

Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Resistenzverhalten
von *Riemerella anatipestifer* und
Ornithobacterium rhinotracheale
des Wirtschaftsgeflügels**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Gasche
Tierärztin aus Jacobsdorf

Berlin 2017
Journal-Nr.: 3967

**Aus dem Institut für Geflügelkrankheiten
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchungen zum Resistenzverhalten von *Riemerella anatipestifer* und
Ornithobacterium rhinotracheale des Wirtschaftsgeflügels**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Gasche
Tierärztin aus Jacobsdorf

Berlin 2017

Journal-Nr.: 3967

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Hafez Mohamed Hafez
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Lierz
Dritter Gutachter: Prof. Dr. Monika Krüger

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
poultry; poultry diseases; *Ornithobacterium rhinotracheale*; *Riemerella anatipestifer*; antibiotics; drug resistance; inhibitors

Tag der Promotion: 14.08.2017

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im
Internet über <<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-877-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2017

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1 Einleitung | 1 |
| 2 Literaturübersicht..... | 2 |
| 2.1 <i>Riemerella anatipestifer</i> | 2 |
| 2.1.1 Definition | 2 |
| 2.1.2 Klassifikation | 2 |
| 2.1.3 Morphologie und kulturelle Eigenschaften | 3 |
| 2.1.4 Biochemische Eigenschaften | 6 |
| 2.1.5 Typisierung und genetische Diversität | 8 |
| 2.1.6 Klinik und Pathologie | 9 |
| 2.1.7 Therapie | 10 |
| 2.1.8 Verfahren zur Resistenztestung | 11 |
| 2.1.9 Resistenzen und Resistenzgene | 12 |
| 2.2 <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> | 17 |
| 2.2.1 Definition | 17 |
| 2.2.2 Geschichte | 17 |
| 2.2.3 Klassifikation | 17 |
| 2.2.4 Morphologie und kulturelle Eigenschaften | 18 |
| 2.2.5 Biochemische Eigenschaften | 19 |
| 2.2.6 Typisierung und genetische Diversität | 21 |
| 2.2.7 Klinik und Pathologie | 23 |
| 2.2.8 Therapie | 23 |
| 2.2.9 Resistenzverhalten von <i>O. rhinotracheale</i> | 24 |
| 3 Material und Methoden | 28 |
| 3.1 Material | 28 |
| 3.1.1 Bakterielle Isolate | 28 |
| 3.1.2 Kontrollstämme | 28 |
| 3.1.3 Verbrauchsmaterial und Geräte | 30 |
| 3.2 Methoden | 38 |
| 3.2.1 Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung | 38 |

| | | |
|---------|---|----|
| 3.2.1.1 | Rekultivierung der aufbewahrten, reinkultivierten Bakterienisolate | 38 |
| 3.2.1.2 | Biochemische Identifizierung | 38 |
| 3.2.1.3 | Molekularbiologische Identifizierung | 38 |
| 3.3 | Durchführung der Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) für <i>O. rhinotracheale</i> und <i>R. anatipestifer</i> | 41 |
| 3.3.1 | Testverfahren zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von <i>R. anatipestifer</i> und <i>O. rhinotracheale</i> | 47 |
| 3.3.1.1 | Mikrodilution | 47 |
| 3.3.1.2 | Agardilution | 50 |
| 3.3.1.3 | E-Test | 52 |
| 4 | Ergebnisse | 53 |
| 4.1 | Charakterisierung und Typisierung von <i>R. anatipestifer</i> | 53 |
| 4.1.1 | Biochemische Identifizierung von <i>R. anatipestifer</i> | 53 |
| 4.1.2 | Molekularbiologische Identifizierung von <i>R. anatipestifer</i> | 54 |
| 4.1.3 | Serotypisierung von <i>R. anatipestifer</i> | 54 |
| 4.1.4 | Makrorestriktionsanalyse von <i>R. anatipestifer</i> | 55 |
| 4.1.5.1 | Etablierung der Bouillon-Mikrodilution für <i>R. anatipestifer</i> | 59 |
| 4.1.5.2 | Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro mittels Bouillon- Mikrodilution | 61 |
| 4.1.5.3 | Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit | 65 |
| 4.2 | Charakterisierung und Typisierung von <i>O. rhinotracheale</i> | 65 |
| 4.2.1 | Biochemische Identifizierung von <i>O. rhinotracheale</i> | 65 |
| 4.2.2 | Molekularbiologische Identifizierung von <i>O. rhinotracheale</i> | 66 |
| 4.2.3 | Serotypisierung von <i>O. rhinotracheale</i> | 67 |
| 4.2.4 | Makrorestriktionsanalyse von <i>O. rhinotracheale</i> | 67 |
| 4.2.5.1 | Versuche zur Etablierung einer Methode zur MHK-Bestimmung für <i>O. rhinotracheale</i> | 71 |
| 4.2.5.2 | Bestimmung des Resistenzverhaltens von <i>O. rhinotracheale</i> in vitro mittels Agardilution | 78 |
| 5 | Diskussion | 81 |
| 5.1 | Erregercharakterisierung und Typisierung (<i>R. anatipestifer</i>) | 81 |
| 5.2 | Etablierung einer Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für <i>R. anatipestifer</i> | 85 |

| | |
|--|-----|
| 5.3 Erregercharakterisierung und Typisierung (<i>O. rhinotracheale</i>) | 91 |
| 5.4 Etablierung einer Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) von <i>O. rhinotracheale</i> | 94 |
| 6 Schlussfolgerungen | 99 |
| 7 Zusammenfassung | 101 |
| 8 Summary | 103 |
| 9 Literaturverzeichnis | 105 |
| 10 Anhang | 117 |

Abkürzungsverzeichnis

Es wurden folgende Abkürzungen in der vorliegenden Arbeit verwendet:

| | |
|-----------------|---|
| Abb. | Abbildung(en) |
| AGP | Agargelpräzipitationstest |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| APV | Aviäre Pneumoviren |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Hirn-Herz-Glucose Bouillon |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| °C | Grad Celsius |
| CHEF | Contour-Clamped-homogeneous Electric-Field |
| CLSI | Clinical and Laboratory Standards Institute; frühere Bezeichnung: NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleic acid) |
| DSMZ | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| Ecoff | Epidemiologischer cut-off Wert |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| g | Gramm |
| h | Stunde |
| KBE | koloniebildende Einheiten |
| KCN | Potassium Cyanid Bouillon |
| kg | Kilogramm |
| kb | Kilobasen |
| l | Liter |
| IPb | lysiertes Pferdeblut |
| McF | McFarland |
| mg | Milligramm |
| MH-Agar | Mueller-Hinton Agar |
| MHB II | Mueller-Hinton Bouillon II |
| MHK | minimale Hemmkonzentration |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|---|
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| MLEE | multilocus enzyme electrophoresis |
| mM | Millimolar |
| MRA | Makrorestriktionsanalyse |
| µm | Mikrometer |
| µl | Mikroliter |
| <i>O. rhinotracheale</i> | <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat buffered saline) |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction) |
| PFGE | Pulsfeldgelelektrophorese |
| pH | negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| PNPG | p-nitrophenyl-β-D galactopyranoside |
| RAPD | random amplified polymorphic DNA (zufällig vervielfältigte polymorphe DNA) |
| RFLP | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| Rep-PCR | repetitive extragenic palindromic-PCR |
| SDS | Sodiumdodecyl-Sulfat |
| <i>S. aureus</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Tab. | Tabelle |
| UPGMA | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean |
| UV | ultraviolett |
| VfM | Veterinary fastidious Medium |

1. Einleitung

Atemwegserkrankungen beim Wirtschaftsgeflügel sind weit verbreitet. Der Atemtrakt ist bei allen Geflügelarten auf Grund deren Flugfähigkeit hoch entwickelt. Bedingt durch die hohe Leistungsfähigkeit, ist das Atmungssystem des Geflügels sehr anfällig für eine Vielzahl von Erkrankungen (Novartis, 2014).

Unabhängig von dem auslösenden Agens zählen Atemwegserkrankungen nicht nur zu den häufigsten, sondern auch zu den wirtschaftlich verlustreichsten Erkrankungen. Wirtschaftliche Schäden entstehen vor allem durch daraus resultierende Wachstumsdepression, eine geringere Futterumsatzrate, erhöhte Medikamentenkosten (Bisgaard, 1982; Floren et al., 1995), erhöhte Verwurfraten bei der Schlachtung (van Veen et al., 2000) verringerte Legeleistung, sowie eine herabgesetzte Befruchtungs- und Schlupfrate (Hafez, 1994).

Schlechtes Stallklima und/oder ungünstige Haltungsbedingungen wie niedrige Luftfeuchtigkeit, zu hoher Ammoniakgehalt der Luft und extreme Temperaturschwankungen begünstigen Erkrankungen des Atmungstraktes. Gebiete mit einem hohen Tieraufkommen bergen die Gefahr der Verbreitung von spezifischen und unspezifischen endemisch auftretenden Infektionskrankheiten (BMELV, 2005).

Aus wirtschaftlichen und tierschutzrechtlichen Gründen werden zur Behandlung von bakteriellen Krankheitsausbrüchen häufig antimikrobielle Substanzen angewendet. Im human-, als auch veterinärmedizinischen Bereich wird immer häufiger Wert auf Monitoringprogramme gelegt, hinsichtlich der zunehmenden Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber Antibiotika in der Nutztierhaltung (QS, 2015).

In der vorliegenden Arbeit sollen für die beiden Geflügelpathogene *Riemerella anatipestifer* (*R. anatipestifer*) und *Ornithobacterium rhinotracheale* (*O. rhinotracheale*) Methoden zur Resistenztestung etabliert werden.

Die Ermittlung eines geeigneten Testmediums und geeigneter Testbedingungen erfolgte unter Berücksichtigung der Vorgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) und unter Einbeziehung definierter Qualitätsstämme.

2. Literaturübersicht

2.1 *Riemerella anatipestifer*

2.1.1 Definition

Riemerella anatipestifer (*R. anatipestifer*) löst eine akute bis chronische, primär septikämisch verlaufende Erkrankung insbesondere bei jungen Enten, aber auch Gänsen, Puten und Hühnern aus. Es können bei einer Infektion sowohl die Atemwege betroffen sein, als auch der Verdauungstrakt oder die Gelenke. Zum Teil werden durch *R. anatipestifer* auch zentralnervöse Störungen ausgelöst (Hinz and Reetz, 2005).

2.1.2 Klassifikation

Die phylogenetische Position von *R. anatipestifer* war bis 1986 ungeklärt (Segers et al., 1993). Erste Berichte über das Geflügelpathogen gehen zurück bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts. Riemer berichtete erstmals 1904 über eine exsudative Septikämie bei Gänsen, welche 1910 von Loeffler als Gänseinfluenza bezeichnet wurde (Loeffler, 1910; Riemer, 1904). Während Riemer das aus Gänsen isolierte Bakterium als „*Bacillus septicaemiae anserum exsudativae*“ bezeichnete, wurde es von Frosch und Bierbaum (1909), sowie von Loeffler (1910) der Gattung *Haemophilus* zugeordnet (Frosch and Bierbaum, 1909; Loeffler, 1910).

In den USA berichteten Hendrickson und Hilbert im Jahre 1932 als erste über das Auftreten einer septikämischen Erkrankung bei jungen Enten. In drei verschiedenen Entenmastbetrieben auf Long Island konnte der Erreger isoliert werden (Hendrickson and Hilbert, 1932). Auf Grund der morphologischen, kulturellen und biochemischen Eigenschaften des Bakteriums erfolgte die Zuordnung zur Gattung *Pfeiferella*, mit der Speziesbezeichnung *Pfeiferella anatipestifer*.

Graham et al. (1938) gelang bei einem Ausbruch der „Duck septicemia“ auf einer Entenfarm in Illinois (USA) ebenfalls die Isolierung des Erregers. Die direkte Anzucht gelang bei ihnen jedoch nur unter mikroaerophilen Bedingungen, wohingegen Hendrickson und Hilbert (1932) den Erreger als streng aerob beschrieben haben. Daher wurde für das Agens die Bezeichnung „*Pfeiferella anatipestifer-like organism*“ verwendet (Graham et al., 1938).

Bruner und Fabricant (1954) sahen die Notwendigkeit einer Reklassifizierung für *Pfeiferella anatipestifer*. Auf Grund der typischen Charakteristika und seiner höheren Ansprüche an

Kulturmedien, passte der Erreger eher zum Genus der *Moraxella*, weshalb die Bezeichnung *Moraxella anatipestifer* gewählt wurde (Bruner and Fabricant, 1954).

Der Erreger wurde 1957 in der 7. Auflage des Bergey's Manual of determinative Bacteriology in den Anhang der Gattung *Pasteurella* aufgenommen (Bergey and Breed, 1957).

Dennoch war *R. anatipestifer* bis 1986 weltweit uneinheitlich in verschiedenen Genera mit mehreren spezifischen Beinamen klassifiziert. Pichulla et al. (1986) beschrieben das erste Mal die heute gültige Zugehörigkeit zur *Flavobakterium-Cytophaga* Gruppe, nachdem Callies und Mannheim festgestellt hatten, dass echte Flavobakterien und Cytophaga-Spezies die Fähigkeit haben Menaquinone sowie verzweigt-kettige Fettsäuren zu produzieren (Callies and Mannheim, 1980; Mannheim et al., 1980; Sugimoto et al., 1983). Der genetische Vergleich von *Moraxella anatipestifer* mit dem *Moraxella*-Typstamm sowie ausgewählten Stämmen des Genus *Pasteurella* mittels DNA-DNA Hybridisierung ergaben keine messbare Verwandtschaft der Desoxyribonukleinsäuren (DNA). Bei einem Vergleich der hydrolytischen Enzyme in analogen Medien wurde die auffallende Ähnlichkeit zwischen *Moraxella anatipestifer* und der *Flavobakterium-Cytophaga* Gruppe deutlich (Piechulla et al., 1986; Sugimoto et al., 1983). Von Pichulla et al. (1986) wurden die Guanin und Cytosin Gehalte der DNA, sowie die Genommasse von *M. anatipestifer* bestimmt. Auf Grund der gefundenen Eigenschaften erfolgte eine Einordnung in die *Flavobakterium-Cytophaga*-Gruppe.

Segers et al. (1993) untersuchten 16 *R. anatipestifer* Stämme, die aus verschiedenen Wirtsspezies und unterschiedlichen Herkunftsgebieten isoliert wurden, mittels der 16S ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA) Gen-Sequenz Analyse. Sie stellten fest, dass sich *R. anatipestifer* in vielen Aspekten zu seinen verwandten Spezies unterscheidet. Auf Basis der genotypischen und phänotypischen Kriterien, sowie der hohen Intraspezies-DNA-Homologie, legten Segers et al. (1993) ein separates Genus für dieses Taxon fest. Zu Ehren von Riemer, der das Agens 1904 erstmals beschrieb, wurde die Spezies *Riemerella anatipestifer* genannt (Segers et al., 1993).

2.1.3 Morphologie und kulturelle Eigenschaften

R. anatipestifer ist ein gramnegatives, kurzes, nicht bewegliches und nicht sporenbildendes Stäbchenbakterium (Asplin, 1955; Jortner et al., 1968; Pickrell, 1966). Es zeigt sich als schmales Bakterium mit leichter Biegung und einer Größe von 0,2 x 0,4 µm bis 1,0 x 2,5 µm

mit einem capnophilen, chemoorganotrophen Metabolismus (Asplin, 1955; Hinz et al., 1998b; Mavromatis et al., 2011). Gelegentlich werden Filamente ausgebildet (Asplin, 1955).

Karstadt und Lusic (1970) zeigten schlechte Wachstumsergebnisse für *R. anatipestifer* bei aerober Bebrütung, im Gegensatz zur aeroben Bebrütung von Hendrickson und Hilbert (1932). Am besten geeignet für die Anzucht sind blut- oder serumhaltige Nährmedien. Durch Blut- oder Serumzusatz wird das Wachstum des proteolytisch aktiven Keims erheblich gefördert (Bruner and Fabricant, 1954). Eine Inkubationstemperatur zwischen 35 Grad Celsius (°C) und 38°C und eine Bebrütungsdauer von 24 bis 48 Stunden (h) werden von vielen Autoren beschrieben (Fulton and Rimler, 2010; Kardos et al., 2007; Zheng et al., 2011).

Mavromatis et al. (2011) berichteten, dass ein Wachstum bei bis zu 45°C möglich ist. Die Bebrütung unter 5 – 10%iger Kohlendioxid (CO₂)-Spannung optimiert das Bakterienwachstum (Glünder and Hinz, 1989; Sarver et al., 2005).

R. anatipestifer wächst auf Schokoladengagar, Trypticase Soja Agar (Aparna and Renjith, 2012; Munday et al., 1970), PPLO-Agar (Price, 1959), PPLO-Agar mit Hefeautolysat und 10% Serumzusatz (Piechulla et al., 1986) und Plain Agar (Asplin, 1955). Kein Wachstum ist auf McConkey-Agar, Litmus-Lactose Agar und Brolac-Agar zu verzeichnen (Behr, 2007; Rimler and Nordholm, 1998; Ryll et al., 2001). *R. anatipestifer* verursacht keine Hämolyse, allerdings kann es zu einer Aufhellung oder Bräunung bei der Anzucht auf Blutagar kommen (Asplin, 1955). Priya et al. (2008) beschreiben hingegen das teilweise Vorkommen einer leichten Hämolyse. In Flüssignährmedien variiert das Wachstum von Stamm zu Stamm. Nährstoffreiche Medien wie Mueller-Hinton-Bouillon II (MHB II) mit Zusatz von zwei Prozent lysiertem Pferdeblut (IPB) oder Hirn-Herz-Glucose Bouillon (BHI) sind zur Anreicherung notwendig (Rubbenstroth et al., 2013). Tabelle (Tab.) 1 gibt eine Übersicht über das Wachstumsverhalten von *R. anatipestifer*.

Tab.1: Wachstum von *R. anatipestifer* auf und in verschiedenen Medien bei unterschiedlichen Bedingungen

| Wachstum auf festen Nährmedien | Ergebnis | Quelle |
|--------------------------------|----------|--|
| Blutagar | ++ | Fulton and Rimler, 2010; Aparna and Renjith, 2012; Ryll et al., 2001 |

Fortsetzung Tab. 1

| Wachstum auf festen Nährmedien | Ergebnis | Quelle |
|--|----------|--|
| McConkey-Agar | - | Fulton and Rimler, 2010; Rimler and Nordholm, 1998; Ryll et al., 2001 Bangun et al., 1981 |
| Schokoladenagar | ++ | Aparna and Renjith, 2012 |
| Trypticase soya Agar | ++ | Aparna and Renjith, 2012 |
| Litmus-Lactose Agar | - | Ryll et al., 2001 |
| Brolac-Agar | - | Behr, 2007 |
| Plain Agar | ++ | Asplin, 1955 |
| PPLO-Agar | ++ | Price, 1959 |
| PPLO-Agar mit Hefeautolysat und 10% Serumzusatz | ++ | Pichulla et al., 1986 |
| Tryptose-Natriumphosphat-Agar | ++ | Bruner and Fabricant, 1954 |
| Cystin-Heart-Agar mit 10% Rinderblut | ++ | Karstad and Lusic, 1970 |
| Citrat-Agar | - | Bangun et al., 1981 |
| Wachstum in Flüssignährmedien | Ergebnis | Quelle |
| Peptonwasser | + | Asplin, 1955 |
| Mueller-Hinton Bouillon II mit 2% lysiertem Pferdeblut | +++ | Rubbenstroth et al., 2013 |
| Hirn-Herz-Glucose Bouillon (BHI) | +++ | Rubbenstroth et al., 2013 |
| Potassium-Cyanid (KCN) – Bouillon | - | Bangun et al., 1981 |
| Wachstum bei unterschiedlicher Temperatur | Ergebnis | Quelle |
| 4 °C | - | Bangun et al., 1981 Mavromatis et al., 2011 |
| 37 °C | +++ | Bangun et al., 1981 |
| 42 °C | + | Segers et al., 1993 |
| 45 °C | ++ | Bangun et al., 1981 Mavromatis et al., 2011 |
| 55 °C | - | Bangun et al., 1981 |

Fortsetzung Tab. 1

| Wachstum bei unterschiedlicher Atmosphäre | Ergebnis | Quelle |
|---|----------|--|
| aerob | + | Karstad and Lusic, 1970 Hendrickson and Hilbert, 1932 |
| microaerophil | +++ | Ryll et al., 2001 Hinz et al., 1998 |
| anaerob | -/+ | Ryll et al., 2001 Hinz et al., 1998 |

- = kein Wachstum +/- = schlechtes Wachstum
 + = geringes Wachstum ++ = gutes Wachstum
 +++ = sehr gutes Wachstums

2.1.4 Biochemische Eigenschaften

R. anatipestifer ist nicht einfach zu identifizieren. Viele biochemische Reaktionen sind negativ oder stammabhängig (Hinz et al., 1998b). Einheitliche positive Reaktionen sind nur bei Oxidase und Katalase zu beobachten (Karstad and Lusic, 1970; Rimler and Nordholm, 1998). Als charakteristische Eigenschaften von *R. anatipestifer* werden proteolytische Aktivität und der nicht vorhandene Abbau von Kohlenhydraten zu Säuren beschrieben (Hinz et al., 1998b). Einige Autoren beobachteten beim Abbau von Maltose, Mannose und Trehalose positive Reaktionen (Brogden et al., 1982; Hinz et al., 1998a). Die Reaktion für Urease und Gelatinase verläuft variabel. Pichulla et al. (1986) zeigten, dass europäische Isolate meistens Urease negativ und amerikanische Isolate Urease variabel sind. Tab. 2 gibt einen Überblick über die biochemischen Reaktionen von *R. anatipestifer* und *O. rhinotracheale* im Vergleich.

Tab.2: Biochemische Reaktionen von *R. anatipestifer*

| Biochemischer Test | Reaktion <i>R. anatipestifer</i> | Autor |
|----------------------------------|-------------------------------------|-------|
| Säurebildung aus Kohlenhydraten: | | |
| Arabinose | - | *2 |
| Glukose | - | *3,4 |
| Laktose | - | *2,4 |

Fortsetzung Tab. 2

| Biochemischer Test | Reaktion <i>R. anatipestifer</i> | Autor |
|------------------------------------|-------------------------------------|--------|
| Säurebildung aus Kohlenhydraten: | | |
| Dextrose | - | *2 |
| Lactulose | - | *3,4 |
| Maltose | variabel | *2,3,4 |
| Galaktose | - | *3,4 |
| Mannose | variabel | *2,3,4 |
| Fruktose | - | *3,4 |
| Raffinose | - | *2 |
| Rhamnose | - | *2 |
| Trehalose | variabel | *2,3,4 |
| Xylose | - | *2 |
| Sorbitol | - | *2 |
| Dulcitol | - | *2 |
| Katalase | + | *1,4,6 |
| Oxidase | + | *2,6 |
| α -Galaktosidase | - | *3 |
| β -Galaktosidase | - | *3 |
| α -Glukosidase | + | *3 |
| β -Glukosidase | - | *3 |
| β -Glukoronidase | - | *3 |
| N-Acetyl- β -Glukosaminidase | - | *3 |
| α -Mannosidase | - | *3 |
| α -Fucosidase | - | *3 |
| Alkalische Phosphatase | + | *3 |
| Esterase | + | *3 |
| Esterase Lipase | + | *3 |
| Lipase | - | *3 |
| Leucin arylamidase | + | *3 |

Fortsetzung Tab. 2

| Biochemischer Test | Reaktion <i>R. anatipestifer</i> | Autor |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------|
| Valin arylamidase | + | *3 |
| Cystin arylamidase | variabel | *3 |
| Trypsin | variabel | *3 |
| Chymotrypsin | variabel | *3 |
| Saure Phosphatase | + | *3 |
| Chondroitin sulfatase | - | *3,4 |
| N-Acetyl- β -Glucosaminidase | - | *3 |
| Indol | variabel | *1,3,4,5,6 |
| Urease | variabel | *2,3,4,5 |
| Gelatinase | variabel | *1,2,3,4,5 |
| Arginindehydrolase | + | *3,4 |
| Esculin Hydrolyse | - | *3,4,5 |
| Voges-Proskauer | + | *3 |
| Hyaluronidase | - | *3,4 |
| Reduktion von Nitrat zu Nitrit | - | *1,2,5 |

Quellen: Aparna and Renjith, 2012^{*1}; Brogden et al., 1982^{*2}; Hinz et al., 1998a^{*3}; Ryll et al., 2001^{*4}; Li et al., 2011^{*5}; Priya et al., 2008^{*6}

2.1.5 Typisierung und genetische Diversität

Viele Autoren berichten bei der Serotypisierung von *R. anatipestifer*-Isolaten gegenüber verschiedenen Referenz-Antisera über Kreuzreaktionen (Brogden et al., 1982, Pathanasophon et al., 2002). Christensen und Bisgaard sind der Ansicht, dass biochemische und physiologische Eigenschaften, sowie Serotypisierung keine ordnungsgemäße Einordnung von *R. anatipestifer* auf Spezies- und Genus-Level zulassen (Christensen and Bisgaard, 2010). Zur molekularbiologischen Charakterisierung werden deswegen Polymerasekettenreaktion (PCR) basierte Methoden eingesetzt. Tsai et al. (2005) beschreiben die Nutzung der Primer RA20F2 und RA20F4 zur Amplifizierung des 16 rRNA Genes von *R. anatipestifer*. Eine Unterscheidung zwischen *R. anatipestifer* und *R. columbina* ist mit den genannten Primern nicht möglich, weshalb diese sich auch zum Screening von *R. columbina*-infektionen bei

Tauben eignen (Tsai et al., 2005). Eine weitere Methode zur Analyse von chromosomalen DNA Restriktionsmustern ist die Puls-Feld Gelelektrophorese (PFGE) (Tenover et al., 1995). Philipp et al. (2013) untersuchten 49 *R. anatipestifer*-Isolate vom Serotyp 14 mittels PFGE. Die genomische DNA jedes Isolates wurde mit dem Restriktionsenzym *SmaI* verdaut. Mittels Cluster-Analyse konnten die Autoren einen Zusammenhang zwischen Bandenmuster, geografischer Herkunft und Zeitpunkt der Isolierung ermitteln. *R. anatipestifer*-Isolate aus Ungarn bildeten innerhalb des Serotyps 14 ein eigenes Cluster. Isolate aus Nordwestdeutschland, isoliert in den Jahren 2008 bis 2011, waren in drei Subclustern zu finden, während 32 *R. anatipestifer*-Stämme aus dem Jahr 2012 ein eigenes großes Cluster bildeten (Philipp et al., 2013).

Von Yu et al. (2008) wurden Untersuchungen zur Genomvielfalt von *R. anatipestifer*-Isolaten durchgeführt. Es wurden 24 Isolate aus acht Krankheitsausbrüchen von fünf unterschiedlichen Farmen (eine Enten- und vier Gänsefarmen) mittels PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (PCR-RFLP), repetitiver Sequenzanalyse und PFGE untersucht. Die größten Unterschiede zwischen den Isolaten wurden durch repetitive Sequenz-PCR und PFGE deutlich. Die Autoren ermittelten, dass Genotypen und Serovare sich zwischen den Farmen, innerhalb derselben Farm und sogar innerhalb einer einzelnen Gans unterscheiden. Für die PFGE wurden die Restriktionsenzyme *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII* und *SmaI* eingesetzt. Bei dem Verdau mit *SmaI* erhielten die Autoren im Gegensatz zu den anderen Restriktionsenzymen deutlich sichtbare Restriktionsfragmente (Yu et al., 2008).

2.1.6 Klinik und Pathologie

R. anatipestifer spielt weltweit als Agens von Atemwegsinfektionen, aber auch als Auslöser von neurologischen Ausfällen, Durchfall, Septikämie und Bauchfellentzündung eine große Rolle. Wirtschaftliche Verluste entstehen hauptsächlich durch Tierverluste, schlechte Futtermittelverwertung und Gewichtsentwicklung genesener Tiere, hohe Verwurfraten bei der Schlachtung, sowie hohe Therapiekosten (Bisgaard, 1982; Floren et al., 1995).

Wassergeflügel ist am häufigsten betroffen, aber auch andere Geflügelspezies (Hühner, Puten) können an einer *R. anatipestifer*-Infektion erkranken (Aparna and Renjith, 2012; Brogden et al., 1982; Li et al., 2011; Metzner et al., 2008; Priya et al., 2008). Klinische Erscheinungen entwickeln sich für gewöhnlich zwei bis fünf Tage nach Infektion. Enten sind im Alter von zwei bis acht Wochen hochempfindlich (Aparna and Renjith, 2012). Die Klinik ist mit Depression, Lethargie, Inkoordination, mukoiden bis purulenten Augen- und

Nasenausfluss, grünlichen Durchfall und rascher Abmagerung sehr unspezifisch. In typischen Fällen liegen infizierte Enten auf dem Rücken und strampeln mit den Füßen. Charakteristische pathologisch anatomische Veränderungen sind vor allem fibrinöses Exsudat in der Bauchhöhle, auf der Leberoberfläche, sowie fibrinöse Luftsackentzündungen. Infektionen des zentralen Nervensystems führen häufig zu einer fibrinösen Meningitis. Tiere unter fünf Wochen versterben in den meisten Fällen innerhalb von zwei Tagen nach Auftreten von Symptomen (Aparna and Renjith, 2012; Floren et al., 1995; Grimes and Rosenfield, 1972; Leibovitz, 1972). Ältere Tiere zeigen einen eher chronischen Verlauf mit Gelenkschwellungen, Bewegungsstörungen, Tremor des Kopfes und weiß-grünlichen Durchfall (Dougherty et al., 1955; Gerlach, 1970). Die Morbidität beträgt 100%, die Mortalität bei Jungtieren kann zwischen 5% und 80% schwanken (Asplin, 1955; Dougherty et al., 1955; Leibovitz, 1972; Sandhu, 1979; Yuan et al., 2011). Bei älteren Tieren beschreiben Dougherty et al. (1955) eine Mortalität unter 20%. Infizierte Zuchttiere entwickeln häufig schleimige bis käsige Eileiterentzündungen und werden zu falschen Legern (Dougherty et al., 1955). Infizierte Puten, meistens in einem Alter von 5 bis 15 Wochen, zeigen Atemnot, Lahmheit und verdrehte Hälsen (Smith et al., 1987; Zehr and Ostendorf, 1970). Fibrinöse Pericarditis und Epicarditis sind die ausgeprägtesten Läsionen (Helfer and Helmboldt, 1977). Fibrinöse Perihepatitis, Luftsackentzündung und/oder purulente Gelenkentzündungen werden gelegentlich beobachtet (Zehr and Ostendorf, 1970). Selten treten Osteomyelitis, Meningitis oder fokale Pneumonien auf (Smith et al., 1987). Die Mortalität kann bis zu 60% erreichen. Eine extreme Mortalität wird bei Puten in der 7. Lebenswoche beschrieben (Helfer and Helmboldt, 1977). Geringe Mortalitätsraten von einem Prozent bei 12 bis 15 Wochen alten Puten ohne pathologisch-anatomische Veränderungen kommen ebenfalls vor (Frommer et al., 1990).

2.1.7 Therapie

Die Resistenzprofile von *R. anatipestifer* haben sich in Anhängigkeit vom Einsatz eines Antibiotikums in bestimmten Ländern über die Zeit verändert. Deshalb ist die Durchführung eines Resistenztestes möglichst vor jeder Behandlung anzustreben (Zhong et al., 2009b). Hilbert und Kiser (1948) und Asplin (1955) berichten, dass die Gabe von Sulfamethazin in Konzentrationen von 0,1% bis 0,25% über das Trinkwasser oder Futter experimentell infizierte Tiere vor klinischen Erscheinungen schützt (Asplin, 1955; Hilbert and Kiser, 1948). Die Verabreichung von Sulfaquinoxalin in Konzentrationen von 0,025% oder 0,05% über das Futter führten zu einer effektiven Reduktion der Mortalität in Tierversuchen und Feldstudien

(Dean et al., 1973; Sandhu and Dean, 1980). Bei experimentell infizierten Tieren kann die Kombination von Sulfadimethoxin und Ormethoprim eine erhöhte Mortalität verhindern und das Vorkommen massiver Gewebsveränderungen herabsetzen (Mitrovic et al., 1978; Sandhu and Dean, 1980). Eine hohe Effektivität zur Reduktion der Mortalität und klinischen Erscheinungen haben Futtermittel gezeigt, die mit Novobiocin (0,0303% - 0,0368%) oder Lincomycin (0,011% - 0,022%) versetzt wurden. Eine gute Wirksamkeit erzielten subkutane Injektionen von Lincomycin-Spectinomycin, Penicillin oder eine Kombination von Penicillin und Dihydrostreptomycin (Ash, 1966; Sandhu and Dean, 1980). Aus Taiwan wurde durch den Einsatz von 2 mg pro Kilogramm (kg) Ceftiofur, einem Breitspektrum-Cephalosporin, das fünf Stunden nach experimenteller Infektion einmalig subkutan verabreicht wurde, über die erfolgreiche Reduzierung der Mortalität berichtet (Chang et al., 2003).

Tetrazykline spielen in der Therapie von *R. anatipestifer*-Infektionen keine große Rolle (Ash, 1966; Prip and Molbak, 1969; Sandhu and Dean, 1980). Nach Ash (1966) bewirkte der Einsatz von 15 mg Oxytetrazyklin als subkutane Injektion bei erkrankten Enten in Alter von 20 Tagen keine Reduzierung der Mortalität. Prip und Molbak (1969) setzten Oxytetrazyklin in prophylaktischen Konzentrationen von 100 und 200 ppm mit dem Futter bei Enten-Eintagsküken bei einer Gruppe über einen Zeitraum von 0-42 Tagen ein und in einer zweiten Gruppe von Tag 0-14 und von Tag 22-28. Die Autoren stellen eine Reduktion der Mortalität fest, berichten jedoch über Aerocystitis (Entzündung der Luftsackschleimhäute) bei einem Großteil der Schlachttiere.

Sandhu und Dean (1980) führten Studien mit antibiotikaversetzten Futtermitteln bei Enten durch. Der Einsatz der medikamentierten Futtermittel begann am 21. Lebenstag und wurde bis zum 31. Lebenstag fortgeführt. Die experimentelle Infektion fand am 24. Lebenstag statt. Die Autoren zeigten, dass sowohl Chlortetrazyklin, als auch Erythromycin, Bacitracin, Tylosin-Sulfamethazin, Fosfomycin, Furazolidon und Penicillin nicht effektiv zur Behandlung von infizierten Enten sind. Der Einsatz von Enrofloxacin über das Trinkwasser in Konzentrationen von 50 ppm am ersten Tag nach der Infektion, gefolgt von 25 ppm für vier weitere Tage hat sich als sehr effektiv zur Absenkung der Mortalität experimentell infizierter Enten erwiesen (Turbahn et al., 1997).

2.1.8 Verfahren zur Resistenztestung

Zur Resistenztestung von Bakterien stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die eine qualitative oder quantitative Aussage über das Resistenzverhalten zulassen.

Mittels Disk-Diffusionstest können definierte Konzentrationen von bis zu 12 unterschiedlichen Wirkstoffen auf einer Agarplatte untersucht werden. Die Einteilung der Isolate in sensibel, intermediär und resistent wird anhand der Hemmhöfe vorgenommen, die um die Antibiotikaplättchen herum entstehen.

Agardilutionstest oder Mikrodilutionsverfahren ermöglichen hingegen eine quantitative Aussage über das Resistenzverhalten von Mikroorganismen (Schwarz et al., 2003).

Resistenztestungen erfolgen nach standardisierten Verfahren, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Für veterinärmedizinische Erreger gelten die CLSI-Richtlinien.

Die Testung humanmedizinischer Erreger ist sowohl durch EUCAST als auch CLSI geregelt. Definierte Referenzstämme (QC-Stämme) sind in den jeweiligen CLSI-Dokumenten gelistet und müssen als Qualitätskontrollen mitgeführt werden (CLSI, 2013; Schwarz et al., 2010a).

Um die Wirksamkeit der antimikrobiellen Substanz abhängig von der Zieltierart und dem betroffenen Organsystem zu beurteilen, liegen für die Interpretation von Ergebnissen klinische Breakpoints vor. Stehen für eine Kombination von antimikrobiellem Wirkstoff und bakteriellen Erreger noch keine Breakpoints zur Verfügung, können die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK), MHK_{50} und MHK_{90} (MHK für 50% bzw. 90% der getesteten Stämme) für die Auswertung und den Vergleich von Ergebnissen der Empfindlichkeitstestung herangezogen werden (Schwarz et al., 2010b). Der epidemiologische cut-off Wert ist eine weitere Möglichkeit eine Bakterienpopulation einzuschätzen. Anhand der Hemmhofzonen oder MHK-Werte kann eine Bakterienpopulation in eine Wildtyp (ohne erworbene Resistenzen) und eine nicht-Wildtyp Population (mit bereits erworbenen Resistenzmechanismen), die höhere MHK-Werte aufweist bzw. schmalere Hemmhöfe aufzeigt, eingeteilt werden (Schwarz et al. 2010).

Nach CLSI-Angaben, existieren weder für *R. anatipestifer*, noch für *O. rhinotracheale* standardisierte Verfahren zur Empfindlichkeitstestung. Es liegen für beide Erreger keine Einteilungen in sensibel, intermediär oder resistent vor, noch existieren klinische Breakpoints für die unterschiedlichen Wirkstoffklassen (CLSI, 2013).

2.1.9 Resistenzen und Resistenzgene bei *R. anatipestifer*

Gegenüber **β -Lactamen** variiert die Resistenzlage von *R. anatipestifer*-Isolaten in Abhängigkeit vom Antibiotikaeinsatz des jeweiligen Landes. Einen Überblick über die Resistenzlage gegenüber β -Lactamen und Cephalosporinen gibt Tab. 3 (siehe Anhang).

Verschiedene Autoren haben Untersuchungen zum Nachweis von β -Lactamase-Resistenz-Genen (*bla_{cmv-2}*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{DHA}* und *bla_{CTX-M}*) bei *R. anatipestifer* durchgeführt. Die aufgeführten β -Lactamase Resistenz-Gene konnten nicht detektiert werden (Sun et al., 2012; Zhong et al., 2009b). Sun et al. (2012) vermuten, dass andere β -Lactamase-Resistenzgene existieren, wie beispielsweise *bla_{OXA}*, welches kürzlich in einem taiwanesischen *R. anatipestifer*-Isolat detektiert wurde (Chen et al., 2012).

Resistenzen gegenüber **Aminoglycosiden** sind bis auf wenige Ausnahmen auf extrachromosomalen Elementen, wie Plasmiden und Transposons codiert (Davies and Wright, 1997). Sun et al. (2012) konnten mittels PCR sechs Aminoglycosid-modifizierende Enzyme bei *R. anatipestifer*-Isolaten identifizieren. Als verantwortlich für Resistenzen gegenüber Streptomycin und Spectinomycin wurden *aadA1* und *aadA2*-Gene gefunden. In 11 bzw. 4 Isolaten wurde das *aac(3')-IV* Gen bzw. das *aac(3')-IIc* Gen detektiert. Beide Gene vermitteln Resistenz gegenüber Tobramicin, Gentamicin und einige andere Wirkstoffe aus der Klasse der Aminoglycoside. Das *aph(3')-VII* Gen, welches Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin vermittelt, wurde in zwei Isolaten detektiert. In 67 *R. anatipestifer*-Isolaten wurde von den Autoren das *aac(6')-Ib* Gen detektiert, das unter anderem für Resistenzen gegenüber Amikain und Kanamycin codiert (Sun et al., 2012). Die Resistenzlage von *R. anatipestifer* gegenüber Aminoglycosiden ist in Tab. 3 dargestellt.

Die Resistenzlage von *R. anatipestifer*-Isolaten aus den ostasiatischen Ländern (Taiwan, China, Thailand) ist gegenüber der Antibiotikaklasse der **Fenicole** uneinheitlich. Obwohl Chloramphenicol in der EU seit 1994 und in Taiwan seit 2003 nicht mehr bei Lebensmittel liefernden Tieren zugelassen sind (EU-Verordnung, Nr. 37/2010), finden sich weiterhin Resistenzen bei *R. anatipestifer* (40,5% (Chen et al., 2010), 65,2% (Chen et al., 2012)). Mittels Agardilution untersuchte Isolate aus Thailand zeigten MHK₅₀-Werte von 1,56 mg/l für Chloramphenicol (Pathanasophon et al., 1993). Für Isolate aus Taiwan und China wurden MHK₅₀-Werte von 8 mg/l (Chang et al., 2003) bzw. 16 mg/l (Sun et al., 2012) ermittelt. Untersuchungen von anderen Autoren aus China und Taiwan ergaben in der Agardiffusion Resistenzraten für Chloramphenicol von 58,3% bzw. 77% (Yu et al., 2008; Zheng et al., 2012). In den USA waren alle Isolate von *R. anatipestifer* in der Agardiffusion für Chloramphenicol sensibel (Bangun et al., 1981). Ein Grund für die Resistenz gegenüber Chloramphenicol sind sogenannte Chloramphenicol Acetyltransferasen (CATs). Diese Gene liegen Plasmid-gebunden vor. Die Prävalenz der *cat*-Gene bei taiwanesischen Isolaten liegt bei 78,4% (Chen et al., 2010). CAT's sind nicht in der Lage Florfenicol zu inaktivieren (Schwarz et al., 2004). Resistenz gegenüber den Wirkstoffen Chloramphenicol und

Florfenicol bei *R. anatipestifer* werden zusätzlich durch das *floR* Gen vermittelt. Das Gen codiert für eine Efflux-Pumpe und wurde sowohl Plasmid-gebunden als auch auf der chromosomalen DNA gefunden (Chen et al., 2012). Bei chinesischen Isolaten wurden für Chloramphenicol und Florfenicol die Resistenzgene *cat2*, *cmlA*, *floR* gefunden (Sun et al., 2012).

(Fluor-) Chinolone entfalten ihre Wirkung über eine Interaktion mit den Enzymen DNA Gyrase (Untereinheiten *gyrA* und *gyrB*) und Topoisomerase IV (Untereinheiten *parC* und *parE*). Die Enzyme spielen eine wichtige Rolle für die Replikation des Chromosoms (Mühlemann, 2002). Spontanmutationen in den sogenannten „Resistenz-determinierenden Regionen“, der Untereinheiten *gyrA* und *parC* sind der Hauptgrund von Resistenzentstehung von verschiedenen Bakterienspezies gegenüber Fluorchinolonen, z.B. bei *Escherichia coli* (*E. coli*) (Gibson et al., 2010; Rastogi et al., 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Rubin et al., 2008), und *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Wang et al., 2010). Sun et al. (2012) berichteten über Punktmutationen des *gyrA*-Genes bei 34 von 49 *R. anatipestifer*-Isolaten. Diese wurden assoziiert mit einer reduzierten Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen. Weiterhin waren die Resistenzlevel von Isolaten mit Doppelmutationen in der *gyrA*-Region deutlich höher, als von Isolaten mit Einzelmutationen. Alle Isolate die eine Mutation in der *parC*-Region besaßen, zeigten hohe Level von Fluorchinolonresistenz bei Nalidixinsäure und Ciprofloxacin. Mutationen im *parC*-Gen assoziieren die Autoren mit Resistenz gegenüber Ciprofloxacin, da bei Isolaten mit Mutationen sowohl in der *gyrA*- als auch der *parC*-Region höhere MHK-Werte ermittelt wurden, als bei Isolaten mit Mutationen ausschließlich im *gyrA*-Gen (Sun et al., 2012). In Tab.3 ist die Resistenzlage von *R. anatipestifer* gegenüber Enrofloxacin, Ciprofloxacin und Nalidixinsäure dargestellt.

