



© Institute of Microbiology and Epizootics, FU Berlin

Mikrotiterplattenlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis

Aktualisierung der Layouts des DVG-Arbeitskreises „Antibiotikaresistenz“

Andrea T. Feßler^{1*}, Alexander Böttner², Michael Fehr³, Heike Kaspar⁴, Corinna Kehrenberg⁵, Manfred Kietzmann⁶, Dieter Klarman⁷, Günter Klein⁵ (†), Thomas Peters⁸, Angelika Richter⁹, Christine Schwarz¹⁰, Claudia Sigge¹¹, Bernd Stephan¹², Karl-Heinz Waldmann¹³, Jutta Verspohl¹⁴, Jürgen Wallmann¹⁵, Christiane Werckenthin⁷, Stefan Schwarz¹⁶

Aufgrund zunehmender Antibiotikaresistenzen bei pathogenen Bakterien nimmt die Empfindlichkeitsbestimmung von Krankheitserregern einen immer höheren Stellenwert ein. Dies spiegelt sich auch in den seit dem 01.04.2014 in Kraft getretenen Änderungen des Arzneimittelgesetzes (AMG) wider, wonach u. a. die Ermächtigung gilt, dass die Erstellung von Antibio-

grammen in bestimmten Fällen verpflichtend vorgeschrieben werden kann. Empfehlungen zur bakteriologischen Diagnostik und der sachgerechten Anwendung chemotherapeutisch wirksamer Mittel geben die „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ (aktuellste Fassung von 2015) der Bundes-tierärztekammer (BTK) [1].

Die Bouillon-Mikrodilutionsmethode stellt die Methode der Wahl für bakterielle Empfindlichkeitsprüfungen dar [2]. Zur Verbesserung der Akzeptanz dieser etablierten Methode in der Routinediagnostik und zur Vereinheitlichung der Empfindlichkeitstestung in den Diagnostiklaboren hat es sich der DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ zur Aufgabe gemacht, Mikrotiter-

¹ Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI)

² MSD AH Innovation GmbH, Schwabenheim

³ Klinik für Kleintiere, Klinik für Heimtiere, Reptilien, Zier- und Wildvögel, Tierärztliche Hochschule Hannover

⁴ Abteilung 5: Referenzlaboratorien, Methodenstandardisierung, Antibiotikaresistenz, Referat 505:

Antibiotikaresistenzmonitoring, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

⁵ Zentrum für Lebensmittelwissenschaften, Institut für Lebensmittelqualität und -sicherheit, Tierärztliche Hochschule Hannover

⁶ Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie, Tierärztliche Hochschule Hannover

⁷ Lebensmittel- und Veterinärinstitut Oldenburg, Abt. 1, Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES)

⁸ Milchtierherden-Betreuungs- und Forschungsgesellschaft mbH (MBFG)

⁹ Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

plattenlayouts für die Empfindlichkeitstestung von Infektionserregern bei Kleintieren [3], Großtieren und Mastitiden [4] zu empfehlen. Diese Empfehlungen sollen dazu beitragen, dass die Mikrotiterplattenlayouts in größeren Stückzahlen angeboten und so kostengünstig in der Routinediagnostik eingesetzt werden können. Die Plattenlayouts wurden unter der Prämisse erstellt, dass nur zugelassene Wirkstoffe für die betreffenden Tierarten bzw. die betreffende Indikation enthalten sind und die Belegungen der Mikrotiterplatten maximal eine bzw. eine halbe Platte umfassen.

Seit den letzten Layoutempfehlungen des Arbeitskreises [3, 4] haben sich Änderungen ergeben im Hinblick auf die Zulassung (Neuzulassungen z. B. von Gamithromycin, Pradofloxacin und Tildipirosin) und die verfügbaren Grenzwerte (z. B. für Amoxicillin/Clavulansäure, Penicillin G = Benzylpenicillin, Pradofloxacin und Tetrazyklin). Wie nachfolgend beschrieben, wurden die Empfehlungen aller drei Layouts überarbeitet und an die entsprechenden Neuerungen angepasst. Die Änderungen sowie deren Hintergründe werden im Folgenden dargestellt.

Qualitätskontrolle und Beurteilung der Ergebnisse

Bei der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung sind Qualitätskontrollen für die Ermittlung valider Ergebnisse unerlässlich. Aus diesem Grund wurden Qualitätskontroll-(QC-)Stämme etabliert, die sich bei Empfindlichkeitstestungen als stabil erwiesen haben und für die QC-Bereiche für eine Vielzahl von Wirkstoffen ermittelt wurden.

