FRÖMKE C., KADLEC K., KLARMANN D., KREIENBROCK L., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Revised recommendation for broth microdilution susceptibility testing of *Rhodococcus equi* from animals. 5th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Ghent, Belgien.
11. RIESENBERG A., FEßLER A.T., FRÖMKE C., KADLEC K., KLARMANN D., KREIENBROCK L., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2013). Revised recommendation for broth microdilution susceptibility testing of *Rhodococcus equi* from animals. Junior Scientist Symposium, Friedrich-Loeffler-Institut, Jena.
12. RIESENBERG A., FEßLER A.T., FRÖMKE C., KADLEC K., KLARMANN D., KREIENBROCK L., SCHWARZ S., WERCKENTHIN C. (2014): Development of a new protocol for antimicrobial susceptibility testing of *Rhodococcus equi* by broth microdilution. Tagung der DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie", Freising.
13. RIESENBERG A., FEßLER A.T., EROL E., PRENGER-BERNINGHOFF E., STAMM I., BÖSE R., HEUSINGER A., KLARMANN D., SCHWARZ S., WERCKENTHIN C. (2014). Minimum Inhibitory Concentrations of 200 *Rhodococcus equi* Isolates to 32 Antimicrobial Agents. Tagung der DVG-Fachgruppe "Bakteriologie und Mykologie", Freising.

14. RIESENBERG A., KASPAR H., FEßLER A.T., WERCKENTHIN C., SCHWARZ S. (2015). Susceptibility testing of *Rhodococcus equi*: an interlaboratory test. 6th Symposium on Antimicrobial Resistance in Animals and the Environment, Tours, Frankreich.

6.2 Verwendete Literatur (Wissenschaftlicher und technischer Stand, eigene Vorarbeiten - DVG-Arbeitskreis und Material und Methoden)

1. DEROSA DC, VEENHUIZEN MF, BADE DJ, SHRYOCK TR. In vitro susceptibility of porcine respiratory pathogens to tilmicosin. J Vet Diagn Invest. 2000; 12:541-546.
2. KADLEC K, KEHRENBURG C, WALLMANN J, SCHWARZ S. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from porcine respiratory tract infections. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48:4903-4906.
3. AARESTRUP FM, SEYFARTH AM, ANGEN O. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. Vet Microbiol. 2004; 101:143-146.
4. DE LA FUENTE AJ, TUCKER AW, NAVAS J, BLANCO M, MORRIS SJ, GUTIERREZ-MARTIN CB. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain. Vet Microbiol. 2007; 120:184-191.
5. CARLSON K, KUSKIE KR, CHAFFIN KM, LIBAL MC, GIGUÈRE S, LAWHON SD, COHEN ND. Antimicrobial activity of tulathromycin and 14 other antimicrobials against virulent *Rhodococcus equi* in vitro. Vet Ther. 2010; 11:E1-9.
6. FEY K & SCHMID P. Susceptibility of bacterial isolates from the equine respiratory tract to trimethoprim, sulfadoxine, sulfadimethoxine and combinations of these compounds. Tierarztl Prax. 1995; 23:148-154.
7. FERA MT, MAUGERI TL, GIANNONE M, GUGLIANDOLO C, LA CAMERA E, BLANDINO G, CARBONE M. In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* to different antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents. 2003; 21:488-491.
8. HOUF K, DEVRIESE LA, HAESEBROUCK F, VANDENBERG O, BUTZLER JP, VAN HOOFF J, VANDAMME P. Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. Microb Drug Resist. 2004; 10:243-7.
9. TRINH HT, BILLINGTON SJ, FIELD AC, SONGER JG, JOST BH. Susceptibility of *Arcobacterium pyogenes* from different sources to tetracycline, macrolide and lincosamide antimicrobial agents. Vet Microbiol. 2002; 85: 353-359.