Makrolid- und Lincosamidantibiotika sind chemisch unterschiedlich, teilen sich jedoch den gleichen Wirkmechanismus – den Angriffspunkt an der 50S-Untereinheit der Ribosomen. Das Wirkungsspektrum umfasst hauptsächlich gram-positive Kokken. Gram-negative Keime sind allgemein resistent, mit einigen wichtigen Ausnahmen (z.B. *Bordetella pertussis*, *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Helicobacter*, und *Legionella* sp.) (Leclercq, 2002). Die Modifikation der ribosomalen Zielstruktur verleiht Breitspektrum-Resistenz gegenüber Makroliden und Lincosamiden. Effluxmechanismen und enzymatische Inaktivierung wirken sich nur auf einige Wirkstoffe der einen oder anderen Antibiotikaklasse aus (Leclercq, 2002). Innerhalb der Erythromycin-Gruppe besteht weitgehend Kreuzresistenz. *R. anatipestifer*-Isolate aus China, die mittels Agardiffusion untersucht wurden, weisen Resistenzen von 32,7% (Zhong et al., 2009a) bzw. 35,4% (Zheng et al., 2012) gegenüber Erythromycin auf.

Bei Isolaten aus Taiwan und den USA lagen die mittels Agardiffusion ermittelten Resistenzraten gegenüber Erythromycin bei 64% bzw. 85% (Bangun et al., 1981; Yu et al., 2008). Aus Thailand stammende Untersuchungen via Agardilution ergaben für Erythromycin und Tylosin einen MHK₅₀ Wert von <0,2 mg/l und MHK₉₀-Werte von 0,39 mg/l bzw. 1,56 mg/l (Pathanasophon et al., 1993) (Tab. 3).

Erworbene Resistenzen gegenüber Vertretern der Klasse der **Tetryzykline** werden durch verschiedene *tet*-Gene vermittelt (Chopra and Roberts, 2001), die einen von drei Resistenzmechanismen regulieren; Efflux-Pumpen, ribosomale Schutzproteine oder direkte enzymatische Inaktivierung von Wirkstoffen. Sun et al. (2012) fanden bei der Untersuchung von 103 *R. anatipestifer*-Isolaten *tet(A)*-, *tet(B)*- und *tet(C)*-Resistenzgene (Sun et al., 2012). Zhong et al. (2013) detektierten *tet(A)*-, *tet(C)*- und *tet(M)*-Resistenzgene in *R. anatipestifer*-Isolaten. In Versuchen unter Einfluss verschiedener Konzentrationen der Wirkstoffe Tetracyclin und Doxycyclin wurde ermittelt, dass *tet(C)* eine effektivere Resistenz gegenüber Doxycyclin vermittelt als gegenüber Tetracyclin. Weiterhin war die Resistenz von *tet(C)* exprimierenden Stämmen höher, als die von *tet(M)* exprimierenden Stämmen (Zhong et al., 2013). Resistenzergebnisse für Wirkstoffe aus der Klasse der Tetryzykline ermittelt durch Agardilution und Agardiffusion in verschiedenen Ländern, sind in Tab. 3 einzusehen.

Bedingt durch den langen und weit verbreiteten Einsatz von **Sulfonamiden** haben zahlreiche Bakterienstämme eine Resistenz gegen sie entwickelt. Auffallend ist dies besonders in Ländern wie China (Sun et al., 2012; Zhong et al., 2009a), Indien (Priya et al., 2008) und Taiwan (Yu et al., 2008) (Tab. 3). In chinesischen *R. anatipestifer*-Isolaten wurden die Resistenzgene *sul-1* und *sul-2* für Sulfonamide gefunden (Sun et al., 2012). Andere Resistenzgene sind bei *R. anatipestifer* bislang nicht erforscht worden.

Das Auftreten von Resistenzen gegenüber **Colistin** ist ungewöhnlich und bezüglich der Resistenzmechanismen sind nur limitierte Daten vorhanden (Li et al., 2005). Wenn es zur Resistenzentwicklung kommt, erfolgt dies sowohl *in-vitro* wie auch *in-vivo* langsam (Taylor and Allison, 1962). Gramnegative Bakterien können eine Colistin-Resistenz mittels Mutation oder Anpassungsmechanismus entwickeln (Falagas and Kasiakou, 2005). Einerseits wird die Modifikation von Lipid A, einer Komponente der Lipopolysaccharide als Mechanismus der Colistin-Resistenz in gram-negativen Bakterien vermutet (Cai et al., 2012). Andererseits wurde kürzlich in China (Liu et al., 2016), wenig später in Deutschland (Irrgang et al., 2016) ein Colistinresistenzgen (*mrc-1*) auf einem Plasmid detektiert. Xavier et al. (2016) detektierten in Belgien ein weiteres mobiles Resistenzgen (*mrc-2*).

In Taiwan wurden *R. anatipestifer*-Isolate von Enten und Gänsen mittels Agardiffusion untersucht. Es wurde eine Resistenzrate von 73% ermittelt (Yu et al., 2008). Untersuchungen mittels Agardilution von thailändischen Isolaten ergaben MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte von >50 mg/l (Pathanasophon et al., 1993) (Tab.3).

In den gesamten Studien zur Resistenztestung von *R. anatipestifer*-Isolaten wurde von sieben Autoren Agardilution und von sechs Autoren Agardiffusion durchgeführt (Tab. 3). Die Agardilution wurde sowohl in älteren, als auch neueren Studien angewendet. Daraus lässt sich schließen, dass die Methodenwahl laborabhängig ist. Die Auswahl der Testmedien richtete sich bei den meisten Autoren nach den Vorgaben CLSI für ähnliche Erreger. Als Medium für beide Methoden wurde nach CLSI-Angaben für anspruchsvolle Erreger und spezielle Veterinärpathogene fast einheitlich Mueller-Hinton Agar (MH-Agar) mit 5% Schafblut verwendet (CLSI, 2013). Bei zwei Autoren differierten die Supplemente. Sun et al. (2012) fügte dem MH-Agar 5% Kälberserum hinzu, Pathanasophon et al. (1997) supplementierten die Agargrundlage mit 0,3% Hefeextrakt.

Da in den CLSI-Dokumenten keine Breakpoints für *R. anatipestifer* vorhanden sind, wurde von einer Vielzahl der Autoren die Breakpoints von anderen Erregern für die jeweiligen Wirkstoffe abgeleitet. Aufgrund fehlender CLSI-geprüfter Breakpoints definierten Chen et al. (2012) *R. anatipestifer*-Isolate als empfindlich (≤ 2 mg/l) intermediär (4 mg/l) und resistent (≥ 8 mg/l) gegenüber Florfenicol auf der Basis von Breakpoints von Atemwegspathogenen von Rindern und Schweinen.

Yu et al. (2008) bewertete die Resistenzlage nach den CLSI- Interpretationskriterien für *E. coli*. Als Grundlage für die Einteilung von *R. anatipestifer*-Stämmen dienten auch die aus der Humanmedizin abgeleiteten standardisierten Bewertungskriterien für Hemmhofdurchmesser (Agardiffusion) und Breakpoints für die minimalen Hemmwerte (Agardilution, Mikrodilution) für Veterinärpathogene (Sun et al.2012; Zhong et al. 2009a). Bei Pathanasophon et al. (1993), Turbahn et al. (1997), Behr (2007) und Priya et al. (2008) wurde keine Bewertungsgrundlage für die Interpretation der Resistenzlage von untersuchten *R. anatipestifer*-Isolaten genannt.

2.2 *Ornithobacterium rhinotracheale*

2.2.1 Definition

Der Erreger *O. rhinotracheale* ist ein hochinfektiöses Agens, das beim Geflügel zu einer akut bis subakut verlaufenden bakteriellen Atemwegserkrankung führt. Die Ornithobakteriose zeichnet sich vor allem durch exsudativ-entzündliche Prozesse aus, die sich im oberen als auch unteren Respirationstrakt manifestieren (Hinz and Hafez, 1997).

2.2.2 Geschichte

Erstmals wurde der Erreger von Brozeit im Jahre 1981 isoliert (Brozeit, 1981). Der Autor beobachtete eine Atemwegserkrankung bei fünf Wochen alten Puten in Deutschland, die sich in Nasenausfluss, Gesichtssödem und purulenter Luftsackentzündung äußerte. Neben *E. coli* konnte ein phänotypisch mit *Pasteurella (Riemerella) anatipestifer* verwandtes, unbekanntes Stäbchen isoliert werden. In Deutschland berichteten Hafez et al. (1993) über eine Atemwegsinfektion bei Mastputen, die ebenfalls durch ein pasteurella-ähnliches Bakterium ausgelöst wurde, welches einige Jahre zuvor bereits in England bei Mastputen beobachtet worden war (Wilding, 1986). Zwei Jahre später gelang die Isolierung des unbekanntes Bakteriums aus Putenorganen (Baxter-Jones, 1988). In Israel wurde der Erreger in Puten unterschiedlichen Alters mit exsudativer Lungen- und Luftsackentzündung isoliert (Bock et al., 1995). In Ungarn brachten Tanyi et al. (1995) ein *Pasteurella-like* Bakterium mit Atemwegserkrankungen bei 6-10 Wochen alten Enten in Verbindung. Berichte über Atemwegsinfektionen mit einem unbekanntes pleomorphen, gram-negativen Stäbchenbakterium reichen von Belgien (Wyffels and Hommez, 1990) über Frankreich (Bissuel, 1988; Dudouyt et al., 1995; Leorat et al., 1994), Afrika (Elgohary and Awaad, 1998; Travers, 1996) bis nach Nord- und Südamerika (Back et al., 1998; Charlton et al., 1993; Hung and Alvarado, 2001; Odor et al., 1997; Roepke et al., 1998; Rosa et al., 1996; Soriano et al., 2002; Sprenger et al., 2000), Kanada (Joubert et al., 1999) sowie in einigen asiatischen Ländern (Bock et al., 1995; El-Sukhon et al., 2002; Sakai et al., 2000).

2.2.3 Klassifikation

Beichel grenzte das Bakterium 1986 von der Familie der Pasteurellaceae ab (Beichel, 1986). 1988 wurde das zunächst noch unbekanntes Bakterium in England von Baxter-Jones aus Putenorganen wieder isoliert und Bisgaard ordnete den Erreger auf Grund phänotypischer

Unterschiede zur Familie Pasteurellaceae in eine eigene Gruppe, das Taxon 28, ein (Hinz and Hafez, 1997). Eindeutige Beweise für die taxonomische Verwandtschaft zum Flavobakterium-Cytophaga-Komplex wurden von Mouahid gefunden (Mouahid et al., 1992). Die Einordnung des bisher unbenannten Bakteriums gelang Vandamme et al.(1994). Nach Durchführung von genetischen und taxonomischen Untersuchungen der Eigenschaften, wurde der Genus-Name *Ornithobacterium* vorgeschlagen und der Speziesname *rhinotracheale* festgelegt. Somit wurde das neue Bakterium als *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov. bezeichnet. Es erfolgte die Einordnung in die rRNA Superfamilie V (Vandamme et al., 1994).

2.2.4 Morphologie und kulturelle Eigenschaften

O. rhinotracheale ist ein gram-negatives unbewegliches Stäbchenbakterium der rRNA Superfamilie V. Nach Vandamme et al. (1994) besteht eine enge Verwandtschaft zu den geflügelpathogenen Erregern *Riemerella anatipestifer* und *Coenia anatina*. Der Erreger weist eine ausgeprägte Pleomorphie auf und variiert in seiner Größe von 0,2 bis 0,9 Mikrometer (μm) in der Breite und 0,6 bis 5 μm in der Länge (Vandamme et al., 1994).

O. rhinotracheale wächst aerob, microaerophil, als auch unter anaeroben Bedingungen. Die Inkubation unter Zusatz von 5% bis 10% CO_2 wirkt sich positiv auf das Wachstum aus. Der Erreger vermehrt sich bei Temperaturen von 30°C bis 45°C. Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 37°C. Als Anzuchtmedium eignet sich am besten 5%-10%iger Schafblutagar. Gutes Wachstum ist auch auf Schokoladen- und Trypticase Soja Agar zu verzeichnen. Kein Wachstum findet dagegen auf McConkey Agar, Gassner-, Endo- und Drigalski-Agar sowie Simmons-Citrate-Medium statt (Hinz et al., 1994; Soriano et al., 2002; Vandamme et al., 1994).

Schmale punktförmige graue bis grau-weiße Kolonien, manchmal mit einem rötlichen Schimmer, sind nach 24 bis 48 h Inkubation zu beobachten. Der Erreger entwickelt einen typischen Geruch nach Buttersäure (Hafez, 1998b; Vandamme et al., 1994).

In Flüssignährmedien wie Pasteurellabouillon, Peptonwasser, Todd-Hewitt-Bouillon und BHI wächst *O. rhinotracheale* nur in geringem Maße (Hafez, 1998b). Nach Supplementierung von BHI mit 1% Pferdeserum wurde gutes Wachstum des Erregers beobachtet (Soriano et al., 2002).

Einzelne *O. rhinotracheale*-Isolate zeigen bei Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 h eine typische aber schwache β -Hämolyse auf Schafblutagar (Tabatabai et al., 2010).

Hämagglutinierende Eigenschaften wurden von verschiedenen Autoren beobachtet (Chansiripornchai, 2004; Fitzgerald et al., 1998; Soriano et al., 2002; Tsai and Huang, 2006; Vega et al., 2008). Zwischen den neun getesteten Referenzstämmen traten sowohl Unterschiede gegenüber Erythrozyten verschiedener Vogelspezies, als auch verschiedener Säugetierspezies auf. Alle neun Referenzstämme waren in der Lage Kaninchenerythrozyten zu agglutinieren (Vega et al., 2008).

Bei Feldisolaten von Tauben konnten Tsai und Huang (2006) keine Hämagglutination beobachten. Die Kolonien waren sehr klein. In derselben Untersuchung wiesen die Hühnerisolate dagegen sehr häufig hämagglutinierende Eigenschaften sowie größere Kolonien auf. Chansiripornchai (2004) wiesen nach, dass der Erreger die Fähigkeit zur Hämagglutination in Flüssignährmedien verlor, stattdessen aber ein starkes Adhäsionsverhalten gegenüber Epithelzellen entwickelte. Von Walters et al. wurden hämolysierende und nicht hämolysierende Feldisolate von *O. rhinotracheale* im Tierversuch verglichen. Die Autoren stellten fest, dass nicht hämolysierende Isolate eine längere Überlebensdauer von bis zu 21 Tagen im Wirt aufweisen, während hämolysierende nur bis Tag 14 nach Inokulation reisoliert werden konnten. Nicht hämolysierende Isolate bewirkten zwar höhere Antikörpertiter, infizierte Tiere entwickelten jedoch schwere Lungenläsionen und zeigten schlechte Gewichtszunahmen (Walters et al., 2014).

2.2.5 Biochemische Eigenschaften

Die biochemischen Reaktionen von *O. rhinotracheale* sind auch unter optimalen Bedingungen nicht immer einheitlich. Positive Reaktionen wurden für α - und β -Galaktosidase, α -Glucosidase, alkalische und saure Phosphatase, Esterase, N-Acetylglucosaminidase, Phosphohydrolase sowie für Leucin-, Valin-, Cystin-, Trypsin- und Chymotrypsin-Arginylamidase erfasst. Die Produktion von Säure aus Kohlenhydraten ist bei Fruktose, Glucose, Laktose, Galaktose, Maltose und Mannose variabel (Chin and Charlton, 1998; Popp, 2003; van Empel and Hafez, 1999). Die Katalase-, Gelatinase-, Lysin-Decarboxylase- und Ornithin-Decarboxylase-Reaktion verläuft negativ. Ebenso sind für die Indolproduktion, die Nitratreduktion und die Säureproduktion aus Sorbitol und Dulcitol negative Reaktionen zu beobachten (Canal et al., 2005; Soriano et al., 2002). Die Esterase-, Chymotrypsin-, Urease- und Arginid-Hydrolase-Reaktion wird als variabel eingestuft (Chin and Charlton, 1998; Hinz et al., 1994; van Beek et al., 1994; van Empel and Hafez, 1999; Vandamme et al., 1994). Nachdem Travers et al. (1996) und Ryll et al. (2002) einen

Cytochromoxidase-negativen Stamm von *O. rhinotracheale* differenzieren konnten, wird diese Reaktion ebenfalls als variabel eingestuft (Tab.4).

Tab. 4: Biochemische Reaktionen von *O. rhinotracheale*

| Biochemischer Test | Reaktion <i>O. rhinotracheale</i> | Autor |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------|
| Säurebildung aus Kohlenhydraten: | | |
| Glukose | variabel | *1,3,4 |
| Laktose | variabel | *1,3,4 |
| Maltose | variabel | *1,3,4 |
| Galaktose | variabel | *3,4 |
| Mannose | variabel | *1,4 |
| Fruktose | variabel | *1,3,4 |
| Sorbitol | - | *1 |
| Dulcitol | - | *1 |
| Katalase | - | *1,3,4,5 |
| Oxidase | + | *1,3,4,5 |
| α -Galaktosidase | + | *4 |
| β -Galaktosidase | + | *3,4 |
| α -Glukosidase | + | *3,4 |
| β -Glukoronidase | - | *3,4 |
| α -Mannosidase | - | *3,4 |
| α -Fucosidase | - | *4 |
| Alkalische Phosphatase | + | *3,4 |
| Esterase | variabel | *3,4 |
| Esterase Lipase | + | *3,4 |
| Lipase | - | *3 |
| Leucin arylamidase | + | *3,4 |
| Valin arylamidase | + | *4 |
| Cystin arylamidase | + | *3,4 |
| Trypsin | + | *2,4 |
| Chymotrypsin | variabel | *2,3,4 |

Fortsetzung Tab. 4

| Biochemischer Test | Reaktion <i>O. rhinotracheale</i> | Autor |
|---|--------------------------------------|----------|
| Saure Phosphatase | + | *2,4 |
| Phosphohydrolase | + | *2,4 |
| N-Acetyl- β -Glucosaminidase | + | *2,4 |
| Indol | - | *2,3,4,5 |
| Urease | variabel | *1,2,4,5 |
| Gelatinase | - | *3 |
| Arginindehydrolase | variabel | *1,2,3,4 |
| Voges-Proskauer | + | *1 |
| Reduktion von Nitrat zu Nitrit | - | *3 |
| p-nitrophenyl- β -D galactopyranoside (PNPG) | + | *3,5 |

Quellen: Canal et al., 2005^{*1}; Chin and Charlton, 1998^{*2}; Van Empel und Hafez, 1999^{*3}; Popp, 2003^{*4}; Soriano et al., 2002^{*5}

2.2.6 Typisierung und genetische Diversität

Bis zum heutigen Zeitpunkt können unter Verwendung monovalenter Antisera und hitzestabilem Antigen 18 verschiedene Serotypen (A-R) bei *O. rhinotracheale* unterschieden werden (Hafez, 2002). Es stehen verschiedene Testmethoden zur Verfügung (Agargelpräzipitationstest (AGP), Schnellagglutination und Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)). Der AGP-Test wird jedoch als bevorzugte Methode angesehen (Hafez and Sting, 1999; van Empel et al., 1997). Je nach Aufbereitung der Antigene und angewandter Methode kommt es zu Kreuzreaktionen zwischen den verschiedenen Serotypen (Hafez, 1996; van Empel et al., 1997; van Empel, 1998b). Hafez und Sting (1999) beschrieben verschiedene Arten der Antigenaufbereitung und wiesen nach, dass hitzestabile und Proteinase-K-stabile Antigene im AGP spezifische Reaktionen für die Serotypen A, C, D, E und G zeigten. Kreuzreaktionen traten nur zwischen den Serotypen B, A und E auf. Als wenig geeignet für die Serotypisierung erwiesen sich mit mittels Sodiumdodecyl-Sulfat (SDS) aufbereitete Antigene. Diese erzeugten im AGP gegenüber allen getesteten Antisera, außer C, Kreuzreaktionen.

Durch den Einsatz des PCR-Fingerprintings mit den Primern M13 und ERIC 1R gelang es auf molekularer Ebene Unterschiede zwischen den meisten getesteten Serotypen, außer zwischen A und B, nachzuweisen (Hafez and Beyer, 1997). Es stehen weitere Typisierungsmethoden wie Multilocus Enzyme Elektrophorese (MLEE), sowie die Sequenzierung des 16S rRNA-Genes (Amonsin et al., 1997), „random amplified polymorphic DNA“ (RAPD) (Leroy-Setrin et al., 1998) oder „amplified fragment length polymorphism“ (AFLP) (van Empel, 1998b) zur Verfügung. Amonsin et al., (1997) untersuchten 55 *O. rhinotracheale*-Isolate aus acht verschiedenen Ländern und vier unterschiedlichen Kontinenten mittels MLEE. Diese konnten in sechs elektrophoretische Typen (ETs) eingeteilt werden. Isolate von domestiziertem Geflügel wurden dem ET 1-Komplex zugeordnet, wohingegen keines der Isolate von Krähen und Perlhuhn zum ET 1-Komplex passte. Die Ergebnisse ließen die Autoren eine Wirtsspezifität der *O. rhinotracheale*-Isolate vermuten. Eine Analyse der Isolate mittels repetitive extragenic palindromic-PCR (rep-PCR) zeigte, dass *O. rhinotracheale*-Isolate die, Sperlingsvögel (Krähen) infizieren, sich genetisch von Isolatenunterscheiden die infektionen bei Hühnervögeln (Huhn, Pute, Perlhuhn) auslösen. Popp und Hafez (2003) untersuchten 119 *O. rhinotracheale*-Isolate mittels PFGE. Für den Restriktionsverdau wurde das Enzym Sall eingesetzt. Das Ergebnis der genetischen Analyse zeigte eine deutliche Diversität der DNA-Fragmentmuster. In der Clusteranalyse ergab sich eine genetische Ähnlichkeit von 41%. Daraus ließ sich eine hohe genomische Heterogenität der Spezies ableiten. Zwischen den Standardstämmen verschiedener Serotypen ergab sich eine geringe genetische Distanz. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass es sich hierbei teilweise um genetisch nah verwandte Stämme handelt. Isolate von Hühnern und Puten waren in mehreren Gruppen zu finden und bildeten keine erkennbaren Subpopulationen. Daher konnte kein Zusammenhang zwischen der Makrorestriktionsanalyse (MRA) und der Tierart abgeleitet werden. Isolate vom Serotyp A, die von Puten aus Deutschland isoliert worden waren, wiesen eine hohe Variabilität auf. Serotyp B-Isolate wiesen hingegen eine geringe Variabilität auf. Der Vergleich von *O. rhinotracheale*-Isolaten aus verschiedenen Ursprungsländern, wies eine hohe Einheitlichkeit innerhalb der Serotypen auf, unabhängig von der Wirtsspezies. Auf Grund dessen vermutete Waldow (2009) einen Zusammenhang zwischen Ursprungsland des Isolates, Serotyp und DNA-Bandenmuster.

2.2.7 Klinik und Pathologie

Klinische Erscheinungen und Krankheitsverlauf, als auch die Mortalitätsrate sind sehr variabel bei einer *O. rhinotracheale*-Infektion. Schlechtes Management, Stress, schlechte Hygiene und Einstreuqualität, inadäquate Belüftung, hohe Besatzdichte, zu hoher Ammoniakgehalt, hohe Staubbelastung und bakterielle Begleitinfektionen sind Parameter die sich negativ auf den Verlauf der Infektion auswirken (Hafez, 1996; Rosa et al., 1996; Tanyi et al., 1995). Die Schwere, als auch der Verlauf der Infektion zeigt saisonale Schwankungen. Die Prävalenz der Infektion ist in den Herbst- und Wintermonaten höher (Lopes et al., 2002; Roepke et al., 1998). Männliche, schwere Tiere zeigten einen ausgeprägteren Verlauf einer *O. rhinotracheale*-Infektion (Rosa et al., 1996; Zorman-Rojs et al., 2000).

Die Initialphase einer *O. rhinotracheale*-Infektion ist gekennzeichnet durch gestörtes Allgemeinbefinden. Es schließen sich respiratorische Symptome wie Husten, Niesen und Nasenausfluss an. Bei einzelnen Tieren kann es zu akuten Symptomen wie Festliegen und Atemnot mit Schnabelatmung kommen (Bock et al., 1995; Hafez, 1994).

Pathologisch-anatomische Veränderungen können bei *O. rhinotracheale*-Infektionen sehr vielfältig sein. Bei verendeten Puten wurde das Vorkommen von Lungenödemen und beidseitigen fibrinopurulenten Pneumonien beschrieben. Fibrinöse Aerosacculitis sowie serofibrinöse Pericarditis und Peritonitis wurden von vielen Autoren beobachtet (Hafez and Friedrich, 1998; Hauck et al., 2015; Joubert et al., 1999; Roepke et al., 1998; Rosa et al., 1996; Ryll et al., 2002; Sprenger et al., 1998; van Beek et al., 1994).

Neben den genannten Veränderungen am Respirationstrakt beobachteten El-Gohary und Awaad (1998) und Sprenger *et al.* (2000) bei Legehennen, Koga und Zavaleta (2005) bei Hennen im Allgemeinen Oophoritis, Eiperitonitis und veränderte Follikel (rupturiert, hämorrhagisch, aträsiert). De Rosa et al., (1996) und Joubert et al., (1999) fanden bei Putenelterntieren Deformationen des Ovars, als auch vereinzelt Arthritiden. Fibrinopurulente Entzündungen der Schädelknochen, sowie Meningitis wurden von vielen Autoren im Rahmen einer *O. rhinotracheale*-Infektion beschrieben (Elgohary and Awaad, 1998; Koga and Zavaleta, 2005; Sprenger et al., 2000; Szalay et al., 2002).

2.2.8 Therapie

O. rhinotracheale-Stämme weisen in Abhängigkeit vom Herkunftsland und den dort eingesetzten Chemotherapeutika eine sehr inkonstante Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen auf. Die therapeutische Behandlung der Krankheit kann

schwierig sein, da eine erworbene Resistenz gegen die üblichen Antibiotika innerhalb dieses Genus sehr häufig vorkommt (van Empel and Hafez, 1999). In Deutschland wurden mit dem Einsatz von 200-300 ppm Amoxicillin für 3 – 7 Tage über das Trinkwasser bei einer *O. rhinotracheale*-Infektion bei Puten gute Ergebnisse erzielt (Hafez et al., 1993). Marien et al. (2007) konnten die Wirkung von Amoxicillin bei von Aviären Pneumovirus (APV), *O. rhinotracheale* und *E. coli* infizierten Puten in Belgien nicht bestätigen (Marien et al., 2007). Die Behandlung mit Enrofloxacin in Tierversuchen, als auch im Feld erzielte in Belgien (Garmyn et al., 2009; Marien et al., 2007) gute Ergebnisse. Die Verabreichung von Enrofloxacin über fünf Tage reduzierte die Klinik bei infizierten Hühnern im Iran deutlich (Mousavi et al., 2011). Joubert et al. (1999) aus Kanada konnten bei dem Einsatz von Enrofloxacin bei Puten hingegen keine Besserung der Symptome feststellen. Durch den metaphylaktischen Einsatz von Tilmicosin in einer Dosierung von 15 mg/kg über fünf Tage werden klinische Symptome bei Broilern als auch Mastputen effektiv gemildert und die Verwurfraten auf den Schlachthöfen deutlich reduziert (Warner et al., 2009).

2.2.9 Resistenzverhalten von *O. rhinotracheale*

Zur Empfindlichkeitstestung von bakteriellen Erregern gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen finden als mögliche Testverfahren die Agardilution bzw. die Dilutionsmethoden (Mikro- und Makrodilution) Anwendung.

Bei der Untersuchung von belgischen Isolaten aus der Nutztierhaltung (Hühner und Puten) in der Agardilution, fanden Devriese et al., (1995) hohe erworbene Resistenzen von *O. rhinotracheale* gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen, im Vergleich zu Wildvogelisolaten, die aus Saatkrähen gewonnen wurden. Die minimalen Hemmwerte (MHK-Werte) für β -Lactam-Antibiotika der Wirtschaftsgeflügel-Isolate, inklusive des Referenzstammes erwiesen sich als fünf bis zwanzig Mal höher, als die der Krähenisolate. Geringe MHK-Werte der Wildstämme wurden weiterhin für Tetrazykline und Flurorchinolone ermittelt. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten die Autoren, dass die Krähenisolate den natürlichen Sensitivitätsstatus von *O. rhinotracheale* repräsentieren, während die Hühnerisolate deutlich erworbene Resistenzen aufwiesen. Bei weiteren Untersuchungen zur Resistenzlage belgischer *O. rhinotracheale* Stämme ermittelten Devriese et al. (2001) sowohl eine rückläufige Empfindlichkeit für β -Lactam-Antibiotika (Ceftiofur und Ampicillin), als auch für Makrolide (Tylosin, Spiramycin, Lincomycin, Tilmicosin). Bei Enrofloxacin und

Doxycyclin wurden kaum Veränderungen in der Resistenzlage gefunden (Tab.5, siehe Anhang).

Die **Fluorchinolone** Enrofloxacin, Nalidixinsäure und Flumequine wurden von vielen Autoren als wirksam gegen *O. rhinotracheale* beschrieben (Dudouyt et al., 1995; El-Sukhon et al., 2002; Erganis et al., 2012; Marien et al., 2007; Murthy et al., 2008; Odor et al., 1997). Eine zunehmende Empfindlichkeit für Enrofloxacin beobachteten Bock et al. (1998) über einen Zeitraum von 1995 bis 1997. Studien aus Slowenien (Zorman-Rojs et al., 2000) und dem Iran (Asadpour et al., 2011) weisen auf hohe Resistenzen gegenüber Enrofloxacin und Flumequine hin.

Resistenzen gegenüber **Aminoglycosiden** (Gentamicin, Neomycin, Spektinomycin, Kanamycin) waren ein häufiges Ergebnis in Empfindlichkeitsstudien (Ak and Turan, 2001; Banani et al., 2004; Erganis et al., 2012; Malik et al., 2003; Murthy et al., 2008; Siddique et al., 2008; Soriano et al., 2003; Varga et al., 2001; Zorman-Rojs et al., 2000). In den USA (Odor et al., 1997), Slowenien (Zorman-Rojs et al., 2000) und Pakistan (Siddique et al., 2008) wurden in Untersuchungen allerdings auch für Spectinomycin und Kanamycin empfindliche Isolate gefunden (Tab.5).

Für die **Makrolide** Erythromycin, Tylosin und Tilmicosin stellt sich die Resistenzlage für *O. rhinotracheale* ebenso uneinheitlich dar. In Ungarn reagierten nach Varga et al. (2001) alle isolierten Stämme sensibel für die angegebenen Makrolide. Französische Isolate waren zu 88% gegenüber Tilmicosin und zu 93% gegenüber Tylosin empfindlich (Zadjian et al., 2009). Mittels Makrodilution untersuchte Stämme aus der Türkei waren sensibel für Tilmicosin (Ak and Turan, 2001). Bei Untersuchungen von Isolaten aus den USA wurden Empfindlichkeiten für Erythromycin und Tylosin gefunden (Nagaraja et al., 1998). Odor et al. (1997) und Malik et al. (2003) wiesen mittels Agardiffusion ebenfalls Sensibilität für Erythromycin von amerikanischen Isolaten nach. El-Sukhon et al., (2002) berichtet aus Jordanien über Resistenzraten von 93,3% gegen Erythromycin. In Taiwan ermittelten Tsai und Huang (2006) Resistenzraten von 96,4% gegenüber Erythromycin. Ähnliche Ergebnisse für Erythromycin liegen von Banani et al. (2004) und Asadpour et al. (2011) aus dem Iran vor (Tab.5).

Angaben über den Sensibilitätsstatus von **Tetrazyklinen** (vor allem Tetrazyklin und Oxytetrazyklin) reichen von sensibel (El-Sukhon et al., 2002; Erganis et al., 2012; Murthy et al., 2008; Odor et al., 1997; Zorman-Rojs et al., 2000) über variabel (Dudouyt et al., 1995; Leorat et al., 2007) bis hin zu resistent (Asadpour et al., 2011; Banani et al., 2004; Mirzaie et al., 2011). Mousavi et al. (2011) beschreiben in vitro als auch in vivo eine gute Wirksamkeit von Doxycyclin. Studien aus Pakistan (Siddique et al., 2008) und Indien (Murthy et al., 2008)

zeigen ebenfalls eine hohe Empfindlichkeit untersuchter *O. rhinotracheale* Isolate für Doxyzyklin. Die Unempfindlichkeit von *O. rhinotracheale*-Isolaten gegenüber **Sulfonamiden in Kombination mit Trimethoprim** wurde in vitro von vielen Autoren ermittelt (Tab. 5).

Die Resistenzlage von *O. rhinotracheale* gegenüber den **Polypeptid-Antibiotika** Polymyxin B und Colistin gestaltet sich einheitlich. Beide Wirkstoffe werden von allen Autoren als unwirksam beschrieben (Banani et al., 2004; Bock et al., 1998; Dudouyt et al., 1995; El-Sukhon et al., 2002; Hafez and Friedrich, 1998; Varga et al., 2001). Im Gegensatz dazu erwies sich Bacitracin als effektiv in der Hemmung des Wachstums von *O. rhinotracheale* (Odor et al., 1997; Zorman-Rojs et al., 2000).

Für die Behandlung von *O. rhinotracheale*-Infektionen erwies sich der Wirkstoff Tiamulin aus der Klasse der **Pleuromutiline** als wirksam (Banani et al., 2004; Devriese et al., 2001; Varga et al., 2001). Deutsche Isolate weisen niedrige MHK-Werte von 0,5 mg/l auf, und wurden somit als empfindlich eingestuft (Popp, 2003). Bei den Autoren Mousavi et al. (2011) und Asadpour et al. (2011) aus dem Iran gehen die Untersuchungsergebnisse zur Resistenzlage auseinander. Während Asadpour et al. (2011) in vitro eine gute Wirksamkeit des Wirkstoffes ermitteln, finden Mousavi et al. (2011) sowohl in vitro als auch in vivo nur eine mäßige Wirkung (Asadpour et al., 2011; Mousavi et al., 2011) (Tab.5).

Gegenüber Penicillin, Amoxicillin und Ampicillin aus der Klasse der **Penicilline** wurden die Bakterien weitestgehend als sensibel eingestuft (Tab.5). Devriese et al. (2001) und Ak und Turan (2001) beschreiben jedoch zunehmende Resistenzen gegenüber Penicillin.

Untersuchungen aus Jordanien (El-Sukhon et al., 2002), Deutschland (Marien et al., 2007) und dem Iran (Mirzaie et al., 2011) ergaben eine Unempfindlichkeit von *O. rhinotracheale*-Isolaten gegenüber Amoxicillin bzw. Ampicillin oder gegenüber beiden Wirkstoffen.

Die Resistenzlage bei den **Lincosamiden** wie Lincomycin und Clindamycin ist ebenfalls anhängig von den jeweilig im Ursprungsland eingesetzten Wirkstoffen. Isolate aus den USA, Israel und Slowenien weisen hohe Sensitivität auf (Bock et al., 1998; Malik et al., 2003; Odor et al., 1997; Zorman-Rojs et al., 2000). Von Autoren aus Belgien (Devriese et al., 2001; Devriese et al., 1995) und dem Iran (Asadpour et al., 2011; Banani et al., 2004) werden hohe Resistenzraten gegenüber Lincomycin beschrieben. Die Kombination aus Lincomycin und Spectinomycin wurde in Ungarn (Varga et al., 2001) als unwirksam beschrieben, während pakistanische Isolate empfindlich reagieren (Siddique et al., 2008) (Tab.5).

Insgesamt wurde zur Empfindlichkeitstestung von *O. rhinotracheale*-Isolaten von 12 Autoren (Tab.5) der Agardiffusionstest angewendet. In der Auswahl der Medien für die Methode bestehen jedoch Unterschiede. Malik et al. (2003) und Erganis et al. (2012) orientierten sich

an den Vorgaben des CLSI (2002) und verwendeten für den Diffusionstest reinen MH-Agar. Tsai und Huang (2006) und Murthy et al. (2008) nutzten mit 5% bzw. 10% Schafblut supplementierten MH-Agar (CLSI, 2002; NCCLS, 1998). Bei Siddique et al. (2008) und Banani et al. (2004) kam ebenfalls MHA nach den Angaben von Bauer zum Einsatz (Bauer et al., 1966). Andere Autoren (Asadpour et al., 2011; El-Sukhon et al., 2002; Mirzaie et al., 2011) verwendeten zur Empfindlichkeitstestung Blutagar mit 5% Schafblut. Van Veen et al. (2001) supplementierte den Schafblutagar mit Thymidinphosphorylase. Zur Interpretation der Ergebnisse der Empfindlichkeitstestung mittels Agardiffusionstest wurden von einigen Autoren die Kriterien des NCCLS (1998) bzw. CLSI (2002) für anspruchsvolle gram-negative Erreger herangezogen (Erganis et al., 2012; Malik et al., 2003; Murthy et al., 2008; Tsai and Huang, 2006). Mirzaie et al. (2011) interpretieren die Ergebnisse der Feldstämme im Vergleich mit den Ergebnissen der mitgeführten Referenzstämmen, während bei El-Sukhon et al. (2002), Dodouyt et al. (1995), Asadpour et al. (2011), Van Veen et al. (2001), Bock et al. (1998) und Siddique et al. (2008) keine Hinweise auf angewandte Interpretationskriterien zu finden sind.

Von Devriese et al. (1995, 2001) wurde Agardilution mit fünf prozentigem Schafblutagar durchgeführt. Die Bewertung erfolgte nach Doern im Vergleich mit anspruchsvollen Erregern aus der Humanmedizin (Doern, 1995).

Bei der Mikrodilution kamen bei der Testung von *O. rhinotracheale*-Stämmen jeweils andere Medium zur Anwendung. Soriano et al. (2003) führten die Empfindlichkeitstestung mit BHI durch, das mit Pferdeserum supplementiert wurde. Das Inokulationsvolumen für die Mikrotiterplatten betrug 100 Mikroliter (µl). Bei gleichem Inokulationsvolumen, aber unter Verwendung von Pasteurellen-Bouillon testete Popp (2003) die Resistenzlage von *O. rhinotracheale*, während Waldow MHB II mit 3% IPb nutzte (Waldow, 2009). Szabó et al. (2015) verwendeten unsupplementierten MHB II. Ein Verweis auf die Inokulationsmenge wurde nicht gegeben. Die Interpretation der Ergebnisse erfolgte bei Waldow (2009) nach Vorgaben des CLSI (CLSI, 2002, 2004). Popp (2003) richtete sich nach Angaben von Doern (1995) und der Deutschen Industrie-Norm (DIN, 1998) nach MHK-Grenzwerten von antibakteriellen Substanzen. Szabó et al. (2015) interpretierten die Ergebnisse ebenfalls auf CLSI-Basis (CLSI, 2004, 2011). Ak und Turan (2001) testeten die Resistenzlage von *O. rhinotracheale* via Makrodilution unter Verwendung von Peptonwasser. Grundlage für die Bewertung war die Richtlinie des NCCLS (1998) für Non-*Enterobacteriaceae*.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1 Bakterielle Isolate

Für die Untersuchungen wurden 100 *O. rhinotracheale*-Isolate aus der Stammsammlung des Instituts für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin verwendet. Tab. 6 (Anhang) gibt einen Überblick über die verwendeten *O. rhinotracheale*-Isolate.

Es wurden 108 Stämme von *R. anatipestifer* untersucht. Vierundzwanzig der Stämmen lagen ebenfalls im Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin vor. Dreißig Isolate aus dem Jahr 2012 wurden freundlicherweise von der Firma Anicon zur Verfügung gestellt. 55 Isolate wurden von der Firma Ripac erworben (Tab. 7, Anhang).

3.1.2 Kontrollstämme

Zur Kontrolle der folgenden Empfindlichkeitstestung wurden Referenzstämme gemäß den CLSI Vorschriften Vet01-S2 untersucht (CLSI 2013). Aus der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) wurden die Kontrollstämme *R. anatipestifer* DSMZ 15868, (American Type Culture Collection (ATCC) 11845)) und *O. rhinotracheale* DSMZ 15997 erworben. Als Referenzstämme für die Bouillon-Mikrodilution wurden zusätzlich *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) DSMZ 2569 (ATCC 29213) und *E. coli* DSMZ 1103 (ATCC 25922) verwendet, die freundlicherweise vom Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) zur Verfügung gestellt wurden. Die Grenzwerte der Referenzstämme DSMZ 2569 und DSMZ 1103 sind in Tab.8 dargestellt. Als Referenzstamm für die Pulsfeldgelelektrophorese diente der Salmonella-Stamm, Serotyp Braenderup (H9812).