Bei der Testung sind die jeweiligen QC-Stämme im vorgegebenen Umfang (täglich/wöchentlich) parallel zu den diagnostischen Isolaten zu testen [5]. Die mit diesen Stämmen erzielten Ergebnisse müssen innerhalb des festgelegten QC-Bereichs liegen. Befindet sich das Ergebnis außerhalb des QC-Bereichs, sind die Ergebnisse dieses Testdurchgangs nicht valide und müssen daher (ggf. nach Fehlersuche) wiederholt werden. Die QC-Bereiche gelten nur für die jeweilige Testmethode [6]; sie sind in dem entsprechenden Dokument des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) für die jeweiligen QC-Stämme und Wirkstoffe angegeben [7].

Bei der Überarbeitung der Layouts wurde darauf geachtet, Wirkstoffe zu benennen, die zum

einen für die entsprechende Tierart/Indikation zugelassen sind, und für die zum anderen entsprechende QC-Bereiche und Beurteilungskriterien (klinische Grenzwerte) vorliegen [5, 7]. Die Testbereiche sind in der Regel so gewählt, dass die QC-Bereiche für mindestens einen der beiden häufig eingesetzten QC-Stämme *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 und *Escherichia coli* ATCC® 25922 abgedeckt und beurteilbar sind [7].

Eine klinische Wirksamkeit eines antimikrobiellen Wirkstoffs wird maßgeblich von zwei Faktoren bestimmt: 1. der erreichbaren Gewebekonzentration, die in Abhängigkeit von Tierart, Zielgewebe sowie pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften des Wirkstoffs variieren kann und 2. der Empfindlichkeit des zu bekämpfenden Bakteriums gegenüber dem antimikrobiellen Wirkstoff gemessen als minimale Hemmkonzentration (MHK-Wert). Klinische Grenzwerte werden für feststehende Kombinationen aus Wirkstoff, Bakterien, Tierart und Indikation auf der Basis von mikrobiologischen Daten, Ergebnissen klinischer Studien und den vorab genannten pharmakologischen Parametern ermittelt. Unter Verwendung klinischer Grenzwerte werden bakterielle Erreger in die Kategorien sensibel, intermediär und resistent gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen eingeteilt. Für die Tiermedizin sind entsprechend erarbeitete klinische Grenzwerte in dem CLSI-Dokument VET01S 3rd Ed. gelistet [7]. Das Dokument ist seit Kurzem frei zugänglich und kann auf der Homepage des CLSI eingesehen werden (<http://vet01s.edaptivedocs.info/Login.aspx>). Da die Grenzwerte entsprechend der Datenlage kontinuierlich aktualisiert und angepasst werden, muss für die Beurteilung der Ergebnisse immer das aktuellste Dokument verwendet werden.

Kleintierlayout

Die Auswahl der Wirkstoffe einschließlich der Verwendung von Stellvertretersubstanzen (ST, stellvertretend für eine Antibiotikaklasse) und Testbereiche für das Kleintierlayout wurde an anderer Stelle bereits ausführlich dargestellt [3], weshalb hier der Fokus im Wesentlichen auf die vorgenommenen Änderungen gelegt wird (**Tab. 1**).

Die Testbereiche wurden für folgende Wirkstoffe angepasst: Amoxicillin/Clavulansäure (2:1), Ampicillin (ST für Aminopenicilline), Cefo-

vecin, Chloramphenicol, Clindamycin (ST für Lincosamide), Enrofloxacin (ST für Fluorchinolone), Erythromycin (ST für Makrolide), Gentamicin, Oxacillin, Penicillin G, Tetrazyklin (ST für Tetrazykline) und Sulfamethoxazol/Trimethoprim (ST für Sulfonamid/Diaminopyrimidin-Kombinationen). Die Anpassung erfolgte im Hinblick auf die vorhandenen QC-Bereiche der beiden gängigsten QC-Stämme und die im CLSI-Dokument VET01S 3rd Ed. [7] enthaltenen klinischen Grenzwerte. Zusätzlich wurde der Wirkstoff Cephalexin (ST für Cephalosporine der 1. Generation) in das Layout aufgenommen und ersetzt nun den Wirkstoff Cephalothin, da Cephalexin derzeit das einzige in der Kleintiermedizin zugelassene Cephalosporin der 1. Generation ist.