10. YOSHIMURA H, KOJIMA A, ISHIMARU M. Antimicrobial susceptibility of *Arcanobacterium pyogenes* isolated from cattle and pigs. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2000; 47:139-143.
11. CHANG CF, LIN WH, YEY TM, CHIANG TS, CHANG YF. Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and the efficacy of ceftiofur treatment. *J Vet Diagn Invest*. 2003; 15:26-9.
12. ZHONG CY, CHENG AC, WANG MS, ZHU DE K, LUO QH, ZHONG CD, LI L, DUAN Z. Antibiotic susceptibility of *Riemerella anatipestifer* field isolates. *Avian Dis*. 2009; 53:601-607.
13. MARIEN M, DECOSTERE A, NAUWYNCK H, FROYMAN R, DEVRIESE L, HAESBROUCK F. In vivo selection of reduced enrofloxacin susceptibility in *Ornithobacterium rhinotracheale* and its resistance-related mutations in *gyrA*. *Microb Drug Resist*. 2006; 12:140-144.
14. SORIANO VE, VERA NA, SALADO CR, FERNÁNDEZ RP, BLACKALL PJ. In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Dis*. 2003; 47:476-480.
15. SCHWARZ S, BÖTTNER A, HAFEZ HM, KEHRENBURG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, LUHOFFER G, RICHTER A, TRAEDE W, WALDMANN KH, WALLMANN J, WERCKENTHIN C. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: methods for in-vitro susceptibility testing and their suitability with regard to the generation of the most useful data for therapeutic applications. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2003; 116:353-361.
16. KIETZMANN M, BÖTTNER A, HAFEZ HM, KEHRENBURG C, KLARMANN D, KRABISCH P, KÜHN T, LUHOFFER G, RICHTER A, SCHWARZ S, TRAEDE W, WALDMANN KH, WALLMANN J, WERCKENTHIN C. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: considerations concerning the predefinition of breakpoints from the clinical pharmacological viewpoint. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2004; 117:81-87.
17. WERCKENTHIN C, BÖTTNER A, HAFEZ HM, HARTMANN K, KASKE M, KEHRENBURG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, LUHOFFER G, RICHTER A, SCHULZ B, SCHWARZ S, SIGGE C, TRAEDE W, WALDMANN KH, WALLMANN J. Cross-resistance between antimicrobial agents used in veterinary medicine: molecular background and practical consequences for susceptibility testing. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2005; 118:471-480.

18. WALLMANN J, BÖTTNER A, GOOSSENS L, HAFEZ HM, HARTMANN K, KASPAR H, KEHREBERG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, LUHOFER G, RICHTER A, SCHULZ B, SCHWARZ S, SIGGE C, TRAEEDER W, WALDMANN KH, WERCKENTHIN C; for the Working Group Antimicrobial Resistance of the German Veterinary Society, Zschiesche E. Results of an interlaboratory test on antimicrobial susceptibility testing of bacteria from animals by broth microdilution. *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27:482-490.
19. WALLMANN J, BÖTTNER A, HAFEZ HM, KEHREBERG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, LUHOFER G, RICHTER A, SCHWARZ S, SIGGE C, TRAEEDER W, WALDMANN KH, WERCKENTHIN C, ZSCHIESCHE E. Results from a German interlaboratory test to establish the broth microdilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of bacteria from animals. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2005; 118:205-213.
20. RICHTER A, BÖTTNER A, GOOSSENS L, HAFEZ HM, HARTMANN K, KASKE M, KEHREBERG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, LUHOFER G, SCHULZ B, SCHWARZ S, SIGGE C, WALDMANN KH, WALLMANN J, WERCKENTHIN C. Mögliche Gründe für das Versagen einer antibakteriellen Therapie in der tierärztlichen Praxis. *Prakt. Tierarzt* 2006; 87:624-631.
21. LUHOFER G, BÖTTNER A, HAFEZ HM, KASKE M, KEHREBERG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, RICHTER A, SIGGE C, TRAEEDER W, WALDMANN KH, WALLMANN J, WERCKENTHIN C, SCHWARZ S. Proposals of the working group "Antibiotic resistance" for the configuration of microtitre plates to be used in routine antimicrobial susceptibility testing of bacterial pathogens from infections of large food-producing animals and mastitis cases. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2004; 117:245-251.
22. WERCKENTHIN C, LUHOFER G, BÖTTNER A, GANGL A, GOOSSENS L, HAFEZ HM, HARTMANN K, KASKE M, KEHREBERG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, KÜHN T, RICHTER A, SCHULZ B, SCHWARZ S, SIGGE C, TRAEEDER W, WALDMANN KH, JÜRGEN W. Layout proposal for a microtitre plate to be used in routine antimicrobial susceptibility testing of bacteria from infections of dogs and cats. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr*. 2008; 121:19-26.
23. SCHWARZ S, BÖTTNER A, GOOSSENS L, HAFEZ HM, HARTMANN K, KASKE M, KEHREBERG C, KIETZMANN M, KLARMANN D, KLEIN G, KRABISCH P, LUHOFER G, RICHTER A, SCHULZ B, SIGGE C, WALDMANN KH, WALLMANN J, WERCKENTHIN C. A proposal of clinical breakpoints for amoxicillin applicable to porcine respiratory tract pathogens. *Vet Microbiol*. 2008; 126:178-188.