Tab. 8: Grenzwerte der Referenzstämme im Mikrodilutionstest in mg/l nach CLSI Vet01-S2

| Wirkstoff | <i>S. aureus</i> DSMZ 2569 (ATCC 29213) | <i>E. coli</i> DSMZ 1103 (ATCC 25922) |
|---------------------------|--|--|
| Amoxicillin/Clavulansäure | 0.12/0.06 – 0.5/0.25 | 2/1 – 8/4 |
| Ampicillin | 0.5 – 2 | 2 – 8 |
| Cefazolin | 0.25 – 1 | 1 – 4 |
| Cefoperazone | 1 – 4 | 0.12 – 0.5 |
| Cefotaxim | | |

Fortsetzung Tab. 8

| Wirkstoff | <i>S. aureus</i> DSMZ 2569 (ATCC 29213) | <i>E. Coli</i> DSMZ 1103 (ATCC 25922) |
|-----------------|--|--|
| Cefquinome | 0.25 – 2 | 0.03 – 0.12 |
| Ceftiofur | 0.25 – 1 | 0.25 – 1 |
| Chloramphenicol | 2 – 16 | 2 – 8 |
| Ciprofloxacin | | |
| Clindamycin | 0.06 – 0.25 | - |
| Colistin | | |
| Doxycyclin | | |
| Enrofloxacin | 0.03 – 0.12 | 0.008 – 0.03 |
| Erythromycin | 0.25 – 1 | - |
| Florfenicol | 2 – 8 | 2 – 8 |
| Gentamicin | 0.12 – 1 | 0.25 – 1 |
| Imipenem | 0.015 – 0.06 | 0.06 – 0.25 |
| Lincomycin | | |
| Marbofloxacin | 0.12 – 0.5 | 0.008 – 0.03 |
| Nalidixinsäure | | |
| Oxacillin | 0.12 – 0.5 | - |
| Neomycin | | |
| Penicillin | 0.25 – 2 | - |
| Pirlimycin | 0.25 – 1 | - |
| Spiramycin | | |
| Streptomycin | | |
| Tetrazyklin | 0.12 – 1 | 0.5 – 2 |
| Tiamulin | 0.5 – 2 | - |
| Tilmicosin | 1 – 4 | - |
| Tylosin | 0.5 – 4 | - |
| Vancomycin | 0.5 – 4 | - |

3.1.3. Verbrauchsmaterial und Geräte

Tab. 9: Material und Geräte für die Identifizierung und Typisierung der Erreger

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|--|--|
| Agarose Biozym LE | Biozym Scientific GmbH, Oldenburg Art.-Nr. 840004 |
| API 20 NE-System (Test zur Identifizierung gramnegativer, nicht fermentierender Bakterien [nicht Enterobacteriaceae]) Zusatzreagenzien: JAMES-Reagenz Nit 1 Nit 2 Zinkpulver | BioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland Art.-Nr. 20050 Art.-Nr. 70540 Art.-Nr. 70440 Art.-Nr. 70450 Art.-Nr. 70380 |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich; Art.-Nr. B2518 |
| Columbia-Agar mit 5% Schafblut | Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland |
| Drigalskispatel | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Art.-Nr. 4080801 |
| Ethidiumbromid 1% | Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Einmalpipettenspitzen mit Aerosolfiltern SafeSeal Tips professional, 1000 µl Biosphere Filter Tips 0,5 – 20 µl 2 – 100 µl | Biozym Scientific GmbH, Oldenburg Art.-Nr. 770400 Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Art.-Nr. 701116210 Art.-Nr. 70760212 |
| Einmal-Impfösen 1 µl 10 µl | Sarstedt AG & Co, Nümbrecht Art.-Nr. 3084280 Art.-Nr. 3083920 |
| Fetales Kälberserum | Biochrom AG, Berlin, Deutschland |
| Größenstandard 100 bp-Ladder | New England Biolabs, Deutschland |

Fortsetzung Tab. 9

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|--|---|
| Lamina HeraSafe | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| Mikrowelle | Severin, Deutschland |
| Netzgerät für Elektrophorese, Power Pac HC | Biorad Laboratories GmbH, München |
| Oxidase-Test: BD BBL™DrySlide™Oxidase | Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA |
| Primer <i>O. rhinotracheale</i> OR16S-F1 (forward) OR16S-R1 (reverse) | Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland |
| Primer <i>R. anatipestifer</i> RA20F2 (forward) RA20R4 (reverse) | Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland |
| PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads | Amersham Biosciences Freiburg, Deutschland |
| RNase freies H ₂ O | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. T143.2 |
| Taq PCR Master Mix Kit | Qiagen, Hilden; Art.-Nr. 201443 |
| Thermocycler | BioRad, USA |
| Vortexer | VWR International, Pennsylvania Model: LAB DANCER D S40 |
| Vortex-Genie | Bender & Hobein AG, Schweiz Model-Nr. K-550-GF |
| Zentrifuge Heraeus (Minifuge RF) | Sepatech GmbH; Fabrik-Nr. 131522 |
| QIAamp DNA Mini Kit Reagenzien ATL-Puffer (Tissue lysis buffer) AL-Puffer (Lysis buffer) AE-Puffer (Elution buffer) AW1-Puffer (wash buffer 1) AW2-Puffer (wash buffer 2) Ethanol | Qiagen GmbH, D-40724 Hilden Mat. Nr. 1014758 Mat. Nr. 1014604 Mat. Nr. 1014591 Mat. Nr. 1014797 Mat. Nr. 1014577 Roth, Karlsruhe, Deutschland |

Tab. 10: Material und Geräte für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|---|---|
| Autoklav | Tuttnauer 3850 ELV |
| Autoinokulator | Trek Diagnostic Systems, United Kingdom |
| Brutschrank (LaBoTec Inkubator, C200) | LaBoTec GmbH, Göttingen |
| Bunsenbrenner, Fireboy S1000 | TecNoMara AG, Wallisellen Typ: 0692 |
| Columbia-Agar mit Schafblut | Fertigplatte, Oxoid GmbH, Wesel, Deutschland |
| Densitometer | Biomerieux, Italien; Modell: 007230 |
| Drigalskispatel | Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht Art.-Nr. 4080801 |
| Einmal-Impfösen 1 µl 10 µl | Sarstedt AG & Co, Nürnbrecht Art.-Nr. 3084280 Art.-Nr. 3083920 |
| E-Test Streifen: Enrofloxacin Tiamulin Tetrazyklin | Bestbion, Köln, Deutschland Art.-Nr. 01B10107 Art.-Nr. 01B10275 Art.-Nr. 01B10224 |
| Kolbenhubpipetten (1-1000 µl) | Eppendorf, Deutschland |
| Mueller-Hinton Agar | Carl Roth GmbH, Karlsruhe Art.-Nr. X926.1 |
| Mueller-Hinton Boullion II mit 2% lysierten Pferdeblut | MCS Diagnostics BV, Voorveld 16, NL-6071 RE Swalmen |
| Mueller-Hinton Bouillon II Kationen optimiert | Becton, Dickinson and Company Sparks, MD 21152 USA, 38800 Le Pont de Claix, France, Art.-Nr.: 1151190 |
| Pferdeblut lysiert | Oxoid GmbH, Wesel Art.-Nr. SR0048C |
| Pipettenspitzen (1-1000 µl) | VWR International, Pennsylvania |

Fortsetzung Tab. 10

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|--|---|
| Sensititre®-Mikrotiterplatten | MCS Diagnostics BV, Voorveld 16, NL-6071 RE Swalmen |
| Sensititre Vizion-System | Trek Diagnostic Systems, United Kingdom |
| Vortexer | VWR International, Pennsylvania Model: LAB DANCER D S40 |
| Wattetupfer, steril | Heinz Herenz, Hamburg |
| Wirkstoffe für Agardilution Enrofloxacin 10% Injektionslösung Tiamulin Tylan Soluble (Pulver) | WDT, Siemensstraße 14, 30827 Garbsen Sigma-Aldrich, Steinheim, Art.-Nr.55297-955 Elanco Animal Health, Giessen |

Tab. 11: Materialien und Geräte für die Pulsfeldgelelektrophorese

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|--|--|
| Biozym Gold Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Art.-Nr. 850150 |
| Borsäure | Roth GmbH+Co., Karlsruhe; Art.-Nr. 5935.1 |
| Einweg-Kammer zum Gießen der Blöcke- Disposable Plug Mold | BioRad, München, Art.-Nr. 170-3713 |
| Ethidiumbromid 1% (10mg/ml) | Roth GmbH, Karlsruhe; Art.-Nr. 2218.1 |
| Klebeband | Tesa, Deutschland |
| Lysozym (50 mg/ml) | Boeringer Mannheim GmbH; Art.-Nr. 107255 |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck, Darmstadt; Art.-Nr. |
| Natriumdesoxycholat | Merck, Darmstadt; Art.-Nr. |
| Natriumhydroxid Plätzchen | Merck, Darmstadt; Art.-Nr. 1.06495 |
| N-Laurylsarcosine | Serva, Heidelberg, Deutschland |
| Proteinase K (20 mg/ml) | Quiagen GmbH, Hilden; Art.-Nr. 142349316 |

Fortsetzung Tab. 11

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|---|---|
| Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Art.-Nr. 329-98-6 |
| RNAse | Quiagen GmbH, Hilden; Art.-Nr. 19101 |
| Salzsäure, rauchend, 37% | Roth, Karlsruhe; Art.-Nr. 4625.1 |
| Seakem Gold Agarose | Lonza, Rockland, ME USA Art.-Nr. 50150 |
| Tritriplex II (EDTA) | Merck, Darmstadt; |
| Tritriplex III (Na ₂ -EDTA) | Roth GmbH+Co., Karlsruhe; Art.-Nr. 8043.1 |
| Tris Base | Merck, Darmstadt; Art.-Nr. 648310 |
| Reaktionsgefäße Safe-Lock Tubes 1,5 ml Safe-Lock Tubes 2,0 ml | Eppendorf, Deutschland Eppendorf, Deutschland |
| Restriktionsendonucleasen <i>Sal</i> I <i>Xba</i> I <i>Sma</i> I | Biolabs, New England; Art.-Nr. R0138S Biolabs, New England; Art.-Nr. R0145S Biolabs, New England; Art.-Nr. R0141L |
| Puffer für Restriktionsendonucleasen NEBuffer 3 (Puffer für <i>Sal</i> I), (Biolabs, New England; Art.-Nr. B7003S) NEBuffer 4 (Puffer für <i>Xba</i> I, <i>Sma</i> I) (Biolabs, New England; Art.-Nr. B7004S) | Biolabs, New England; Art.-Nr. B7003S Biolabs, New England; Art.-Nr. B7004S |
| CUT SMART | Biolabs, New England; Art.-Nr. B7204S |
| Pulse Marker 50-1000kb (PFGE-Marker) | Sigma Aldrich, Steinheim; Art.-Nr. 070M1365 |
| Waage | Sartorius AG, Göttingen |

Fortsetzung Tab. 11

| Verbrauchsmaterial/Geräte | Hersteller/Vertrieb |
|---------------------------|--|
| Feinwaage | Sartorius AG, Göttingen |
| Thermoblock | Eppendorf, Hamburg |
| CHEF III | BioRad, München |
| Cooling Modul | BioRad, München |
| Variable Speed Pump | BioRad, München |
| pH-Meter | Handlab 1, Schott, Mainz |
| Tischschüttler | Edmund Bühler Typ: SM 25A-SWIP |
| Wasserbad | Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel; Typ: 1002 |
| Schüttelwasserbad | Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach Fabrikat-Nr. 920981 |
| Fotokammer | BioRad, Gel Doc™ XR+System |

Tab. 12: Reagenzien und Lösungen für die Pulsfeldgelelektrophorese

| Name | Zusammensetzung |
|---|---|
| <u>Lysispuffer</u> | |
| Stammlösung | 1 M NaCl, 10 M Tris pH 8, 200 Millimolar (mM) Na ₂ -EDTA, 0,5% Na- Laurylsarcosine, 0,2% Na- Desoxycholat |
| Gebrauchslösung | 5M NaCl 50 ml, 2M Tris 1,25 ml, 0,5 M Na ₂ -EDTA 100 ml, 10% Na- Laurylsarcosine 6 ml, 0,2% Na- Desoxycholat 0,5 g In 250 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) |
| Gebrauchslösung mit RNAse und Lysozym (für 10 Proben) | Lysispuffer 35 ml RNAse 7 µl Lysozym 700 µl |

Fortsetzung Tab. 12

| Name | Zusammensetzung |
|---|--|
| <u>TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA)</u> Stammlösung (10xTBE) Gebrauchslösung (0,5xTBE) | 0,9 M Tris-HCL 54,0 g, 0,9 M Borat 27,5 g, 1,0 mM EDTA-Dinatriumsalz (pH 8) 20,0 ml, In 500 ml Aqua dest. 10 x TBE-Puffer 50 ml in 950 ml Aqua dest. |
| <u>Pett IV-Puffer</u> Stammlösung Gebrauchslösung | 1 M NaCl, 10 mM Tris (pH 8), 10 mM Na ₂ -EDTA 5 M NaCl 40 ml, 2 M Tris 1 ml, 0,5 M Na ₂ -EDTA 4 ml In 200 ml Aqua dest. |
| <u>ES-Puffer / ESP-Puffer</u> Stammlösung Gebrauchslösung für 20 Proben | 0,5 M Na ₂ EDTA (pH9) 46,56 g 1,0% N-Laurylsarkosin 2,5 g ES-Puffer 70 ml Proteinase K 2,275 ml |
| <u>CSB-Puffer (Zell-Suspensions-Puffer)</u> | 1 M Tris 10 ml 1 M Na ₂ -EDTA 10 ml Aqua dest. ad. 100 ml |

Fortsetzung Tab. 12

| Name | Zusammensetzung |
|--|---|
| <u>TE-Puffer (10:1)</u> | 1 M Tris 10 ml 0,5 M Na ₂ -EDTA 2 ml in 1000 ml Aqua dest. |
| <u>TE-PMSF-Lösung</u> (für 20 Proben) | 100 mM PMSF 600 µl in 40 ml TE (10:1) |
| <u>Äquilibrierungspuffer</u> (je Probe) | Aqua dest. 225 µl Puffer des Enzyms 25 µl |
| <u>Restriktionslösung</u> (je Probe) | Aqua dest. 43 µl Restriktionsenzym 2 µl (<i>SalI</i> / <i>XbaI</i> / <i>SmaI</i>) Puffer des Enzyms 3 µl |
| <u>Färbelösung</u> | Ethidiumbromid 40µl In 400ml Aqua dest. |
| <u>Blöckchenagarose</u> <i>O. rhinotracheale</i> <i>R. anatipestifer</i> | Biozym Gold Agarose 0,18 g TE-Puffer 9,0 ml Saekem Gold Agarose 0,18 g TE-Puffer 9,0 ml |
| <u>Agarose Gel 1%</u> | Biozym Gold Agarose/ Saekem Gold Agarose 1,2 g 0,5 x TBE-Puffer 120 ml |

3.2. Methoden

3.2.1. Methoden zur Identifizierung und Charakterisierung

3.2.1.1. Rekultivierung der aufbewahrten, reinkultivierten Bakterienisolate

Die in Kälberserum eingefrorenen Bakterienisolate wurden auf Columbia-Agar mit Schafblut (Oxoid GmbH, Wesel) ausgestrichen und 24 h bei 37° C und 5% CO₂-Spannung kultiviert. Bei Kontamination mit Fremdkeimen wurde das betroffene Isolat erneut unter gleichen Bedingungen subkultiviert. Im Anschluss wurden diese Stämme biochemisch differenziert, um die angegebene Speziesbezeichnung zu verifizieren.

3.2.1.2. Biochemische Identifizierung

Alle *O. rhinotracheale*- und *R. anatipestifer*-Isolate wurden auf das Vorhandensein von Cytochromoxidase unter Verwendung des DrySlide™ Oxidase-Tests (Becton, Dickinson and Company, USA) getestet.

Im weiteren Verlauf erfolgte eine Identifizierung mittels des kommerziellen biochemischen Testsystems API 20 NE (BioMérieux, Nürtingen). Abgelesen wurde nach 24 h und nach 48 h. Bei Isolaten von *R. anatipestifer* erfolgte eine weitere Ablesung nach 72 h, da die Gelatinasreaktion verzögert erfolgen kann (Rubbenstroth et al., 2011).

Die Inkubationstemperatur betrug 30°C.

3.2.1.3 Molekularbiologische Identifizierung

DNA-Präparation

Die DNA-Präparation von *R. anatipestifer* und *O. rhinotracheale* erfolgte aus frischen Übernachtskulturen unter Verwendung des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen, Hilden). Es wurde nach Herstelleranweisung gearbeitet. In sterile Eppendorfgefäße wurden 180 µl ATL und 20 µl Proteinase K vorgelegt. Mit einer Impföse entnommenes Kulturmaterial wurde gründlich suspendiert und es erfolgte eine Inkubation bei 56°C im Thermoschüttler für eine Dauer von zwei Stunden. Anschließend wurden 200 µl AL hinzu pipettiert und nach 15 Sekunden Vortexen erfolgte eine weitere Inkubation bei 70°C für 10 Minuten (min).

Vor dem Überführen des gesamten Volumens auf eine Säule mit Silikatmembran, wurden 200 µl 96%iges Ethanol hinzugegeben. Im nächsten Schritt folgte eine Zentrifugation bei 8000 x g für eine Minute. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Sammelutube überführt.

Es folgten zwei Waschschr tte. Einmal mit dem Puffer AW1 mit einer Zentrifugation bei 8000 x g bei einer Minute und einmal mit dem Puffer AW2 mit einer Zentrifugation bei 14000 x g für drei Minuten. Bei beiden Waschschr tten wurde das Filtrat verworfen. Die Säule wurde in ein sterilen 1,5 ml Ependorfgef   überführt und 100 µl AE Puffer hinzu pipettiert. Nach einer Inkubation von einer Minute bei Raumtemperatur erfolgte erneut eine Zentrifugation für eine Minute bei 8000 Umdrehungen pro Minute. Dies bewirkte die Elution der DNA aus der Silikatmembran. Die Aufbewahrung der PCR-Produkte erfolgte bei -20°C.

PCR von *R. anatipestifer*

Für den molekularbiologischen Nachweis von *R. anatipestifer* entwickelten Tsai et al. (2005) eine PCR mit der Primerkombination RA20F2 und RA20R4. Mit Hilfe derer wird ein Fragment von 662 Basenpaaren (bp) innerhalb des 16S rRNA Genes nachgewiesen, welches spezifisch für *R. anatipestifer* ist. Die PCR erfolgte unter Nutzung des *Taq PCR Master Mix Kits* in einem Ansatzvolumen von 25 µl. Je Probe wurden 15 µl *Taq PCR Master Mix* verwendet. Im Mastermix war 1 µl der Primerkombination RA20F2 (5'-CAGCTTAACTGTAGAACTGC-3') und RA20R4 (5'-TCGAGATTTGCATCACTTCG-3') enthalten, sowie nukleasefreies Wasser. Nach Herstellung des *Taq PCR Mastermixes* wurde 1 µl Proben-DNA hinzupipettiert und es wurde mit nukleasefreien Wasser auf 25 µl Ansatzvolumen aufgefüllt. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler nach dem Temperaturprofil, das in Tab. 13 aufgezeigt ist.

Tab. 13: Temperaturprofil für PCR von *R. anatipestifer*

| Schritt | Temperatur in °C | Dauer (Zeit) in min | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------------|------------------------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 94 | 3 | 1 |
| Denaturierung | 94 | 1 | 40 |
| Annealing | 60 | 1 | |
| Extension | 72 | 1,5 | |
| Finale Extension | 72 | 5 | 1 |
| Pause | 4 | Unendlich | |

PCR von *O. rhinotracheale*

Für *O. rhinotracheale* wurden Ready-To-Go PCR Beads verwendet. Mit diesen wurde ein 25 µl Ansatz, bestehend aus 10 µl Primermix OR 16S-F1 (5'-GAG AAT TAA TTT ACG GAT TAA G) und OR 16S-R1 (5'-TTC GCT TGG TCT CCG AAG AT), 1 µl DNA, sowie nukleasefreien Wasser (van Empel, 1998a). In Tab.14 ist das Temperaturprofil für die Amplifikation von *O. rhinotracheale* angegeben.

Tab.14: Temperaturprofil für PCR von *O. rhinotracheale*

| Schritt | Temperatur in °C | Dauer (Zeit) in min | Anzahl Zyklen |
|------------------------|------------------|---------------------|---------------|
| Initiale Denaturierung | 94 | 5 | 1 |
| Denaturierung | 94 | 0,5 | 45 |
| Annealing | 52 | 1 | |
| Extension | 72 | 1,5 | |
| Finale Extension | 72 | 7 | 1 |
| Pause | 4 | unendlich | |

Qualitätssicherung

Von Beginn der DNA-Extraktion wurde eine Extraktionskontrolle unter Verwendung von einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) als Ausgangsmaterial parallel zu den Feldproben je Durchgang mitgeführt. PCR begleitend lief eine Negativkontrolle mit, um Kontaminationen der verwendeten Substanzen und Reagenzien auszuschließen. Für *R. anatipestifer* wurde als Positivkontrolle der Stamm 772/05 verwendet. Der Standardserotyp *O. rhinotracheale* A (Ag 885) diente als Positivkontrolle für *O. rhinotracheale*. Die unterschiedlichen Arbeitsschritte wurden zwecks Kontaminationsvermeidung in getrennten Arbeitsräumen durchgeführt. Um das Kontaminationsrisiko weiterhin zu vermindern, standen für jeden Untersucher eigene Substanzen und Reagenzien zur Verfügung.

Gelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese. Für die Auftrennung der Fragmente wurde ein 1,2%iges für *R. anatipestifer* und ein 1%iges Gel für *O. rhinotracheale* hergestellt. Als Gelgrundlage dienten 1,2 g bzw. 1 g Agarose (SaeKem LE Agarose) in 100 ml

TBE-Puffer gelöst. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle bis zum Aufkochen erhitzt. Es durften keine Agarosestückchen mehr in der Flüssigkeit sichtbar sein.

Nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid 1% wurde das flüssige Gel in einen Gelträger gegossen.

Beladen des Gels

Vorbereitend wurden entsprechend der Probenanzahl 0,5 µl des Probenladepuffers auf ein steriles Stück Parafilm vorgelegt, mit jeweils 5 µl der PCR-Produkte vermischt und in die Vertiefungen des Gels pipettiert. Bei jedem Durchgang fand die Befüllung des ersten und letzten Slots mit 8 µl des Größenstandards (100 bp-Ladder) statt. Nach dem Beladen wurde die Elektrophorese bei 50 – 60 Volt über 1,5 – 2 h laufen gelassen. Als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer.

Analyse der Fragmente

Für die Analyse wurde das Gel in die Dokumentationseinrichtung (Gel DocTM XR+System, BioRad) verbracht. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte unter Verwendung von ultraviolettem (UV) Licht. Für die Auswertung stand die Software Image LabTM von BioRad zur Verfügung.

3.3 Durchführung der PFGE für *O. rhinotracheale* und *R. anatipestifer*

Die PFGE für *R. anatipestifer* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Philipp et al. (2013). Für *O. rhinotracheale* erfolgte die PFGE mit geringen Abweichungen nach dem Protokoll von Popp (2003). Als Marker wurde der DNA Größenstandard Stamm *Salmonella* Serovar Braenderup H9812 verwendet. Der Referenzstamm DSMZ 15868 wurde für *R. anatipestifer* und der Referenzstamm DSMZ 15997 für *O. rhinotracheale* als interne Referenz mitgeführt.

Kultivierung der Isolate

Die zu untersuchenden Isolate wurden auf Columbia Schafblut-Agar ausgestrichen und 24 h bei 37°C und 5% CO₂-Spannung inkubiert wie unter 3.2.1.1. beschrieben.

Herstellung der Blöckchen *R. anatipestifer*

Ausreichend Bakterienmaterial wurde in zwei ml Zellsuspensionspuffer (CSB-Puffer) mit einem sterilen Tupper gelöst. Die optische Dichte wurde mittels Densitometer auf einen McFarland (McF) Standard von 1,3 – 1,4 eingestellt. Von der Bakteriensuspension wurden 400 µl in vorbereitete Eppendorfgefäße mit je 20 µl vorgelegter Proteinase K pipettiert. Es wurde eine 1%igen Agarose-Lösung (Seakem Gold, Lonza) mit 1% SDS in 0,5 x TE-Puffer hergestellt. Die Agaroselösung wurde bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad bei 56°C aufbewahrt. Es erfolgte die Erwärmung der Bakteriensuspension auf 37°C. Dann wurden 400 µl der Agarose zur Bakteriensuspension hinzu pipettiert. Nach ausreichender Durchmischung wurden ca. 100 µl in jede Vertiefung der Gießform gefüllt. Pro *R. anatipestifer*-Isolat wurden 4 bis 5 Blöckchen hergestellt. Anschließend wurde die Gießform für 10 min auf Eis gestellt.

Herstellung der Blöckchen *O. rhinotracheale*

Für die Herstellung der Blöckchen wurde eine ausreichende Menge Bakterien-DNA benötigt. Infolgedessen wurden nur dicht bewachsene Platten geerntet. Platten mit geringem Wachstum wurden über eine Dauer von 48 h kultiviert. Das Ernten erfolgte mit einer Einmalimpfchlinge und die Suspension des Bakterienmaterials erfolgte in PBS. Nachdem das Spektralphotometer gegen das Erntemedium PBS kalibriert wurde, erfolgte die Einstellung der Suspension auf eine optische Dichte von 0,3-0,4 bei einer Wellenlänge von 550 nm. Fünf Milliliter der Bakteriensuspension wurden in Reagenzgläser verbracht und es erfolgte eine Zentrifugation von 4000 Umdrehungen pro Minute für 20 min. Eine weitere Zentrifugation bei gleichen Bedingungen fand nach Dekantieren des Überstandes und Resuspension des Bakterienmaterials in 5 ml Pett IV Puffer statt. Auch dieser Puffer wurde dekantiert. Das Bakterienpellet am Boden des Reagenzglases wurde in 0,5 ml Pett IV Puffer gelöst, in vorbereitete Eppendorfgefäße pipettiert und auf Eis gestellt. Die Unterseite der speziellen Gießkammer wurde mit Tesafilm abgeklebt. Es erfolgte die Herstellung einer 2% igen Agarose, die durch das Lösen von 0,18 g Biozym Gold Agarose in 9 ml TE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle entstand. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Agaroselösung bei 56°C im Wasserbad aufbewahrt. Die Erwärmung der Bakteriensuspension erfolgte ebenfalls im Wasserbad auf 37°C, und es wurden 500 µl der warmen (56°C) Agarose-Lösung hinzu pipettiert. Nach Durchmischung der Lösung wurden ca. 100 µl pro Plug direkt in die Gießform pipettiert. Für 10 min wurden die gefüllten Gießformen im Kühlschrank abgekühlt. Pro *O. rhinotracheale* Isolat wurden 4-5 Blöckchen hergestellt.

Lyse

Nach dem Abkühlen und Aushärten der Blöckchen im Kühlschrank bzw. auf dem Eis wurden diese mit Hilfe eines Spatels direkt in Reagenzgläser verbracht (ca. 4-5 Blöckchen pro *O. rhinotracheale*- und *R. anatipestifer* Isolat).

Für *O. rhinotracheale* wurden die Reagenzgläser mit 5 ml einer frisch hergestellten Gebrauchslösung des Lysispuffers mit RNase und Lysozym beschickt.

Der Lysispuffer für *R. anatipestifer* enthielt keine RNase und kein Lysozym. Stattdessen wurde 0,1 mg/ml Proteinase K hinzugefügt.

Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C für *O. rhinotracheale* im Shakerwasserbad (50-60 Umdrehungen pro Minute) um die Diffusion zu verbessern. Die Blöckchen von *R. anatipestifer* wurden bei 54°C im Shakerwasserbad unter gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss wurde die Gebrauchslösung dekantiert.

Deproteinisierung (nur *O. rhinotracheale*)

Die Deproteinisierung dient dazu, Bakterienprotein zu entfernen, das die Aktivität des Restriktionsenzym stören kann. Aus diesem Grund wurden 3 ml einer frisch angesetzten ESP-Lösung in jedes der mit *O. rhinotracheale* belegten Reagenzgläser hinzu pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 56°C im Wasserbad mit leichtem Schütteln über Nacht.

Waschen der Blöckchen

Die Glasröhrchen wurden aus dem Shaker-Wasserbad genommen und die Flüssigkeit vorsichtig in ein Auffanggefäß dekantiert. Um ein Ausgießen der Blöckchen zu vermeiden, wurde zusätzlich über einem Sieb gearbeitet. Von Isolat zu Isolat erfolgte eine Zwischendesinfektion mit Ethanol. Die Blöckchen wurden mit 5 ml Aqua dest. überschichtet und 10 – 15 min. bei Raumtemperatur in Schräglage auf einem Schüttler inkubiert. Der Waschschritt mit Aqua dest. erfolgte sowohl für *O. rhinotracheale* als auch *R. anatipestifer* zweimalig.

Anschließend wurden die *O. rhinotracheale*-Blöckchen mit 5 ml des frisch angesetzten TE-PMSF-Puffer überschichtet und 30 min. unter sanftem Schwenken inkubiert. Dieser Schritt diente zur Inaktivierung von möglichen Protinase-Resten. Nach dreimaliger Wiederholung wurde der Puffer dekantiert und 5 ml steriler TE-Puffer hinzugefügt.

Die weiteren Waschschritte der *R. anatipestifer*-Blöckchen erfolgten mit auf 50°C vorgewärmten TE-Puffer ohne weitere Zusätze. Die Inkubationszeit betrug bei jedem der vier Wiederholungen 10 bis 15 min.

Für die Aufbewahrung wurden für die Blöckchen jeder Probe 2,0 ml Eppendorfgefäße mit 1 ml TE-Puffer befüllt. In diese Gefäße wurden die Blöckchen verbracht und konnten bei 2 – 8°C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Prärestriktion/Äquilibrierung und Restriktion

Die benötigte Anzahl 1,5 ml Eppendorfgefäße wurde mit je 250 µl Prärestriktionspuffer gefüllt. Nun wurden die Blöckchen entweder direkt nach dem Waschen aus einem Reagenzröhrchen oder nach Aufbewahrung in einem 2,0 ml Eppendorfreaktionsgefäß auf einen Objektträger gebracht. Ein Stückchen mit einer Größe von 2 x 5 mm wurde mit einem Skalpell vom Blöckchen abgeschnitten und in die vorbereitete Prärestriktionslösung verbracht.

Für den *Salmonella*-Stamm, als auch für *R. anatipestifer* wurde der NEBuffer 4, für *O. rhinotracheale* NEBuffer 3 dem Prärestriktionspuffer hinzugefügt. Nach einer einstündigen (*O. rhinotracheale*) bzw. 15 minütigen (*R. anatipestifer*) Inkubation bei Raumtemperatur im Prärestriktionspuffer wurden je 50 µl Emzymlösung mit dem für das Enzym empfohlenen Puffer hinzu pipettiert.

Für die *R. anatipestifer*-Isolate und den *Salmonella*-Stamm wurde das Enzym *Xba*I bzw. *Sma*I, für die *O. rhinotracheale*-Isolate das Enzym *Sal*I eingesetzt. Für *O. rhinotracheale* wurde dem Puffer Bovines-Serumalbumin (BSA) hinzugefügt.

Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 25°C im Thermomixer für *R. anatipestifer* und eine Inkubation bei 37°C für 4 h bei *O. rhinotracheale*.

Herstellung des Gels

Vor dem Zusammenbau des Gelträgers wurden alle Teile mit Ehtanol gereinigt. Anschließend wurde der Gelträger auf eine waagerechte Fläche gestellt und der 15-zahnige Kamm eingesetzt. Zur Herstellung des 1%igen Gels wurden 1,2 g der Biozym Gold Agarose in 120 ml 0,5 x TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte und die Agarose kochte. Für *R. anatipestifer* wurde Saekem Gold Agarose verwendet. Die Konzentration des Gels betrug ebenfalls 1%. Anschließend wurde die jeweilige Agarose in den Gelträger gegossen. Nach 30 min konnte das Gel verwendet werden.

Standards

Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgröße und als Kontrolle wurde ein PFGE- Pulse Marker mitgeführt, mit einer Spanne von 50-1000 kilobasen (kb).

Laden des Gels

Die Blöckchen wurden mit Hilfe eines Skalpells und eines Objektträgers in die Slots des Gels geladen. Mit dem Skalpell wurden die Blöckchen an die Vorderwand der Geltaschen gedrückt. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftbläschen in den befüllten Slots befanden. Zum Verschließen der geladenen Geltaschen wurde 56°C warme 1%ige 0,5 x TBE-Agarose-Lösung verwendet. Es wurden 15-20 min gewartet, um das Gel bei Raumtemperatur aushärten zu lassen, bevor es in der Pufferwanne des Contour-Clamped-homogeneous Electric-Field(CHEF) III PFGE-Geräts platziert wurde.

Laufbedingungen

Die Pufferwanne des CHEF III PFGE Gerätes wurde mit 3 Liter 0,5 x TBE-Puffer befüllt. Etwa 30 min vor Start des Laufprogramms wurden Pumpe und Kühlung eingeschaltet, um den Puffer zu akklimatisieren. Nach Positionierung des Gels wurde das Programm gestartet. Die Laufbedingungen für *R. anatipestifer* und *O. rhinotracheales* sind in den Tab.15 und 16 dargestellt.

Tab 15: Laufbedingungen für *R. anatipestifer* (Philipp et al., 2013)

| Pumpen- geschwindigkeit | Temperatur | Spannung | Winkel | Ramping time | | |
|----------------------------|------------|-----------|--------|--------------|-----------------------|----------|
| | | | | Block | Pulswechsel- raten | Laufzeit |
| 70 | 14°C | 6 Volt/cm | 120° | I | 2,2 – 54,2 sec | 20 h |

Tab. 16: Laufbedingungen für *O. rhinotracheale* (Popp, 2003)

| Pumpen- geschwindigkeit | Temperatur | Spannung | Winkel | Ramping time | | |
|----------------------------|------------|-----------|--------|--------------|-----------------------|----------|
| | | | | Block | Pulswechsel- raten | Laufzeit |
| 70 | 14°C | 6 Volt/cm | 120° | I | 1 – 15 sec | 11 h |
| | | | | II | 15 – 40 sec | 13 h |
| | | | | | | |

Dokumentation

Nach dem Ende des Programms wurde das Gel aus dem Laufpuffer entnommen und in eine Färbelösung mit Ethidiumbromid gelegt. Das Gel blieb 20 min in der Ethidiumbromidlösung und wurde danach für 25 min in Aqua dest. entfärbt.

Anschließend wurde das Gel in die Dokumentationseinrichtung (Gel DocTM XR+System, BioRad) gelegt. Die Sichtbarmachung der Fragmente erfolgte mittels UV-Licht.

Analog zur Dokumentation der Gelelektrophorese der PCR, wurde das Gel fotografiert und elektronisch gespeichert.

Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm BioNumerics 6.0.

Anfangs wurden alle Isolate und die dazugehörigen Daten wie Serotyp, Wirtsspezies, Herkunft und Biocode in das Experiment eingetragen. Anschließend wurden die Bilder mit den ermittelten Banden hochgeladen und in Graustufen konvertiert.

Die Bearbeitung der Bilder erfolgte in drei Schritten. Konvertierung, Normalisierung und Analyse. Mittels Konvertierung wurde für jede Bande ein Rahmen festgelegt. Für jede Bande wurden die DNA-Banden bestimmt. Dann erfolgte die Zuordnung der jeweiligen Banden zu den Probennummern.

Mit Hilfe der Normalisierung wurden die Längenunterschiede der Laufstrecken ausgeglichen, die trotz gleicher Elektrophoresebedingungen entstanden sind. Dazu wurden alle untersuchten Stämme an dem auf jedem Gel dreifach mitgeführten Standardmarker (*Salmonella enterica* Serotyp braenderup) ausgerichtet. Die normalisierten Laufstrecken der Stämme wurden bei der Analyse untereinander verglichen und über die Berechnung der Ähnlichkeit der Profile erfolgte eine Einteilung in Gruppen (Cluster).

Der Vergleich basiert auf Berechnung der Ähnlichkeitsmatrix (similarity matrix). Verwendet wurde der Jaccard-Koeffizient mit einem Toleranzfaktor von 2% und einer Optimierung von

5%, sowie der Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA) Dendrogramm-Typ. Stämme wurden demselben PFGE- Profiltyp zugeordnet, wenn sie visuell die gleichen Fragmentgrößen zeigten zwischen den Markerfragmentgrößen von 1135 kb und 33 kb. Mittels Topscore UPGMA wurde eine advanced cluster Analyse durchgeführt, um den Verwandtschaftsgrad der Isolate zu verdeutlichen. Basis dafür war der DICE-Koeffizient mit einem Toleranzfaktor von 0,5% und einer Optimierung von 0,5%.

3.3.1 Testverfahren zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit von *R. anatipestifer* und *O. rhinotracheale*

3.3.1.1 Mikrodilution

Die Durchführung der Mikrodilution erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben des CLSI in der Fassung VET01-A4, 2013. Da weder für *R. anatipestifer* noch für *O. rhinotracheale* validierte Testbedingungen vorlagen, wurden Wachstumskurven in verschiedenen Medien und unter verschiedenen Inkubationsbedingungen, wie im Ergebnisteil genannt, angefertigt. Zur Bestimmung der MHK wurden Mikrotiterplatten verwendet, die die Form einer 96-Well-Platte mit je acht Wirkstoffen zu je zehn bis zwölf Konzentrationsstufen, sowie zwei Wachstumskontrollen besaßen. Tab. 17 gibt einen Überblick über die eingesetzten Chemotherapeutika und die jeweils getestete Konzentrationsspanne.

Tab. 17: Konzentration der eingesetzten Chemotherapeutika

| Wirkstoff | Abkürzung | Wirkstoffgehalt (mg/l) |
|---------------------------------|-----------|------------------------|
| Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) | AUG2 | 0,03/0,015 – 64/32 |
| Ampicillin | AMP | 0,03 - 64 |
| Cefoperazone | FOP | 0,06 - 32 |
| Cefotaxime | FOT | 0,015 - 32 |
| Cefquinome | CQN | 0,015 - 32 |
| Ceftiofur | XNL | 0,03 - 64 |
| Cephalothin | CEP | 0,06 - 128 |
| Chloramphenicol | CHL | 0,5 - 256 |
| Colistin | COL | 0,03 - 16 |

Fortsetzung Tab. 17

| Wirkstoff | Abkürzung | Wirkstoffgehalt (mg/l) |
|-------------------------------|-----------|------------------------|
| Doxycycline | DOX | 0,06 - 128 |
| Enrofloxacin | ENRO | 0,008 - 16 |
| Florfenicol | FFN | 0,12 - 256 |
| Gentamycin | GEN | 0,12 - 256 |
| Imipenem | IMI | 0,015 - 32 |
| Nalidixic Acid | NAL | 0,06 - 128 |
| Penicillin | PEN | 0,015 - 32 |
| Spiramycin | SPI | 0,06 - 128 |
| Sulfamethoxazole | SMX | 0,5 - 1024 |
| Tetracyclin | TET | 0,12 - 256 |
| Tiamulin | TIA | 0,03 - 64 |
| Tilmicosin | TIL | 0,06 - 128 |
| Trimethoprim/Sulfamethoxazole | SXT | 0,015/0,29 - 32/608 |
| Tulathromycin | TUL | 0,03 - 64 |

Herstellung des Inokulums

Mit einem sterilen Tupfer wurden ein bis zwei Kolonien einer über 18 bis 24 h gewachsenen Bakterienkultur von *R. anatipestifer* aufgenommen und in 5 ml einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung suspendiert. Mittels Densitometer wurde diese Bakteriensuspension auf einen Trübungsstandard 0,5 McF eingestellt. Es dienten 11 ml MHB II mit 2% IPb als Medium zur Herstellung der Inokulumsuspension. Für die mitgeführten Referenzstämme wurde MHB II ohne Supplement eingesetzt. Die Herstellung der Inokulumsuspension erfolgte, indem 55 µl aus der Bakteriensuspension in 11 ml Medium pipettiert wurden. Die Durchmischung des Inokulums erfolgte zunächst durch kurzes Schütteln des Röhrchens für ca. 30 Sekunden bei hoher Stufe auf dem Vortex und anschließendem Dauerschütteln auf dem Vortex ununterbrochen bis zur Beschickung der Mikrotiterplatten. Die Beschickung der Mikrotiterplatten erfolgte innerhalb von 15 min nach Herstellung des Inokulums. Zur Herstellung der Inokulumsuspension der Referenzstämme/Qualitätsstämme, *E. coli* DSMZ 1103 und *S. aureus* DSMZ 2569, wurden 55 µl der analog hergestellten Bakteriumsuspension in 11 ml MHB II ohne Zusatz von IPb pipettiert. Es erfolgte ebenfalls eine Durchmischung

mit Hilfe des Vortex für 30 Sekunden. Die speziesgleichen Referenzstämme wurden gleichermaßen wie die Isolate behandelt.

Beschickung der Mikrotiterplatten

In jede Vertiefung der Mikrotiterplatten wurden 50 µl Inokulum mit Hilfe des Sensititre Autoinokulators pipettiert. Es wurden drei verschiedene Platten mit je acht verschiedenen Wirkstoffen für *R. anatipestifer* verwendet. Im Laufe der Testphase kam es zu einem Layoutwechsel der Mikrotiterplatten, weshalb nicht alle Isolate gegenüber den weggefallenen bzw. neu aufgenommenen Wirkstoffen getestet werden konnten.

Versiegelung und Inkubation

Unmittelbar nach Beendigung des Pipettiervorganges wurden die Platten mit *R. anatipestifer*, sowie die mit den Referenzstämmen beimpften Platten mit einer nicht-perforierten, vom Hersteller mitgelieferten Folie verschlossen und bei einer Temperatur von 37°C für 24 h inkubiert.

Ablesung

Das Ablesen der Mikrotiterplatten erfolgte halbautomatisch mit dem Vizion-System und dem Programm „SWIN“. Positives Bakterienwachstum zeigte sich als Ansammlung von Zellen auf dem Boden der Vertiefungen der Mikrotiterplatten, als sogenannte Knopfbildung. In Kavitäten in denen kein Wachstum erfolgt war, stellten sich rötlich-braun, klar und durchscheinend dar. Die Ablesung der positiv-Kontrolle musste als erstes erfolgen. In beiden Vertiefungen musste ein deutliches, gleichartiges Wachstum zu erkennen sein. War dies nicht der Fall wurde die gesamte Platte als ungültig bewertet. In den nächsten Reihen wurde jeweils das entsprechende Feld markiert, das gemäß der Definition der MHK entsprach. War trotz ordnungsgemäßem Inokulum kein Wachstum zu erkennen, wurde die erste Vertiefung (= niedrigste Konzentration) als MHK-Wert festgelegt. War ein MHK-Wert nicht festzulegen, weil die Vertiefungen bis zur höchsten Konzentration bewachsen waren, wurde er als „resistent“ bezeichnet. Als Springer wurden Platten bezeichnet in denen keine kontinuierliche Abnahme des Bakterienwachstums vorhanden war, sondern eine oder mehrere Vertiefungen „übersprungen“ wurden und in der darauffolgenden Vertiefung wieder Wachstum vorhanden war. War dies in einer oder mehreren Reihen der Fall, wurde die Untersuchung der ganzen Platte wiederholt.

Reinheitsausstrich

Um die Reinheit des Inokulums zu überprüfen, wurde nach der Beschickung der Mikrotiterplatten ein Tropfen des Inokulums mit einer Einmalimpföse steril entnommen und auf einer Columbia-Schafblut-Agar-Platte ausgestrichen. Unter gleichen Bedingungen wie die Mikrotiterplatten wurde die Schafblutagar-Platte 18-24 h bebrütet. Vor der Ablesung der Mikrotiterplatten wurden die Reinheitsausstriche beurteilt. Bei Auftreten von Mischkulturen, wurde dies im Protokoll vermerkt. Die zur Probennummer gehörigen MHK-Platten wurden zunächst abgelesen, und aus einer Positiv-Kontrolle jeder MHK-Platte wurde ein Kontrollausstrich angefertigt. Beim Vorliegen einer Mischkultur wurden die MHK-Werte nicht verwendet. Es erfolgte eine Lagerung der Reinheitsausstriche für weitere 24 h bei Raumtemperatur und anschließend eine erneute Beurteilung. War nach diesen 48 h eine Mischkultur zu erkennen, wurden die bereits ermittelten MHK-Werte aus der Auswertung ausgeschlossen.

Keimzahlbestimmung

Mit Hilfe der Keimzahlbestimmung wurde überprüft, ob die Konzentration der Bakterien des Inokulums tatsächlich den Vorgaben von 5×10^5 koloniebildenden Einheiten (KBE) pro ml entsprach. Als Stammsuspension wurde das Inokulum verwendet, mit dem die Mikrotiterplatten beschickt wurden. Es erfolgte mindestens eine Überprüfung der Kontrollstämme

3.3.1.2 Agardilution

Die Durchführung der Agardilution erfolgte nach Vorgaben des CLSI in der Fassung VET01-A4 und Vet01-S2 (2013). Tab. 18 gibt einen Überblick über die untersuchten Chemotherapeutika und deren Konzentrationsspanne.