Bei den Wirkstoffen Amoxicillin/Clavulansäure (2:1), Ampicillin und Penicillin G wurde der Testbereich in den höheren Konzentrationsstufen eingeschränkt und zum Teil zugunsten der niedrigeren Konzentrationen verschoben. Bei Penicillin G führt dies zu der Einschränkung, dass der aus der Humanmedizin übernommene Grenzwert für *Enterococcus* spp. nicht angewendet werden kann; dem Wirkstoff kommt bei der Behandlung von Enterokokken jedoch kaum Bedeutung zu. Bei Ampicillin kann durch die Konzentrationsverschiebung bei den humanmedizinischen Grenzwerten nicht mehr zwischen intermediär und resistent differenziert werden. Der Wirkstoff Oxacillin wurde ins Layout aufgenommen, um eine Methicillinresistenz bei Staphylokokken (MRS) nachweisen zu können, bei deren Vorliegen das entsprechende Isolat als resistent gegenüber anderen β -Lactam-Antibiotika beurteilt wird. Diese Resistenz umfasst alle in der Veterinärmedizin zugelassenen β -Lactam-Antibiotika sowie die humanmedizinischen β -Lactam-Antibiotika mit Ausnahme spezieller Wirkstoffe, die zur Behandlung von MRSA entwickelt wurden. Bei Enrofloxacin wurde der Testbereich in den niedrigen Konzentrationsstufen eingeschränkt, wodurch nur noch der QC-Bereich für *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 enthalten ist.

Bei den Fluorchinolonen wurde der Wirkstoff Pradofloxacin zusätzlich zu Enrofloxacin aufgenommen. Die beiden Wirkstoffe Difloxacin und Orbifloxacin sind nicht mehr im Layout enthalten, da derzeit lediglich für Letzteres ein einziges Präparat in Deutschland zugelassen ist und die Testergebnisse von Enrofloxacin und Pradofloxacin aufgrund der gleichen Resistenzmechanismen

¹⁰ Abteilung 3: Tierarzneimittel, Referat 303: Veterinärmedizinische Beurteilung, Beurteilung der Umweltverträglichkeit, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

¹¹ Bundesverband für Tiergesundheit e. V.

¹² Bayer Animal Health GmbH

¹³ Klinik für kleine Klautiere, Tierärztliche Hochschule Hannover

¹⁴ Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

¹⁵ Abteilung 3: Tierarzneimittel; Team Antibiotika, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL)

¹⁶ Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin

* derzeitige Adresse: Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin

Tab. 1: Wirkstoffe, Testbereiche, Qualitätskontrolle und Grenzwerte für das Kleintierlayout (ganze Platte)

Wirkstoff ¹	Testbereich (mg/L)	QC-Bereich (mg/L)		Kombination Tierart, Indikation und Erreger	Grenzwerte (mg/L) ²		
		<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>E. coli</i> ATCC® 25922		S	I	R
AMC	0,06/0,03–16/8	0,12/0,06–0,5/0,25	2/1–8/4	Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 0,25/0,12	0,5/0,25	≥ 1/0,5
				Katzen Haut-/Weichteilinfektionen/ Harnwegsinfektionen <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.			
				Hunde Harnwegsinfektionen <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 8/4	–	–
AMP ³	0,12–8	0,5–2	2–8	Enterobacteriaceae	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
				Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	≤ 0,25	–	≥ 0,5
				Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>Streptococcus canis</i> (Gruppe G, β-hämolyse- rende Gruppe), <i>Streptococcus</i> spp.	≤ 0,25	–	–
				Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>Escherichia coli</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1
				Hunde Harnwegsinfektionen <i>Escherichia coli</i>	≤ 8	–	–
				Enterobacteriaceae	≤ 8	16	≥ 32
				Streptokokken (β-hämolyse- rende Gruppe)	≤ 0,25	–	–
				Streptokokken (Viridans-Gruppe)	≤ 0,25	0,5–4	≥ 8
				<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 8	–	≥ 16
CFX ⁴	0,5–16	1–8	4–16	Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>E. coli</i> , Streptokokken (β-hämolyse- rende Gruppe)	≤ 2	4	≥ 8
				Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>pseudintermedius</i>	≤ 2	–	≥ 4
CEV	0,25–4	0,5–2	0,5–2	Hunde, Katzen	≤ 2	4	≥ 8
CHL	1–16	2–16	2–8	<i>Pasteurella multocida</i>	≤ 8	16	≥ 32
				Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.			
				Streptokokken (außer <i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i>)	≤ 4	8	≥ 16
CLI ⁵	0,03–2	0,06–0,25	–	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 4	–	≥ 8
				Hunde Haut-/Weichteilinfektionen <i>Staphylococcus</i> spp., Streptokokken (β-hämolyse- rende Gruppe)	≤ 0,5	1–2	≥ 4
ENR ⁶	0,015–2	0,03–0,12	0,008–0,03	Streptokokken (β-hämolyse- rende Gruppe, Viridans-Gruppe, <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	≤ 0,25	0,5	≥ 1
				Katzen Haut-/Weichteilinfektionen Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	≤ 0,5	1–2	≥ 4
ERY ⁷	0,12–4	0,25–1	–	Hunde Haut-/Weichteilinfektionen Atemwegs-/Harnwegsinfektionen Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.			
				<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	≤ 0,5	1–4	≥ 8
GEN	0,06–4	0,12–1	0,25–1	Streptokokken (β-hämolyse- rende Gruppe, Viridans-Gruppe, <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	≤ 0,25	0,5	≥ 1
				Hunde Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≤ 2	4	≥ 8
				Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 4	8	≥ 16
OXA	0,06–2	0,12–0,5	–	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus</i> <i>lugdunensis</i>	≤ 2	–	≥ 4
				<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , Koagulase- negative Staphylokokken außer <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	≤ 0,25	–	≥ 0,5
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,06	0,12–1	≥ 2