24. HOZBOR D, FOUQUE F, GUIZO N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. Res Microbiol. 1999; 150:333-341.
25. OLIVEIRA S, GALINA L, PIJOAN C. Development of a PCR Test to Diagnose *Haemophilus parasuis* Infections. J Vet Diagn Invest. 2001; 13:495-501.
26. LADRÓN N, FERNÁNDEZ M, AGÜERO J, GONZÁLEZ ZÖRN B, VÁZQUEZ-BOLAND JA, NAVAS J. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. J Clin Microbiol. 2003; 41:3241-3245.
27. DOUIDAH L, DE ZUTTER L, VANDAMME P, HOUF K. Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. J Microbiol Methods. 2010; 80:281-6.
28. TSAI H, LIU Y., TSENG C, PAN M, Genetic variation of the ompA and 16S rRNA genes of *Riemerella anatipestifer*. Avian Pathology 2005; 34:55-64.
29. VAN EMPEL P, 1998. *Ornithobacterium rhinotracheale*.

6.3 Verwendete CLSI Standards

1. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard – Third edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
2. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard – Fourth edition VET01-A4. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
3. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Second Informational Supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
4. CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 3rd ed. CLSI supplement VET01S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

Anlagen

Anlage zu Kapitel 3.1.5 a: *Bordetella bronchiseptica*

103 Isolate (Schwein)

Antimikrobieller Wirkstoff	Anzahl Isolate mit dem angegebenen MHK-Wert [mg/l]																		MHK ₅₀	MHK ₉₀
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024		
Ampicillin								2	16	30	47	2	3	3*					16	16
Amoxicillin/Clavulansäure 2:1							1	3	49	47	3								2	4
Ceftiofur												5	20	49	29*				64	≥ 64
Cefquinom									4	2	40	46	11					16	32	
Cefoperazon							2	3	38	51	5	4						4	4	
Cefotaxim											2	3	39	59*				≥ 64	≥ 64	
Chloramphenicol								2	21	55	10	15						4	16	
Ciprofloxacin				2	1	11	78	11										0,5	1	
Colistin				1	20	82												0,25	0,25	
Doxycycline				19*	66	3	5	3			6	1						0,12	0,5	
Enrofloxacin			1	1	4	32	61	3	1									0,5	0,5	
Florfenicol						1	2	32	46	21	1							2	4	
Gentamicin								7	95	1								2	2	
Imipenem						61	42											0,25	0,5	
Marbofloxacin				2	5	59	34	3										0,25	0,5	
Nalidixinsäure								2	3	3	90	2	3					8	8	
Neomycin									9	91					3*			4	4	
Penicillin												1	20	82*				≥ 64	≥ 64	
Spiramycin											2	5	4	45	44	3*		64	128	
Streptomycin													4	48	35		16*	64	≥ 512	
Tiamulin										1		4	4	17	77*			128	128	
Tetrazyklin					2*	43	42	3	5				1	1	6			0,5	2	
Tilmicosin									2	2	6	44	47			2*		16	32	
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19)		7*	18	10	3	3	1	11	30	12	3	2		3*				1	4	

*MHK-Werte größer oder gleich der höchsten Testkonzentration; ^aMHK-Werte von Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) als MHK-Werte von Amoxicillin dargestellt; ^bMHK-Werte von Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19) als MHK-Werte von Trimethoprim dargestellt. Die grau hinterlegten Zellen kennzeichnen die nicht getesteten Bereiche.