Tab. 18: Konzentrationen der eingesetzten Chemotherapeutika

| Wirkstoff | Abkürzung | Wirkstoffgehalt (mg/l) |
|--------------|-----------|------------------------|
| Enrofloxacin | ENRO | 0,12 - 32 |
| Tiamulin | TIA | 0,12 - 128 |
| Tylosin | TYL | 0,12 - 128 |

Herstellung der Agarplatten

Gemäß den Herstellerangaben wurden 38 Gramm MH-Agar in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und 15 min bei 121°C autoklaviert. Anschließend wurde die Agarose-Lösung im Wasserbad auf 60°C herunter gekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von IPb, um eine 5%ige Lösung zu erhalten. Dann wurden die entsprechenden Mengen antibiotischer Lösung in die Kolben gefüllt. Mit Hilfe einer Glaspipette wurden je 25 ml der 60°C warmen Agarose-Lösung in die Kolben pipettiert und nach vorsichtigem Schwenken in die bereitgestellten Petrischalen gegossen. Für jede Konzentrationsreihe wurde mindestens eine wirkstofffreie Kontrollplatte gegossen. Das Gießen der Platten erfolgte unter einer Sterilbank. Zum Abkühlen wurden die Platten 30 min unter dem Abzug stehen gelassen. Die Verwendung der Platten erfolgte entweder am gleichen Tag, oder innerhalb von fünf Tagen nach der Herstellung.

Herstellung des Inokulums

Mit einem sterilen Tupfer wurden zwei bis drei Kolonien einer 24 h gewachsenen Bakterienkultur von *O. rhinotracheale* aufgenommen und in 5 ml einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung suspendiert. Mittels Densitometer wurde diese Bakteriensuspension auf einen Trübungsstandard 0,5 McF eingestellt, was einer OD600 von 0,08-0,13E entspricht. Mit einem *E. coli* (ATCC 25922) Referenzstamm und einem *S. aureus*-Isolat wurde analog verfahren.

Beimpfung der Agarplatten und Inkubation

Wurden die Agarplatten über Nacht bei 2-8°C aufbewahrt, wurden diese eine halbe Stunde vor Verwendung bei Zimmertemperatur stehen gelassen, um ein Abtrocknen der Agaroberfläche zu gewährleisten. Auf jede Platte wurde je 1 µl des Inokulums pipettiert und mit einer sterilen Impföse auf der Agaroberfläche verteilt. Es wurde mit der wirkstofffreien Platte begonnen und von der niedrigsten zur höchsten Konzentrationsstufe beimpft. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Platten bei 35°C +/- 2°C und 5% CO₂ für *O. rhinotracheale*. Die Referenzstämme wurden bei gleicher Temperatur aerob bebrütet.

Ablesung

Die Ablesung erfolgte nach 24 h Inkubation. Als positives Wachstum wurde die Bildung von Bakterienkolonien bzw. eines Bakterienflecks gewertet. Kein Wachstum zeichnete sich durch eine blanke, glänzende Agaroberfläche aus.

Die Ablesung der wirkstofffreien Platten erfolgte als Erstes. Es musste ein deutliches, gleichartiges Wachstum zu erkennen sein. Im Anschluss wurden die Platten nach aufsteigender Wirkstoffkonzentration ausgewertet und die Konzentrationsstufen notiert, die gemäß der Definition der MHK entsprach.

3.3.1.3 E-Test

Herstellung der Agarplatten

Wie bei der Agardilution wurden 38 Gramm MH-Agar in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und 15 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung der Agaroselösung auf 60°C, erfolgte die Zugabe von 1Pb, um eine 5%ige Lösung zu erhalten. Die Herstellung und das Abkühlen der Platten erfolgte analog zur Agardilution. Die Haltbarkeit der Platten betrug fünf Tage.

Herstellung des Inokulums und Beimpfung der Agarplatten

Das Inokulum wurde hergestellt wie in der Agardilution beschrieben.

Beimpfung der Agarplatten und Inkubation

Voraussetzung für die Beimpfung der Platten war eine trockene Agaroberfläche. Es wurde je 1 µl des Inokulums auf die Agarplatte pipettiert und mit einer sterilen Impföse auf der Agaroberfläche verteilt. Nach dem Abtrocknen der Agaroberfläche wurde der E-Test Streifen, ein mit einem Antibiotikumkonzentrationsgradienten imprägnierter Teststreifen, auf den beimpften Agar aufgelegt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Platten bei 35°C +/- 2°C und 5% CO₂ für *O. rhinotracheale*. Die Inkubation der Referenzstämmen erfolgte unter den Bedingungen wie in der Agardilution beschrieben.

Ablesung

Die Ablesung erfolgte nach 24 h Inkubation. Die MHK konnte an der Stelle abgelesen werden, an der die Bakterien bis an den Teststreifen herangewachsen sind.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung und Typisierung von *R. anatipestifer*

Von den 108 *R. anatipestifer*-Isolaten wurden 57 aus Puten, 30 aus Enten und 11 aus Hühnern isoliert. Von 10 Isolaten ist die Geflügelspezies unbekannt.

102 *R. anatipestifer*-Isolaten waren aus Deutschland. Zwei Isolate waren aus den Niederlanden. Aus England, Frankreich, Tschechien und Thailand stammte je ein Isolat (Tab. 19).

Tab.19: Herkunftsland und Wirtsspezies der 108 untersuchten *R. anatipestifer*-Isolate

| Herkunft/Land | Herkunft/Tierart | Anzahl |
|---------------|----------------------|--------|
| Deutschland | Ente | 25 |
| | Pute | 56 |
| | Huhn | 11 |
| | Unbekannt (Geflügel) | 10 |
| England | Ente | 1 |
| Frankreich | Ente | 1 |
| Niederlande | Pute | 1 |
| | Ente | 1 |
| Thailand | Ente | 1 |
| Tschechien | Ente | 1 |

4.1.1 Biochemische Identifizierung von *R. anatipestifer*

Bei der biochemischen Identifizierung von *R. anatipestifer* ergaben sich sechs verschiedene Reaktionsprofile. Alle 108 Isolate waren Oxidase-positiv. Knapp 85% der Isolate zeigten im API 20 NE-Test eine positive Reaktion für das proteolytische Enzym Gelatinase. Die Hälfte war positiv für Urease, während nur ein Anteil von zwei Isolaten eine positive Reaktion für p-nitrophenyl-beta-D-glucoside (PNPG) zeigte.

Der API-Code 0210004 (positive Reaktion für Gelatinase, PNPG und Oxydase) kam mit 47,7% am häufigsten vor, gefolgt von Code 0010004 (positive Reaktion für PNPG und Oxidase) mit 36,7%. Dreizehn Isolate (11,9%) wiesen den Code 0000004 (positive Reaktion für Oxidase) auf, während der Code 020004 (positive Reaktion für Gelatinase und Oxidase) zweimal vorkam (1,8%). Die Codes 0220004 und 0020004 wurden nur jeweils einmal (0,9%) ermittelt. Abbildung (Abb) 1 verdeutlicht die Verteilung der API-Profile.

Das Reaktionsprofil 0220004 von einem *R. anatipestifer*-Isolat ist identisch mit einem Reaktionsprofil von *O. rhinotracheale*. Mittels PCR wurde das Vorhandensein von *O. rhinotracheale* ausgeschlossen.

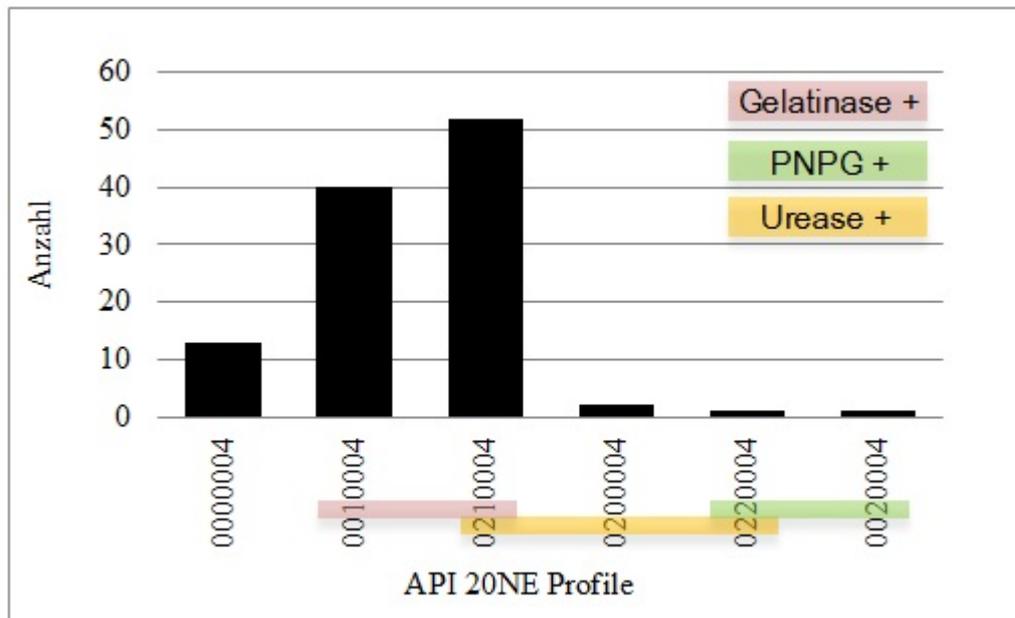


Abb. 1: Häufigkeit der verschiedenen API 20 NE-Profile von 108 *R. anatipestifer*-Isolaten

4.1.2 Molekularbiologische Identifizierung von *R. anatipestifer*

Die PCR für *R. anatipestifer* wurde mit der Primerkombination RA20F2 und RA20R4 durchgeführt. Durch diese wird ein Fragment von 662 bp innerhalb des 16S rRNA Genes nachgewiesen. Alle 108 untersuchten Isolate waren PCR positiv.

4.1.3 Serotypisierung von *R. anatipestifer*

Für *R. anatipestifer* wurden die Ergebnisse zur Serotypisierung bei der Stammakquise aus anderen Untersuchungseinrichtungen (Anicon, Ripac-Labor), sofern vorhanden, freundlicherweise mit übermittelt. Siebzehn *R. anatipestifer*-Isolate aus dem Institut für Geflügelkrankheiten wurden nicht serotypisiert. Die Serotypisierung der *R. anatipestifer*-Isolate von Anicon erfolgte nach dem Biovac System. Alle 30 Isolate gehören dem Serotyp A an. Die Typisierung der Ripac-Isolate wurde mit monovalenten Antiseren vorgenommen. Dem Serotyp 1 gehörten 24 Isolate an. Die Serotypen 2, 3, 4, 13, 15, 17, G1678K, Th67 und 428 waren nur durch jeweils ein Isolat vertreten. Kreuzreaktionen traten vor allem bei den Serotypen 4, 6, 7, 17 und Th67 auf (Abb. 2). Es wurden fünf Isolate des Serotyps A mittels monovalenter Antiseren überprüft. Alle fünf Isolate waren vom Serotyp 1. Eine Gesamtübersicht über die Herkunft der Isolate, biochemisches Profil und Serotypen gibt Tab. 6 im Anhang.

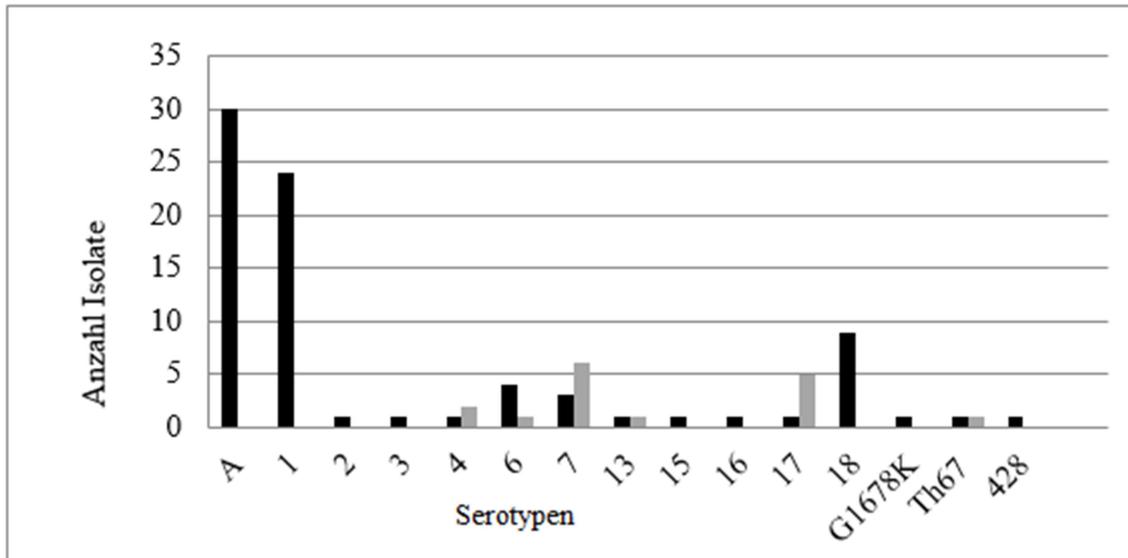


Abb. 2: Zuordnung der *R. anatipestifer*-Isolate zu den verschiedenen Serotypen, exklusive 17 nicht typisierter Isolate. Schwarz = Einzelreaktion, Grau = Kreuzreaktion

4.1.4 Makrorestriktionsanalyse von *R. anatipestifer*

Für den Verdau der genomischen DNA von *R. anatipestifer* wurden zwei in der Literatur beschriebene Restriktionsenzyme (*Sma*I, *Xba*I) getestet. Das Restriktionsenzym *Xba*I erwies sich nach mehreren Versuchen als ungeeignet, da keine deutlichen Bandenmuster ermittelt werden konnten. Mit dem Restriktionsenzym *Sma*I wurden hingegen zufriedenstellende Ergebnisse erzielt. Von den 108 *R. anatipestifer*-Isolaten konnten für 95 Isolate Bandenmuster mittels PFGE ermittelt werden. Für 13 Isolate war dies nach mehreren Versuchsdurchgängen nicht möglich. Für den Referenzstamm ATCC 15868 konnte in mehreren Durchgängen ebenfalls keine Bande nachgewiesen werden.

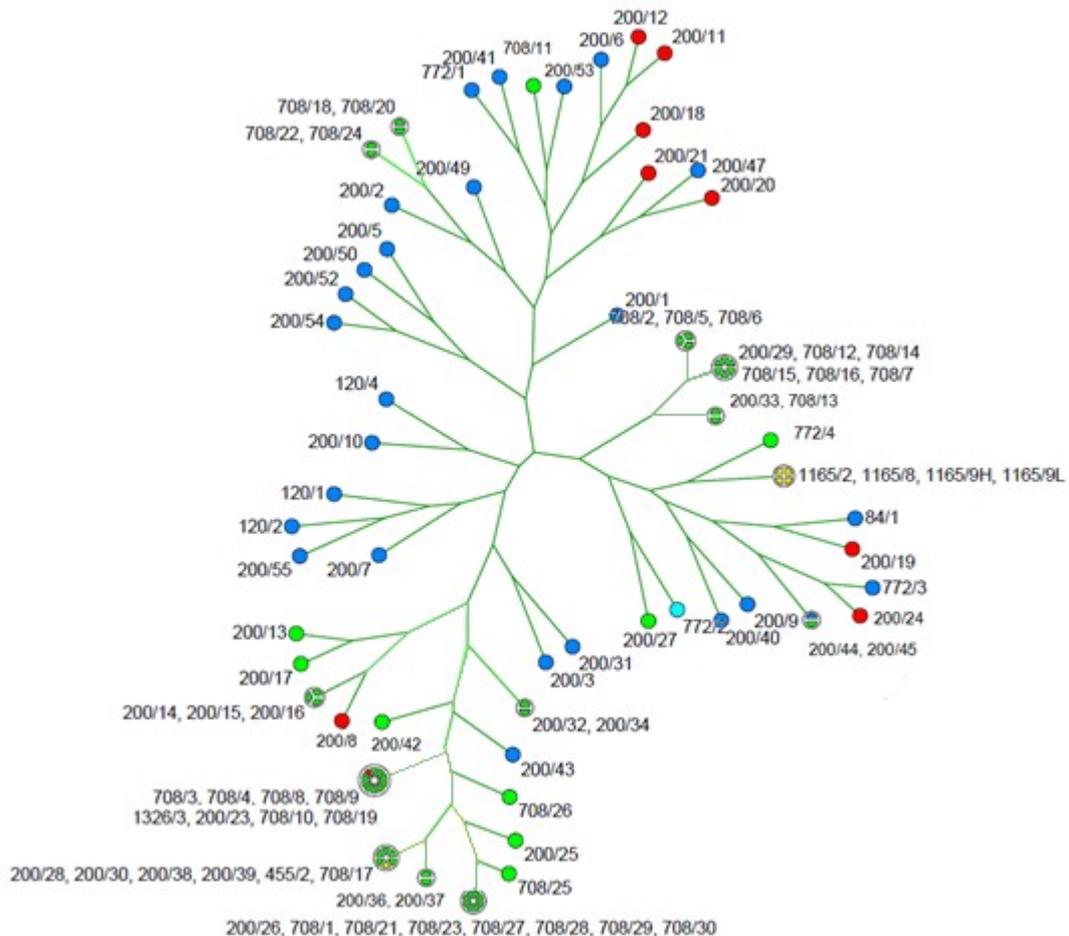


Abb. 3: Advanced Cluster Analysis mit Topscore UPGMA. Das Cluster zeigt den Verwandtschaftsgrad der 95 *R. anatipestifer* Isolate. Die Farben der Kreise stehen für die einzelnen Wirtspezies: blau = Ente, grün = Pute, rot = Huhn, hellblau = Broiler, gelb = unbekannt. Die Farben der Äste spiegeln die genetische Distanz der Isolate.

Aus der Advanced cluster Analyse (Abb. 3) wird ersichtlich, dass Putenisolate (grün) häufig gemeinsame Cluster bilden. Die Entenisolate (blau) zeigen große genetische Variabilität und sind nie in gemeinsamen Clustern zu finden. Mit den Hühnerisolaten (rot) verhält es sich ähnlich, sie sind weitgefächert zwischen Puten- und Entenisolaten verteilt.

Bei Betrachtung der Fragment-Muster der Entenisolate fällt eine große Heterogenität auf (Abb. 4). Keines der 26 Isolate ist mit einem der anderen identisch. Es wird weder ein Zusammenhang zwischen dem jeweils selben Serotyp noch zwischen demselben API-Profil ersichtlich. Bei den Putenisolate waren vier Isolatgruppen mit identischen Fragment-Mustern festzustellen, die größtenteils demselben Serotyp zugeordnet waren (Serotyp A und Serotyp 1). Die Isolate vom Serotyp 6 und Serotyp 10 waren ausschließlich einzeln zu finden. Isolate

Ergebnisse

vom Serotyp 18 waren bis auf zwei Ausnahmen mit einem Isolat vom Serotyp 12 und zwei Isolaten vom Serotyp A in einer Gruppe zu 100% identisch (Abb. 4).

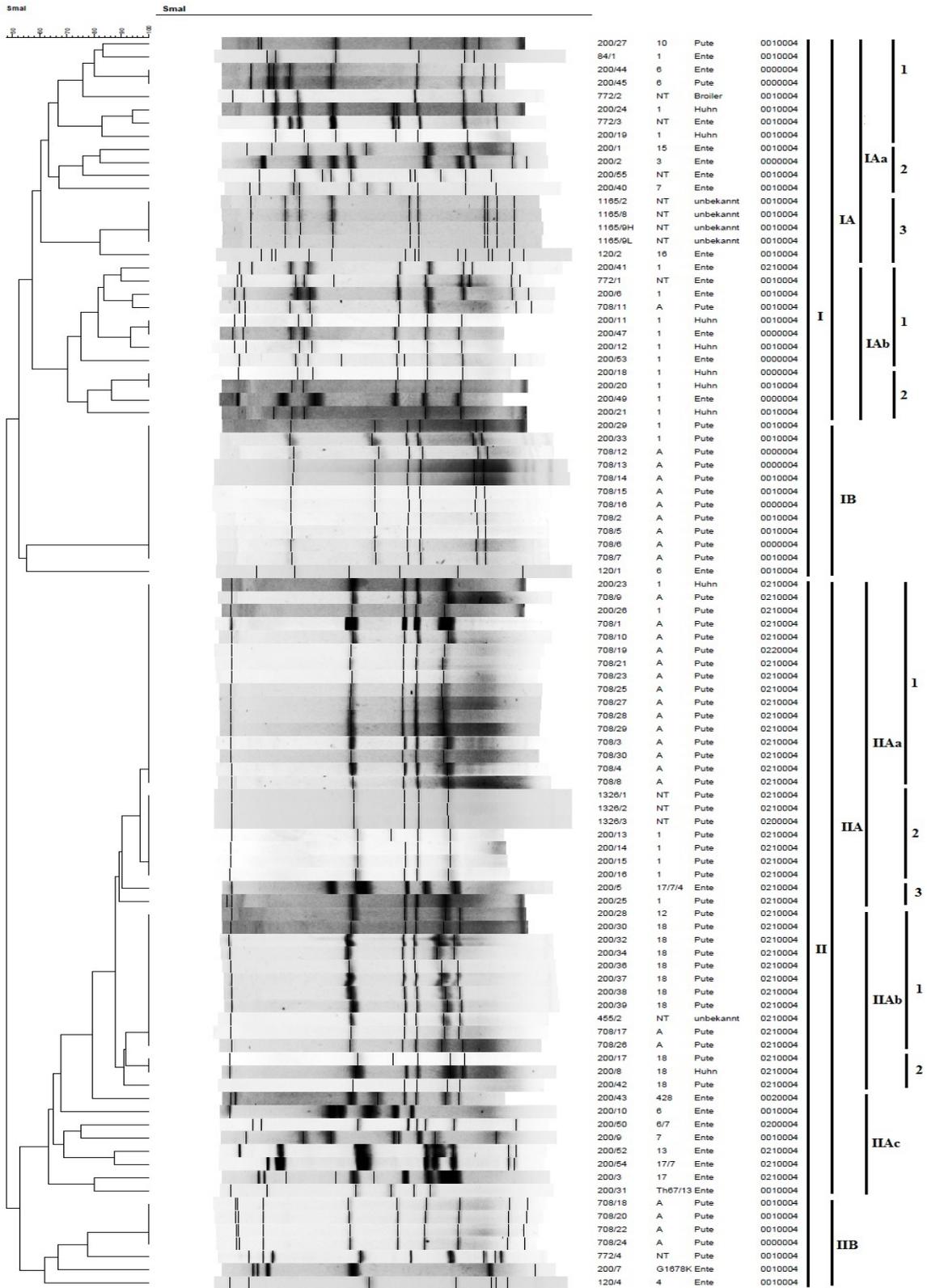


Abb. 4: Elektropherogramme und Stammbaum von *R. anatipestifer*, errechnet auf der Basis der genotypischen Ähnlichkeit nach Restriktion mit *Sma*I (n=95).

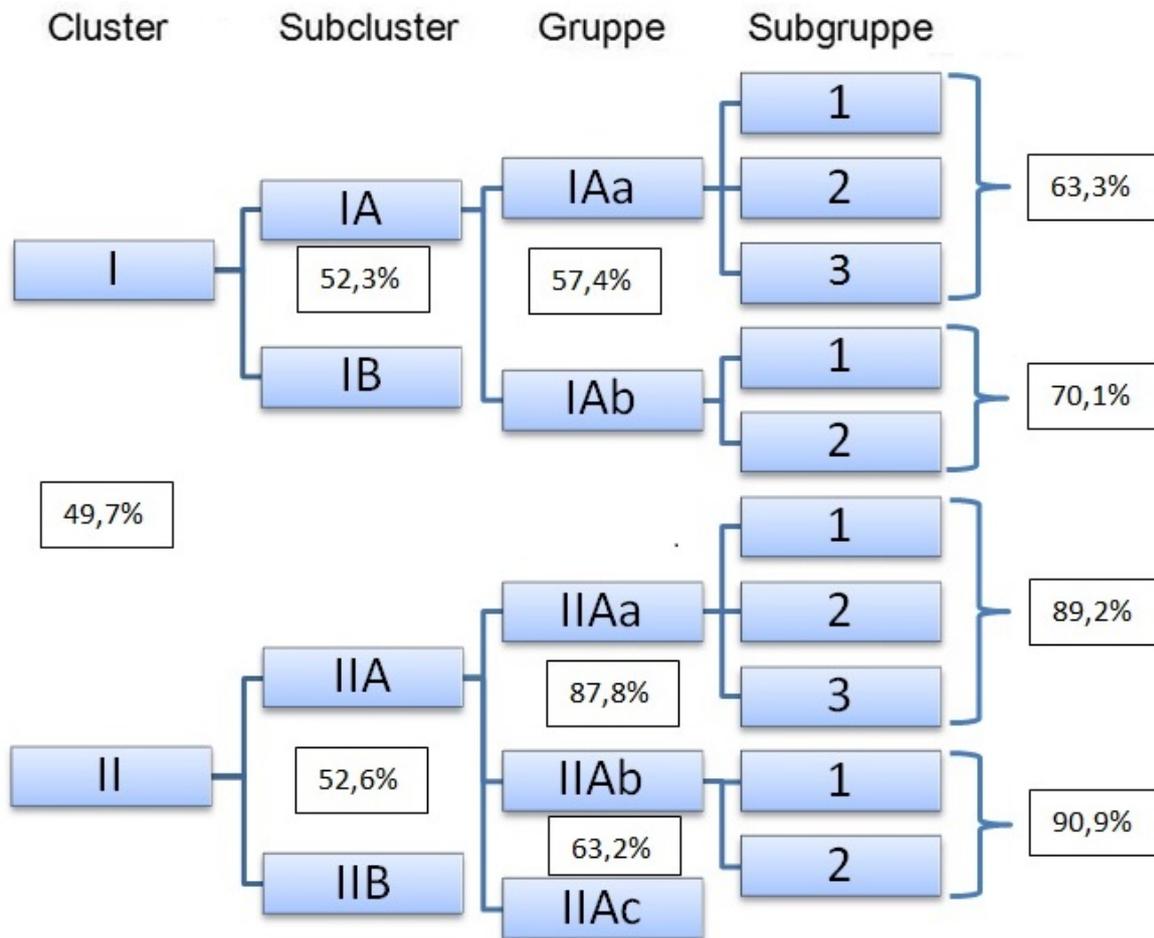


Abb. 5: Einteilung der mittels CHEF-PFGE untersuchten *R. anatipestifer*-Isolate

Die Restriktion der Sammlung erfolgte mit dem Enzym *Sma*I. Es ergaben sich zwei klonale Cluster (Cluster I und II). Die Ähnlichkeit der Cluster I und II untereinander betrug 49,7% (Abb. 5). Cluster I wurde weiterhin in zwei weitere Subcluster (IA und IB) unterteilt, deren Ähnlichkeit bei 52,3% lag. Die interne Übereinstimmung des Subclusters IB lag bei 55,1%. Von den 12 Isolaten im Subcluster IB stammten 11 Isolate von Puten und eins von einer Ente. Die Putenisolate waren zu 100% identisch und waren ausschließlich von den Serotypen A und 1. Das Entenisolat war vom Serotyp 6 (Abb. 4).

Der Subcluster IA konnte in zwei Gruppen (IAa und IAb) unterteilt werden mit einer Ähnlichkeit von 57,4% (Abb. 5). Die Gruppe IAa ließ sich in drei Subgruppen (1-3) unterteilen. Der interne Verwandtschaftsgrad Subgruppe 1 lag bei 66,7%, in Subgruppe 2 bei 67% und in Subgruppe 3 bei 82,4%. Mit einer Ähnlichkeit von 70,1% ließ sich die Gruppe

IAb in zwei Subgruppen mit einer internen Übereinstimmung von 75,3% (1) und 77,6% (2) unterteilen.

Der interne Verwandtschaftsgrad der Isolate im Cluster II betrug 52,6%. Cluster II wurde in zwei Subcluster (IIA und IIB) unterteilt. Die genetische Übereinstimmung im Subcluster IIB betrug 61,9%. Vier der sieben Isolate waren zu 100% klonal und stammten von Puten (Abb. 4). Im Subcluster IIA betrug der interne Verwandtschaftsgrad 63,2%. Das Subcluster wurde weiter unterteilt in drei Gruppen (IIAa, IIAb und IIAc). Die Ähnlichkeit der Gruppen IIAa und IIAb lag bei 87,8%, während die Gruppen IIAb und IIAc eine Ähnlichkeit von 63,2% auswiesen (Abb. 5).

Gruppe IIAa wurde in drei Subgruppen (1-3) unterteilt, mit einer Ähnlichkeit von 89,2%. In Subgruppe 1 befanden sich 16 Isolate. Fünfzehn stammten von Puten, ein Isolat war von einer Legehennen. Alle Isolate waren zu 100% klonal und es kam 14 mal der Serotyp A vor und zweimal der Serotyp 1. In Subgruppe 2 befanden sich ausschließlich Putenisolate, ebenfalls von Serotyp A oder Serotyp 1. Sie waren zu 100% identisch. Der Verwandtschaftsgrad bei Subgruppe 3 betrug 90,3% (Abb. 5).

Die Gruppe IIAb wurde in zwei Subgruppen (1-2) unterteilt, mit einer Ähnlichkeit von 90,9%. In Subgruppe 1 clustern, bis auf eine Ausnahme, Putenisolate vom Serotyp 12, 18 und A zusammen. Die genetische Übereinstimmung lag bei 100%. In Subgruppe 2 befanden sich ausschließlich Isolate vom Serotyp 18. Der Verwandtschaftsgrad betrug 90,9%.

4.1.5.1. Etablierung der Bouillon-Mikrodilution für *R. anatipestifer*

Zur Ermittlung eines geeigneten Testmediums für *R. anatipestifer* wurden Wachstumskurven mit zwei Feldisolaten und dem Referenzstamm ATCC11845 in reiner MHB II und in MHB II mit 2% IPb durchgeführt. Von den genannten Medium wurden jeweils 50 ml in einen Kolben gegeben und mit 1 ml einer Bakteriensuspension beimpft, die photometrisch auf eine Trübung von McF 0,5 eingestellt wurde. Nach Bestimmung der Ausgangswerte der optischen Dichte wurden die Suspensionen bei 37°C inkubiert. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurde jeweils 1 ml der Kultur entnommen und eine log₁₀ Verdünnungsreihe angefertigt. Es wurden die Verdünnungsstufen 10⁻³ bis 10⁻⁸ auf Blutagarplatten ausgespatelt, die anschließend weiter bei 37°C inkubiert wurden. Eine Auszählung der Verdünnungsreihen erfolgte nach 24 h.

Zur Validierung der Ergebnisse wurden der Referenzstamm und zwei Feldstämme in drei voneinander unabhängigen Durchgängen getestet und die Mittelwerte aus diesen ermittelt (Abb.6 und 7).

Ergebnisse

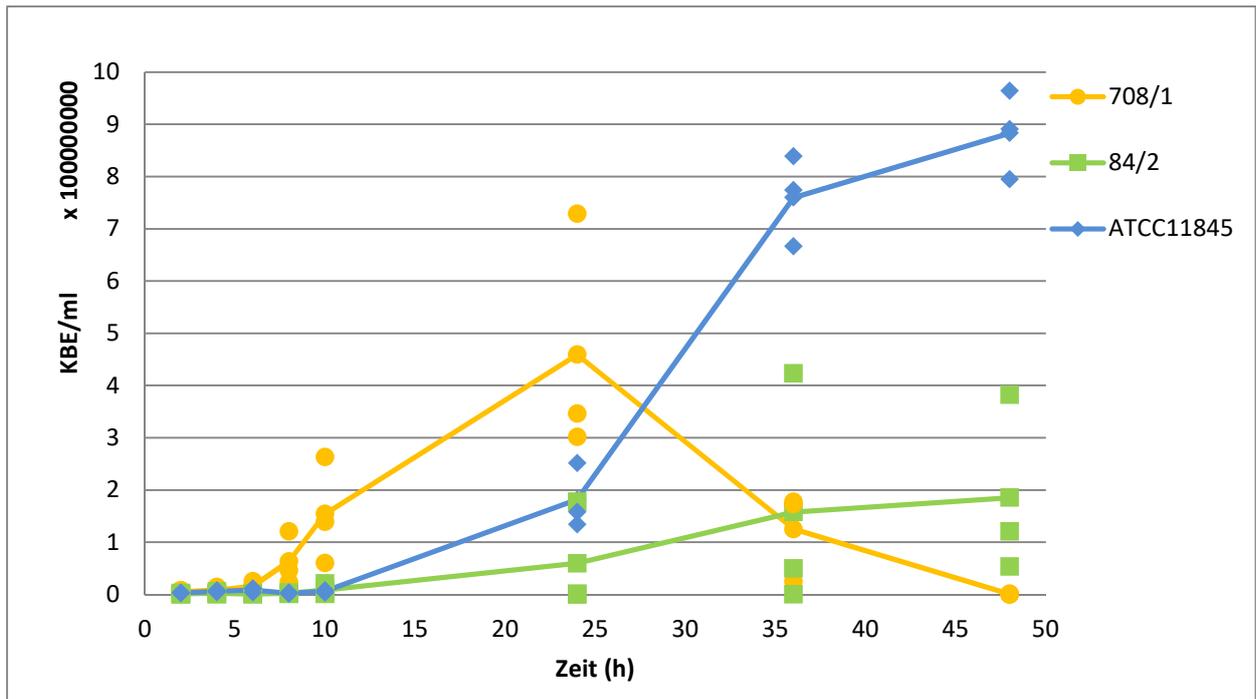


Abb6: Wachstumskurve von Feldstamm 708/1 und 84/2, sowie Referenzstamm ATCC 11845 in MHB II.

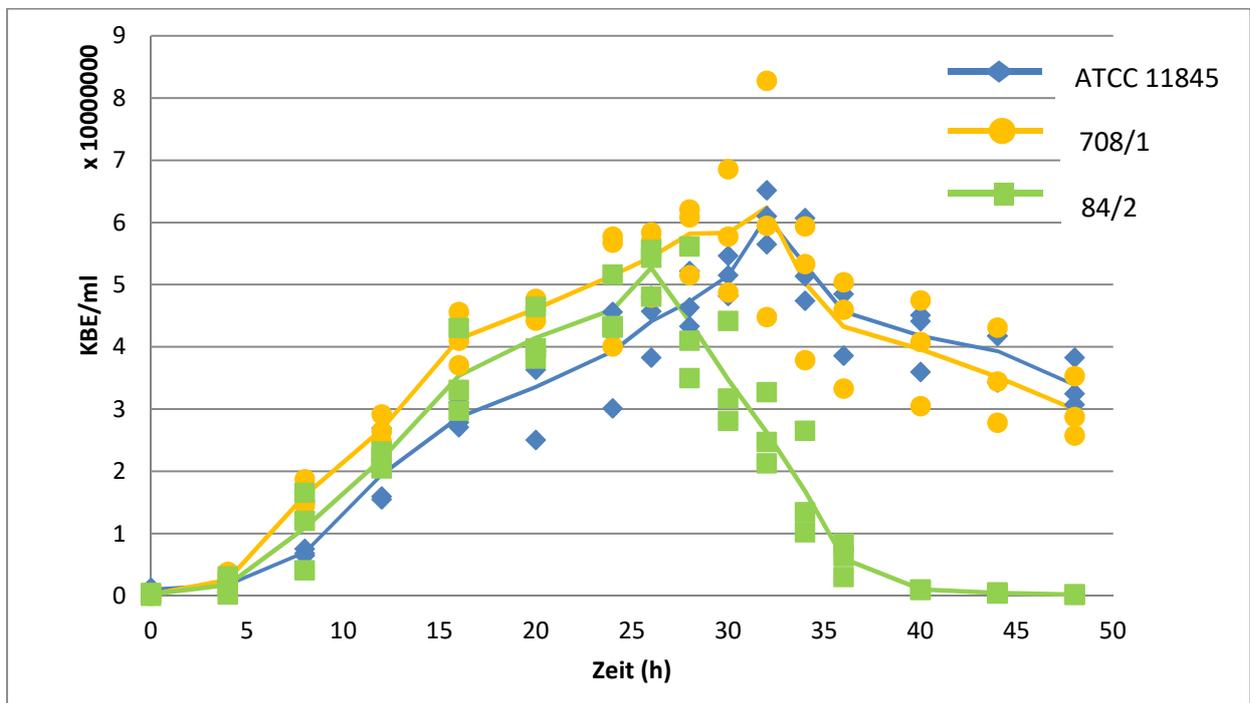


Abb7: Wachstumskurve von Feldstamm 708/1 und 84/2, sowie Referenzstamm ATCC 11845 in MHB II mit 2% IPb.

Anhand von Abb. 6 und 7 ist erkennbar, dass *R. anatipestifer* in MHB II mit 2% IPb sowohl bei den Feldstämmen 708/1 und 84/2 als auch beim Referenzstamm einen schnelleren Anstieg der Keimzahl zeigt, als in reiner MHB II.

Basierend auf den Ergebnissen der Wachstumskurven, wurde MHB II mit 2% IPb für die Testung von *R. anatipestifer* in der Bouillon-Mikrodilution gewählt. Die Inkubation muss mindestens 24 bis 30 h andauern. Zur Bestätigung wurde ein Doppelansatz unbeschichteter Mikrotiterplatten mit Suspensionen – eingestellt auf McF 0,5 – dieser Isolate beimpft. Es wurde jeweils ein Ansatz aerob und ein Ansatz unter mikroaerophiler Atmosphäre (semipermeable Verschlussfolie, 5% CO₂) inkubiert. Nach 24 h Inkubation wurde eine konstant gute Ablesbarkeit dokumentiert, unabhängig von der Inkubationsatmosphäre. Anschließend wurde die Bouillon-Mikrodilution mit den zwei Feldstämmen und dem Referenzstamm auf Antibiotika-beschichteten Mikrotiterplatten und unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Zur Validierung der Ergebnisse erfolgten ebenfalls drei voneinander unabhängige Versuchsdurchgänge. Das Ergebnis bei Feldisolat 708/1 zeigte bei fünf antimikrobiellen Wirkstoffen eine Schwankung der Hemmkonzentration von +1/-1 bei je einem der drei Testdurchgänge. Das zweite Feldisolat 84/2 zeigte bei 9 antimikrobiellen Wirkstoffen eine Schwankung im genannten Bereich, während beim Referenzstamm ATTC11845 bei 13 Wirkstoffen das Ergebnis um +1/-1 Titerstufe schwankte und bei Penicillin der MHK-Wert in einem Durchgang um zwei Titerstufen niedriger ausfiel. Die Durchführung des MHK-Tests mit MHB II mit 2% IPb und einer Inkubationsdauer von 24 h unter aerober Atmosphäre wurde als geeignet für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

4.1.5.2. Bestimmung des Resistenzverhaltens in vitro mittels Bouillon-Mikrodilution

Es wurden 108 *R. anatipestifer*-Stämme in der Bouillon-Mikrodilution getestet. Für alle Isolate konnten MHK-Werte gegenüber 22 antimikrobiellen Wirkstoffen aus 11 Antibiotikaklassen ermittelt werden. Die Stammakquise erfolgte über einen Zeitraum von eineinhalb Jahren. Innerhalb dieser Zeitspanne kam es zu einem Layout-Wechsel der Mikrotiterplatten. Die Bouillon-Mikrodilution wurde anfangs mit 53 Isolaten durchgeführt und zu einem späteren Zeitpunkt mit 55 Isolaten. Spiramycin und Chloramphenicol fielen weg, dafür kamen Tulathromycin und Cephalothin auf den Mikrotiterplatten neu dazu. Für diese Wirkstoffe liegen demzufolge nur die Ergebnisse von 53 bzw. 55 getesteten Isolaten vor. Da für *R. anatipestifer* keine Grenzwerte beim CLSI vorliegen, werden für eine geeignete Beurteilung der Empfindlichkeit der Isolate gegenüber den getesteten Wirkstoffen im Folgenden (Tab. 20, Anhang) die ermittelten Modalwerte, anschließend die MHK₅₀- und

MHK₉₀-Werte der Isolate vorgestellt. Weiterhin wurden die epidemiologischen cut off-Werte (Ecoff-Werte) sofern möglich statistisch ermittelt (Turnidge et al., 2006), (Tab. 21).

Tab. 21: Statistisch ermittelte Ecoff-Werte von *R. anatipestifer*

| Antimikrobieller Wirkstoff | Ecoff 97,5% | [n] |
|---|--------------------|------------|
| β-Lactame/Cephalosporine | | |
| Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) ^b | -* | 108 |
| Ampicillin | 0,125 | 108 |
| Penicillin | -* | 108 |
| Cefalothin | -* | 55 |
| Cefoperazon | 0,125 | 108 |
| Cefotaxim | 0,03 | 108 |
| Cefquinom | 0,03 | 108 |
| Ceftiofur | 0,06 | 108 |
| Aminoglycoside | | |
| Gentamicin | -* | 108 |
| Neomycin | -* | 108 |
| Streptomycin | -* | 108 |
| Carbapenem | | |
| Imipenem | 0,25 | 108 |
| Fenicole | | |
| Chloramphenicol | 8 | 53 |
| Florfenicol | -* | 108 |
| Fluorchinolone | | |
| Enrofloxacin | -* | 108 |
| Ciprofloxacin | -* | 108 |
| Marbofloxacin | -* | 108 |
| Nalidixinsäure | -* | 108 |
| Makrolide | | |
| Tilmicosin | -* | 108 |
| Tulathromycin | -* | 55 |
| Spiramycin | -* | 53 |
| Pleuromutilin | | |
| Tiamulin | 0,25 | 108 |
| Polymyxyn | | |
| Colistin | -* | 108 |
| Tetrazykline | | |
| Doxycyclin | -* | 108 |
| Tetrazyklin | -* | 108 |
| Sulfonamide | | |
| Trimethoprim/Sulfmethoxazol (1:19) ^c | 8 | 108 |

*Bestimmung mit Ecoff-Finder nicht möglich

Die Verteilung der MHK-Werte der 108 *R. anatipestifer* Isolate, sowie die Verteilung der MHK-Ergebnisse nach Wirtsspezies ist im Anhang in den Tab. 22 und 23 zusammenfassend dargestellt.

Pleuromutilin/Amphenicol/Carbapenem

Die MHK-Verteilung der 108 *R. anatipestifer*-Isolate gegenüber Tiamulin, Florfenicol und Imipenem liegen weitestgehend im Bereich der niedrigen bis mittleren getesteten Hemmkonzentrationen, gegenüber Chloramphenicol ergaben sich größtenteils MHK-Werte zwischen 2 mg/l und 128 mg/l. Ein Isolat aus Frankreich, welches aus einer Ente isoliert wurde, weist einen MHK-Wert von 2 mg/l gegenüber Imipenem auf und damit den höchsten Wert gegenüber dieses Antibiotikums. Bei allen anderen Entenisolaten liegen die MHK zwischen $\leq 0,015$ mg/l bis 0,12 mg/l. Für die Puten- und Hühnerisolate, sowie die Isolate unbekannter Herkunft wurden maximal MHK-Werte gegenüber Imipenem bis 1 mg/l ermittelt, die somit eine Konzentrationsstufe über dem ermittelten MHK_{90} -Wert liegen. Die statistisch ermittelten Ecoff 97,5%-Werte gegenüber Tiamulin und Imipenem liegen bei 0,25 mg/l und gegenüber Chloramphenicol bei 8 mg/l. Für Florfenicol konnte kein Ecoff-Wert ermittelt werden.

Fluorchinolone/Chinolone

Für die Fluorchinolone Enrofloxacin, Marbofloxacin und Ciprofloxacin wird eine bimodale Verteilung der Isolate im Testbereich ersichtlich. Ein Drittel der Isolate ist im unteren Hemmbereich zu finden, während sich zwei Drittel in der oberen Hälfte mit höheren Konzentrationen befinden. Das Chinolon Nalidixinsäure, eine Vorstufe der Fluorchinolone wies andeutungsweise eine Aufteilung in zwei Populationen auf, jedoch mit einer deutlichen Verschiebung in die höheren Hemmbereiche zwischen 1 mg/l bis >128 mg/l. Für die genannten Wirkstoffe konnten mit dem Ecoff-Finder statistisch keine Ecoff-Werte ermittelt werden

Polymyxin

Gegenüber Colistin konnten für alle Isolate MHK-Werte über der höchsten Testkonzentration von >16 mg/l nachgewiesen werden. Auch hier war die Berechnung eines Ecoff-Wertes nicht möglich.