Wirkstoff ¹	Testbereich (mg/L)	QC-Bereich (mg/L)		Kombination Tierart, Indikation und Erreger	Grenzwerte (mg/L) ²		
		<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>E. coli</i> ATCC® 25922		S	I	R
PEN	0,06–4	0,25–2	–	<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 0,12	–	≥ 0,25
				Streptokokken (außer <i>Streptococcus pneumoniae</i>) Viridans-Gruppe	≤ 0,12	0,25–2	≥ 4
				Streptokokken (außer <i>Streptococcus pneumoniae</i>) β-hämolyisierende Gruppe	≤ 0,12	–	–
				<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 8	–	≥ 16
PRA	0,004–1	0,03–0,12	0,008–0,03	Hunde Haut-/Harnwegsinfektionen <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	≤ 0,25	0,5–1	≥ 2
				Katzen Haut-/Atemwegsinfektionen <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus felis</i>	≤ 0,25	–	–
SXT	0,25/4,75–2/38	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 2/38	–	≥ 4/76
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,5/9,5	1/19–2/38	≥ 4/76
TET ⁸	0,06–8	0,12–1	0,5–2	Hunde Haut- und Weichteilinfektionen <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 0,25	0,5	≥ 1
				Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	≤ 4	8	≥ 16
				<i>Streptococcus</i> spp. außer <i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 2	4	≥ 8
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1

¹ AMC = Amoxicillin/Clavulansäure (2:1); AMP = Ampicillin; CFX = Cefalexin; CEV = Cefovecin; CHL = Chloramphenicol; CLI = Clindamycin; ENR = Enrofloxacin; ERY = Erythromycin; GEN = Gentamicin; OXA = Oxacillin; PEN = Penicillin G; PRA = Pradofloxacin; SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19); TET = Tetrazyklin

² S = sensibel; I = intermediär; R = resistent; Grenzwerte die aus der Humanmedizin übernommen sind, sind hellgrün hinterlegt, Beurteilungskriterien beruhend auf Herstellerangaben sind dunkelgrün hinterlegt dargestellt

³ gilt auch für Amoxicillin; ⁴ gilt auch für alle anderen „Erst-Generation“-Cephalosporine; ⁵ gilt auch für Lincomycin; ⁶ gilt auch für andere Fluorchinolone wie Marbofloxacin und Orbifloxacin; ⁷ gilt auch für andere Makrolide/Nachweis der induzierbaren Makrolidresistenz; ⁸ gilt auch für Doxycyclin

auf Orbifloxacin und auch auf Marbofloxacin übertragbar sind.

Bezüglich der Aussagekraft der qualitativen Beurteilung der Testergebnisse ist zu beachten, dass die Grenzwerte für Erythromycin und Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1:19 ausschließlich aus der Humanmedizin übernommen sind; Hunde- oder Katzen-spezifische Beurteilungskriterien stehen nicht zur Verfügung.

Da für die Beurteilung des Drittgeneration-Cephalosporins Cefovecin lediglich QC-Bereiche, aber keine CLSI-anerkannten klinischen Grenzwerte zur Verfügung stehen, wurde, wie bereits bei der letzten Version des Kleintierlayouts, auf die entsprechenden Herstellerangaben zurückgegriffen [3].

Großtierlayout

Die Auswahl der Wirkstoffe (einschließlich der Verwendung von Stellvertretersubstanzen) und

der Testbereiche für das Großtierlayout wurde an anderer Stelle ausführlich dargestellt [4], weshalb hier ebenfalls vorwiegend auf die vorgenommenen Änderungen eingegangen wird (**Tab. 2**).