Anlage zu Kapitel 3.1.5 b: *Bordetella bronchiseptica*

43 Isolate (Begleitiere)

Antimikrobieller Wirkstoff	Anzahl Isolate mit dem angegebenen MHK-Wert [mg/l]																			MHK ₅₀	MHK ₉₀
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024			
Ampicillin									1	2	20	18	1	1						8	16
Amoxicillin/Clavulansäure (2:1)								2	22	18			1							2	4
Ceftiofur													5	30	8*					64	≥ 64
Cefquinom											13	30								16	16
Cefoperazon								3	9	29	1	1								4	4
Cefotaxim												1	4	38*						≥ 64	≥ 64
Chloramphenicol								1	12	24	5	1								4	8
Ciprofloxacin						4	36	3												0,5	0,5
Colistin				1	6	33	3													0,25	0,25
Doxyzyklin				15*	15	9	3		1											0,12	0,25
Enrofloxacin					2	23	18													0,25	0,5
Florfenicol							1	16	11	12	2	1								2	4
Gentamicin								1	40	2										2	2
Imipenem						23	20													0,25	0,5
Marbofloxacin					3	31	9													0,25	0,5
Nalidixinsäure										18	23	2								8	8
Neomycin									4	38						1*				4	4
Penicillin												1	3	39*						≥ 64	≥ 64
Spiramycin												2	1	21	18	1*				64	128
Streptomycin														24	18			1*		64	128
Tiamulin														27	16*					64	128
Tetrazyklin					1*	14	22	4	1					1						0,5	0,5
Tilmicosin											3	12	24	3		1*				32	32
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19)		4*	9	15	1		1	6	6	1										0,06	2

*MHK-Werte größer oder gleich der höchsten Testkonzentration; ^aMHK-Werte von Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) als MHK-Werte von Amoxicillin dargestellt; ^bMHK-Werte von Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19) als MHK-Werte von Trimethoprim dargestellt. Die grau hinterlegten Zellen kennzeichnen die nicht getesteten Bereiche.

Anlage zu Kapitel 3.1.17: *Haemophilus parasuis*

47 Isolate in CAMHB+ -Medium

Antimikrobieller Wirkstoff	Anzahl Isolate mit dem angegebenen MHK-Wert [mg/l]																MHK ₅₀	MHK ₉₀		
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			512	1024
Ampicillin			17*	10	11	7	1						1						0,06	0,25
Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) ^a			7*	19	15	5	1												0,06	0,25
Ceftiofur			46*	1															0,03	0,03
Cefquinom		38*	4	4	1														0,015	0,06
Cefoperazon				47*															0,06	0,06
Cefotaxim		45*	1	1															0,03	0,03
Ciprofloxacin	39*	2	5							1									0,008	0,03
Colistin			6*	25	12	4													0,06	0,12
Doxyzyklin				2*	9	25	7	1	1		2								0,25	0,5
Enrofloxacin	31*	9	3	3							1								0,008	0,03
Florfenicol					9*	25	13												0,25	0,5
Gentamicin					3*	2	4	24	14										1	2
Imipenem		4*	11	21	11														0,06	0,12
Nalidixinsäure					2	1	8	27	1	1	1	4	1	1					1	16
Neomycin				1	1		2	4	13	21	5								4	8
Penicillin		12*	8	7	4	13	2							1*					0,06	0,25
Streptomycin						1*		2	2	1	10	20	6	1		1	3		16	64
Tiamulin			1*	1		1	3	5	14	17	5								2	8
Tetrazyklin					3*	6	29	3		1	2	2	1						0,5	8
Tilmicosin				3*	1	4	12	14	12						1				1	2
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19) ^b		8*	4	2	6	7	9	5	1	3		2							0,25	4

*MHK-Werte größer oder gleich der höchsten Testkonzentration; ^aMHK-Werte von Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) als MHK-Werte von Amoxicillin dargestellt; ^bMHK-Werte von Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19) als MHK-Werte von Trimethoprim dargestellt. Die grau hinterlegten Zellen kennzeichnen die nicht getesteten Bereiche.