Aminoglycoside

Die MHK-Werte gegenüber Neomycin, Streptomycin und Gentamicin waren weitestgehend in der oberen Hälfte mit höheren Hemmkonzentrationen zu finden. Der MHK_{50} und MHK_{90} lag für alle drei Wirkstoffe bei 32 mg/l bzw. 64 mg/l. Die Ermittlung von Ecoff-Werten war für keinen der Wirkstoffe möglich.

Makrolide

Die MHK-Werte für Tulathromycin liegen sowohl für die Puten- als auch die Hühnerisolate bis auf wenige Ausnahmen über der höchsten getesteten Hemmkonzentration. Bei den Entenisolaten sind angedeutet zwei Populationen zu erkennen. Eine Hälfte der Isolate ist im mittleren bis hohen Testbereich zwischen 1 mg/l und 32 mg/l zu finden, während die andere Hälfte sich wie bei den Puten- und Hühnerisolaten verhält. Für Tilmicosin gibt es in der Verteilung der MHK-Werte bei den einzelnen Spezies Unterschiede. Bei Puten ist eine Hälfte über die oberen zwei Drittel des Testbereiches verteilt zwischen 1 mg/l und 128 mg/l, während die andere Hälfte der Isolate über der höchsten Testkonzentration von 128 mg/l zu finden ist. Die MHK-Werte der Entenisolate zeigen ein bimodales Verteilungsmuster. Zwei Drittel sind im unteren Hemmbereich zwischen $\leq 0,06$ mg/l und 0,25 mg/l zu finden und ein Drittel ist im mittleren Hemmbereich zwischen 1 mg/l und 8 mg/l positioniert. Für die Hühnerisolate sind die MHK-Werte über den gesamten mittleren Testbereich gleichmäßig verteilt.

Der Großteil der Isolate wies hohe MHK-Werte ab 64 mg/l gegenüber Spiramycin auf, mit Ausnahme einiger Hühner- und Entenisolate.

Penicilline

Für Penicillin und Ampicillin ergab sich eine weite Streuung der MHK-Werte über den gesamten Testbereich mit zunehmender Anzahl an Isolaten in den höheren Hemmbereichen. Andeutungsweise sind auch hier zwei Populationen erkennbar. Hier konnte nur für Ampicillin ein Ecoff 97,5%-Wert von 0,125 mg/l ermittelt werden. Die Verteilung der MHK-Werte für Amoxicillin/Clavulansäure konzentrierte sich hingegen im mittleren Hemmbereich zwischen 0,25 mg/l und 4 mg/l.

Cephalosporine

Für Ceftiofur wurden bei allen Isolaten niedrige MHK-Werte von $\leq 0,12$ mg/l ermittelt, sowie ein Ecoff 97,5%-Wert von 0,06 mg/ml. Bei Cefotaxim zeigen wenige Isolate einen Trend zum

mittleren Hemmbereich (bis 2 mg/l). Die MHK-Werte für Cefoperazone und Cefquinome hingegen sind bei den Hühnerisolaten, sowie bei den Isolaten unbekannter Herkunft über den gesamten Testbereich verteilt. Bei den Putenisolaten zeigt sich hingegen eine Aufspaltung in zwei Populationen. Die MHK-Werte von einem Drittel der Isolate sind im unteren Hemmbereich zu finden von $\leq 0,015$ mg/l bis 0,25 mg/l. Zwei Drittel der MHK-Werte bewegen sich am Übergang vom mittleren zum hohen Testbereich zwischen 1 mg/l bis 32 mg/l. Die Ecoff 97,5%-Werte liegen bei Cefotaxim und Cefquinome bei 0,03 mg/l und von Cefoperazon bei 0,125 mg/l.

Sulfonamide

Die MHK-Werte für Trimethoprim/Sulfmethoxazol liegen durchweg im mittleren Testbereich zwischen $\leq 0,06$ mg/l bis 4 mg/l verteilt. Eine Ausnahme bildet das französische Entenisolat, das mit einem MHK-Wert von 16 mg/l im hohen Hemmbereich aufzufinden ist. Alle anderen Isolate überschreiten den MHK-Wert von 4 mg/l nicht. Der Ecoff 97,5%-Wert liegt bei 8 mg/l (Tab. 21).

Tetrazykline

Im Vergleich der beiden Wirkstoffe Tetrazyklin und Doxyzyklin waren für Tetrazyklin mehr Isolate mit höheren MHK-Werten zu zählen. Für Doxyzyklin lag der MHK_{50} bei 1 mg/l, der MHK_{90} bei 4 mg/l, bei Tetrazyklin hingegen bei 8 mg/l bzw. bei 16 mg/l.

4.1.5.3. Qualitätssicherung und Reproduzierbarkeit

Die Qualitätsstämme *E. coli* ATCC 25922 und *S. aureus* ATCC 29213 wurden zur Qualitätssicherung mitgeführt. Die MHK-Werte lagen innerhalb der Spannweite und sind unter Tab. 24 im Anhang aufgeführt.

4.2. Charakterisierung und Typisierung von *O. rhinotracheale*

Die 100 Isolate von *O. rhinotracheale* wurden aus dem Zeitraum 2009 bis 2012 ausgewählt. Alle Isolate stammen aus Deutschland. Der größte Anteil der Isolate stammt von Puten (87%), ein Isolat wurde aus Legehennen gewonnen. Bei den zwölf übrigen Isolaten war die Tierart nicht bekannt. Sie wurden jedoch aus Geflügelspezies isoliert.

4.2.1 Biochemische Identifizierung von *O. rhinotracheale*

Bei den 100 *O. rhinotracheale*-Isolaten traten die für diese Spezies typischen Charakteristika auf. Es verhielten sich 92 Isolate Oxidase-positiv und acht Oxidase-negativ (Tab. 25). Der

API-20-NE-Test ergab bei 57% der Stämme den Code 0020004, bei 34% den Code 0220004 und bei 1% den Code 1220004. Für die oxidasenegativen Stämme ergaben sich zu 6% der Code 0020000 und je zu 1% der Code 1020000 und 0220000 (Abb. 8).

Tab. 25: Anzahl Oxidase positiver und –negativer *O. rhinotracheale*-Stämme der einzelnen Wirtsspezies

| Tierart | Anzahl | Oxidase + | Oxidase - |
|------------|--------|-----------|-----------|
| Puten | 87 | 81 | 6 |
| Legehennen | 1 | 1 | 0 |
| Unbekannt | 12 | 10 | 2 |
| Insgesamt | 100 | 92 | 8 |

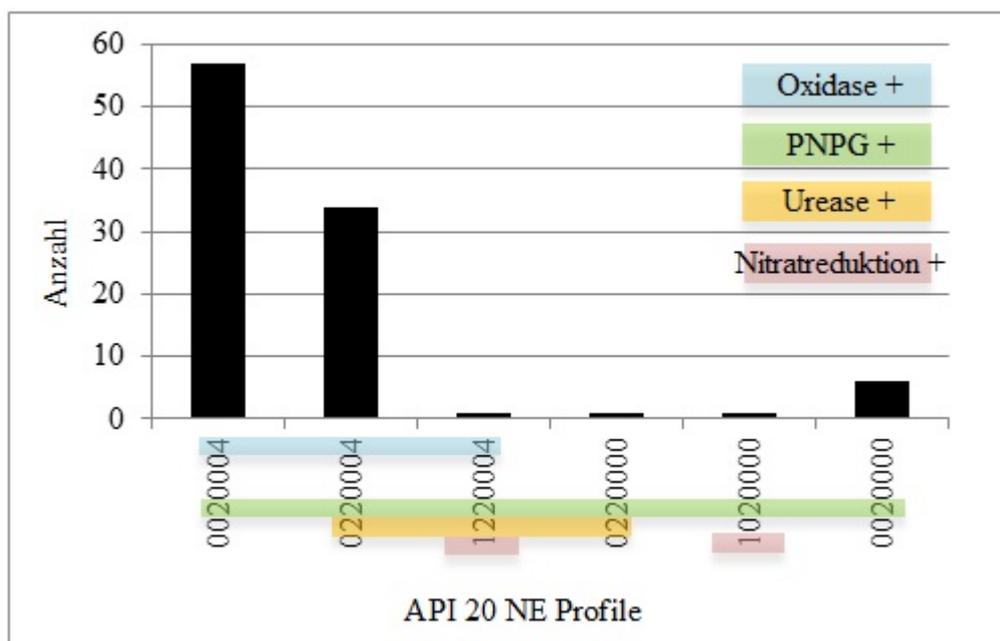


Abb. 8: Häufigkeit der verschiedenen API 20 NE-Profile von *O. rhinotracheale* (n=100)

4.2.2. Molekularbiologische Identifizierung von *O. rhinotracheale*

Zusätzlich zur biochemischen Identifizierung wurden alle zur Verfügung stehenden *O. rhinotracheale* Isolate in der PCR untersucht. Die Durchführung erfolgte mit der Primerkombination OR 16S-F1/OR 16S-R1 zum Nachweis eines 784 bp großen Fragmentes, welches spezifisch für *O. rhinotracheale* ist. Alle 100 Isolate waren PCR positiv.

4.2.3. Serotypisierung von *O. rhinotracheale*

Die Serotypisierung von *O. rhinotracheale* wurde bereits im Rahmen einer anderen Dissertation am Institut für Geflügelkrankheiten für die ausgewählten Isolate vorgenommen (Numee, 2012). In Deutschland am häufigsten vorkommend ist der Serotyp A. Diesem Serotyp gehören 68 Isolate an. Deutlich weniger häufig treten die Serotypen B, E und I auf, wohingegen Serotyp C und H nur durch jeweils zwei Isolate vertreten werden. Fünf Isolate waren mittels Agargelpräzipitationstest nicht typisierbar (Abb. 9).

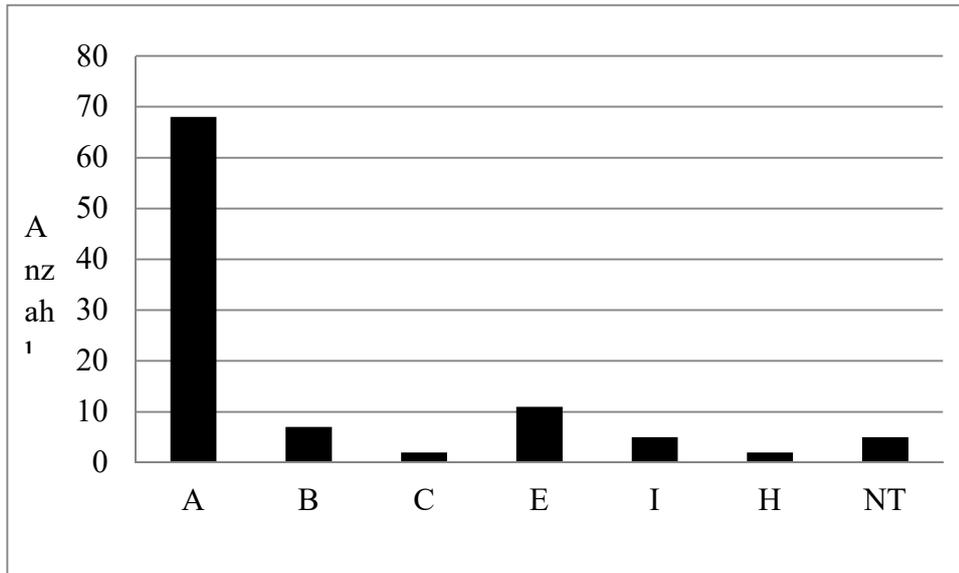


Abb. 9: Zuordnung der deutschen *O. rhinotracheale*-Isolate zu den verschiedenen Serotypen (n=100), *¹NT= nicht typisierbar

4.2.4. Makrorestriktionsanalyse von *O. rhinotracheale*

Der Verdau der genomischen DNA wurde für *O. rhinotracheale* mit der Restriktionsendonuklease *SalI* umgesetzt. Im Anschluss erfuhren die Fragmente mittels CHEF-PFGE ihre Auftrennung.

Es konnten alle 100 *O. rhinotracheale*-Isolate via PFGE typisiert werden. Mit dem Computerprogramm BioNumerics Version 6.0 wurde der Verwandtschaftsgrad der 100 Isolate, basierend auf der Analogie ihrer Restriktionsfragment-Längenprofile analysiert. Die Darstellung erfolgte in Form eines Dendrogramms mit den dazugehörigen Elektropherogrammen (Abb. 10). Abb. 11 zeigt die Einteilung in Cluster, Subcluster, Gruppen und Subgruppen.

Ergebnisse

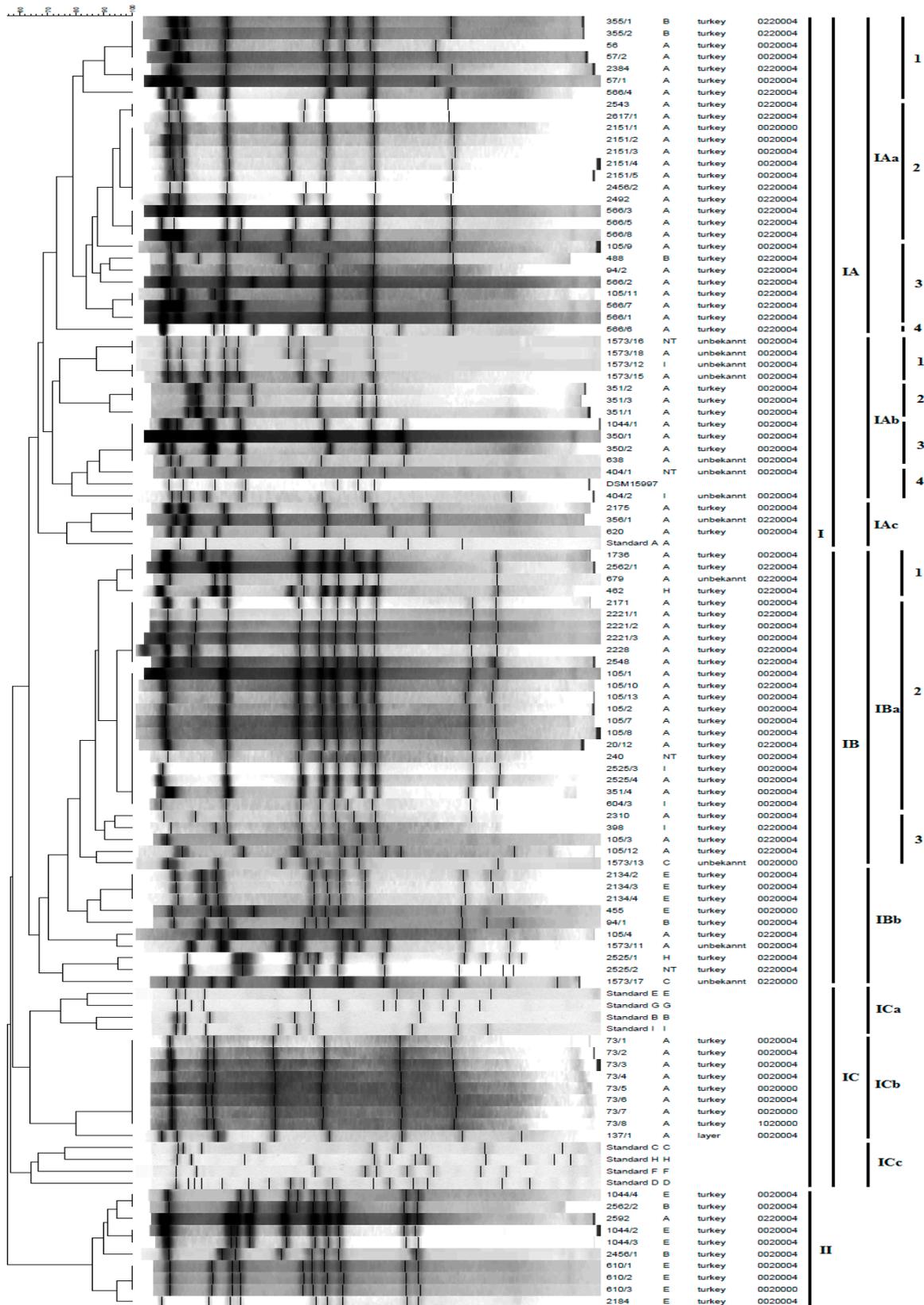


Abb. 10: Elektropherogramme und Stammbaum der *O. rhinotracheale*-Isolate, errechnet auf der Basis der genotypischen Ähnlichkeit nach Restriktion mit *Sa*II (n=100)

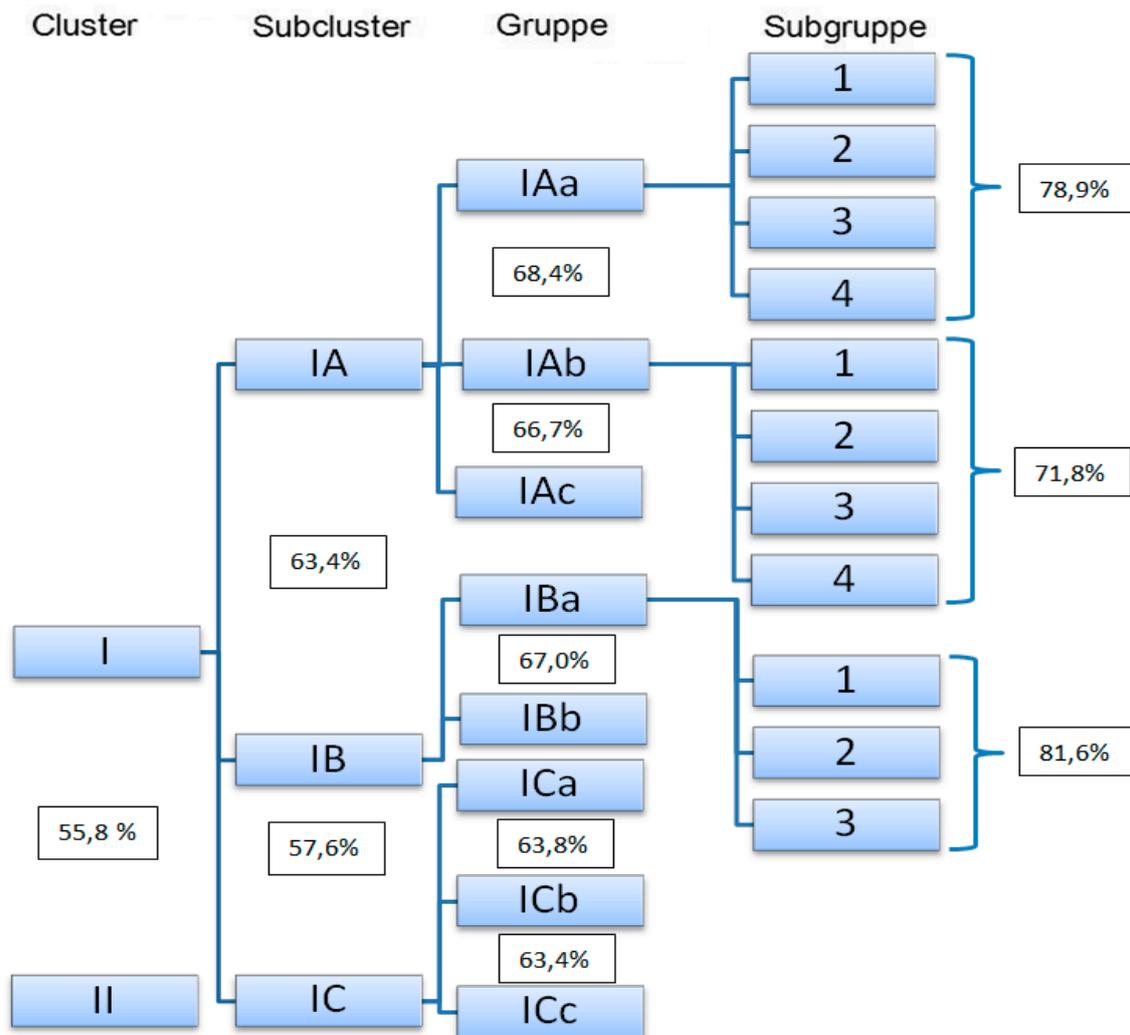


Abb. 11: Einteilung der mittels CHEF-PFGE untersuchten *O. rhinotracheale*-Isolate

Die Restriktion des gesamten Stammkollektivs mit dem Enzym *SaII* ergab zwei klonale Gruppen (Cluster I und II). Beide wiesen eine Ähnlichkeit von 55,8% zueinander auf (Abb. 11). Cluster I wurde in drei weitere Subcluster (IA, IB und IC) unterteilt. Die Ähnlichkeit der Cluster IA und IB zu IC betrug 57,6%, während Cluster IA und IB eine Ähnlichkeit von 63,4% aufwiesen. Die interne Übereinstimmung des Clusters IC betrug 63,4%, wobei acht der neun Isolate zu 100% identisch waren. Alle acht Isolate stammten von Puten. Das Einzelisolat im Clusters IC stammte von einer Legehennen. Der Subcluster IA konnte in drei Gruppen (IAa, IAb und IAc) mit einer Ähnlichkeit von 66,7% unterteilt werden. Der Subcluster IB konnte in zwei Gruppen (IBa und IBb) mit einer Ähnlichkeit von 67,0% unterteilt werden (Abb. 11). Die Gruppe IAa ließ sich in vier weitere Subgruppen (1-4) unterteilen, die eine Ähnlichkeit von 78,9% aufwiesen. Die interne Übereinstimmung lag bei 82,8% (1), 93,3 (2), 83,8% (3) und 100% (4). Die Gruppe IAb wurde in vier Subgruppen (1-4) unterteilt mit einer

Ähnlichkeit von 71,8%. Dabei war eine interne Übereinstimmung der einzelnen Subgruppen von 87,5% (1), 92,3% (2), 100% (3) und 78,6% (4) zu finden. Mit einer Ähnlichkeit von 81,6% ließ sich die Gruppe IBa in drei Subgruppen (1-3) unterteilen, mit einer internen Übereinstimmung von 94,7% (1), 94,7 (2) und 81,6% (3).

Die Standardserotypen von *O. rhinotracheale* zeigten alle unterschiedliche Fragmentmuster. Die genetische Ähnlichkeit der Standardserotypen A, B, C, D, E, F, G, H und I untereinander lag bei 39,8%. Verglichen mit den Fragment Mustern der Stammsammlung ergaben sich keine genetischen Übereinstimmungen mit den Standards (Abb. 10 und 12).

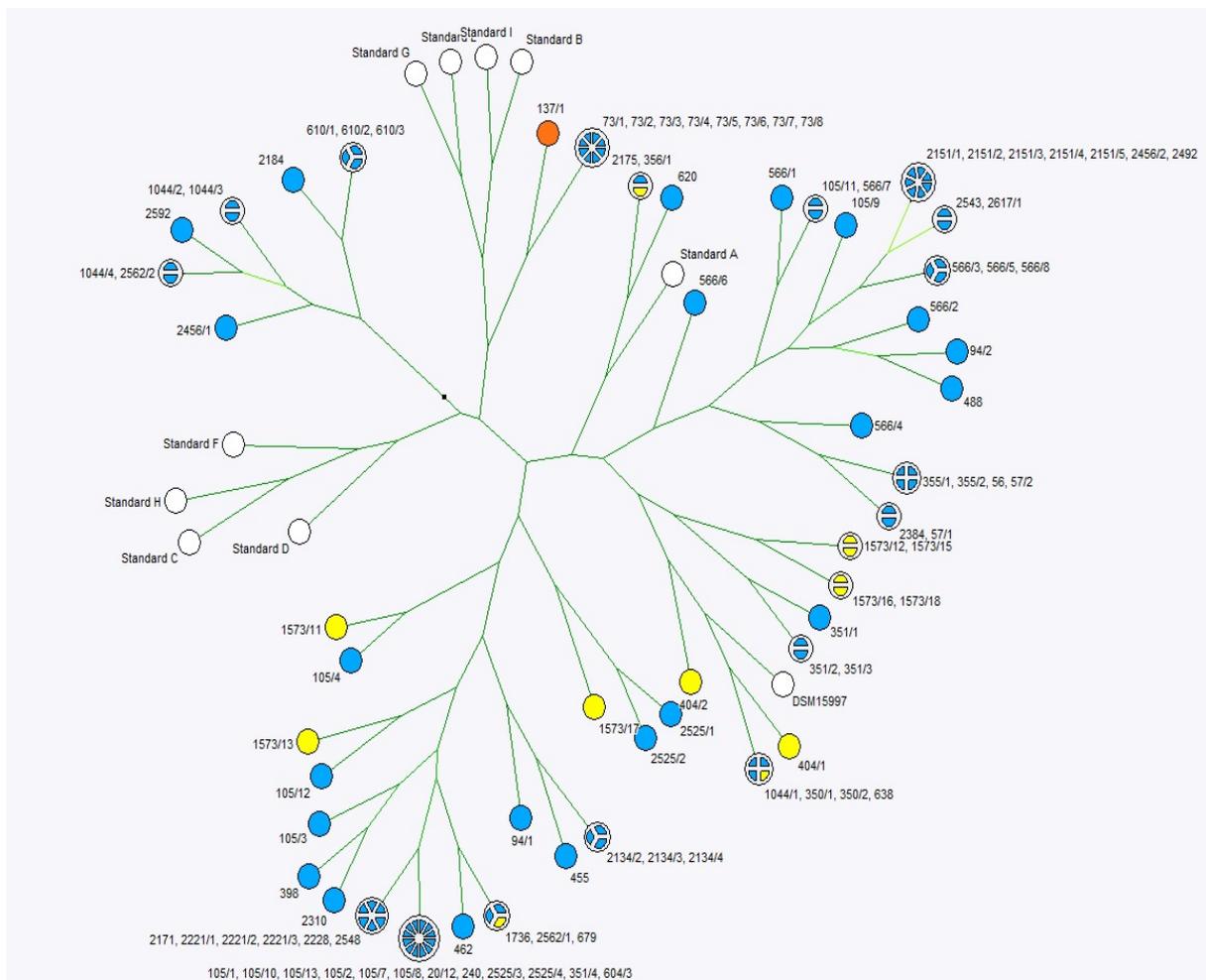


Abb. 12: Advanced Cluster Analysis mit Topscore UPGMA. Das Cluster zeigt den Verwandtschaftsgrad der 100 *O. rhinotracheale*-Isolate. Die Farben stehen für die einzelnen Wirtspezies: blau = Pute, orange = Huhn, gelb = unbekannt, weiß = Standards/Referenzstamm.

4.2.5.1. Versuche zur Etablierung einer Methode zur MHK-Bestimmung für *O. rhinotracheale*

Es wurden für *O. rhinotracheale* Wachstumskurven mit zwei Feldisolaten und dem Referenzstamm DSMZ 15997 in MHB II, MHB II mit Supplementierung von 3% IPb, sowie BHI angelegt. Es erfolgten jeweils drei voneinander unabhängige Wiederholungen. Das beste Wachstum wurde im BHI-Medium erzielt. In MHB II ohne Zusätze wurde bei allen drei Stämmen nur sehr schwaches Wachstum beobachtet. In supplementierter MHB II wurde etwas besseres Wachstum erzielt (Abb. 13, 14 und 15).

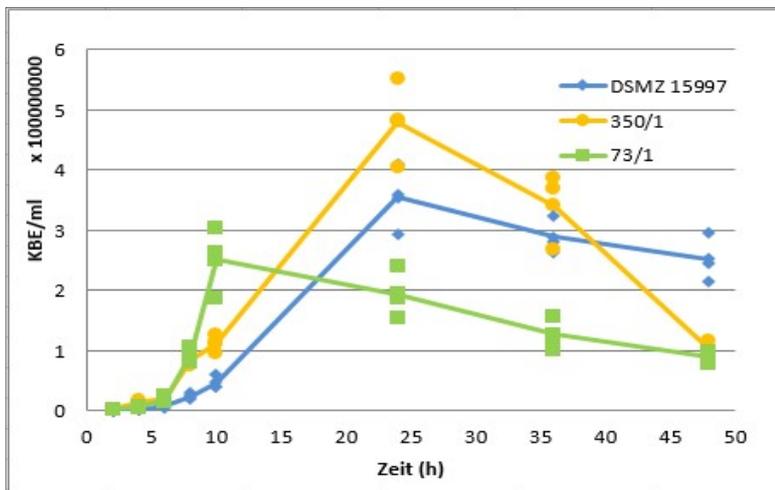


Abb. 13: Wachstumskurven von Referenzstamm DSMZ15997 und der Feldstäme 350/1 und 73/1 in BHI.

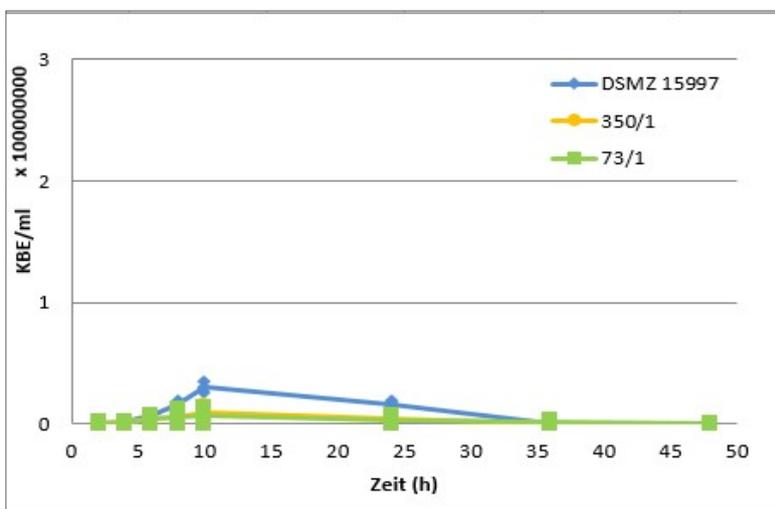


Abb. 14: Wachstumskurven von Referenzstamm DSMZ15997 und der Feldstäme 350/1 und 73/1 in MHB II.

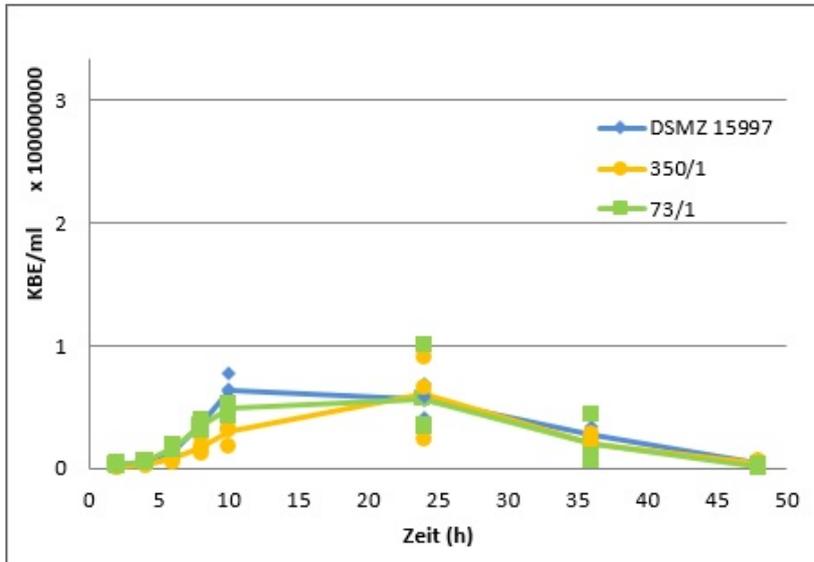


Abb. 15: Wachstumskurven von Referenzstamm DSMZ15997 und der Feldstämme 350/1 und 73/1 in MHB II mit 3% IPb.

Es wurde MHB II mit 3% Prozent IPb als Medium für die weiteren Versuche ausgewählt und 20 Isolate mittels Bouillon-Mikrodilution auf antibiotikabeschichteten Mikrotiterplatten getestet. Von den untersuchten 20 Isolaten zeigten acht Isolate die gewünschte Knopfbildung in den Kavitäten der Mikrotiterplatten. Zwölf Isolate waren wegen schlechten bzw. rasenartigen Wachstums nicht auswertbar. Die Abb. 16 und 17 zeigen je ein Beispiel eines rasenbildenden- und eines knopfbildenden Isolates.

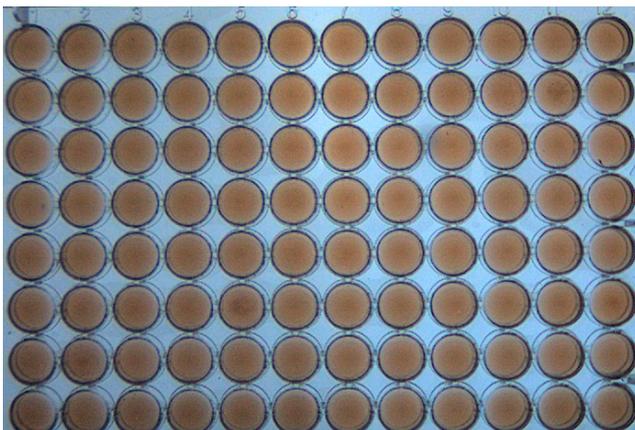


Abb. 16: Isolat 20/12, Rasenbildner

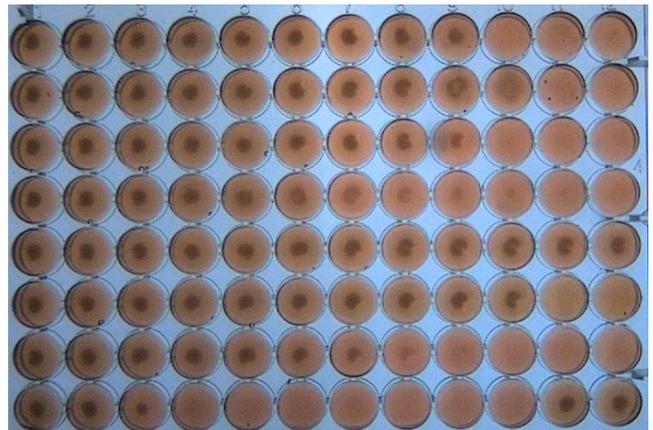


Abb. 17: Isolat 488, Knopfbildner

Es wurden je sechs Isolate mit Knopf- und sechs Isolate mit Rasenbildung für weitere Versuche ausgewählt. In 96-Well Mikrotiterplatten ohne Wirkstoff wurde das Wachstumsverhalten der zwölf *O. rhinotracheale*-Isolate, sowie des Referenzstammes DSMZ

15997 nochmals 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 hingegen ausschließlich vom Serotyp A, während andere Serotypen wie E, B und H Knöpfe in den Wells der Mikrotiterplatten bildeten

(Tab. 26).

| 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 |
| 351/4 | 0020004 | A | | 2456/1 | 0020004 | B |
| 1044/3 | 0020004 | E | | 2562/2 | 0020004 | B |
| 2221/3 | 0020004 | A | | | | |
| 2548 | 0220004 | A | | | | |
| 105/1 | 0020004 | A | | | | |
| 105/12 | 0220004 | A | | | | |

Tab. 26: Vergleich der rasen- und knopfbildenden Isolate von *O. rhinotracheale*

*¹ ST= Serotyp, *²= nicht typisierbar

Für die rasenbildenden Isolate bzw. die Isolate, bei denen kein Wachstum erkennbar war, war die Bestimmung einer MHK nicht möglich. Dies machte eine weitere Optimierung des Testsystems bezüglich der Wachstumsbedingungen notwendig.

Zunächst wurde das Veterinary fastidious Medium (VfM) getestet, welches vom CLSI (2013) als weiteres geeignetes Medium für die Resistenztestung von anspruchsvollen Erregern empfohlen wird. Im Testdurchgang mit den zwölf Isolaten in einer 96-Well Mikrotiterplatte ohne Wirkstoff wurde makroskopisch kein Wachstum gesehen.

In einem weiteren Versuchsdurchgang wurde der Anteil an IPb in der MHB II erhöht. Getestet wurden Konzentrationen von 5%, 7,5% bzw. 10% Anteilen an IPb. Die Prüfung

erfolgte in einer 96-Well Mikrotiterplatte ohne Antibiotikazusatz. Das Wachstum war bei 5% bzw. 7,5% supplementierten IPb zur MHB II bei den sechs Rasenbildnern besser sichtbar, jedoch nicht zufriedenstellend. In MHB II mit 10% IPb war das Wachstum wegen der hohen Blutkonzentration nicht zu beurteilen. Zudem erfolgte ein Nachdunkeln des Pferdeblutes nach 24 h Inkubation. Da ein Ablesen so nicht möglich war, wurde von weiteren Versuchen mit einer 10%igen Supplementierung mit IPb verzichtet.

Das Wachstum der zwölf *O. rhinotracheale*-Isolate wurde in 96-Well Mikrotiterplatten mit 5% und 7,5% Pferdeblutzusatz, sowie bei 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 allgemeinen 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 Rasenbildner-Stamm durchgeführt. Für die Ablesbarkeit ergab sich keine Verbesserung. Die Keimzahl veränderte sich ebenfalls nur geringfügig um plus fünf bis zwanzig Kolonien im positiven Bereich.

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 MHB II supplementiert mit 5% bzw. 7,5% IPb. Nach einer Inkubation von 24 h ergab sich eine gute Ablesbarkeit aller knopfbildenden Isolate und ebenfalls eine gute Ablesbarkeit bei drei der sechs rasenbildenden Isolate bei beiden gewählten Wachstumsbedingungen. Das Wachstum der Stämme war bei 7,5% Pferdeblut geringfügig besser.

Da die *O. rhinotracheale*-Isolate in MHB II mit 5% oder 7,5% IPb gutes Wachstum zeigten, wurden Wachstumskurven in diesen beiden Medien ermittelt (Abb.18 und 19). Ausgewählt wurden von den Isolaten ein Knopfbildner und ein Rasenbildner. Als Kontrolle wurde jeweils der Referenzstamm DSMZ 15997 mitgeführt.

Sowohl beim Wachstum in MHB II mit Zusatz von 5% IPb, als auch mit Zusatz von 7,5% IPb wurde die Plateauphase nach 24 h erreicht. Diese hielt bis zu 36 h an und ging danach in die Absterbephase der Bakterien über. Die ermittelten Keimzahlen der zwei Feldisolate und des Referenzstammes waren in beiden Medien annähernd gleich, obwohl bei einer Supplementierung mit 7,5% Pferdeblut die Werte der unterschiedlichen Isolate und des Referenzstammes einheitlicher beieinander lagen. In Abb. 18 sind die Mittelwerte der drei

Ergebnisse

Messungen je Stamm und Zeitpunkt durch Linien verbunden. Die Peaks der Mittelwert-Linien liegen etwa bei 24 h (Feldstamm 488 und 20) sowie bei 36 h (Referenzstamm).

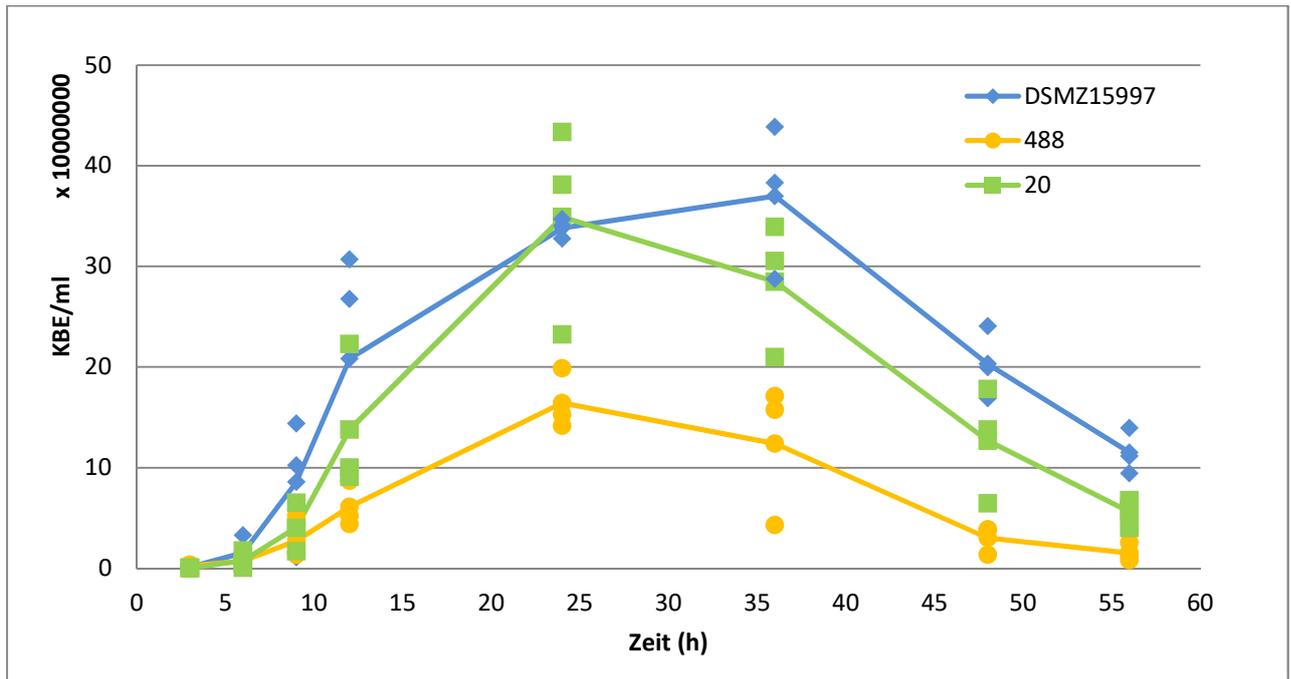


Abb.18: Wachstumskurven von Referenzstamm DSMZ15997 und der Feldstämmen 488 und 20 in MHB II mit 5% IPb.