Die Testbereiche für die Wirkstoffe Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin (ST für Aminopenicilline), Cephalothin (ST für Cephalosporine 1. Generation), Ceftiofur, Colistin, Enrofloxacin (ST für Fluorchinolone), Erythromycin, Gentamicin, Penicillin G, Spectinomycin, Sulfamethoxazol/Trimethoprim (ST für Sulfonamid/Diaminopyrimidin-Kombinationen), Tetrazyklin (ST für Tetrazykline), Tiamulin (ST für Pleuromutiline) und Tilmicosin wurden im Hinblick auf die vorhandenen QC-Bereiche und klinischen Grenzwerte [7] angepasst.

Eine Beurteilung der Ergebnisse für Colistin ist mangels CLSI-anerkannter QC-Bereiche und klinischer Grenzwerte bislang nicht möglich. Daher wird für die Beurteilung der Ergebnisse wie bisher auf die vom „Arbeitskreis Veterinärmedi-

zinische Infektionsdiagnostik“ (AVID) veröffentlichten Grenzwerte aus der Vorschrift DIN 58940 des Deutschen Instituts für Normung (DIN) verwiesen [4].

Der Wirkstoff Tulathromycin wurde ins Layout aufgenommen. Damit sind im Layout ein 14-gliedriges Makrolid (Erythromycin), ein 16-gliedriges Makrolid (Tilmicosin) und mit der Aufnahme von Tulathromycin auch ein 15-gliedriges Makrolid enthalten. Obwohl es für die beiden vergleichsweise neuen Wirkstoffe Gamithromycin und Tildipirosin ebenfalls Grenzwerte gibt, wird aus Platzgründen auf eine Testung dieser Wirkstoffe verzichtet, da Tulathromycin als ST für 15-gliedrige Makrolide (Gamithromycin) und Tilmicosin als ST für 16-gliedrige Makrolide (Tildipirosin) verwendet werden kann. Erythromycin kann als ST für 14-gliedrige Makrolide verwendet werden. Die Testung der drei strukturell unterschiedlichen Makrolide ist u. a. für den Nachweis der induzierbaren Makrolidresistenz von

Tab. 2: Wirkstoffe, Testbereiche, Qualitätskontrolle und Grenzwerte für das Großtierlayout (ganze Platte)

Wirkstoff ¹	Testbereich (mg/L)	QC-Bereich (mg/L)		Kombination Tierart, Indikation und Erreger	Grenzwerte (mg/L) ²		
		<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>E. coli</i> ATCC® 25922		S	I	R
AMC	2/1–16/8	0,12/0,06–0,5/0,25	2/1–8/4	Enterobacteriaceae	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
AMP ³	0,12–16	0,5–2	2–8	Pferde Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i> und <i>equi</i>	≤ 0,25	–	–
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus suis</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 0,5	1	≥ 2
				Enterobacteriaceae	≤ 8	16	≥ 32
				Streptokokken (β-hämolysierende Gruppe)	≤ 0,25	–	–
				Streptokokken (Viridans-Gruppe)	≤ 0,25	0,5	≥ 8
				<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 8	–	≥ 16
CEF ⁴	1–16	0,12–0,5	4–16	Enterobacteriaceae	≤ 8	16	≥ 32
XNL	0,12–4	0,25–1	0,25–1	Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus somni</i>	≤ 2	4	≥ 8
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus suis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>			
				Pferde Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus equi</i> subsp. <i>zooepidemicus</i>	≤ 0,25	–	–
COL	0,5–2	–	–	–	≤ 0,5	1–2	≥ 4
ENR ⁵	0,015–1	0,03–0,12	0,008–0,03	Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus somni</i>	≤ 0,25	0,5–1	≥ 2
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus suis</i>	≤ 0,5	1	≥ 2
ERY ⁶	0,12–4	0,25–1	–	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	≤ 0,5	1–4	≥ 8
				Streptokokken (β-hämolysierende Gruppe, Viridans-Gruppe, <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	≤ 0,25	0,5	≥ 1
FLO	1–8	2–8	2–8	Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus somni</i>	≤ 2	4	≥ 8
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus suis</i> , <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>			
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> Serovar Choleraesuis	≤ 4	8	≥ 16
GEN	0,12–8	0,12–1	0,25–1	Pferde Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 2	4	≥ 8
				Enterobacteriaceae, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 4	8	≥ 16