Anlage zu Kapitel 3.1.22: *Rhodococcus equi*

Wirkstoff, Wirkstoffkombination	Anzahl von Isolaten mit dem angegebenen MHK-Wert [mg/L]																			MIC [mg/L]	
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	50 %	90 %
Rifampicin	4	6	28	85	70	1				1	2			1	1	1				0.06	0.125
Azithromycin				2	3	22	65	100	7	1										1	1
Clarithromycin	6	18	64	106	5		1													0.06	0.06
Erythromycin				3	18	48	129	1		1										0.5	0.5
Tilmicosin							2	1	5	13	11	41	126	1						32	32
Tylosin Tartrat								2	7	9	36	25	117	4						32	32
Tulathromycin											2	7	32	140	19					64	64
Spiramycin									2	12	39	36	109	2						32	32
Ampicillin				1	1	5	9	9	11	114	50									4	8
Amoxilillin/Clavulansäure (2:1)				2	1	7	6	11	12	123	38									4	8
Penicillin			1	1	4	4	12	8	30	123	17									4	4
Ceftiofur						1	3	8	16	14	128	30								8	16
Cefquinome					4	11	17	14	63	87	4									2	4
Cephalothin				1	3	8	8	7	3	7	65	94	4							16	32
Cefotaxim				3	7	11	14	18	46	95	6									8	8
Cefoperazone					2	1	2	8	11	8	91	75	2							16	32
Imipinem		9	18	37	131	5														0.125	0.125
Vancomycin				4	83	113														0.5	0.5
Florfenicol										1	23	163	13							16	16
Chloramphenicol										18	145	37								8	16
Clindamycin							2	9	25	131	33									4	8
Pirlimycin								3	36	90	71									8	16
Apramycin				12	105	81	1				1									0.25	0.5
Gentamicin				8	70	109	13													0.5	0.5
Enrofloxacin					2	73	118	6	1											1	1
Nalidixinsäure											1	1	54	143	1					128	128
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19)				3	33	116	47	1												0.25	0.5
Tetrazyklin						1	13	21	79	84	2									4	8
Doxyzyklin					13	31	148	8												1	1
Quinupristin/Dalfopristin								5	39	129	27									8	16
Tiamulin									1	14	60					125				32	32
Colistin																200				≥32	≥32

Anlage zu Kapitel 3.1.29: *Trueperella pyogenes*

Wirkstoff, Wirkstoffkombination	Anzahl von Isolaten mit dem angegebenen MHK Wert [mg/L]																	
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,13	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
Penicillin		205	1															
Ampicillin			199	7														
Amoxicillin/Clavulansäure (2:1)			175	31														
Oxacillin		24	14	34	106	27	1											
Cephalothin				182	20	4												
Cefotaxim		148	26	29	2	1												
Cefoperazon				202	4													
Ceftiofur					1	32	129	44										
Cefquinom		3	36	126	38	3												
Vancomycin						118	88											
Imipinem		194	7	5														
Ciprofloxacin						1	11	175	17	2								
Enrofloxacin						10	151	36	2	5	2							
Marbofloxacin						2	24	169	4	5	2							
Nalidixinsäure													17	45	142	2		
Erythromycin		185	8	1							1	1		10				
Clindamycin			81	109	3			3					1		9			
Tylosintartrate				195	2			1			1	1	5	1				
Tulathromycin					71	116	6	2	1		3	1		6				
Pirlimycin			11	125	56	3		1					1	1	8			
Tilmicosin				194	1	1	2	2								6		
Gentamicin						1	62	143										
Neomycin							2	15	135	54								
Streptomycin						1	7	113	12	2	4	33	17	6	3			8
Florfenicol					2	21	158	24	1									
Tetrazyklin					62	7	1	2	9	17	37	47	20	4				
Doxyzyklin				66	5	2	3	5	10	85	29	1						
Trimethoprin/Sulfamethoxazol (1:19)		47	99	45	13	1			1									
Tiamulin			186	18		2												
Colistin													206					