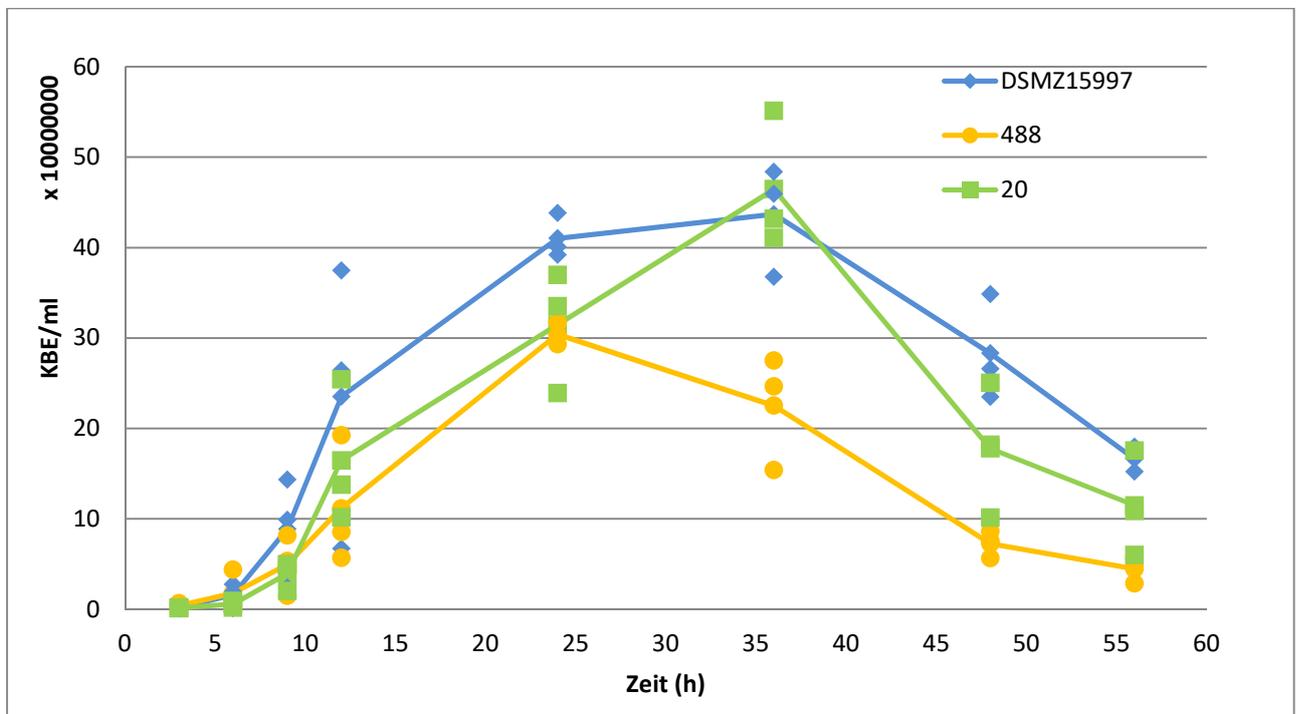


Abb.19: Wachstumskurven von Referenzstamm DSMZ15997 und der Feldstämmen 488 und 20 in MHB II mit 7,5% IPb.

Von einer Verwendung eines Inokulationsvolumens von 100 µl pro Well wurde abgesehen, da die aktuell verfügbaren Mikrotiterplatten nach Herstellerangaben nur für 50 µl zugelassen sind.

Auch die Verwendung des Farbstoffes Alamar Blue, der bei der Inkubation einen Farbumschlag in den beimpften Wells der Mikrotiterplatte von blau zu rosa bewirkt, wurden keine zufrieden stellenden Ergebnisse erreicht. Abb.20 zeigt zwei Isolate von *O.*

rhinotracheale (Isolat 350/2 als Vertreter für Rasenbildner, Isolat 488 als Vertreter für Knopfbildner). Die erste Reihe zeigt jeweils die Beimpfung von reinem MHB II, in der zweiten Reihe wurde 5% IPb supplementiert. In reinem MHB II 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 MHB II mit Supplement ist ebenfalls kaum ein Unterschied zur Negativkontrolle erkennbar (Abb. 20). Die untere Reihe wurde mit dem *E. coli* Referenzstamm ATCC 25922 in reiner MHB II beimpft. Der Farbumschlag nach rosa ist nach 24 h Inkubation im Vergleich mit der negativ Kontrolle deutlich sichtbar (Abb. 20).

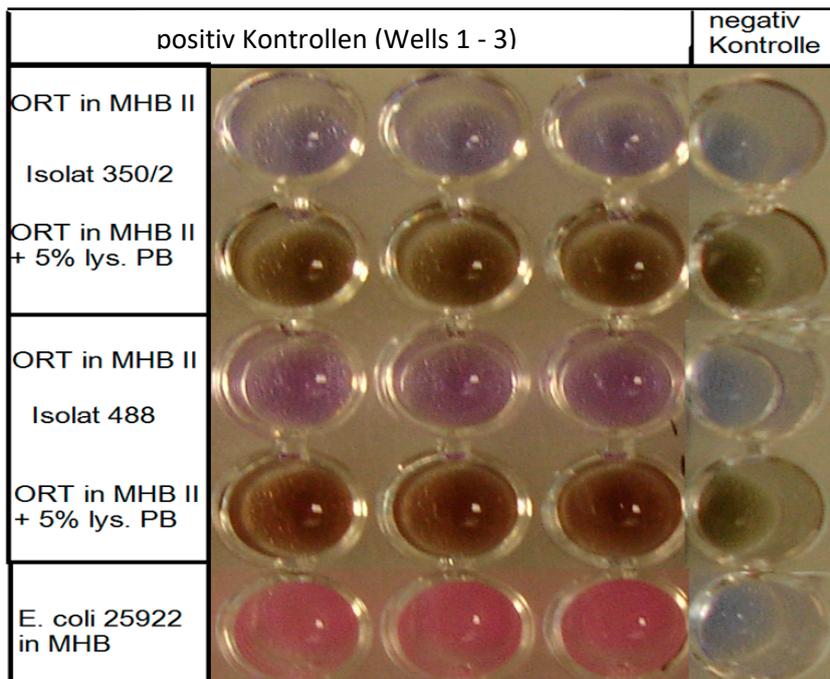


Abb. 20: Ergebnisse der Mikrodilution nach Zusatz des Farbstoffes Alamar Blue bei zwei *O. rhinotracheale*-Isolaten und einem *E. coli* Referenzstamm, inklusive negativ Kontrolle.

Da mit den untersuchten Medien und den unterschiedlichen Konzentrationen an IPb, sowie Veränderungen in Keimzahl und CO₂-Spannung keine zufriedenstellenden Ergebnisse für die

Bouillon Mikrodilution für *O. rhinotracheale* erzielt werden konnte, wurde der E-Test als alternative Methode herangezogen, um MHK-Werte zu erhalten.

Es wurden unterschiedliche Medien getestet, die in der Diskussion weiter erläutert werden. Die Ergebnisse der MHK-Bestimmung zeigten Abweichungen von maximal einer Titerstufe nach oben bzw. unten von dem am häufigsten ermittelten MHK-Wert (Modalwert). Eine MHK-Abweichung von einer Titerstufe vom Modalwert nach oben bzw. unten ist laut CLSI (2013) nicht als deviant zu bewerten. Lysiertes Pferd Blut wird nach CLSI (2013) als Zusatz empfohlen. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Wachstum von *O. rhinotracheale* bei Verwendung dieses Supplements deutlicher ausgeprägt ist und eine Ablesbarkeit des Wachstums auf den Platten einfacher wird. Reproduzierbare MHK-Ergebnisse wurden mit beiden Medien sowohl bei den, nach ihren Wachstumsintensitäten in der Bouillon-Mikrodilution ausgesuchten, Feld-, als auch bei den Referenzstämmen ermittelt. Durch den im Doppelansatz in drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen durchgeführten E-Test konnten Beeinflussungen der MHK-Ergebnisse durch verschiedene Supplemente ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse von E-Test und Mikrodilution sind in Tab. 27 gegenüber gestellt.

Tab. 27: Vergleich der MHK-Werte von vier Wirkstoffen ermittelt in Mikrodilution und E-Test von *O. rhinotracheale*(2 Feldstämme, 1 Referenzstamm)

| Methode | Mikrodilution | E-Test | Mikrodilution | E-Test |
|--------------------|---------------|--------|---------------|--------|
| Isolat \ Wirkstoff | Tiamulin* | | Ampicillin* | |
| DSMZ 15997 | 0,12 | 0,094 | 4 | 4 |
| 20/12 | 0,12 | 0,25 | ≤0,03 | 0,016 |
| 455 | 0,06 | 0,25 | 8 | 24 |
| Isolat/ Wirkstoff | Enrofloxacin* | | Tetrazyklin* | |
| DSMZ 15997 | 0,12 | 0,012 | 0,25 | 0,047 |
| 20/12 | 1 | 2 | 4 | 1,5 |
| 455 | 4 | 6 | 32 | 12 |

Beim Vergleich der minimalen Hemmwerte ermittelt in der Bouillon-Mikrodilution und via E-Test sind bei dem Wirkstoff Tiamulin bei Referenzstamm und dem Feldstamm 20/12 nur Abweichungen von einer Titerstufe vorgekommen. Bei dem zweiten Feldstamm lagen die

MHK-Werte zwei Titerstufen voneinander entfernt. Bei Ampicillin waren die MHK-Werte des Referenzstammes bei beiden Testverfahren identisch. Die Abweichung der zwei Feldstämme 20/12 und 455 betrug etwas mehr als eine Titerstufe. Die Feldstämme zeigten bei dem Fluorchinolon Enrofloxacin ähnliche Abweichungen wie bei Ampicillin, während der Referenzstamm in der Bouillon-Mikrodilution einen dreifach höheren MHK-Wert aufwies als im E-Test. Für Tetrazyklin wurden im E-Test durchweg niedrigere MHK-Werte für die getesteten Stämme ermittelt (Tab. 27).

4.2.5.2. Bestimmung des Resistenzverhaltens von *O. rhinotracheale* in vitro mittels Agardilution

Es wurden 31 von 101 *O. rhinotracheale*-Stämmen mittels Agardilution gegenüber drei unterschiedlichen Wirkstoffen getestet (Enrofloxacin, Tiamulin, Tylosin). 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* DSMZ 15997 und *S. aureus* mitgeführt.

Geprüfte Medien waren MH-Agar mit 5% Schafblut und MH-Agar mit 5% IPb. Da sich bei den Supplementen kaum Unterschiede in den Ergebnissen ergaben wurde mit MH-Agar mit 5% IPb weiter gearbeitet.

Für die 31 *O. rhinotracheale*-Stämme ergaben sich gegenüber den geprüften Antibiotika die in Tab. 28 dargestellten MHK-Werte in drei Wiederholungen.

Tab. 28: Verteilung der MHK-Werte von 31 *O. rhinotracheale*-Isolaten in der Agardilution nach 24 h Inkubation

| Wirkstoff/ Wiederholung | Verteilung der MHK-Werte nach 24 h (Angaben in 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 |

Bei Enrofloxacin war der Großteil der Isolate zwischen 2 mg/l und 8 mg/l angesiedelt. Drei Isolate waren konstant im unteren Hemmbereich zwischen $\leq 0,12$ mg/l und 0,25 mg/l zu finden. Die MHK-Verteilung der *O. rhinotracheale*-Isolate lag für Tiamulin bis auf eine Ausnahme von 4 mg/l nicht über 0,25 mg/l. Gegenüber Tylosin lagen die MHK-Werte über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich verteilt (Tab. 26). Innerhalb der drei Wiederholungen ergaben sich bei den 31 *O. rhinotracheale*-Isolaten nach 24 h Inkubation maximal Abweichungen um +/- eine Titerstufe. Die Anzahl der Abweichungen der untersuchten Isolate sind in Tab.27 aufgeführt.

Tab. 27: Anzahl der Abweichungen von *O. rhinotracheale*-Isolaten um +/- eine Titerstufe bei drei voneinander unabhängigen Versuchsdurchgängen nach 24 h Inkubation.

| Wirkstoff/ Wiederholung | Anzahl der Abweichungen um +/-eine Titerstufe je Wiederholung (n=31) | | |
|----------------------------|---|----|----|
| | -1 | 0 | +1 |
| Enrofloxacin | | | |
| 1 | - | 29 | 2 |
| 2 | 3 | 24 | 4 |
| 3 | 6 | 22 | 3 |
| Tiamulin | | | |
| 1 | - | 28 | 3 |
| 2 | - | 31 | - |
| 3 | 8 | 23 | - |
| Tylosin | | | |
| 1 | 2 | 23 | 6 |
| 2 | 3 | 28 | - |
| 3 | 2 | 26 | 3 |

Es wurden die Referenzstämme (ORT 15997, *E. coli* ATCC25922, *S. aureus*) bei je neun Versuchsdurchgängen mitgeführt. Bei dem *O. rhinotracheale*-Referenzstamm DSMZ 15997 ergab sich gegenüber dem Wirkstoff Tiamulin bei einem Testdurchgang eine Abweichung um eine Titerstufe in den höheren Hemmbereich. Für die übrigen Referenzstämme waren die MHK-Werte bei allen Wiederholungen konstant (Tab. 28).

Tab. 28: Ergebnisse der Referenzstammführung nach 24 h Inkubation

| Wirkstoff/ Wiederholung | Anzahl Abweichungen um +/- eine Titerstufe Referenzstämme | | |
|----------------------------|--|----------------------------|------------------|
| | <i>O. rhinotracheale</i> DSMZ 15997 | <i>E.coli</i> ATCC25922 | <i>S. aureus</i> |
| Enrofloxacin | | | |
| 1-9 | 0 | 0 | 0 |
| Tiamulin | | | |
| 1-9 | +1 (1)* ¹ | 0 | 0 |
| Tylosin | | | |
| 1-9 | 0 | 0 | 0 |

*¹= Anzahl der Abweichungen bei neun Wiederholungen

5. Diskussion

Für veterinär relevante bakterielle Infektionserreger ist eine Etablierung eines standardisierten Empfindlichkeitstestungsverfahrens notwendig, damit vergleichbare und reproduzierbare quantitative Ergebnisse (MHK-Werte) zur Verfügung stehen (CLSI, 2013a). MHK-Werte sollen, auch im Fall fehlender klinischer Grenzwerte, dem behandelnden Tierarzt Hinweise für die Auswahl eines zur Therapie geeigneten antimikrobiellen Wirkstoffes geben. Dieses ist umso wichtiger geworden, da die stetig zunehmenden Resistenzen mehr und mehr die Therapiemöglichkeiten einschränken bzw. unmöglich machen könnten. Es kann durch die zielgerichtete Therapie der Selektion resistenter Erreger zumindest entgegengewirkt, wenn auch nicht verhindert werden (Wallmann et al., 2015).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Infektionserregern des Geflügels (*R. anatipestifer*, *O. rhinotracheale*) handelt es sich im Vergleich zu schnell wachsenden und nicht anspruchsvollen Bakterien um langsamer wachsende Bakterien, die zudem auch besondere Ansprüche an die Nährmedien stellen (Hafez, 1998a; Rubbenstroth et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten zur Methodenanpassung für *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale* auf Grundlage der vom CLSI beschriebenen Verfahren überprüft bzw. alternativ die Neuentwicklung einer Prüfmethode zur quantitativen Empfindlichkeitstestung überprüft.

5.1. Erregercharakterisierung und Typisierung (*R. anatipestifer*)

Da bis dato die routinemäßige Erregeridentifizierung und –charakterisierung von *R. anatipestifer* nicht ohne Schwierigkeiten möglich ist, war es Ziel des ersten Teils dieser Arbeit, die bisher dokumentierte Identifizierung und Charakterisierung der 108 zur Verfügung stehenden *R. anatipestifer*-Isolate zu überprüfen. Bei der Kultivierung der Isolate wurde nach 48 h Bebrütung auf Blutagar eine leichte β -Hämolyse beobachtet, die mit den Ergebnissen von Priya et al. (2008) übereinstimmte. Vermutet wird, dass *R. anatipestifer*-Isolate hämolysierende Enzyme besitzen oder Toxine ausbilden, die zu oben genannter Hämolyse der Erythrozyten führen.

Jede Bakterienspezies besitzt für ihre Spezies typische Enzymaktivitäten zur Umsetzung oder zum Abbau von Substraten bzw. ist zur Bildung unterschiedlicher Stoffwechselprodukte in der Lage. Bei allen *R. anatipestifer*-Isolaten wurden positive Reaktionen für die Enzyme Katalase und Cytochromoxidase nachgewiesen, wobei erstere Reaktion bereits von Karstad

und Lusi (1970), sowie Rimler und Nordholm (1998) als einheitliche biochemische Reaktion dieser Bakterienspezies beschrieben wurde.

Bei 92 (84,4%) der Isolate wurde eine positive Reaktion für das proteolytische Enzym Gelatinase dokumentiert, während 55 (50,5%) der Isolate eine positive Urease-Reaktion zeigten. Dies entspricht den Ergebnissen der Untersuchungen von Aparna und Renjith (2012), Brogden et al. (1982), Hinz et al. (1998), Ryll et al. (2001) und Li et al. (2011). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Variabilität der biochemischen Reaktionen von *R. anatipestifer* eine gesicherte Identifizierung des Erregers mit biochemischen Tests nicht möglich ist.

Die Identifizierung der *R. anatipestifer*-Isolate auf molekularbiologischer Ebene wurde dann erfolgreich mit einer speziesspezifischen PCR durchgeführt (Tsai et al., 2005). Diese speziesspezifische PCR kann als verlässlich geeignete Methode, auch routinemäßig zur Identifizierung von *R. anatipestifer* eingesetzt werden.

Unter Verwendung von monovalenten Antiseren konnten bis vor einigen Jahren nur 21 Serotypen (Sandhu and Leister, 1991) von *R. anatipestifer* unterschieden werden. Weiterhin existiert die Problematik der Nutzung einer unterschiedlichen Nomenklatur für die Bezeichnung der Serotypen, die vom untersuchenden Labor abhängig ist. In den letzten Jahren wurden im Zuge systematischer Untersuchungen immer wieder neue Serotypen bei zunächst nicht typisierbaren Isolaten erkannt (Metzner et al., 2008).

Bei der Übergabe der *R. anatipestifer*-Isolate aus externen Laboren wurden die Ergebnisse der Serotypisierung von den Untersuchungseinrichtungen mit übermittelt. Dreißig *R. anatipestifer*-Isolate gehörten demnach zum Serotyp A und 24 Isolate aus einem anderen Labor wurden als dem Serotyp 1 zugehörig identifiziert. Die Überprüfung von fünf zufällig ausgewählten Serotyp A-Isolaten mit monovalenten Antiseren ergab dann eine hundertprozentige Übereinstimmung mit dem Serotyp 1. Bereits die Ergebnisse der Untersuchungen mehrerer Autoren (Bisgaard, 1982; Loh et al., 1992; Sandhu and Harry, 1981) zeigten die Richtigkeit der Annahme, dass es sich bei dem Serotyp A und dem Serotyp 1 um ein und denselben Serotyp handelt. Auf eine Überprüfung der übrigen Serotyp A-Isolate in dieser Arbeit wurde daher verzichtet, da postuliert werden konnte, dass bei den nicht geprüften Serotyp A-Isolaten auch eine Übereinstimmung von Serotyp A und Serotyp 1 vorlag.

Der Serotyp A bzw. 1 wies bei Isolaten, die insgesamt aus einem Labor und alle von Puten stammten, die höchste Prävalenz auf, was den Literaturangaben entspricht (Bisgaard, 1982;

Brogden et al., 1982; Li et al., 2012; Loh et al., 1992; Pathanasophon et al., 1995; Rubbenstroth et al., 2009; Sandhu and Leister, 1991).

Im Unterschied zur Serotypisierung ist es mit der MRA möglich, das gesamte Genom bei der Bestimmung von Gemeinsamkeiten oder Unterschieden zwischen Isolaten einer Spezies zu beschreiben. Als Maß für die Verwandtschaft verschiedener Stämme miteinander wird hierbei die Ähnlichkeit der Größe und der Anzahl der bei der Restriktion entstandenen DNA-Fragmente angesehen.

Mit Hilfe der MRA sollte bestätigt werden, dass ein repräsentativer Querschnitt von epidemiologisch voneinander unabhängigen *R. anatipestifer*-Isolaten für die weiteren Untersuchungen zur Verfügung steht.

Analog zu den Ergebnissen anderer Studien (Sun et al., 2012; Yu et al., 2008) konnten in dieser Arbeit nicht alle *R. anatipestifer*-Isolate mit dem Restriktionsenzym *Sma*I geschnitten werden. Für 13 (12%) von 108 Isolaten konnte kein Restriktionsprofil ermittelt werden. Im Gegensatz dazu gelang es Philipp et al. (2013) mit demselben Enzym für die Gesamtheit der von den Autoren untersuchten Isolate Restriktionsmuster darzustellen. Es fiel jedoch auf, dass Philipp et al. (2013) fast ausschließlich Isolate vom Serotyp 14 untersuchten, während in weiteren Studien Untersuchungen mit zahlreichen verschiedenen Serotypen durchgeführt wurden (Yu et al., 2008; Sun et al., 2012). Daher muss vermutet werden, dass bei den Isolaten einiger Serotypen die Schnittstellen für das Restriktionsenzym *Sma*I nicht oder nur in sehr geringer Zahl vorliegen, sodass keine distinkten Restriktionsfragmentmuster sichtbar werden.

Mit der MRA konnte bei 54 *R. anatipestifer*-Isolaten von Puten die größte Homogenität mit einer teilweisen Übereinstimmung von bis zu 100% festgestellt werden. Dabei gehörten *R. anatipestifer*-Isolate in einem Subcluster häufig dem Serotyp A (30x) bzw. 1 (8x) und/oder Serotyp 18 (9x) an. Andere Serotypen (6 (1x), 10 (1x) und 12 (1x)) waren nur selten in demselben Subcluster zu finden. Vier nicht typisierbare Putenisolate clusterten mit Putenisolaten vom Serotyp A zusammen. Diese Daten weisen auf eine nahe genetische Verwandtschaft hin. Um diese Annahme zu bestätigen müssten jedoch weitere Untersuchungen, wie zum Beispiel eine Sequenzierung durchgeführt werden. Da die Putenisolate trotz großer Homogenität mehrere Subcluster mit mindestens drei Bandenunterschieden (Tenover et al., 1995) bildeten und zudem unterschiedliche Serotypen aufwiesen, wurden sie als verschieden genug angesehen und für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die Untersuchungen zu den Entenisolaten ergaben, dass es sich bei den Entenisolaten um genetisch sehr unterschiedliche Stämme handelte. Dieses zeigten die Studienergebnisse von Philipp et al. (2013), die für *R. anatipestifer*-Entenisolate vom Serotyp 14 zwar identische PFGE-Bandenmuster nachwiesen, jedoch keine Übereinstimmung der Serotypen 12, 14 und 17 zeigen konnten, was den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit entspricht. Dies stützt die Vermutung, dass zwischen dem Serotyp und den PFGE-Bandenmustern ein Zusammenhang besteht.

Die Ergebnisse zu den Hühnerisolaten waren ähnlich heterogen wie die der Entenisolate, wobei lediglich zwei Isolate aus Niedersachsen möglicherweise demselben Klon angehören, da ausschließlich für sie ein identisches Bandenmuster ermittelt wurde.

Bei der Auswertung der Verteilung der Serotypen der Hühnerisolate in der Gesamtclusteranalyse wurde festgestellt, dass in vielen unterschiedlichen Clustern jeweils Vertreter desselben Serotyps zu finden sind. Dies unterstreicht die Annahme, wie dies bereits hier für die Entenisolate beschrieben wurde, dass es zwischen PFGE-Bandenmuster und Serotyp einen Zusammenhang gibt. Weiterhin wurde deutlich, dass bestimmte Serotypen nur bei bestimmten Wirtsspezies vertreten waren. Die größte Bandbreite an Serotypen war bei Isolaten von Enten zu finden. Dieses lässt die Interpretation zu, wie dies bereits von Riemer (1904) sowie von Hendrickson und Hilbert (1932) formuliert wurde, dass *R. anatipestifer* ursprünglich eigentlich ein Enten- und Gänse-Pathogen gewesen ist. Erst deutlich später konnte sich der Erreger auch bei Puten (Zehr und Ostendorf, 1970, Helfer und Helmboldt, 1977) und Hühnern (Rosenfeld, 1973) etablieren. Viele Autoren aus unterschiedlichen Ländern wiesen bei Enten am häufigsten den Serotyp 1 bzw. den Serotyp A nach (Bisgaard, 1982; Harry, 1969; Loh et al., 1992; Pathanasophon et al., 1995; Philipp et al., 2013). Diese Angaben decken sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Serotyp A bzw. 1 der bis jetzt am besten an unterschiedliche Wirtsspezies angepassten Serotyp war. Aus der Clusteranalyse wird jedoch auch ersichtlich, dass andere Serotypen inzwischen ebenfalls ein erweitertes Wirtsspektrum besitzen, was die Studien von Philipp et al. (2013) belegen.

Zwischen dem PFGE-Bandenmuster und dem Resistenzprofil schien zunächst bei den Putenisolaten teilweise ein Zusammenhang zu bestehen, da bei einigen Isolaten mit ähnlichen PFGE-Bandenmuster auch ähnliche MHK-Werte auffielen. Diese Isolate waren jedoch von

ihrer regionalen Herkunft sehr unterschiedlich, weshalb sich dieser Zusammenhang nicht bestätigen ließ. Gleiches gilt für die Enten- und Hühnerisolate.

Die Stammsammlung von 108 *R. anatipestifer*-Isolaten war nicht nur gekennzeichnet durch die Herkunft von unterschiedlichen Wirtsspezies, sondern es waren auch verschiedene Serotypen und regionale Herkunftsgebiete vertreten. Aus diesem Grund und der in der MRA ermittelten epidemiologischen Unabhängigkeit wurden die Isolate für die Untersuchung zur Etablierung der Bouillon-Mikrodilution als geeignet eingestuft.

5.2. Etablierung einer Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) für *R. anatipestifer*

Für die Empfindlichkeitsbestimmung bakterieller Erreger können verschiedene Methoden angewendet werden (Diffusionstests, Agardilutions- und Bouillondilutionsmethoden) (Schwarz et al., 2003). Das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren gilt sowohl national als auch international als Methode der Wahl zur Empfindlichkeitsbestimmung bakterieller Infektionserreger gegenüber antimikrobiellen Substanzen (Luhofner et al., 2004), da sie am ehesten einen wahren Wert für die Empfindlichkeit von Mikroorganismen liefert (Altreuther et al., 1997). Bisher gibt es allerdings keine standardisierten Untersuchungen zur Empfindlichkeit von *R. anatipestifer* gegenüber antibakteriell wirksamen Substanzen mit der Bouillon-Mikrodilutionsmethode. Daher sollte die Etablierung dieser Methode für *R. anatipestifer* realisiert werden. Verschiedene Parameter der Methode, wie die Menge der zu untersuchenden Bakterien (Inokulumdichte), die zu verwendende Nährbouillon sowie die Inkubationsatmosphäre und -dauer mussten zunächst an die Bakterienspezies *R. anatipestifer* adaptiert und optimiert werden.

Für veterinärmedizinische Bakterienisolate existieren zur Verwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode zahlreiche Vorschriften zur Durchführung und Bewertung. Die bedeutendste für den Veterinärbereich ist die, die vom CLSI erarbeitet und veröffentlicht wird.

Im CLSI-Dokument Vet01-S2 (2013) werden für die Empfindlichkeitstestung von Erregern MHB II und das Veterinary Fastidious Medium (VFM) genannt. Zudem gibt das Dokument zur Standardisierung der eingesetzten Bakterienmenge den McF von 0,5 vor, der etwa 10^8 KBE/ml entspricht. In anderer Literatur wurden allerdings solche Angaben zur Möglichkeit der Testung von *R. anatipestifer* unter Verwendung von VFM nicht gefunden.

In den zunächst durchgeführten Vorversuchen wurde festgestellt, dass *R. anatipestifer* in VFM kein Wachstum zeigte. Daher wurde angenommen, dass die Nährstoffzusammensetzung im VFM für *R. anatipestifer* nicht geeignet ist, da elementare Zusätze, die zum Wachstum notwendig sind, fehlen.

In MHB II war das Wachstum von *R. anatipestifer* nur mäßig bis unzureichend, sodass dieses ebenfalls nicht geeignet war, um in der Mikrotiterplatte durch entsprechendes Wachstum der Bakterien eine gesicherte MHK-Ablesung zu ermöglichen. Daher musste ein geeignetes Medium und/ oder Supplement gefunden werden.

Nach dem CLSI-Dokument Vet01-S2 (2013) ist zur Durchführung der Bouillon-Mikrodilution bei anderen veterinärmedizinisch relevanten anspruchsvollen Bakterienspezies wie *Listeria* ssp. und *Streptococcus* ssp. IPb in Konzentrationen von zwei bis fünf Prozent als Supplement zum Standardmedium erfolgreich etabliert worden. Deshalb wurde MHB II supplementiert mit zwei Prozent IPb auf seine Eignung zur Durchführung der Bouillon-Mikrodilution von *R. anatipestifer* geprüft. In den Wachstumsversuchen zeigte sich ein einheitlich gutes Wachstum bei den Feldstämmen und dem Referenzstamm. Die Ablesung der Mikrotiterplatten wurde durch die deutlich ausgeprägte Knopfbildung der Bakterien im Medium möglich. Die dunklere Färbung des Mediums durch den Blutzusatz hatte dabei keinen Einfluss auf den Ablesungsprozess. Basierend auf den dokumentierten Ergebnissen wurde festgelegt, für die Empfindlichkeitsbestimmung von *R. anatipestifer*-Isolaten als Medium MHB II mit 2% IPb zu verwenden. Folgend wurden die zur Verfügung stehenden 108 Isolate gegenüber 24 unterschiedlichen antimikrobiell wirksamen Substanzen getestet. Mit diesem Medium konnten gut ablesbare MHK-Werte erarbeitet werden.

Neben Inokulationsmenge und zu verwendendem Medium war als dritter Parameter die Inkubationsatmosphäre zu beurteilen. Hier stellte sich die Frage, ob eine Inkubation unter aeroben Bedingungen möglich ist oder ob Änderungen der Inkubationsatmosphäre notwendig sind.

Dass sich eine CO₂ angereicherte Atmosphäre begünstigend auf das Wachstum von *R. anatipestifer* auf Festmedien (Blutagarplatten) auswirkt, wurde von Glünder und Hinz (1989) sowie Sarver et al.(2005) beobachtet. Über das Wachstumsverhalten in Flüssignärmedien bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen lagen bisher keine Erkenntnisse vor. Auf Grund dessen wurde eine parallele Inkubation von inokulierten Mikrotiterplatten unter aerober und mikroaerophiler Atmosphäre geprüft. Dafür wurden die Isolate verwendet, die bereits zur

Ermittlung der Wachstumskurven gewählt worden waren (708/1, 84/2, DSMZ 15868). Der Vergleich der MHK-Werte von drei Isolaten für 22 Wirkstoffe zeigte, dass die Ergebnisbreite aller ermittelten MHK-Werte für beide Versuchsanordnungen (aerob/mikroaerophil) nicht mehr als eine Titerstufe nach oben bzw. unten vom häufigsten ermittelten MHK-Wert (Modalwert) nach 24 h Inkubation betrug. Auch die unterschiedliche Versiegelung (gasundurchlässige Standardfolie vom Hersteller, semipermeable Folie) der unter CO₂-Zugabe inkubierten Mikrotiterplatten ergab keine Veränderung in der Ergebnisbreite der MHK-Werte. Die Vermutung, dass das CO₂-reiche Milieu zu einem besseren Wachstum und folglich zu mehr Bakterien in der Kavität führt und daraus, ohne die Höhe der MHK-Werte zu beeinflussen, eine Verbesserung der Ablesbarkeit resultiert, konnte nicht bestätigt werden. In normaler Atmosphäre hat CO₂ einen Anteil von nur 0,04%. Höhere Konzentrationen bewirken eine Veränderung des pH-Wertes von Flüssigmedien, nicht aber von Festmedien. Die Ansäuerung des flüssigen Mediums durch CO₂ könnte eine Erklärung für das unterschiedliche Wachstum des Erregers auf Fest- bzw. in Flüssignährmedium sein. Demzufolge ist eine Inkubation unter CO₂ angereicherter Atmosphäre nicht sinnvoll. Die Inkubationsdauer wurde mit Hilfe von Wachstumskurven ermittelt und sollte zwischen 24 und 30 h erfolgen.

Ausgehend von der CLSI-Norm ist eine Titerstufenabweichung um jeweils eine Stufe nach oben oder unten in der Bouillon-Mikrodilution bezogen auf den am häufigsten ermittelten MHK-Wert (Modalwert) eines Stammens auch bei korrekter Versuchsdurchführung möglich. Daher werden vom CLSI (2013) sich über drei Titerstufen erstreckende MHK-Werte als „richtig“ für die Referenz- und/ oder die Kontrollstämme angegeben. Zur Interpretation der in dieser Arbeit für *R. anatipestifer* ermittelten MHK-Werte wurden in Ermangelung klinischer Grenzwerte die Ecoff-Werte für die einzelnen Wirkstoffe mit Hilfe statistischer Berechnungen ermittelt (Turnidge et al., 2006). Bei der Angabe des statistisch errechneten Ecoff-Wertes wird dieser i. d. R. mit einer Sicherheitswahrscheinlichkeit von 97,5% angegeben. Entgegen der visuellen Zuordnung der ermittelten MHK-Werte-Verteilung konnten nur für weniger als die Hälfte der *R. anatipestifer*-Wirkstoffkombinationen statistisch abgesicherte Ecoff-Werte berechnet werden.

Die deutliche bimodale Verteilung der MHK-Werte gegenüber den **Fluorchinolonen** Enrofloxacin, Ciprofloxacin und Marbofloxacin zeigte jeweils eine deutliche Auftrennung des Anteils der Bakterienpopulation, die mit großer Wahrscheinlichkeit noch keine aufgenommenen Resistenzmechanismen besitzen (Wildtyp, normalverteilt) und der

Bakterien, die bereits Resistenzmechanismen erworben haben und auf Grund dessen höhere MHK-Werte aufweisen (Nicht-Wildtyp, nicht-normalverteilt). Für alle drei Wirkstoffe konnte mit der zur Verfügung stehenden Software jedoch kein Ecoff-Wert berechnet werden, da für die niedrigen Verdünnungsstufen der MHK-Testung keine ausreichende Anzahl an Werten zur Verfügung stand. Somit fehlten die entsprechenden MHK-Daten zur Darstellung des aufsteigenden Schenkels der Normalverteilung der Wildtyppopulation. Diese Werte sind aber zur Berechnung notwendig. Bei Nalidixinsäure befindet sich der visuell ablesbare Ecoff-Wert mindestens sieben bis acht Titerstufen über dem für die Fluorchinolone visuell festgestellten Ecoff-Werten. Da es sich bei Nalidixinsäure um ein Chinolon und somit um einen Vorläufer der Fluorchinolone handelt, und nur eine Mutation zur Resistenzausbildung notwendig ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Bakterienisolate bereits einen einfachen Resistenzmechanismus, i.d.R. einen Gyrasehemmer, gegenüber diesem Wirkstoff erworben haben. Um eine vollständige Unempfindlichkeit gegenüber der Fluorchinolone auszubilden wird noch ein zweiter Resistenzmechanismus benötigt.

Für die Wirkstoffe Tetracyclin und Doxycyclin aus der Klasse der **Tetracykline** konnten weder visuell noch rechnerisch Ecoff-Werte ermittelt werden. Die Verteilung der MHK-Werte für die Bakterienpopulation ist bei beiden Wirkstoffen jedoch ähnlich, was an der bestehenden Kreuzresistenz innerhalb der Wirkstoffklasse liegt.

Auch für die **Makrolide** konnten keine Ecoff-Werte ermittelt werden, da der Part der Resistenzen gegenüber dem Wirkstoffen Tilmicosin nicht normal verteilt ist. Auf Grund eines Layoutwechsels der Mikrotiterplatten wurde eine geringe Anzahl an Isolaten gegenüber Tulathromycin und Spiramycin untersucht. Die Population war womöglich nicht ausreichend groß, um eine Normalverteilung zu erhalten. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten müsste eine größere Population an Isolaten getestet werden.

Penicilline werden seit langem im Geflügelbereich zur Behandlung von bakteriellen Infektionen (*O. rhinotracheale*, *Clostridien ssp.*, *Streptokokken ssp.*) angewendet (Kroker et al., 2006; Kronthaler, 2009). Während in den eigenen Untersuchungen für Ampicillin ein Ecoff-Wert von 0,125 mg/l errechnet werden konnte, konnten für Penicillin und die Wirkstoffkombination Amoxicillin/Clavulansäure aufgrund der Diversität der MHK-Werte weder visuell noch rechnerisch Werte bestimmt werden.

Bekanntermaßen sind Cephalosporine für die Behandlung beim Geflügel nicht zugelassen. Die Prüfung von Wirkstoffen aus der Klasse der Cephalosporine fand dennoch statt, weil die

zur Verfügung stehende Mikrotiterplattenbelegung unter Berücksichtigung human- und veterinärmedizinischer Therapieaspekte erfolgte. Durch diese Herangehensweise wurden u. a. auch Wirkstoffe geprüft, die für die hier untersuchten Tierarten bzw. Indikationen nicht zugelassen bzw. nicht wirksam sind. Bei den **Cephalosporinen** ergaben sich keine gravierenden Unterschiede bei den errechneten Ecoff Werten für die Wirkstoffe der neueren Generationen. Für Cefotaxim, Cefquinom und Ceftiofur lagen die Ecoff-Werte im Bereich von 0,03 mg/l bis 0,06 mg/l, wohingegen für Cefoperazon ein Ecoff-Wert von 0,125 mg/l errechnet wurde und für Cephalothin kein Ecoff-Wert berechnet werden konnte. Gegenüber Cephalothin wurden nur 55 *R. anatipestifer*-Isolate geprüft, sodass die zu kleine Stichprobe ein Grund dafür sein kann, dass die Verteilung der MHK-Werte rechnerisch nicht erfasst werden kann. Ein weiterer Grund könnte in der bereits zu hohen Anfangskonzentration der Wirkstoffe liegen.

Carbapeneme sind für die Therapie bei keiner Tierart zugelassen und es gilt hinsichtlich der Testung in dieser Arbeit das bereits zu den Cephalosporinen Gesagte. Etwa 80% der *R. anatipestifer*-Isolate zeigten MHK-Werte die unterhalb des errechneten Ecoffs von 0,25 mg/l lagen. Damit kann diese Population als noch gut empfindlich gegenüber Carbapenemen bezeichnet werden.

Zwischen **Aminoglycosiden** und anderen Wirkstoffklassen besteht keine Kreuzresistenz, der Einsatz der Substanzen kann jedoch einen erheblichen Effekt innerhalb der eigenen Klasse bewirken, d.h. ein erhöhter Einsatz von Aminoglycosid-Wirkstoffen bewirkt eine Resistenzentwicklung gegenüber allen Wirkstoffen dieser Klasse (Vanlanduyt et al., 1986). Studien von Sun et al. (2012) belegen das Vorhandensein von einer Reihe von Resistenzgenen, die Resistenz gegenüber verschiedene Aminoglycosiden vermitteln, wie z.B. das *aac(3')-IV* Gen bzw. das *aac(3')-IIc* Gen, welche Resistenz gegenüber Tobramycin und Gentamicin vermitteln, oder das bei 67 Isolaten nachgewiesene *aac(6')-Ib* Gen, das unter anderem für Resistenzen gegenüber Amikain und Kanamycin codiert (Sun et al., 2012). Von den geprüften 108 *R. anatipestifer*-Isolaten zeigten jeweils mehr als zwei Drittel MHK-Werte von ≥ 16 mg/l. Ob die Unempfindlichkeit der Isolate durch die Resistenzgene bedingt ist, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Gleiches gilt für **Colistin**, da alle untersuchten 108 Isolate MHK-Werte über der höchsten getesteten Konzentration von ≥ 16 mg/l zeigten. Es kann angenommen werden, dass *R. anatipestifer* gegenüber diesem Wirkstoff intrinsisch resistent ist. Colistin ist zugelassen zur

Behandlung und Metaphylaxe von Darminfektionen bei Kälbern, Schweinen und Hühnern. Nachdem erstmals in China ein Colistinresistenzgen (*mrc-1*) auf einem Plasmid detektiert werden konnte (Liu et al., 2016), wurde auch in Deutschland dieses Resistenz-Gen mit hoher Prävalenz in der Puten- und Broiler-Lebensmittelproduktionskette, mit geringerer Prävalenz bei Schweinen, Kälbern und Legehennen detektiert (Irrgang et al., 2016). Die Etablierung dieses Resistenzgens in der Geflügelpopulation könnte ebenfalls ein Grund für die ermittelten hohen MHK-Werte sein. Mittlerweile wurde in Belgien ein weiteres mobiles Colistinresistenzgen (*mrc-2*) auf einem anderem Plasmid detektiert (Xavier et al., 2016). Untersuchungsergebnisse aus Deutschland dazu stehen noch aus. Die Untersuchung von *R. anatipestifer*-Isolaten auf diese(s) Resistenzgen(e) wird Inhalt weiterer Untersuchungen sein.

Die Verteilung der MHK-Werte von *R. anatipestifer* Isolaten gegenüber **Tiamulin** war bimodal. Es befanden sich 93,5% (101 Isolate) der MHK-Werte unterhalb des errechneten Ecoff-Werts von 0,25 mg/l und repräsentierten somit die Wildtyp-Population, die noch keine Resistenzdeterminanten erworben hat. Ob der Einsatz von Ionophoren zur Kokzidienprophylaxe hier einen Einfluss bzgl. der hohen Empfindlichkeitsrate liefern kann, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da dazu keine Daten zur Verfügung stehen. Zwischen Ionophoren und Tiamulin besteht eine Inkompatibilität, sodass der Wirkstoff vermutlich selten zur Therapie bakterieller Infektionen beim Geflügel eingesetzt wurde und sich folglich nur wenig Resistenzen bei *R. anatipestifer* gegenüber Tiamulin gebildet haben.

Einem weit höheren Einsatz unterliegen die Sulfonamide, zumindest in den fernöstlichen Ländern wie China (Zhong et al. 2009a; Sun et al. 2012), Indien (Priya et al., 2008) und Taiwan (Yu et al., 2008). Einige Autoren konnten für untersuchte *R. anatipestifer*-Isolate die Resistenzgene *SulI* und *SulII* nachweisen (Sun et al., 2012). In Deutschland wurden diese Resistenzgene in verschiedenen veterinärmedizinischen als auch humanpathogenen Erregern, wie *E.coli*, *Streptococcus ssp.*, *Neisseria ssp.*, *Camphylobacter ssp.* und *Staphylococcus ssp.* nachgewiesen (Maskell et al., 1997; Skold, 2000; Sun et al., 2012). Die Verteilung der MHK-Werte gegenüber der Kombination Trimethoprim/Sulfmethoxazol über fast den gesamten Testbereich und dem Ecoff 97,5%-Wert bei 8 mg/l weisen darauf hin, dass bereits ein Eintrag von Resistenzgenen in die untersuchte Population stattgefunden hat. Der Eintrag von Resistenzgenen durch den alljährlichen Vogelzug zwischen Deutschland und dem nahen Osten könnte ein Grund für ermittelten MHK-Werte sein. Ein Übertrag von Resistenzgenen von Humanpathogenen auf Veterinärpathogene und andersherum erscheint ebenfalls möglich.

5.3. Erregercharakterisierung und Typisierung (*O. rhinotracheale*)

Auf Columbia Schafblutagar wiesen nahezu alle *O. rhinotracheale*-Isolate nach 24-stündiger Kultivierung runde, glatte, grau bis grauweiße Kolonien auf, die in der Größe von ein bis drei Millimetern variierten. Diese Varianz der Koloniegröße wurde auch von Vandamme et al. (1994) und Tsai und Huang (2006) berichtet.

Von Tabatabai et al. (2010) wird beschrieben, dass bei *O. rhinotracheale* vereinzelt eine schwache β -Hämolyse nach 48 h Inkubation zu beobachten war und weitere Autoren berichten ebenfalls über die Fähigkeit des Erregers zur Hämolyse (Chansiripornchai, 2004; Fitzgerald et al., 1998; Soriano et al., 2002; Tsai und Huang, 2006; Vega et al., 2008). In der aktuellen Studie konnte allerdings bei keinem der 100 *O. rhinotracheale*-Isolate eine Hämolyse beobachtet werden. Es kann vermutet werden, dass *O. rhinotracheale*-Isolate regional bedingt entsprechende Enzyme besitzen, wie in diesem Falle das Hämolysin, und im Gegensatz zu Isolaten aus anderen Regionen damit zu zusätzlichen StoffwechsellLeistungen in der Lage sind.