Wirkstoff ¹	Testbereich (mg/L)	QC-Bereich (mg/L)		Kombination Tierart, Indikation und Erreger	Grenzwerte (mg/L) ²		
		<i>S. aureus</i> ATCC [®] 29213	<i>E. coli</i> ATCC [®] 25922		S	I	R
PEN	0,06–8	0,25–2	–	Pferde Atemwegserkrankungen, Weichteilinfektionen <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	≤ 0,5	1	≥ 2
				Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus somni</i> Schweine <i>Streptococcus suis</i> , <i>Pasteurella multocida</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1
				Streptokokken (außer <i>Streptococcus pneumoniae</i>) Viridans-Gruppe	≤ 0,12	0,25–2	≥ 4
				<i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 0,12	–	≥ 0,25
				Streptokokken (außer <i>Streptococcus pneumoniae</i>) β-hämolysierende Gruppe	≤ 0,12	–	–
				<i>Enterococcus</i> spp.	≤ 8	–	≥ 16
				Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus somni</i>	≤ 32	64	≥ 128
SXT	0,25/4,75–2/38	≤ 0,5/9,5	≤ 0,5/9,5	Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp.	≤ 2/38	–	≥ 4/76
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,5/9,5	1/19–2/38	≥ 4/76
TET ⁷	0,12–8	0,12–1	0,5–2	Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i>	2	4	≥ 8
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Streptococcus suis</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 0,5	1	≥ 2
				Enterobacteriaceae, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	≤ 4	8	≥ 16
				Streptokokken (außer <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	≤ 2	4	≥ 8
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,25	0,5	≥ 1
TIA	0,25–32	0,5–2	–	Schweine Atemwegserkrankungen <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 16	–	≥ 32
TIL ⁸	0,5–16	1–4	–	Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i>	≤ 8	16	≥ 32
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 16	–	≥ 32
TUL ⁹	1–32	2–8	–	Rinder Atemwegserkrankungen <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i> , <i>Histophilus somni</i> Schweine Atemwegserkrankungen <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Pasteurella multocida</i>	≤ 16	32	≥ 64
				Schweine Atemwegserkrankungen <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	≤ 64	–	–

¹AMC = Amoxicillin/Clavulansäure (2:1), AMP = Ampicillin, CEF = Cephalothin, XNL = Ceftiofur, COL = Colistin, ENR = Enrofloxacin, ERY = Erythromycin, FLO = Florfenicol, GEN = Gentamicin, PEN = Penicillin G, SPE = Spectinomycin, TET = Tetracyclin, TIA = Tiamulin, TIL = Tilimicosin, TUL = Tulathromycin, SXT = Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1:19)

²S = sensibel, I = intermediär, R = resistent, Grenzwerte, die aus der Humanmedizin übernommen sind, sind hellgrün hinterlegt, Beurteilungskriterien beruhend auf DIN/AVID-Angaben sind dunkelgrün hinterlegt dargestellt

³gilt auch für Amoxicillin; ⁴ gilt auch für alle anderen „Erst-Generation“-Cephalosporine; ⁵ gilt auch für andere Fluorchinolone wie Marbofloxacin; ⁶ gilt auch für andere 14-gliedrige-Makrolide/Nachweis der induzierbaren Makrolidresistenz; ⁷ gilt auch für Doxycyclin; ⁸ gilt auch für Tildipirosin; ⁹ gilt auch für Gamithromycin

Tab. 3: Wirkstoffe, Testbereiche, Qualitätskontrolle und Grenzwerte für das Mastitislayout (halbe Platte)

Wirkstoff ¹	Testbereich (mg/L)	QC-Bereich (mg/L)		Erreger	Grenzwerte (mg/L) ²		
		<i>S. aureus</i> ATCC [®] 29213	<i>E. coli</i> ATCC [®] 25922		S	I	R
AMC	1/0,5–16/8	0,12/0,06–0,5/0,25	2/1–8/4	Enterobacteriaceae	≤ 8/4	16/8	≥ 32/16
AMP ³	0,25–16	0,5–2	2–8	Enterobacteriaceae	≤ 8	16	≥ 32
				Streptokokken (β-hämolysierende Gruppe)	≤ 0,25	–	–
				Streptokokken (Viridans-Gruppe)	≤ 0,25	0,5–4	≥ 8
				<i>Enterococcus</i> spp	≤ 8	–	≥ 16
ERY ⁴	0,12–4	0,25–1	–	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.	≤ 0,5	1–4	≥ 8
				Streptokokken (β-hämolysierende Gruppe, Viridans-Gruppe, <i>Streptococcus pneumoniae</i>)	≤ 0,25	0,5	≥ 1
FOP ⁵	0,5–4	1–4	0,12–0,5	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , Koagulase-negative Staphylokokken, <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i>	≤ 2	4	≥ 8
KAN/CFX ⁵	0,5/0,05–16/1,6	1/0,1–4/0,4	2/0,2–8/0,8	–	≤ 8/0,8	16/1,6	≥ 32/3,2
MAR ⁶	0,06–4	0,12–0,5	0,008–0,03	–	≤ 1	2	≥ 4
OXA	0,06–2	0,12–0,5	–	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	≤ 2	–	≥ 4
				<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> , Koagulase-negative Staphylokokken außer <i>Staphylococcus lugdunensis</i>	≤ 0,25	–	≥ 0,5
				<i>Streptococcus pneumoniae</i>	≤ 0,06	0,12–1	≥ 2
PIR	0,12–2	0,25–1	–	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Streptococcus dysgalactiae</i> , <i>Streptococcus uberis</i>	≤ 2	–	≥ 4