Anlage zu Kapitel 3.1.33: *R. anatipestifer*

Antimikrobieller Wirkstoff	Anzahl der Isolate mit MHK [mg/L] ^a :															MHK ₅₀	MHK ₉₀		
	≤0.015	≤0.03	≤0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			512	[n]
β-Lactame/Cephalosporine																			
Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) ^b	-	5	3	2	5	12	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	108	1	2
Ampicillin	-	5	4	3	4	4	18	5	13	8	18	22	3	-	-	-	108	4	32
Penicillin	5	2	2	3	5	3	22	7	11	16	24	8	-	-	-	-	108	4	16
Cefalothin	-	-	3	6	17	6	4	3	10	5	1	-	-	-	-	-	55	0,5	8
Cefoperazon	-	-	29	12	15	7	1	5	5	24	8	2	-	-	-	-	108	0,25	8
Cefotaxim	46	14	3	6	27	9	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	108	≤0,03	0,5
Cefquinom	47	9	6	4	3	3	15	17	3	1	-	-	-	-	-	-	108	≤0,03	2
Ceftiofur	-	60	27	16	1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108	≤0,03	0,12
Aminoglycoside																			
Gentamicin	-	-	-	-	-	1	1	1	8	17	19	34	24	3	-	-	108	32	64
Neomycin	-	-	-	-	-	-	-	4	3	16	20	23	34	8	-	-	108	32	64
Streptomycin	-	-	-	-	-	-	-	-	1	16	12	37	34	6	2	-	108	32	64
Carbapenem																			
Imipenem	5	10	36	15	16	23	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	108	0,12	0,5
Fenicole																			
Florfenicol	-	-	1	-	4	37	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108	1	1
Fluorchinolone																			
Enrofloxacin	25	9	1	-	-	1	6	43	19	3	-	1	-	-	-	-	108	2	4
Ciprofloxacin	27	7	1	-	-	1	6	42	20	3	1	-	-	-	-	-	108	2	4
Marbofloxacin	7	26	2	-	-	5	43	17	6	-	1	1	-	-	-	-	108	1	2
Nalidixinsäure	-	-	-	-	-	-	1	1	27	4	3	5	12	38	17	-	108	128	>128
Makrolide																			
Tilmicosin	-	-	1	10	12	3	4	9	11	5	3	7	8	1	34	-	108	8	>128
Pleuromutilin																			
Tiamulin	-	5	49	44	2	-	1	-	-	1	4	1	1	-	-	-	108	≤0,06	0,12
Polymyxyn																			
Colistin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	108	-	-	-	108	>16	>16
Tetrazykline																			
Doxycyclin	-	-	2	3	2	31	29	27	12	2	-	-	-	-	-	-	108	1	4
Chlortetrazyklin	-	-	-	-	1	1	-	7	18	1	6	12	6	1	-	-	53	4	64
Tetrazyklin	-	-	-	2	3	2	1	1	25	34	38	2	-	-	-	-	108	8	16
Sulfonamide																			
Trimethoprim/Sulfmethoxazol (1:19) ^c	-	2	8	16	18	22	9	19	13	-	1	-	-	-	-	-	108	0,5	4

^a MHK-Werte, die größer oder gleich der höchsten Testkonzentration sind, werden als eine Stufe über der letzten getesteten Stufe angegeben; ^b Die MHK-Werte von Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) werden als MHK-Werte von Amoxicillin dargestellt; ^c Die MHK-Werte von Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19) werden als MHK-Werte von Trimethoprim dargestellt. Die grau hinterlegten Zellen kennzeichnen die nicht getesteten Bereiche.