Bei *O. rhinotracheale* handelt es sich um ein Bakterium mit einer großen Variabilität bei wenigen positiven biochemischen Reaktionen. Ein Reaktionscode des API20 NE, der das Vorhandensein der Enzyme β -Galactosidase und Oxidase, aber eine negative Reaktion für Urease beinhaltet lautet 0020004 und kam in den eigenen Untersuchungen bei 57 Isolaten (57%) vor. In Studien von van Empel et al. (1997) wurde dieses Profil für 35% niederländischer Isolate, bei Waldow (2009) für 77,26% deutscher und für 96,55% französischer *O. rhinotracheale* Isolate ermittelt. In der aktuellen Untersuchung wurde bei 35 Isolaten (35%) eine zusätzlich positive Urease-Reaktion ermittelt. Das Profil lautet 0220004. Von van Empel et al. (1997) wurde die positive Urease Reaktion bei 65% niederländischer, bei Waldow (2009) bei 13,64% deutscher und 3,45% französischer Isolate ermittelt. Weitere Reaktionscodes, die sich aus dem Fehlen der Cytochromoxidaseaktivität ergaben, kamen in der aktuellen Studie bei 8 Isolaten (8%) analog zu den Ergebnissen von Waldow (2009) (8 x (9,1%) vor. Ein Zusammenhang zwischen geografischer Herkunft und biochemischem Reaktionscode könnte vermutet werden, da Isolate mit negativer Cytochromoxidase ausschließlich aus Deutschland stammten (Waldow, 2009). Isolate mit nicht vorhandener Oxidaseaktivität wurden in die folgenden Untersuchungen mit einbezogen, da Ryll et al. (2002) bereits das Vorkommen von *O. rhinotracheale* Stämmen ohne Cytochromoxidase nachweisen konnte. Aufgrund der variablen Reaktionen ist die Identifizierung von *O. rhinotracheale* über biochemische Verfahren nicht eindeutig möglich. Daher wurden die

100 Isolate mit der speziesspezifischen PCR nach van Empel (1998) geprüft und als *O. rhinotracheale* identifiziert.

Die Serotypisierung unter Verwendung des AGP wurde bereits in einer früheren Studie am Institut für Geflügelkrankheiten vorgenommen (Numeë, 2012). Die Auswahl der *O. rhinotracheale*-Isolate aus der Stammsammlung erfolgte unter Berücksichtigung verschiedener Aspekte, wie Wirtsspezies, geografische Herkunft, Serotyp und Isolationsjahr, um einen möglichst repräsentativen Querschnitt der Gattung *Ornithobacterium* zu erhalten. Typischerweise war in Bezug auf die Serotypen die Prävalenz von Serotyp A beim Wirtschaftsgeflügel am höchsten, wie auch von anderen Autoren ermittelt wurde (van Empel et al. 1997; Popp, 2003; Waldow, 2009; Numeë, 2012).

In der aktuellen Studie konnten für die 100 untersuchten *O. rhinotracheale*-Stämme Restriktionsmuster mittels MRA ermittelt werden, die eine genetische Übereinstimmung von 55,8% zeigten, was die genetische Heterogenität der Gruppe deutlich macht.

In die Untersuchung wurden die *O. rhinotracheale* Standard-Isolate aus dem Institut für Geflügelkrankheiten der Serotypen A bis I mit einbezogen. Popp (2003) stellte in der MRA fest, dass die Standards der Serotypen C, D, F, G, H, J, L und Q zwar unterschiedliche Restriktionsmuster aufwiesen, aber in einem Subcluster gemeinsam zu finden waren. In der eigenen Untersuchung clusterten die Standards der Serotypen B bis I ebenfalls gemeinsam in einem Subcluster, was auf eine geringe genetische Distanz hinweist. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich vielleicht um genetisch nah verwandte Stämme handelt.

Im Vergleich der Fragmentmuster der Standardstämme der Serotypen A bis I zu den Fragmentmustern der zugehörigen Feldisolate wurden keine Übereinstimmungen gefunden. Die Gründe für die Unterschiede zwischen den Standards und den Feldstämmen können nur vermutet werden. Zum einen könnten regional bedingt unterschiedliche Verwandtschaftsverhältnisse vorliegen. Zum anderen wurden die Feldisolate zwischen den Jahren 2009 bis 2012 isoliert. Die Standards der Serotypen stammten hingegen aus den 90er Jahren und werden seitdem bei – 80°C im Institut für Geflügelkrankheiten gelagert. Bedingt durch die Lagerung waren die Standards keinem Selektionsdruck ausgesetzt im Gegensatz zu den untersuchten Feldisolaten, was die genetischen Unterschiede erklären könnte.

Weiterhin konnte für die Feldisolate eine Unabhängigkeit von PFGE-Muster und Serotyp dokumentiert werden. In einem Subcluster mit Serotyp A-Isolaten kamen sowohl Serotyp B- als auch Serotyp I-Isolate vor. Die betroffenen Isolate stellten sich in der MRA sehr ähnlich

dar, sind antigenetisch aber scheinbar unterschiedlich, da sich aus der AGP ein anderer Serotyp ergibt.

Van Empel et al. (1997) fanden heraus, dass zwischen den Serotypen A, B und E Kreuzreaktivität besteht. Kreuzreaktionen zwischen den Serotypen A und I wurden ebenfalls häufig beobachtet (Numeë, 2012). Kreuzreaktionen deuten auf eine ähnliche Oberflächenbeschaffenheit der Isolate hin und könnten als Ausprägung der teilweise geringen genetischen Distanz der Serotypen A, B, E und I interpretiert werden.

Auch die Ergebnisse von Amonsin et al. (1997) deuten auf eine genetische Ähnlichkeit, trotz unterschiedlicher Antigenetik, hin. Die Autoren stellten fest, dass der Hauptteil der *O. rhinotracheale*-Isolate durch eine kleine Gruppe eng verwandter Klone repräsentiert wird, und die meisten Ausbrüche einer Erkrankung in der domestizierten Geflügelpopulation der ganzen Welt aus der Infektion mit einem einzigen Klon-Komplex resultiert.

Daraus kann für die eigenen Ergebnisse geschlossen werden, dass die genetische Ähnlichkeit basierend auf dem PFGE-Bandenmuster von *O. rhinotracheale* unabhängig vom Serotyp ist. Ein Einfluss der Wirtsspezies kann weitestgehend ausgeschlossen werden, da der größte Teil der Isolate (87%) aus Mastputen isoliert wurde.

Es wurden auch Isolate ermittelt, die dasselbe Bandenmuster aufwiesen aber in unterschiedlichen Jahren isoliert wurden. Wildvögel stellen nach Amonsin et al. (1997) und Devriese et al. (1995) ein Reservoir für *O. rhinotracheale* dar. Studien von Lopes et al. (2002) ergaben, dass *O. rhinotracheale* bei niedrigen Temperaturen von minus 12 bis plus 4 Grad Celsius zwischen 40 und 150 Tagen in der Natur überleben können. Die Persistenz in der Natur könnte ein Grund für das Überdauern von Isolat mit identischem Bandenmuster über einen gewissen Zeitraum sein. Daraus lässt sich weiter schließen, dass im Zusammenspiel zwischen Persistenz in der Natur und dem Vorkommen bei Wildvögeln das Auftreten von Klonen in unterschiedlichen Regionen zu verschiedenen Zeitpunkten vorkommt. Kürzlich konnten Autoren mittels multilocus sequence typing (MLST) nachweisen, dass vom Wirtschaft Geflügel isolierte *O. rhinotracheale* Erreger unabhängig von der geografischen Region eine sehr hohe genetische Ähnlichkeit aufweisen (Thieme et al., 2016).

Zwischen PFGE-Bandenmuster und Resistenzprofil der untersuchten Isolate bestand größtenteils kein Zusammenhang. Die MHK-Werte von 30 Isolat, die parallel sowohl in der Mikrodilution, als auch in der Agardilution ermittelt wurden, zeigten im Cluster I Werte von 0,06 mg/l bis 0,25 mg/l gegenüber Tiamulin und Werte von 1 mg/l bis 8 mg/l gegenüber Enrofloxacin. Eine Ausnahme bildeten zwei Isolate im Cluster II bei der Prüfung gegenüber Enrofloxacin. Bei diesen beiden Isolat wurden im Gegensatz zu den Isolat aus Cluster I

mit beiden Testmethoden MHK-Werte von 0,25 mg/l ermittelt. Beide Isolate stammten vom selben Einsender und waren vom Serotyp E, wurden aber in unterschiedlichen Jahren isoliert. Hier kann vermutet werden, dass es sich um Isolate aus demselben Klon handelt, was die identischen MHK-Werte erklären würde.

5.4. Etablierung einer Methode zur Bestimmung der MHK von *O. rhinotracheale*

Für die Empfindlichkeitstestung von *O. rhinotracheale*-Isolaten sollte ebenfalls die Bouillon-Mikrodilution etabliert werden. Als Grundlagendokument diente auch hier das Dokument Vet01-S2 (2013) des CLSI. In bisherigen Untersuchungen zur Empfindlichkeit von *O. rhinotracheale* wurde die Bouillon-Mikrodilution selten und mit unterschiedlichem Versuchsablauf angewendet (Soriano et al., 2003; Popp, 2003; Waldow, 2009). Vor der Realisierung der Methode in dieser Arbeit wurden, analog zu den Arbeiten mit *R. anatipestifer* zunächst verschiedene Parameter (Inokulumsdichte, Nährmedium, Inkubationsatmosphäre und Inkubationsdauer) für die Mikrodilution für *O. rhinotracheale* angepasst.

Die Inokulumsdichte für *O. rhinotracheale* konnte in Übereinstimmung mit der Literatur (Waldow, 2009) auf den McFStandard 0,5 justiert werden, das der optischen Dichte einer äquivalenten Bakteriensuspension zwischen 10^6 und 10^8 KBE/ml entspricht und damit auch den Vorgaben des CLSI (2013).

Mittels Bouillon-Mikrodilution wurden von Soriano et al. (2003) in BHI mit einer Supplementierung von 1% Pferdeserum bei einem Inokulationsvolumen von 100 µl pro Well zuverlässig MHK-Werte für *O. rhinotracheale*-Isolate ermittelt. Bei der Erstellung eigener Wachstumskurven zeigten *O. rhinotracheale*-Isolate in BHI-Medium ebenfalls gutes Wachstum. Daher wurde das Wachstum anschließend auch in Mikrotiterplatten mit zwei Feldstämmen und einem Referenzstamm bei einer vom Hersteller angegebenen Inokulationsmenge von 50 µl pro Vertiefung geprüft. Hier konnte allerdings kein sichtbares Wachstum festgestellt werden, sodass keine Ablesung möglich war. Da sowohl das BHI-Medium als auch Pferdeserum als Supplement weder vom European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testung (EUCAST, 2017) noch vom CLSI (2013) für die Empfindlichkeitstestung empfohlen werden, wurde von einer weiteren Verwendung des Mediums abgesehen.

Das Medium der Wahl für Resistenztestungen im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren ist nach den Empfehlungen des CLSI die MHB II, die auch die Aktivität antimikrobieller Wirkstoffe nicht beeinflusst (CLSI, 2013). In der Literatur wird *O. rhinotracheale* als Erreger mit hohen Ansprüchen an das Nährmedium beschrieben (Hafez, 1998, Soriano et al., 2002). Von Waldow (2009) wurde bereits ermittelt, dass *O. rhinotracheale* in MHB II kein Wachstum aufweist. Dies konnte in eigenen Untersuchungen anhand von Wachstumskurven überprüft und bestätigt werden. Für sehr anspruchsvolle Mikroorganismen wird vom CLSI (2013) das VFM empfohlen. Allerdings liegen keine Literaturangaben zur Verwendung dieses Mediums vor. Da *O. rhinotracheale* auf Grund der Kultivierungsansprüche zur Gruppe der sehr anspruchsvollen Mikroorganismen gerechnet werden kann, wurde auch das VFM geprüft. Da es in den Wells der Mikrotiterplatten jedoch zu keinem sichtbaren Wachstum kam, wurde dann von einer weiteren Verwendung auch des VFM abgesehen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass für die Bouillon-Mikrodilution bei anspruchsvollen Erregern wie zum Beispiel *Streptococcus* ssp. und *Listeria* ssp. IPb in einer Konzentration von 3 bis 5% zur MHB II supplementiert werden kann (EUCAST, 2003; CLSI, 2013). Im Gegensatz zu Waldow (2009) konnte in den eigenen Untersuchungen unter Verwendung von MHB II supplementiert mit 3% IPb nur eine unzureichende Knopfbildung, teilweise nur eine Rasenbildung oder gar kein Wachstum in den Wells der Mikrotiterplatten beobachtet werden, obwohl bei den Ergebnissen der Wachstumskurven in Übereinstimmung mit Literaturangaben und eigenen Untersuchungen deutliches Wachstum vorlag. Dies kann zum einen darin begründet liegen, dass Waldow (2009) ein Inokulationsvolumen von 100 µl pro Well genutzt hat und in den eigenen Versuchen die Herstellerangaben (50 µl pro Well) berücksichtigt wurden. Ein Phänomen, das van Empel und Hafez (1999) bereits beobachteten, waren die unterschiedlichen Wachstumsintensitäten von *O. rhinotracheale* Isolaten im Flüssignährmedium kombiniert mit einem Anstieg der Pleomorphie der Bakterien im Gegensatz zur Anzucht auf Festmedien. Bei *in vitro*-Versuchen fanden Soriano et al. (2002) heraus, dass die Anheftungsfähigkeit von *O. rhinotracheale* an Trachealepithelzellen ein essentieller Prozess im Infektionsgeschehen ist. Da der Erreger in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten gehäuft feines, rasenartiges Wachstum zeigte, kann die Vermutung geäußert werden, dass die Anheftungsfähigkeit von *O. rhinotracheale* auch an andere Oberflächen möglich zu sein scheint. Die mögliche Anheftungsfähigkeit von *O. rhinotracheale*-Isolaten wurde vor allem beim Serotyp A festgestellt, selten bei anderen Serotypen. Daher kann auch vermutet werden, dass der Anheftungsfähigkeit eine Serotypabhängigkeit zu Grunde liegt. In

der Literatur gibt es jedoch dazu keine Angaben, sodass weitere Untersuchungen hierzu sinnvoll wären.

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob Änderungen der Inkubationsatmosphäre das Wachstum von *O. rhinotracheale* beeinflussen. In früheren Studien wurde die Bouillon-Mikrodilution sowohl unter aeroben Bedingungen (Soriano et al., 2003) als auch unter CO₂-Supplementierung durchgeführt (Popp, 2003; Waldow, 2009). Unter CO₂-angereicherter Atmosphäre wuchsen *O. rhinotracheale*-Isolate in der vorliegenden Arbeit unwesentlich besser als im aeroben Milieu. Die Inkubation unter mikroaerophilen Bedingungen führte auch zu keiner Verbesserung der Ablesbarkeit der im Wuchs rasenbildenden Isolate in den Wells der Mikrotiterplatten.

Mit allen bisher in dieser Arbeit genannten und eingesetzten Medien bzw. Inkubationsparametern konnten keine zufriedenstellenden Ergebnisse hinsichtlich der Ablesbarkeit des Wachstums von *O. rhinotracheale* in den Wells der Mikrotiterplatten erzielt werden. Aus diesem Grunde wurde entschieden, ein alternatives Testverfahren zu entwickeln.

Als Medien für Diffusionstests werden vom CLSI-Dokument Vet01-S2 (2013) für anspruchsvolle Erreger MH-Agar, MH-Agar supplementiert mit unterschiedlichen Konzentrationen an Schafblut (2 – 5%), sowie Schokoladen MH-Agar empfohlen. Abweichend zu den weiteren Literaturangaben (Malik et al., 2003; Erganis et al., 2012) konnte in den eigenen Untersuchungen auf MH-Agar kein Wachstum von *O. rhinotracheale* nachgewiesen werden. Vermutet wird, dass bei den in dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Isolaten es höchst wahrscheinlich Stämme gibt (Isolate aus den USA: Malik et al., 2003, und der Türkei: Erganis et al., 2012), die regional bedingt mit unterschiedlichen Stoffwechsellleistungen ausgestattet sind und dementsprechend andere Ansprüche an Nährmedien haben. Auch die Verlängerung der Inkubationszeit auf 72 h (Erganis et al., 2012) brachte keine positiven Wachstumsergebnisse. Ein Zusammenhang zwischen der Beschaffenheit der Oberflächenstruktur und der Aufnahme sowie Verwertung von Nährstoffen aus der Umgebung kann nur vermutet werden und könnte Inhalt weiterer Untersuchungen sein. Folgend wurde der bereits in der Literatur verwendete MH-Agar mit 5% Schafblut (El-Sukhon et al., 2002; Tsai und Huang, 2006) und MH-Agar mit 5% IPb vergleichend untersucht. Die Verwendung von IPb wurde geprüft, da sich das Supplement in der Bouillon-Mikrodilution in anderen Untersuchungen (Waldow, 2009, Ruppenstroth et al., 2013) als wachstumsfördernd erwiesen hatte. Auf beiden Medien wurde nach 24 h

mikroaerophiler Inkubation bei 37°C gut sichtbares Wachstum erzielt, was bei MH-Agar supplementiert mit Schafblut den Literaturangaben entspricht (El-Sukhon et al., 2002; Tsai und Huang, 2006). Bei der Supplementierung mit IPb war das Wachstum auf den Platten bei einigen Isolaten prominenter ausgeprägt. Da die 10% Supplementierung des MH-Agars mit Schafblut (Murthy et al., 2008) die Ablesbarkeit der Platten nur unwesentlich verbesserte, wurde dieses Nährmedium nicht weiter verwendet.

Nach der erfolgreichen Ermittlung geeigneter Wachstumsmedien wurde zunächst der E-Test als alternative Methode zur Bestimmung von MHK-Werten untersucht. Dazu wurden in der vorliegenden Arbeit in einem Doppelansatz zwei Medien (MH-Agar mit 5% Schafblut; MH-Agar mit 5% lysiertem Pferdeblut) auf die Eignung zur Bestimmung der MHK-Werte von zwei *O. rhinotracheale*-Feldisolaten, einem *O. rhinotracheale*-Referenzstamm und dem Referenzstamm *E. coli* ATCC 25922 gegenüber vier unterschiedlichen Wirkstoffen (Ampicillin, Enrofloxacin, Tetrazyklin und Tiamulin) mittels E-Test geprüft. Aufgrund der besseren Ablesbarkeit der Ergebnisse wurde die Verwendung von MH-Agar mit 5% IPb als geeignet für die Durchführung der Empfindlichkeitsbestimmung bei *O. rhinotracheale* mittels E-Test eingestuft.

In der Routinediagnostik spielt der E-Test jedoch eine eingeschränkte Rolle, durch die begrenzte Verfügbarkeit veterinärmedizinisch relevanter Wirkstoffe und den relativ hohen Kostenaufwand (Schwarz et al., 2003). Damit ist diese Testmethode eher für Einzelfälle geeignet.

Auf Grund der oben genannten Einschränkungen wurde weiterhin die Agardilution als Alternativmethode zur Empfindlichkeitstestung von *O. rhinotracheale* herangezogen. Bereits Devriese et al. (1995, 2001) setzten die Agardilution ein, um quantitative MHK-Werte zu erhalten. Im Unterschied zur aktuellen Studien sind jedoch nur Untersuchungen mittels Agardilution bekannt, bei denen Columbia-Schafblutagar als Medium verwendet wurde (Devriese et al., 2001; Devriese et al., 1995; van Veen et al., 2001). Van Veen et al. (2001) setzten dem Agar als Supplement Thymidin-Phosphorylase zu. Eine Beeinflussung der antibiotischen Wirkstoffe kann nur vermutet werden. Auf Grund der in der Literatur unterschiedlichen verwendeten Medien (Schafblutagar, MH-Agar mit 5% IPb), sowie der unterschiedlich langen Inkubationsdauer von zwei Tagen (Devriese et al., 2001, 1995) bzw. 24 h (eigene Untersuchungen) ist ein Vergleich der Ergebnisse nicht möglich. Die in der Agardilution ermittelten MHK-Werte von 31 *O. rhinotracheale* Isolaten der aktuellen Studie

erwiesen sich innerhalb der drei Wiederholungen als stabil, sodass diese Methode ähnlich wie der E-Test eine mögliche Alternative zur Bouillon-Mikrodilution sein kann.

6 Schlussfolgerungen

R. anatipestifer

Die Ergebnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit (Biochemie, Molekularbiologie) weisen darauf hin, dass es sich bei *R. anatipestifer* um einen Erreger mit vielen genetischen Fragmentmustern handelt, die sich aber dennoch durch eine nahe klonale Verwandtschaft auszeichnen. Ähnliches gilt für die verschiedenen Serotypen. Auf Basis der Ergebnisse der MRA können Aussagen über mögliche Zusammenhänge zwischen geografischer Herkunft, dem Serotyp und dem Resistenzprofil getroffen werden. Aussagen zur Übertragung, Verschleppung oder Persistenz eines Stammes in einer Herde, einem Betrieb oder einer Region wären somit eventuell möglich und Maßnahmen zur Verhinderung der Einschleppung bzw. Verbreitung könnten angepasst werden.

Die Untersuchung des Resistenzverhaltens zeigen, dass *R. anatipestifer* größtenteils sehr unterschiedliche MHK-Werte aufweist. Bei der Wahl eines Therapeutikums sollten eine Abhängigkeit von der tierischen und geografischen Herkunft berücksichtigt werden. Überwiegend als wirksam haben sich Tiamulin und alle Wirkstoffe aus den Klassen der Cephalosporine und Carbapeneme erwiesen. Cephalosporine, als auch Carbapeneme sind jedoch in der Geflügelpraxis in Deutschland nicht zugelassen, womit die Auswahl an wirksamen Therapeutika deutlich eingeschränkt ist. Da bis dato keine Bewertungsgrundlage von MHK-Werten von *R. anatipestier* vorliegt, besteht die Schwierigkeit bei der Auswertung und der Interpretation der Ergebnisse. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Parameter zur Untersuchung von *R. anatipestifer* in der Bouillon-Mikrodilution etabliert und validiert. Dies soll für das CLSI die Basis sein eigens für *R. anatipestifer* eine Bewertungsgrundlage zu schaffen, sodass eine generelle Standardisierung bei der Durchführung solcher Tests zwischen verschiedenen Laboren möglich wird.

O. rhinotracheale

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der E-Test als auch die Agardilution funktionierende Methoden zur Empfindlichkeitsbestimmung von *O. rhinotracheale* sind. Auch wenn der E-Test auf Grund des hohen Kostenaufwandes nicht für die Routinediagnostik geeignet ist, kann er aber im Einzelfall durchaus eingesetzt werden. Die Agardilution

hingegen ist ein Verfahren mit hohem Arbeitsaufwand, sodass der Einsatz in der Routinediagnostik durchaus fraglich ist bzw. wird er vermutlich nur in Speziallaboren durchgeführt werden. Obwohl beide Methoden bisher nicht für die Routinediagnostik geeignet erscheinen, bieten sie doch die Möglichkeit einer quantitativen, reproduzierbaren Bestimmung von MHK-Werten und könnten somit eine Alternative zu herkömmlichen Diffusionstests sein, die ausschließlich qualitative Empfindlichkeitsergebnisse liefern.

7 Zusammenfassung

Ein großes Problem der bakteriellen Atemwegserkrankungen von Geflügel sind die Anforderungen an eine wirksame Behandlung der Herde, um die Gesundheit und den Tierschutz zu gewährleisten und wirtschaftliche Verluste zu verhindern. Die Verwendung und der Missbrauch von antimikrobiellen Substanzen ist derzeit ein großes Problem, da dies meist zu einer erhöhten Inzidenz von Antibiotika-resistenten Bakterien führt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, geeignete Testmethoden zur Bestimmung der antibiotischen Sensitivität von *R. anatipestifer* und *O. rhinotracheale* gegenüber derzeit verwendeten Wirkstoffen zu entwickeln und zu etablieren.

Im ersten Teil der Arbeit wurden zur Identifizierung und Charakterisierung von *R. anatipestifer*- und *O. rhinotracheale*-Isolaten, die in den Jahren 2007 bis 2012 aus verschiedenen Geflügelarten isoliert wurden, biochemische und molekularbiologische Methoden angewandt. Insgesamt konnten 108 Feldisolate eindeutig als *R. anatipestifer* identifiziert werden, ebenso wie 100 Feldisolate als *O. rhinotracheale*. Das Ergebnis der Makro-Restriktionsanalyse zeigte eine große Vielfalt von DNA-Fingerabdrücken sowohl bei *R. anatipestifer* als auch bei *O. rhinotracheale*.

Im Falle von *R. anatipestifer* konnte eine große Vielfalt von Fragmentmustern innerhalb der Entenisolate nachgewiesen werden. Während Isolate von Puten 100% genetische Ähnlichkeit innerhalb der Untergruppe zeigten. Im Falle von *O. rhinotracheale* wurden die Isolate der Serotypen A, B und E in gemeinsamen Subclustern gefunden.

Die Bestimmung der antibiotischen Sensitivität von *R. anatipestifer* und *O. rhinotracheale* ist aufgrund der komplexen Kultivierungsansprüche und des ungewöhnlich häufigen Auftretens von Resistenz schwierig. Daher wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit die Wirkung verschiedener Parameter untersucht (Testmedium, Inokulationsdichte, Inkubationszeit und Inkubationsatmosphäre).

Ziel war es die Bouillon-Mikrodilution als Standard-Prüfmethode für *R. anatipestifer* zu etablieren und validieren. Die erhaltenen Ergebnisse zeigten, dass Müller-Hinton-Bouillon II (MHB II) suppelentiert mit 2% lysiertem Pferdeblut (IPb) ein geeignetes Kulturmedium ist. Die Inkubation bei 37 ° C für 24 Stunden unter aeroben Bedingungen ergab visuell gut

ablesbare Ergebnisse in den kommerziellen Sensititre-Mikrotiterplatten. Aufgrund fehlender Breakpoints wurden die epidemiologischen Cut-off-Werte sowie die minimale Hemmkonzentration MHK_{50} und MHK_{90} -Werte mit Hilfe eines statistischen Programms bestimmt. Tiamulin und alle Substanzen, die zu den Klassen der Cephalosporine und Carbapeneme gehören, haben sich als wirksam erwiesen.

Die multimodale Verteilung der *R. anatipestifer*-Isolate gegenüber den Fluorchinolonen zeigt die Aufteilung in eine empfindliche und eine unempfindliche Population und zeigt die Notwendigkeit quantitativer Empfindlichkeitstests. Bezüglich der Aminoglycoside und Tetracycline wurde der Großteil der MHK-Werte in den hohen Konzentrationsbereichen bestimmt.

Für *O. rhinotracheale* konnte keine Kombination von Testparametern ermittelt werden, die zu visuell gut ablesbaren Ergebnissen in den Mikrotiterplatten führte. Stattdessen konnte Mueller-Hinton-Agar mit 5% lysiertem Pferdeblut (IPb) als Medium für den E-Test sowie für den Agar-Dilutionstest hergestellt werden. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 ° C war ein visuell gutes Ablesen der Platten möglich. Bei beiden Methoden können *O. rhinotracheale*-Isolate nur für wenige antimikrobielle Substanzen getestet werden. Die Verfügbarkeit von E-Teststreifen mit tiermedizinisch relevanten Wirkstoffen ist begrenzt und mit hohen Kosten verbunden. Das Agar-Dilutionsverfahren hingegen führt zu einem hohen Arbeitsaufwand und wird nur in speziellen Labors durchgeführt. Jedoch können beide Verfahren eine Alternative zu herkömmlichen Diffusionstests mit der Möglichkeit einer quantitativen MHK-Bestimmung bieten.

8 Summary

Investigations on the antibiotic resistance of *Riemerella anatipestifer* and *Ornithobacterium rhinotracheale* of the commercial poultry.

A major problem of bacterial respiratory diseases of poultry are the requirements for an effective treatment of the flock, in order to ensure the health, the animal welfare as well as to prevent economic losses. Use and misuse of antimicrobial substance is mostly lead to increase the incidence of antibiotic resistant bacteria and this is currently a huge problem. Therefore the aim of this thesis was focus on the development and establishment of suitable test methods to determine antibiotic sensitivity of *R. anatipestifer* and *O. rhinotracheale* to common used drugs.

The first part was the identification and characterization of *R. anatipestifer* and *O. rhinotracheale* isolates, which were isolated from different poultry species during the period 2007 to 2012 by using biochemical and molecular biological methods. A total of 108 field isolates could be clearly identified as *R. anatipestifer*, as well as 100 field isolates as *O. rhinotracheale*. The result of the macro-restriction analysis showed a large variety of DNA fingerprints in both, *R. anatipestifer* and *O. rhinotracheale*.

In the case of *R. anatipestifer*, a large diversity of fragment patterns could be detected within the duck isolates, while isolates from turkeys showed 100% genetic similarity within the subgroup. In the case of *O. rhinotracheale* the isolates of serotypes A, B and E were found in common subclusters.

The determination of the antibiotic sensitivity of *R. anatipestifer* and *O. rhinotracheale* is difficult, because of the complex cultivation requirements and the unusually frequent occurrence of resistance. Therefore, in the second part of the present work was aimed to study the effect of different parameters (Test medium, Inoculation density, Incubation time and Incubation atmosphere).

The aim was to establish and validate Bouillon microdilution as a standard test method for *R. anatipestifer*. The obtained results proved that Mueller-Hinton broth II (MHB II) with 2% lysed horse blood (IPb) supplementation to be a suitable medium for cultivation. Incubation at 37 ° C for 24 hours under aerobic conditions gave visually good readable results in the

commercial sensititre microtiter plates. Since, lack of Breakpoints the epidemiological cut-off values as well as the Minimum inhibitory concentration MIC₅₀ and MIC₉₀ values were determined with the help of a statistical program. Tiamulin and all substances belonging to the classes of cephalosporins and carbapenemes have been proved to be effective. The multimodal distribution of the *R. anatipestifer* isolates against the fluoroquinolones shows the division into a sensitive and as well as resistance population and shows the necessity of quantitative sensitivity tests. Concerning aminoglycosides and tetracyclins, the majority of the MIC values were determined in the high concentration ranges.

For *O. rhinotracheale* no combination of test parameters could be established, which leads to visually clearly readable results in the microtiter plates. Instead, it was possible to establish a Mueller-Hinton-Agar with 5% lysed horse blood (IPb) as the medium for the E-test as well as for the agar dilution test. A visually well reading of the plates was possible after 24 hours of incubation at 37 ° C. With both methods, *O. rhinotracheale* isolates can only be tested for a few antimicrobial substances. The availability of E-test strips with veterinary relevant active substances is limited and connected with high costs. The agar dilution method, on the other hand, entails a high amount of work and will only be carried out in special laboratories. However, both methods can provide an alternative to conventional diffusion tests with the possibility of quantitative MIC determination.

9 Literaturverzeichnis

- Ak, S., Turan, N., 2001, Antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated from broiler chickens in Turkey. *Veterinarski Arhiv*71, 121-127.
- Altreuther, P., Böttner, A., Scheer, M., Schmid, P., Traeder, W., Weiskopf, S., 1997, Anmerkungen zum Resistenzmonitoring in der Tiergesundheit. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 418-421.
- Amonsin, A., Wellehan, J.F.X., Li, L., Vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R., Kapur, V., 1997, Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology*35, 2894-2898.
- Aparna, S., Renjith, R., 2012, New duck disease. *Indian veterinary association*10, 76-77.
- Asadpour, Y., Banani, M., Pourbakhsh, S.A., 2011, Isolation, identification and antibiotic sensitivity determination of *Ornithobacterium rhinotracheale* in slaughtering broiler chicken flocks of Guilan province. *Iranian Journal of Veterinary Research*12, 345-349.
- Ash, W.J., 1966, Antibiotics and infectious serositis in white peking ducklings. *Avian Diseases*11, 38-41.
- Asplin, F.D., 1955, A septicaemic disease of Ducklings. *Veterinary research*67, 854-858.
- Back, A., Halvorson, D., Rajashekara, G., Nagaraja, K.V., 1998, Development of a serum plate agglutination test to detect antibodies to *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*10, 84-86.
- Banani, M., Pourbakhsh, S.A., Deihim, A.H., 2004, Antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates associated with respiratory diseases. *Archives of Razi Institute*58, 111-117.
- Bangun, A., Tripathy, D.N., Hanson, L.E., 1981, Studies of *Pasteurella anatipestifer*: an approach to its classification. *Avian Diseases*25, 326-337.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of clinical Pathology*. 45, 493-496.
- Baxter-Jones, C., 1988, Zitiert nach Hinz und Hafez (1997).
- Behr, K.-P. 2007. Bacterial colonisation of respiratory tract: Observations in commercial turkey flocks. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Turkey Production*, Berlin, Mensch und Buch Verlag, ISBN: 3-86664-356, pp. 317-324.
- Beichel, E., 1986, Differenzierung von 130 X- und V-Faktor-unabhängigen aviäre Bakterienstämmen der Familie Pasteurellaceae Pohl 1901 unter besonderer Berücksichtigung neuer taxonomischer Erkenntnisse. *Vet. med. Dissertation*, Hannover.
- Bergey, D.H., Breed, R.S., 1957, Genus I. Pasteurella, In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (7th Edition)*. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 395-402.
- Bisgaard, M., 1982, Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination. *Avian Pathology*11, 341-350.
- Bissuel, 1988, Zitiert nach Vandamme et al. (1994).
- BMELV, 2005, Gutachten zur Zukunft der Nutztierhaltung. *Angewandte Wissenschaft, Heft 508*, Münster-Hiltrup, Stand 20.07.2015, http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Service/AnWis/Heft508.pdf;jsessionid=46CA1BF2C354C3CF1FD0BB89ED5F6799.2_cid339?__blob=publicationFile.

- Bock, R., Freidlin, P., Tomer, S., Manoim, M., Inbar, A., Frommer, A., Berman, E., Pokamunsky, S., 1998, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT): "Current status in Israel". Proceedings of the 1st international Symposium on Turkey Diseases, Berlin. H.M. Hafez und A. Mazaheri (Eds). 151-162.
- Bock, R., Freidlin, P., Tomer, S., Manoim, M., Inbar, A., Frommer, A., Vandamme, P., Wilding, P., Hickson, D., 1995, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) associated with a new turkey respiratory tract infectious agent. Proceedings of the 33rd Annual Convention of the Israel Branch of the World Veterinary Association/World Poultry Science Association, Zichron, Israel, 43-45.
- Brogden, K.A., Rhoades, K.R., Rimler, R.B., 1982, Serologic types and physiologic characteristics of 46 avian *Pasteurella anatipestifer* cultures. Avian Diseases 26, 891-896.
- Brozeit, H.E., 1981, zitiert nach Hinz und Hafez (1997).
- Bruner, D.W.a., Fabricant, J., 1954, A strain of *Moraxella anatipestifer* (*Pfeiferella anatipestifer*) isolated from ducks. Cornell Veterinarian 44, 461-464.
- Cai, Y., Chai, D., Wang, R., Liang, B., Bai, N., 2012, Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. Journal of antimicrobial chemotherapy 67, 1607-1615.
- Callies, E., Mannheim, W., 1980, Desribonucleic acid relatedness of some menaquinone producing Flavobacterium and cytophaga strains. Antonie van leeuwenhoek 46, 41-49.
- Canal, C.W., Leao, J.A., Rocha, S.L.S., Macagnan, M., Lima-Rosa, C.A.V., Oliveira, S.D., Back, A., 2005, Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens in Brazil. Research in Veterinary Science 78, 225-230.
- Chang, C., Lin, W., Yeh, T., Chiang, T., Chang, Y., 2003, Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and the efficacy of ceftiofur treatment. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 15, 26-29.
- Chansiripornchai, N., 2004. Molecular interaction of *Ornithobacterium rhinotracheale* with eukaryotic cells. Vet. met. Dissertation, Amsterdam,
- Charlton, B.R., Channing-Santiago, S.E., Bickford, A.A., Cardona, C.J., Chin, R.P., Cooper, G.L., Droual, R., Jeffrey, J.S., Meteyer, C.U., Shivaprasad, H.L., Walker, R.L., 1993, Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 5, 47-51.
- Chen, Y., Tsao, M., Lee, S., Chou, C., Tsai, H., 2010, Prevalence and molecular characterization of chloramphenicol resistance in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese in Taiwan. Avian Pathology 39, 333-338.
- Chen, Y.P., Lee, S.H., Chou, C.H., Tsai, H.J., 2012, Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese. Veterinary Microbiology 154, 325-331.
- Chin, R., Charlton, B., 1998, Ornithobacteriosis. In: Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens (4th Edition). Swayne, D.S., Glisson J.R., Jackwood, M.W., Person, J.E., Reed, W.M. (Eds.) American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, USA 89-91.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001, Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65, 232.
- Christensen, H., Bisgaard, M., 2010, Phylogenetic relationships of *Riemerella anatipestifer* serovars and related taxa and an evaluation of specific PCR tests reported for *R. anatipestifer*. Journal of Applied Microbiology 108, 1612-1619.

- CLSI, 2002, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from animals; Approved Standard-Second Edition. NCCLS, 22 No. 6, M31-A2.
- CLSI, 2004, Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS, 24 No. 2, M11-A6.
- CLSI, 2013, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement. CLSI Dokument Vet01-S2 CLSI, Wayne, PA, USA.
- Davies, J., Wright, G.D., 1997, Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends in microbiology. 5, 234-240.
- Dean, W.F., Price, J.I., Leibovitz, L., 1973, Effect of feed medicaments on bacterial infections in ducklings. Poultry Science52, 549-558.
- Devriese, L.A., Herdt, P.d., Haesebrouck, F., 2001, Antibiotic sensitivity and resistance in *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from Belgian broiler chickens. Avian Pathology30, 197-200.
- Devriese, L.A., Hommez, J., Vandamme, P., Kersters, K., Haesebrouck, F., 1995, In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from poultry and wild birds. Veterinary Record137, 435-436.
- DIN, 1998, Deutsche Industrie Norm. Methoden zur Empfindlichkeitstestung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. Teil 3: Agardiffusionstest. Beiblatt 1: Angaben für die Bewertung der Hemmhofdurchmesser. DIN58940-3, Beiblatt 1.
- Doern, G., 1995, Susceptibility tests of fastidious bacteria. In P.R. Murray (Ed.), Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington, DC, 1342-1349 pp.
- Dougherty, E., Saunders, L.Z., Parsons, E.H., Jr., 1955, The pathology of infectious serositis of ducks. American journal of pathology31, 475-489.
- Dudouyt, J., J. Leorat, P. van Empel, Y. Gardin, Dore, C., 1995, Isolement d'un nouvel agent pathogène chez la dinde: *Ornithobacterium rhinotracheale*; conduite à tenir. Proceedings des Journées de la recherche avicole, Centre de Congress d'Anger, 240-243.
- El-Sukhon, S.N., Asad, M., Al-Attar, M., 2002, Studies on the bacterial etiology of airsacculitis of broilers in Northern and Middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium*. Avian Diseases46, 605-612.
- Elgohary, A.A., Awaad, M.H.H., 1998, Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) and *E. coli* infection in chicken broilers. Veterinary Medical Journal Giza46, 67-75.
- Erganis, O., Hadimli, H.H., Kav, K., Sayn, Z., 2012, The antimicrobial susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. Eurasian Journal of Veterinary Sciences28, 27-30.
- EU-Verordnung, Nr. 37/2010, Über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Tabelle 2.
- EUCAST, 2017, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0.
- Falagas, M.E., Kasiakou, S.K., 2005, Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections, Clinical infectious diseases. 40, 1333-1341.
- Fitzgerald, S.L., Greyling, J.M., Bragg, R.R., 1998, Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomycin. Onderstepoort Journal of Veterinary Research65, 317-320.

- Floren, U., Storm, P.K., Kaleta, E.F., 1995, *Pasteurella anatipestifer* sp. i. c. bei Pekingenten: Pathogenitätsprüfungen und immunisierung mit einer inaktivierten, homologen, monovalenten (Serotyp 6/B) Ölemulsionsvakzine. Deutsche tierärztliche Wochenschrift 1995, 210-214.
- Frommer, A., Bock, R., Inbar, A., Zemer, S., 1990, Muscovy ducks as a source of *Pasteurella anatipestifer* infection in turkey flocks. Avian Pathology 19, 161-163.
- Frosch, P., Bierbaum, K., 1909, Über eine durch *Bacillus septicaemiae anserum exsudativae* (Riemer) bedingte Gänseseuche. Zugleich ein Beitrag zur Frage der Pseudoinfluenzabacillen. Zentralblatt für Bakteriologie 52, 433-440.
- Fulton, R.M., Rimler, R.B., 2010, Epidemiologic investigation of *Riemerella anatipestifer* in a commercial duck company by serotyping and DNA fingerprinting. Avian Diseases 54, 969-972.
- Garmyn, A., Martel, A., Froyman, R., Ludwig, C., Nauwynck, H., Haesebrouck, F., Pasmans, F., 2009, The effect of reduced treatment time and dosage of enrofloxacin on the course of respiratory disease caused by avian metapneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale*. Poultry Science 88, 2315-2323.
- Gerlach, H., 1970, Anatipestifer Infektion bei Entenküken. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 77, 541-542.
- Gibson, J.S., Cobbold, R.N., Kyaw-Tanner, M.T., Heisig, P., Trott, D.J., 2010, Fluoroquinolone resistance mechanisms in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections in dogs. Veterinary Microbiology 146, 161-166.
- Glünder, G., Hinz, K.-H., 1989, Isolation of *Moraxella anatipestifer* from embryonated goose eggs. Avian Pathology 18, 351-355.
- Graham, R., Brandly, C.R., Dunlap, G.L., 1938, Studies on duck septicaemia. Cornell Veterinarian 28, 1-8.
- Grimes, T.M., Rosenfield, L.E., 1972, *Pasteurella anatipestifer* infection in ducks in Australia. Australian Veterinary Journal. 48, 367-368.
- Hafez, H.M., 1994, Respiratory disease conditions on meat turkeys caused by *Ornithobacterium rhinotracheale*: clinical signs, diagnostics and therapy. Proceedings of the 43th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, USA, 113-114.
- Hafez, H.M., 1996, Current status on the role of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) in respiratory disease complexes in poultry. Archiv für Geflügelkunde 60, 208-211.
- Hafez, H.M., 1998a, Current status on the laboratory diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" in poultry. Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift 111, 143-145.
- Hafez, H.M., 1998b, *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). Respiratory diseases conference. 6th International Poultry Health Conference, Hannover, Germany.
- Hafez, H.M., 2002, Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. International Journal of Poultry Science 1, 114-118.
- Hafez, H.M., Beyer, W., 1997, Preliminary investigation on *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates using PCR-fingerprints. Proceedings of the XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, 51.
- Hafez, H.M., Friedrich, S., 1998, Isolierung von *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) aus Mastputen in Österreich. Tierärztliche Umschau 53, 503-504.
- Hafez, H.M., Kruse, W., Emele, J., Sting, R., 1993, Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch *Pasteurella*-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. Proceedings of the International Conference on Poultry Diseases, Potsdam, Deutschland, 105-112.
- Hafez, H.M., Sting, R., 1999, Investigation on different *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates. Avian Diseases 43.