¹AMC = Amoxicillin/Clavulansäure (2:1), AMP = Ampicillin, ERY = Erythromycin, FOP = Cefoperazon, KAN/CFX = Kanamycin/Cephalexin (1:0,1), MAR = Marbofloxacin, OXA = Oxacillin, PIR = Pirlimycin

²S = sensibel, I = intermediär, R = resistent, Grenzwerte die aus der Humanmedizin übernommen sind, sind hellgrün hinterlegt, Beurteilungskriterien beruhend auf Herstellerangaben sind dunkelgrün hinterlegt dargestellt,

³gilt auch für Amoxicillin; ⁴ gilt auch für andere Makrolide/Nachweis der induzierbaren Makrolidresistenz; ⁵ Grenzwerte aus wissenschaftlichen Publikationen übernommen (FOP [9], KAN/CFX [8]); ⁶ gilt auch für andere Fluorchinolone wie Danofloxacin und Enrofloxacin

Bedeutung, da lediglich 14- und 15-gliedrige Makrolide eine Ablesung der entsprechenden Resistenzgene induzieren, während dies bei den 16-gliedrigen Makroliden nicht der Fall ist. Daher kann eine induzierbare Makrolidresistenz beim alleinigen Testen von 16-gliedrigen Makroliden und/oder Lincosamiden nicht erkannt werden (www.dvg.net/avid/22tag/34-Werckenthin.pdf).

Das Aminocyclitol Apramycin ist im vorliegenden Panel nicht mehr enthalten, da es für diesen Wirkstoff derzeit weder QC-Bereiche noch anerkannte klinische Grenzwerte gibt. Auf die Testung von Neomycin wurde verzichtet, weil es derzeit für die Bouillon-Mikrodilution weder anerkannte Grenzwerte noch QC-Bereiche gibt.

Enrofloxacin wird im Großtierlayout als ST für die Fluorchinolone getestet; die Ergebnisse können aufgrund der gleichen Resistenzmechanismen auf die anderen für Großtiere zugelassenen

Fluorchinolone, Marbofloxacin und Danofloxacin, übertragen werden.

Mastitislayout

Derzeit gibt es lediglich für drei Wirkstoffe bzw. Wirkstoffkombinationen CLSI-anerkannte klinische Grenzwerte für die Indikation Mastitis. Davon ist lediglich Pirlimycin in Deutschland für die Mastitistherapie zugelassen. Im Rahmen von zwei Studien wurden weitere klinische Grenzwerte für bovine Mastitiserreger erarbeitet. Dies betrifft die Wirkstoffkombination Kanamycin/Cephalexin [8] und Cefoperazon [9]. Weitere Grenzwerte (für Amoxicillin/Clavulansäure, Ampicillin, Oxacillin und Erythromycin) sind aus der Humanmedizin übernommen, wodurch die Aussagekraft für Mastitiserreger eingeschränkt sein kann, oder basieren, wie für Marbofloxacin [10], auf Herstelleran-

gaben (Tab. 3). Auch bei der Überarbeitung des Mastitislayouts haben sich Änderungen ergeben (Tab. 3). Die Kombination Kanamycin/Cephalexin wurde neu in das Layout aufgenommen. Marbofloxacin wird stellvertretend für Fluorchinolone getestet. Da Resistenz gegenüber Fluorchinolonen über die gleichen Mechanismen vermittelt wird, sind die Ergebnisse für Marbofloxacin auf die anderen derzeit für die Bekämpfung der akuten Mastitis zugelassenen Fluorchinolone, Enrofloxacin und Danofloxacin, übertragbar.

Auf die Testung von Penicillin G wurde verzichtet, da der Ampicillin-MHK-Wert Aussagen über die Empfindlichkeit grampositiver Bakterien gegenüber Penicillin G zulässt. Ampicillin ist auch gegen gramnegative Bakterien wirksam und ermöglicht somit eine Beurteilung für Penicilline. Wenn Staphylokokken und Streptokokken als Ampicillin-sensibel beurteilt werden, sollte

Penicillin G zur Therapie verwendet werden. Der Wirkstoff Oxacillin wurde ins Layout aufgenommen, um eine Methicillinresistenz bei Staphylokokken (MRS) nachweisen zu können, bei deren Vorliegen das entsprechende Isolat – wie bereits beim Kleintierlayout erläutert – als resistent gegenüber anderen β -Lactam-Antibiotika beurteilt wird. Bei Erythromycin handelt es sich um ein 14-gliedriges Makrolid, wodurch auch induzierbare Makrolidresistenzen erkennbar sind (siehe auch Abschnitt Großtierlayout). Bei vorliegender Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin kann das nicht als Induktor wirkende 16-gliedrige Tylosin ebenfalls eingesetzt werden. Die Wirkstoffe Cefazolin, Cefquinom, Gentamicin und Tetracyclin sind nicht im aktuellen Layout enthalten, da für sie keine spezifischen Grenzwerte für bovine Mastitiserreger vorliegen.

Fazit

Die Empfehlungen des Arbeitskreises „Antibiotikaresistenz“ zu Plattenlayouts bieten die Möglichkeit der harmonisierten Empfindlichkeitstestung von Krankheitserregern bei Kleintieren, Großtieren und Mastitiden. Die Layouts wurden, basierend auf dem aktuellen wissenschaftlichen Erkenntnisstand, überarbeitet und aktualisiert. Weiterhin ist es aber Realität, dass bislang nicht für alle Testkombinationen (veterinärmedizinische) klinische Grenzwerte zur Verfügung stehen.

Literatur:

- [1] Bundestierärztekammer (2015): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln mit Erläuterungen. Deutsches Tierärzteblatt 03/2015, Beilage. www.bundestieraerztekammer.de/downloads/btk/leitlinien/Antibiotika-Leitlinien_01-2015.pdf.
- [2] Schwarz S, Böttner A, Hafez HM, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Krabisch P, Kühn T, Luhofer G, Richter A, Sigge C, Traeder W, Waldmann K-H, Wallmann J, Werckenthin C (2003): Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 116, 353–61.
- [3] Werckenthin C, Luhofer G, Böttner A, Gangl A, Goossens L, Hafez HM, Hartmann K, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Richter A, Schulz B, Schwarz S, Sigge C, Traeder W, Waldmann KH, Wallmann J (2008). Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik: Vorschlag für ein Layout für Mikrotiterplatten zur Testung von Bakterien von Hunden und Katzen. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 121, 19–26.
- [4] Luhofer G, Böttner A, Hafez HM, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Richter A, Sigge C, Traeder W, Waldmann K-H, Wallmann J, Werckenthin C, Schwarz S (2004): Vorschläge der Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ für die Belegung von Mikrotiterplatten zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik – Mastitis- und Großtierlayouts. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 117, 245–51.
- [5] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard – fourth edition. CLSI document VET01-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- [6] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016): Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters. CLSI document M23. 4th Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2015): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI document VET01-S. 3rd Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA. (<http://vet01s.edaptivedocs.info/Login.aspx>)
- [8] Pillar CM, Goby L, Draghi D, Grover P, Thornsberry C (2009): Evaluating the in vitro susceptibility of bovine mastitis pathogens to a combination of kanamycin and cefalexin: Recommendations for a disk diffusion test. J Dairy Sci. 92, 6217–27.
- [9] Feßler AT, Kaspar H, Lindeman CJ, Stegemann MR, Peters T, Mankertz J, Watts JL, Schwarz S (2012): A proposal of interpretive criteria for cefoperazone applicable to bovine mastitis pathogens. Vet Microbiol 157, 226–31.
- [10] Kroemer S, Galland D, Guérin-Faubleé V, Giboin H, Woehrlé-Fontaine F (2012): Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe. Vet Rec 170, 53.

Anschrift der korrespondierenden Autorin

Dr. Andrea T. Feßler, PhD



Centre for Infection Medicine,
Institute of Microbiology and
Epizootics
Freie Universität Berlin
Robert-von-Ostertag-Str. 7–13,
14163 Berlin

Tel. +49 30 83863074, andrea.fessler@fu-berlin.de