- Hafez, H.M., 1994, Respiratory disease conditions in meat rukeys caused by *Ornithobacterium rhinotracheale*: clinical signs, diagnostics and therapy. Proceedings of the 43th Western Poultry Disease Conference Sacramento, USA, 113-114.
- Harry, E.G., 1969, *Pasteurella* (*Pfeiferella*) *anatipestifer* Serotypes Isolated from cases of *anatipestifer* Septicaemia in ducks. *The veterinary Record*84, 673.
- Hauck, R., Chin, R.P., Shivaprasad, H.L., 2015, Retrospective Study on the Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Chickens and Turkeys in Central California: 294 cases (2000–12). *Avian Diseases*59, 1-10.
- Helfer, D.H., Helmboldt, C.F., 1977, *Pasteurella anatipestifer* infection in turkeys. *Avian Diseases*21, 712-715.
- Hendrickson, J.M., Hilbert, K.F., 1932, A new and serious septicaemic disease of young ducks with a description of the causative Organism *Pfeiferella anatipestifer*, n.s. (not specified). *Cornell Veterinarian*22, 239-252.
- Hilbert, K.F., Kiser, J.S., 1948, Chemotherapy of duck diseases with sulfonamides. *Cornell Veterinarian*, 148-155.
- Hinz, K.-H., Reetz, G., 2005, *Riemerellose*. Kompendium der Geflügelkrankheiten6. Auflage.
- Hinz, K.-H., Ryll, M., Köhler, B., 1998a, Detection of acid production from carbohydrates by *Riemerella anatipestifer* and related organisms using the buffered single substrate test. *Veterinary Microbiology*60, 277-284.
- Hinz, K.-H., Ryll, M., Köhler, B., Glünder, G., 1998b, Phenotypic characteristics of *Riemerella anatipestifer* and similar micro-organisms from various hosts. *Avian Pathology*27, 33-42.
- Hinz, K.H., Blome, C., Ryll, M., 1994, Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. *Veterinary Record*135, 233-234.
- Hinz, K.H., Hafez, H.M., 1997, The early history of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT). *Archiv für Geflügelkunde*61, 95-96.
- Hung, A.L., Alvarado, A., 2001, Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from Peru. *Avian Diseases*45, 999-1005.
- Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., Roesler, U., Kasbohrer, A., 2016, Prevalence of mcr-1 in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010-2015. *PLoS ONE*11, e0159863.
- Jortner, B.S., Porro, R., Leibovitz, L., 1968, Central nervous-system lesions of spontaneous *pasteurella anatipestifer* infection in ducklings. *Avian Diseases*13, 27-35.
- Joubert, P., Higgins, R., Laperle, A., Mikaelian, I., Venne, D., Silim, A., 1999, Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from turkeys in Quebec, Canada. *Avian Diseases*43, 622-626.
- Kardos, G., Nagy, J., Antal, M., Bistyak, A., Tenk, M., Kiss, I., 2007, Development of a novel PCR assay specific for *Riemerella anatipestifer*. *Letters in Applied Microbiology*44, 145-148.
- Karstad, L., Lusi, P., 1970, *Pasteurella anatipestifer* as a cause of mortality in captive wild waterfowl, *Journal of wildlife diseases*. 6, 408-413.
- Koga, Y., Zavaleta, A.I., 2005, Intraspecies genetic variability of *Ornithobacterium rhinotracheale* in commercial birds in Peru. *Avian Diseases*49, 108-111.
- Kroker, R., Ungemach, F.R., Löscher, W. 2006. Pharmaka zur Behandlung und Verhütung bakterieller Infektionen. In: Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren (Stuttgart, Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH Co. KG), pp. 234-278.
- Kronthaler, F., 2009. Untersuchungen zur in-vitro-Antibiotikaempfindlichkeit aerober Bakterien beim Wirtschaftsgeflügel mittels Agardiffusionstest und Bouillon-Mikrodilutionsmethode. *Vet. med. Dissertation, München.*

- Leclercq, R., 2002, Mechanisms of Resistance to Macrolides and Lincosamides: Nature of the Resistance Elements and Their Clinical Implications. *Clinical Infectious Diseases*34, 482-492.
- Leibovitz, L., 1972, A survey of the so-called '*anatipestifer* syndrome'. *Avian Diseases*16, 836-851.
- Leorat, J., Bonnete, A., Guillot, E., 2007, Suivi de l'efficacite des traitements antibiotiques en dindes de chair sur *Ornithobacterium rhinotracheale*. (Monitoring the effectiveness of antibiotics against *Ornithobacterium rhinotracheale* in broiler turkeys). *Actes des 7emes Journees de la Recherche Avicole, Tours, France*28, 314-318.
- Leorat, J., Dudouyt, J., Dore, C., Gardin, Y., 1994, *Ornithobacterium rhinotracheale*: une nouvelle raison de tousser. *Filieres Avicoles*559, 69-70.
- Leroy-Setrin, S., Flaujac, G., Thenaisy, K., Chaslus-Dancla, E., 1998, Genetic diversity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from poultry in France. *Letters in Applied Microbiology*26, 189-193.
- Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D., Coulthard, K., 2005, Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant in Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*25, 11-25.
- Li, J.X., Tang, Y., Gao, J.Y., Huang, C.H., Ding, M.J., 2011, *Riemerella anatipestifer* infection in chickens. *Pakistan Veterinary Journal*31, 65-69.
- Li, L., Zhu, D.K., Zhou, Y., Wang, M.S., Cheng, A.C., Jia, R.Y., Chen, S., Liu, F., Yang, Q.M., Chen, X.Y., 2012, Adhesion and invasion to duck embryo fibroblast cells by *Riemerella anatipestifer*. *Poultry Science*91, 3202-3208.
- Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G.B., Dong, B.L., Huang, X.H., Yu, L.F., Gu, D.X., Ren, H.W., Chen, X.J., Lv, L.C., He, D.D., Zhou, H.W., Liang, Z.S., Liu, J.H., Shen, J.Z., 2016, Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study, *Lancet Infectious Diseases*. 16, 161-168.
- Loeffler, F., 1910, Über eine im Jahre 1904 in Klein-Kiesow bei Greifswald beobachtete Gänseseuche. *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde*36, 289-298.
- Loh, H., Teo T. P., Tan, H.-C., 1992, Serotypes of "*Pasteurella*" *anatipestifer* isolates from ducks in singapore: a proposal of new serotypes. *Avian Pathology*21, 453-459.
- Lopes, V.C., Velayudhan, B., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V., 2002, Survival of *Ornithobacterium rhinotracheale* in sterilized poultry litter. *Avian Diseases*46, 1011-1014.
- Luhofe, G., Böttner, A., Hafez, H.M., Kaske, M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kühn, T., Richter, A., Sigge, K., 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. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*117, 245-251.
- Malik, Y.S., Olsen, K., Kumar, K., Goyal, S.M., 2003, In vitro antibiotic resistance profiles of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from Minnesota turkeys during 1996-2002. *Avian Diseases*47, 588-593.
- Mannheim, W., Pohl, S., Hollander, R., 1980, Zur Systematik von *Actinobacillus*, *Haemophilus* and *Pasteurella*: Basenzusammensetzung der DNS, Atmungschinone und kulturell-biochemische Eigenschaften repräsentativer Sammlungsstämme. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale. A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie.* 246, 512-540.

- Marien, M., Decostere, A., Duchateau, L., Chiers, K., Froyman, R., Nauwynck, H., 2007, Efficacy of enrofloxacin, florfenicol and amoxicillin against *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Escherichia coli* O2:K1 dual infection in turkeys following APV priming. *Veterinary Microbiology* 121, 94-104.
- Maskell, J.P., Sefton, A.M., Hall, L.M., 1997, Mechanism of sulfonamide resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41, 2121-2126.
- Mavromatis, K., Lu, M., Misra, M., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Hammon, N., Deshpande, S., Cheng, J., Tapia, R., Han, C., Goodwin, L., Pitluck, S., Liolios, K., Pagani, I., Ivanova, N., Mikhailova, N., Pati, A., Chen, A., Palaniappan, K., Land, M., Hauser, L., Jeffries, C.D., Detter, J.C., Brambilla, E.M., Rohde, M., Göker, M., Gronow, S., Woyke, T., Bristow, J., Eisen, J.A., Markowitz, V., Hugenholtz, P., Klenk, H.-P., Kyrpides, N.C., 2011, Complete genome sequence of *Riemerella anatipestifer* type strain (ATCC 11845T). *Standards in genomic sciences* 4, 144-153.
- Metzner, M., Köhler-Repp, D., Köhler, B., 2008, *Riemerella anatipestifer* Infections in turkey and other poultry. 7th international Symposium on turkey diseases, Berlin, ISBN: 978-3-939902-96-6, 117-122.
- Mirzaie, S., Hassanzadeh, M., BozorgmehriFard, M.H., Banani, M., 2011, Isolation and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* in the commercial turkey, quail flocks and domestic pigeons by bacteriological and molecular methods. *Archives of Razi Institute* 66, 121-127.
- Mitrovic, M., Schildknecht, E.G., Maestrone, G., Luther, H.G., 1978, Refonaid in control of *Pasteurella anatipestifer* and *E. coli* infections in ducklings. *Poultry Science* 57, 1159.
- Mouahid, M., Engelhard, E., Grebe, M., Kroppenstedt, R.M., Mutters, R., Mannheim, W., 1992, Characterisation of non pigmented members of Flavobacterium Catophaga-Komplex parasitizing in mammals and birds. Second Symposium on Flavobacterium-Cytophaga and related bacteria, 2-5 April 1992, Bloemfontein, Republic of South Africa.
- Mousavi, S.M., Hassanzadeh, M., Tarang, A., 2011, Antibiotic sensitivity and effect of doxycyclin, tiamulin and enrofloxacin against broiler chickens with *Ornithobacterium rhinotracheale* infection symptoms. *Global Veterinaria* 7, 482-486.
- Mühlemann, K., 2002, Mechanismen der Antibiotikaresistenz. *Therapeutische Umschau* 59.
- Munday, B.L., Corbould, A., Heddleston, K.L., Harry, E.G., 1970, Isolation of *Pasteurella anatipestifer* from black swan (*Cygnus atratus*), *Australian veterinary journal*. 46, 322-325.
- Murthy, T.R.G.K., Natarajan, D., Balasubramaniam, G.A., Dinakaran, A.M., Kulandaivelu, S., 2008, In vitro antibiotic sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale* strains isolated from laying hens in India. *Veterinarski Arhiv* 78, 49-56.
- Nagaraja, K., Back, A., Sorenger, S., Rajashekara, G., Halverson, D., 1998, Tissue distribution post-infection and antimicrobial sensitivity of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Proceeding of the 47th Western Poultry Disease Conference*, Sacramento, USA, 57-60.
- NCCLS, 1998, MIC interpretive Standards for *pseudomonas aeruginosa* and other non-*Enterobacteriaceae*. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Villanova, PA., 18.
- Novartis, 2014, Atemwegserkrankungen beim Geflügel, Stand 20.07.2015.
Novartis, <http://www.ah.novartis.de/page/content/index.asp?MenuID=168&ID=154&Menu=5&Item=6.1.6#Allgemeines>.

- Numee, S., 2012, Investigations on the viability as well as on the molecular and serological characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) isolates. Vet. med. Dissertation, Berlin.
- Odor, E.M., Salem, M., Pope, C.R., Sample, B., Primm, M., Vance, K., Murphy, M., 1997, Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial broiler flocks on the Delmarva Peninsula. *Avian Diseases*41, 257-260.
- Pathanasophon, P., Sawada, T., Tanticharoenyos, T., 1995, New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology*24, 195-199.
- Pathanasophon, P., Tipa Tanticharoenyos, Sawada, T., 1993, Physiological characteristics, antimicrobial susceptibility and serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Veterinary Microbiology*39, 179-185.
- Philipp, H.C., Taras, D., Liman, M., Grosse-Herrenthey, A., Ronchen, S., Behr, P., 2013, Molecular typing of *Riemerella anatipestifer* serotype 14, an emerging pathogen for ducks. *Archiv für Geflügelkunde*77, 218-225.
- Pickrell, J.A., 1966, Pathologic Changes Associated with Experimental *Pasteurella anatipestifer* Infection in Ducklings. *Avian Diseases*10, 281-288.
- Piechulla, K., Pohl, S., Mannheim, W., 1986, Phenotypic and genetic relationship of so-called "Moraxella" (*Pasteurella*) *anatipestifer* to the Flavobacterium/Cytophaga Group. *Veterinary Microbiology*11, 261-270.
- Popp, C. 2003. *Ornithobacterium rhinotracheale*: Typisierung, Pathogenität, Resistenzverhalten und Bekämpfung. In Vet. med. Dissertation, Berlin.
- Price, J., 1959, Studies on *Pasteurella anatipestifer* infection in white peking ducks. *Avian Diseases*3, 486-487.
- Prip, M., Molbak, K., 1969, On the application of oxytetracycline (terramycin hydrochloride) in the new duck syndrome. *Nord. Veterinary Medicine*21, 655-659.
- Priya, P.M., Pillai, D.S., Balusamy, C., Rameshkumar, P., Senthamilselvan, P., 2008, Studies on outbreak of "new duck disease" in Kerala, India. *International Journal of Poultry Science*7, 189-190.
- QS, 2015, QS: Leitfaden Antibiotikamonitoring Mastgeflügel. Stand: 20.07.2015
- Rastogi, S.K., Rutledge, V.J., Gibson, C., Newcombe, D.A., Branen, J.R., Branen, A.L., 2011, Ag colloids and Ag clusters over EDAPTMS-coated silica nanoparticles: synthesis, characterization, and antibacterial activity against *Escherichia coli*. *Nanomedicine*7, 305-314.
- Riemer, 1904, Kurze Mitteilung über eine bei Gänsen beobachtete exsudative Septikämie und deren Erreger. *Zentralblatt für Bakteriologie*Abt. 1, 641-648.
- Rimler, R.B., Nordholm, G.E., 1998, DNA Fingerprinting of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Diseases*42, 101-105.
- Roepke, D.C., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Sprenger, S.J., Halvorson, D.A., 1998, Isolation and identification of *Ornithobacterium rhinotracheale* from commercial turkey flocks in the upper midwest. *Avian Diseases*42, 219-221.
- Rosa, M.d., Droual, R., Chin, R.P., Shivaprasad, H.L., Walker, R.L., 1996, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkey breeders. *Avian Diseases*40, 865-874.
- Rosenfeld, L.E., 1973, *Pasteurella anatipestifer* infection in fowls in Australia, *Australian veterinary journal*. 49, 55-56.
- Rubbenstroth, D., Hotzel, H., Knobloch, J., Teske, L., Rautenschlein, S., Ryll, M., 2011, Isolation and characterization of atypical *Riemerella columbina* strains from pigeons and their differentiation from *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology*147, 103-112.

- Rubbenstroth, D., Ryll, M., Behr, K.P., Rautenschlein, S., 2009, Pathogenesis of *Riemerella anatipestifer* in turkeys after experimental mono-infection via respiratory routes or dual infection together with the avian metapneumovirus. *Avian Pathology*38, 497-507.
- Rubbenstroth, D., Ryll, M., Knobloch, J.K.M., Kohler, B., Rautenschlein, S., 2013, Evaluation of different diagnostic tools for the detection and identification of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*42, 17-26.
- Rubin, J., Walker, R.D., Blickenstaff, K., Bodeis-Jones, S., Zhao, S., 2008, Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Veterinary Microbiology*131, 164-172.
- Ryll, M., Christensen, H., Bisgaard, M., Christensen, J.P., Hinz, K.H., Kohler, B., 2001, Studies on the prevalence of *Riemerella anatipestifer* in the upper respiratory tract of clinically healthy ducklings and characterization of untypable strains. *Journal of Veterinary Medicine*48, 537-546.
- Ryll, M., Günther, R., Hafez, H.M., Hinz, K.H., 2002, Isolierung und Differenzierung eines Cytochromoxidase-negativen *Ornithobacterium-rhinotracheale*-Stamms aus Puten. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*115, 274-277.
- Sakai, E., Tokuyama, Y., Nonaka, F., Ohishi, S., Ishikawa, Y., Tanaka, M., Taneno, A., 2000, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in Japan: preliminary investigations. *Veterinary Record*146, 502-504.
- Sandhu, T., 1979, Immunization of White Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection. *Avian Diseases*23, 662-669.
- Sandhu, T., Harry, E.G., 1981, Serotypes of *pasteurella anatipestifer* isolated from commercial white peking ducks in the united states. *Avian Diseases*25, 497-502.
- Sandhu, T.S., Dean, W.F., 1980, Effect of chemotherapeutic agents on *Pasteurella anatipestifer* infection in white peking ducklings. *Poultry Science*59, 1027-1030.
- Sandhu, T.S., Leister, M.L., 1991, Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from poultry in different countries. *Avian Pathology*20, 233-239.
- Sarver, C.F., Teresa Y. Morishita, Nersessian, B., 2005, The effect of route of inoculation and challenge dosage on *Riemerella anatipestifer* infection in pekin ducks (*Anas platyrhynchos*). *Avian Diseases*49, 104-107.
- Schwarz, S., Bottner, A., Hafez, H.M., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kuhn, T., Luhofer, G., Richter, A., Traeder, W., Waldmann, K.H., Wallmann, J., Werckenthin, C., 2003, Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: Methods for in-vitro susceptibility testing and their suitability with regard to the generation of most useful data for therapeutic applications. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*116, 353-361.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004, Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol, *Fems Microbiology Reviews*. 28, 519-542.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010a, Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology*141, 1-4.
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A.P., Gaastra, W., 2010b, Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*65, 601-604.
- Segers, P., Mannheim, W., Vancanneyt, M., Brandt, K.d., Hinz, K.H., Kersters, K., Vandamme, P., 1993, *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exudativa, and its phylogenic affiliation within the *Flavobacterium-Cytophaga* rRNA homology group. *International Journal of Systematic Bacteriology*43, 768-776.

- Siddique, M., Zia, T., Rehman, S.U., 2008, Outbreak of *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) infection in chickens in Pakistan. *Archiv für Geflügelkunde*72, 202-206.
- Skold, O., 2000, Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug resistance updates*3, 155-160.
- Smith, J.M., Frame, D.D., Cooper, G., Bickford, A.A., Ghazikhanian, G.Y., Kelly, B.J., 1987, *Pasteurella anatipestifer* infection in commercial meat-type turkeys in California. *Avian Diseases*31, 913-917.
- Soriano, V.E., Longinos, M.G., Navarrete, P.G., Fernandez, R.P., 2002, Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. *Avian Diseases*46, 686-690.
- Soriano, V.E., Vera, N.A., Salado, C.R., Fernandez, R.P., Blackall, P.J., 2003, In vitro susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. *Avian Diseases*47, 476-480.
- Sprenger, S.J., Back, A., Shaw, D.P., Nagaraja, K.V., Roepke, D.C., Halvorson, D.A., 1998, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in turkeys: experimental reproduction of the disease. *Avian Diseases*42, 154-161.
- Sprenger, S.J., Halvorson, D.A., Nagaraja, K.V., Spasojevic, R., Dutton, R.S., Shaw, D.P., 2000, *Ornithobacterium rhinotracheale* infection in commercial laying-type chickens. *Avian Diseases*44, 725-729.
- Sugimoto, C., E. Miyagawa, M. Nakazawa, K. Mitany, Isayama, Y., 1983, Cellular fatty acid composition comparison of *Haemophilus equigenitalis* and *Moraxella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*33, 181-187.
- Sun, N., Liu, J., Yang, F., Lin, D., Li, G., Chen, Z., Zeng, Z., 2012, Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks. *Veterinary Microbiology*158, 376-383.
- Szalay, D., Glavits, R., Nemes, C., Kosa, A., Fodor, L., 2002, Clinical signs and mortality caused by *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkey flocks. *Acta Veterinaria Hungarica*50, 297-305.
- Tabatabai, L.B., Zimmerli, M.K., Zehr, E.S., Briggs, R.E., Tatum, F.M., 2010, *Ornithobacterium rhinotracheale* North American field isolates express a hemolysin-like protein. *Avian Diseases*54, 994-1001.
- Tanyi, J., Bistyak, A., Kaszanyitzky, E., Vetesi, F., Dobos-Kovacs, M., 1995, Isolation of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chicks, hens and turkeys with respiratory symptoms. Preliminary report. [Ungarisch]. *Magyar Allatorvosok Lapja*50, 328-330.
- Taylor, G., Allison, H., 1962, "Colomycin". Laboratory and clinical investigations, *British medical journal*. 2, 161-163.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, v.R., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995, Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. *Journal of Clinical Microbiology*33, 2233-2239.
- Thieme, S., Muhldorfer, K., Luschow, D., Hafez, H.M., 2016, Molecular characterization of the recently emerged poultry pathogen *Ornithobacterium rhinotracheale* by multilocus sequence typing. *PLoS ONE*11.
- Travers, A.F., 1996, Concomitant *Ornithobacterium rhinotracheale* and Newcastle disease infection in broilers in South Africa. *Avian Diseases*40, 488-490.
- Tsai, H., Huang, C., 2006, Phenotypic and molecular characterization of isolates of *Ornithobacterium rhinotracheale* from chickens and pigeons in Taiwan. *Avian Diseases*50, 502-507.
- Tsai, H., Liu, Y., Tseng, C., Pan, M., 2005, Genetic variation of the ompA and 16S rRNA genes of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*34, 55-64.

- Turbahn, A., Sonia Cortez De Jäckel, E. Greuel, A. De Jong, & R.F., Kaleta, E.F., 1997, Dose response study of enrofloxacin against *Riemerella anatipestifer* septicaemia in Muscovy and Pekin ducklings. *Avian Pathology*26, 791-802.
- Turnidge, J., Kahlmeter, G., Kronvall, G., 2006, Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values, *Clinical microbiology and infection*. 12, 418-425.
- van Beek, P.N.G.M., Empel, P.C.M.v., Bosch, P.G.v.d., Storm, P.K., Bongers, J.H., Preez, J.H.d., 1994, Respiratory disease, growth depression and arthritis in turkeys and broilers caused by a *Pasteurella-like* bacterium, *Ornithobacterium rhinotracheale* or 'taxon 28'. [Holländisch]. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*119, 99-101.
- van Empel, P., 1998a. *Ornithobacterium rhinotracheale*, Vet. med. Dissertation, Utrecht.
- van Empel, P., Bosch, H.v.d., Loeffen, P., Storm, P., 1997, Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Clinical Microbiology*35, 418-421.
- van Empel, P.C.M., 1998b, *Ornithobacterium rhinotracheale*: Current status and control. Proceeding of the 1st International Symposium on Turkey Diseases, Berlin, 129-137.
- van Empel, P.C.M., Hafez, H.M., 1999, *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. *Avian Pathology*28, 217-227.
- van Veen, L., Gruys, E., Frik, K., Empel, P.v., 2000, Increased condemnation of broilers associated with *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Veterinary Record*147, 422-423.
- van Veen, L., Hartman, E., Fabri, T., 2001, In vitro antibiotic sensitivity of strains of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolated in the Netherlands between 1996 and 1999. *Veterinary Record*149, 611-613.
- Vandamme, P., Segers, P., Vancanneyt, M., Hove, K.v., Mutters, R., Hommez, J., Dewhirst, F., Paster, B., Kersters, K., Falsen, E., Devriese, L.A., Bisgaard, M., Hinz, K.H., Mannheim, W., 1994, *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract. *International Journal of Systematic Bacteriology*44, 24-37.
- Vanlanduyt, H.W., Boelaert, J., Glibert, B., Gordts, B., Verbruggen, A.M., 1986, Surveillance of Aminoglycoside Resistance - European Data. *American Journal of Medicine*80, 76-81.
- Varga, J., Fodor, L., Makrai, L., 2001, Characterisation of some *Ornithobacterium rhinotracheale* strains and examination of their transmission via eggs. *Acta Veterinaria Hungarica*49, 125-130.
- Vega, V., Zepeda, A., Ramirez, S., Morales, V., Fernandez, P., Montes de Oca, R., Guerra-Infante, F.M., Haro-Cruz, M.d.J.d., Blackall, P.J., Soriano, E.V., 2008, Hemagglutinating activity of serovar reference strains of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*20, 353-355.
- Waldow, K., 2009, Untersuchungen zur Embryoletalität, Genotypisierung und Resistenzlage aktueller *Ornithobacterium rhinotracheale*-Isolate. Vet. med. Dissertation, Berlin.
- Wallmann, J., Hauck, R., Schwarz, C., Heberer, T., 2015, Antibiotika: Gesetzgebung und Datenerfassung in Deutschland. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*10.
- Walters, J., Evans, R., LeRoith, T., Sriranganathan, N., McElroy, A., Pierson, F.W., 2014, Experimental comparison of hemolytic and nonhemolytic *Ornithobacterium rhinotracheale* field isolates in vivo. *Avian Diseases*58, 78-82.
- Wang, Y., Chan, P., Yeh, K., Chang, C., Hsuan, S., Hsieh, Y., Chang, Y., Lai, T., Lin, W., Chen, T., 2010, Molecular characterization of enrofloxacin resistant *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. *Veterinary Microbiology*142, 309-312.
- Warner, K., Clark, M.I., Perez, S., Jennison, R., 2009, Control of *Ornithobacterium rhinotracheale* in poultry. *Veterinary Record*165, 668.

- Wilding, G.P., 1986, Zitiert nach Hinz und Hafez (1997).
- Wyffels, R., Hommez, J., 1990, *Pasteurella-anatipestifer* Isolated from Respiratory Lesions in Partridges Kept in Captivity (Perdix-Perdix). Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift 59, 105-106.
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016, Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Eurosurveillance 21, 8-13.
- Yu, C., Liu, Y., Chou, S., Chao, M., Weng, B., Tsay, J., Chiu, C., Wu, C., Lin, T., Chang, C., Chu, C., 2008, Genomic diversity and molecular differentiation of *Riemerella anatipestifer* associated with eight outbreaks in five farms. Avian Pathology 37, 273-279.
- Yuan, J., Liu, W., Sun, M., Song, S., Cai, J., Hu, S., 2011, Complete genome sequence of the pathogenic bacterium *Riemerella anatipestifer* strain RA-GD. Journal of Bacteriology 193, 2896-2897.
- Zadjian, C., Bostvironnois, C., Leorat, J., 2009, In vitro sensitivity of the tilmicosin in the *Ornithobacterium rhinotracheale* culture: pH and CO₂ influence. [Französisch]. Proceedings of the 8th Avian French Research Days, St Malo, France, 25-26 March 2009.
- Zehr, W.J., Ostendorf, J., Jr., 1970, Case report. *Pasteurella anatipestifer* in turkeys. Avian Diseases 14, 557-560.
- Zheng, F., Lin, G., Zhou, J., Cao, X., Gong, X., Wang, G., Qiu, C., 2012, Discovery and characterization of gene cassettes-containing integrons in clinical strains of *Riemerella anatipestifer*. Veterinary Microbiology 156, 434-438.
- Zheng, F., Lin, G., Zhou, J., Wang, G., Cao, X., Gong, X., Qiu, C., 2011, Loop-mediated isothermal amplification assay targeting the *ompA* gene for rapid detection of *Riemerella anatipestifer*. Molecular and Cellular Probes 25, 65-67.
- Zhong, C., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Luo, Q., Chen, S., Zhang, S., Chen, X., 2013, Quantitative real-time PCR study of the expression and regulation of the tetracycline resistance gene in *Riemerella anatipestifer*. Poultry Science 92, 1552-1559.
- Zhong, C., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Luo, Q., Zhong, C., Li, L., Duan, Z., 2009a, Antibiotic susceptibility of *Riemerella anatipestifer* field isolates. Avian Diseases 53, 601-607.
- Zhong, C., Cheng, A., Wang, M., Zhu, D., Zhang, S., Luo, Q., Chen, X., 2009b, Study on the mechanism of resistance of *Riemerella anatipestifer* to β -lactam antibiotics. . Chinese Veterinary Science / Zhongguo Shouyi Kexue Vol. 39, 1066-1073
- Zorman-Rojs, O., Zdovc, I., Bencina, D., Mrzel, I., 2000, Infection of turkeys with *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Mycoplasma synoviae*. Avian Diseases 44, 1017-1022.

10 Anhang

Tab. 3: Untersuchungsergebnisse der Resistenztestung von *R. anatipestifer* mittels unterschiedlicher Verfahren gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-----------------------------------|---|---|------------------|-----------------|-------------------------------|
| β-Lactame / Cephalosporine | | | | | |
| Ampicillin | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 58,4% I = 2,2% S = 39,4% | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | Agardiffusion | n = 48 R = 25% | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| | | n = 24 R = 13 (54%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 60 S = 57 (95%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 32 MHK ₉₀ = >256 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| | | n = 103 MHK ₅₀ = 4 MHK ₉₀ = 8 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | | n = 20 MHK ₅₀ = < 0,2 MHK ₉₀ = 0,39 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| Amoxycillin/ Clavulansäure | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 45,7% I = 7,2% S = 47,1% | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| Amoxicillin | Agardiffusion | n = 5 S = 100% | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| | | n = 102 (2005) S = 97 (95%) | Deutsch- land | Puten | Behr, 2007 |
| | | n = 80 (2007) S = 36 (45%) | Deutsch- land | Puten | Behr, 2007 |
| | | n = 24 R = 10 (42%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz | |
|--|---|---|---|-----------------|-------------------------------|-----------------------|
| β-Lactame / Cephalosporine | | | | | | |
| Penicillin G | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 86,9% I = 0% S = 13,1% | China | Enten | Zhong et al., 2009a | |
| | Agardiffusion | n = 48 R = 33,3% | China | Enten | Zheng et al., 2012 | |
| | | n = 24 R = 14 (58%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 | |
| | | n = 60 S = 100% | USA | Enten | Bangun et al., 1981 | |
| | | n = 5 R = 100% | Indien | Enten | Priya et al., 2008 | |
| | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 2 MHK ₉₀ = 16 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 | |
| | | n = 20 MHK ₅₀ = < 0,2 MHK ₉₀ = 0,78 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 | |
| | | n = 54 R = 54 (100%) | China | Enten | Zhong et al., 2009b | |
| | Ceftiofur | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 4 MHK ₉₀ = 32 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| | Cefoperazon | Agardiffusion | n = 48 R = 31,25% | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| Cefotaxim | Agardilution | n = 54 R = 36 (66,7%) | China | Enten | Zhong et al., 2009b | |
| Cefepim | Agardilution | n = 54 R = 53 (98,15%) | China | Enten | Zhong et al., 2009b | |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-----------------------|---|---|----------|-----------------|-------------------------------|
| Aminoglycoside | | | | | |
| Gentamicin | Agardiffusion | n = 60 S = 53 (88,3%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | | n = 48 R = 27 (56,25%) | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| | | n = 24 R = 17 (73%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 5 S = 5 (100%) | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = 32 MHK ₉₀ = >128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | | n = 20 MHK ₅₀ = >50 MHK ₉₀ = >50 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| | | n = 50 MHK ₅₀ = 64 MHK ₉₀ = >256 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| Kanamycin | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 63 (28,0%) I = 30 (13,6%) S = 131 (58,4%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | Agardiffusion | n = 60 S = 8 (13,3%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 32 MHK ₉₀ = 64 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| | | n = 103 MHK ₅₀ = >128 MHK ₉₀ = >128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | | n = 20 MHK ₅₀ = >50 MHK ₉₀ = >50 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| Neomycin | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 22 (9,6%) I = 64 (28,6%) S = 138 (61,8%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = >128 MHK ₉₀ = >128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | Agardiffusion | n = 60 S = 60 (100%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-----------------------|---|--|----------|-----------------|-------------------------------|
| Aminoglycoside | | | | | |
| Spectinomycin | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 25 (11,3%) I = 49 (21,7%) S = 150 (67%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 32 MHK ₉₀ = 256 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| Fenicole | | | | | |
| Chloramphenicol | Agardiffusion | n = 48 R = 28 (58,3%) | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| | | n = 24 R = 18 (77%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 60 S = 60 (100%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | | n = 5 S = 5 (100%) | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 8 MHK ₉₀ = 64 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| | | n = 74 R = 30 (40,5%) I = 34 (45,9%) S = 10 (13,5%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Chen et al., 2010 |
| | | n = 66 R = 52 (79%) I = 4 (6%) S = 10 (15%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Chen et al., 2012 |
| | | n = 103 MHK ₅₀ = 16 MHK ₉₀ = 64 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | | n = 20 MHK ₅₀ = 1,56 MHK ₉₀ = 3,14 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| | | | | | |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-----------------------|---------------|---|------------------|-----------------|-------------------------|
| Florfenicol | Agardilution | n = 66 R = 7 (10,6%) I = 2 (3%) S = 57 (86,4%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Chen et al., 2012 |
| | | n = 103 MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 8 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | Agardiffusion | n = 48 R = 7 (14,6%) | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| Fluorchinolone | | | | | |
| Enrofloxacin | Agardiffusion | n = 48 R = 20 (41,7%) | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| | | n = 24 R = 17 (73%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 5 S = 5 (100%) | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| | | n = 102 (2005) S = 102 (100%) | Deutsch- land | Puten | Behr, 2007 |
| | | n = 80 (2007) S = 78 (98%) | Deutsch- land | Puten | Behr, 2007 |
| | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = 4 MHK ₉₀ = 32 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | | n = 8 MHK ₅₀ = 0,015 MHK ₉₀ = 0,06 | Deutsch- land | Enten | Turbahn et al., 1997 |
| Ciprofloxacin | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = 4 MHK ₉₀ = 16 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| Nalidixinsäure | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = ≥ 128 MHK ₉₀ = ≥ 128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---|---|----------|-----------------|-------------------------------|
| Makrolide | | | | | |
| Erythromycin | Agardiffusion | n = 224 R = 73 (32,7%) I = 44 (19,5%) S = 107 (47,7%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | | n = 48 R = 17 (35,4%) | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| | | n = 24 R = 15 (64%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 60 S = 51 (85%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | Agardilution | n = 20 MHK ₅₀ = <0,2 MHK ₉₀ = 0,39 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| Tilmicosin | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = 16 MHK ₉₀ = >128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| Tylosin | Agardilution | n = 20 MHK ₅₀ = < 0,2 MHK ₉₀ = 1,56 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| Tetrazykline | | | | | |
| Tetrazyklin | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 104 (46,6%) I = 48 (21,3%) S = 72 (32,1%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | | n = 60 S = 60 (100%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | | n = 24 R = 16 (69%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = 8 MHK ₉₀ = >128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | | n = 50 MHK ₅₀ = 64 MHK ₉₀ = 256 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|--|---|---|------------------|-----------------|-------------------------------|
| Doxycyclin | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 55 (24,4%) I = 28 (12,7%) S = 141 (62,9%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | Agardiffusion | n = 24 R = 8 (35%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 5 S = 5 (100%) | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| Chlortetrazyklin | Agardiffusion | n = 48 R = 21 (43,75%) | China | Enten | Zheng et al., 2012 |
| Oxytetrazyklin | Agardiffusion | n = 24 R = 14 (58%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | | n = 5 R = 5 (100%) | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| | | n = 102 (2005) S = 99 (97%) | Deutsch- land | Puten | Behr, 2007 |
| | | n = 80 (2007) S = 70 (88%) | Deutsch- land | Puten | Behr, 2007 |
| | Agardilution | n = 20 MHK ₅₀ = 12,5 MHK ₉₀ = >50 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |
| Oxacillin | Agardilution | n = 54 R = 54 (100%) | China | Enten | Zhong et al., 2009b |
| Sulfonamide | | | | | |
| Trimethoprim/ Sulfmethoxazol (Co-trimoxazol) | Agardiffusion MH-Agar mit Schafblut | n = 224 R = 177 (79,2%) I = 4 (1,8%) S = 43 (19,0%) | China | Enten | Zhong et al., 2009a |
| | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = 2 MHK ₉₀ = 8 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| | Agardiffusion | n = 60 S = 42 (70%) | USA | Enten | Bangun et al., 1981 |
| | | n = 5 R = 5 (100%) | Indien | Enten | Priya et al., 2008 |
| Sulfadimidin | Agardilution | n = 103 MHK ₅₀ = ≥ 128 MHK ₉₀ = ≥ 128 | China | Enten | Sun et al., 2012 |
| Trimethoprim | Agardiffusion | n = 24 R = 21 (87%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |

Fortsetzung Tab. 3

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-------------------------------|---------------|--|----------|-----------------|-------------------------------|
| Lincosamide | | | | | |
| Lincomycin | Agardilution | n = 50 MHK ₅₀ = 128 MHK ₉₀ = 256 | Taiwan | Enten | Chang et al., 2003 |
| Polypeptid-Antibiotika | | | | | |
| Colistin | Agardiffusion | n = 24 R = 17 (73%) | Taiwan | Enten/ Gänse | Yu et al., 2008 |
| | Agardilution | n = 20 MHK ₅₀ = >50 MHK ₉₀ = >50 | Thailand | Enten | Pathanasophon et al., 1993 |

Tab. 5: Übersicht über wichtige Arbeiten zur Empfindlichkeit von *O. rhinotracheale* gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|---------------------------------|-----------------------------|--|-----------------|---|---------------------------|
| β-Lactame/Cephalosporine | | | | | |
| Amoxicillin | Agardiffusion | n=30 S=30 (100%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=3 I=2 (66,7%) R=1 (33,3%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=47 S= 45 (95,9%) R= 2 (4,1%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |
| | | n=40 S= 39 (97,5%) R= 1 (2,5%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | n=15 R= 10 (66,6%) S= 5 (33,4%) | Jorda- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | Mikrodilution mit MHB II | n=30 (Farm- Geflügel) MHK ₅₀ = 4 MHK ₉₀ = 16 | Ungarn | Pute, Huhn, Gans | Szabó et al., 2015 |
| | | n=6 (Wildvögel) MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 0,5 | Ungarn | Hühner- habicht, Rebhuhn, Sperber, Tauben | Szabó et al., 2015 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|---------------------------------|---|--|------------------|--|--------------------------|
| β-Lactame/Cephalosporine | | | | | |
| Amoxicillin | Mikrodilution mit BHI + Pferdeserum 100 µl/Well | n=19 MHK ₅₀ = 23 MHK ₉₀ = 128 | Mexico | Pute, Broiler, Legehennen | Soriano et al., 2003 |
| | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 4 | Deutsch- land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |
| Amoxicillin + Clavulansäure | E-Test | n=12 MHK ₅₀ <0,25 MHK ₉₀ <0,25 | Nieder- lande | Broiler | van Veen et al., 2001 |
| Ampicillin | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =2 MHK ₉₀ =4 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | | n=45 MHK ₅₀ =4 MHK ₉₀ =8 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | Agardiffusion | n=30 S=30 (100%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=124 R= 0-44,4% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=30 R= 21 (70%) S= 7 (30%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| | | n=105 S= 18 (17,1%) I= 62 (59,1%) R= 25 (23,8%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=47 S= 46 (97,6) R=1 (2,4%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|---------------------------------|---|--|------------------|--|--------------------------|
| β-Lactame/Cephalosporine | | | | | |
| Ampicillin | Agardiffusion | n=40 S= 39 (97,5%) R= 1 (2,5%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | 1995 n=94 S= 88 (94%) 1996 n=150 S= 141 (94%) 1997 n=111 S= 104 (94%) | Israel | Pute | Bock et al., 1998 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =4 MHK ₉₀ =64 | Deutsch land | Mastpute | Waldow, 2009 |
| Penicillin | Makrodilution (Pepton- wasser) | n= 12 MHK ₅₀ =8 MHK ₉₀ =16 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =0,5 MHK ₉₀ =1 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | Agardiffusion | n=30 S=28 (93,33%) R=2 (6,66%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al, 2012 |
| | | n=124 R= 12,5-43,5% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=105 S= 8 (17,6%) I= 62 (59,1%) R= 35 (33,3%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=40 S= 36 (90%) R= 4 (10%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | E-Test | n=12 MHK ₅₀ =0,75 MHK ₉₀ =3 | Nieder- lande | Broiler | van Veen et al., 2001 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|---------------------------------|---|---|------------------|--|--------------------------|
| β-Lactame/Cephalosporine | | | | | |
| Penicillin | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 2 | Deutsch- land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =4 MHK ₉₀ =64 | Deutsch- land | Mastpute | Waldow, 2009 |
| Ceftiofur | Agardiffusion | n=124 R= 0-74,1% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=40 S= 38 (95%) R= 2 (5%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | 1996 n=150 S= 147 (98%) 1997 n=111 S= 110 (99%) | Israel | Pute | Bock et al., 1998 |
| | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =2 MHK ₉₀ =4 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | | n=45 MHK ₅₀ =8 MHK ₉₀ =16 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | | n=12 MHK ₅₀ =4 MHK ₉₀ =8 | Nieder- lande | Broiler | van Veen et al., 2001 |
| | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 8 | Deutsch- land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =8 MHK ₉₀ =16 | Deutsch- land | Mastpute | Waldow, 2009 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---------------------------------|---|-----------------|--|---------------------------|
| Aminoglycoside | | | | | |
| Spectinomycin | Agardiffusion | n=124 R= 0-80% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =64 MHK ₉₀ =64 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| Streptomycin | Agardiffusion | n=30 R=30 (100%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=18 I= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| Neomycin | Agardiffusion | n=30 S=1 (3,33%) R=29 (96,66%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=47 S=1 (1,56%) R= 46 (98,4%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |
| | | n=105 R= 105 (100%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=70 S=34 (48,6%) R=36 (51,4%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| | | n=15 R= 12 (86,6%) S= 2 (13,4%) | Jorda- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | Makrodilution (Peptonwasser) | n= 12 MHK ₅₀ =32 MHK ₉₀ =64 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| Gentamicin | Agardiffusion | n=30 R=30 (100%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=124 R= 62,5-100% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=105 I= 1 (1%) R= 104 (99%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=47 S=3 (6,25%) R= 44 (93,7%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|--|--|---|---------------------------------|--|---------------------------|
| Aminoglycoside | | | | | |
| Gentamicin | Agardiffusion | n=18 R= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=40 S= 17 (42,5%) R= 23 (57,5%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | n=15 R= 14 (93,3%) S= 1 (6,3%) | Jordanien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | E-Test | n=12 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Niederlande | Broiler | Van Veen et al., 2001 |
| | Makrodilution (Peptonwasser) | n= 12 MHK ₅₀ =32 MHK ₉₀ =64 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| Mikrodilution mit BHI + Pferdeserum 100 µl/Well | n=19 MHK ₅₀ >128 MHK ₉₀ >128 | Mexico | Pute, Broiler, Legehennen | Soriano et al., 2003 | |
| Fenicole | | | | | |
| Florfenicol | Agardiffusion | n=3 S=2 (66,7%) I= 1 (33,3%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| Chloramphenicol | Agardiffusion | n=30 S= 20 (100%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| | | n=105 S=102 (97,1%) I= 2 (1,9%) R= 1 (1%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=70 S=46 (66%) R=24 (34%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| Fluorchinolone | | | | | |
| Enrofloxacin | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =0,5 MHK ₉₀ =2 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---|--|-----------------|--------------------------------|---------------------------|
| Fluorchinolone | | | | | |
| Enrofloxacin | Agardilution | n=45 MHK ₅₀ =2 MHK ₉₀ =2 | Belgien | Broiler | Devriese et al. 2001 |
| | Agardiffusion | n=30 S=29 (96,66%) R= 1 (3,33%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehenne | Erganis et al., 2012 |
| | | n=3 R=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=124 R= 0-59,3% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=105 S= 5 (4,8%) I= 39 (37,1%) R= 61 (58,1%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehenne | Murthy et al., 2008 |
| | | n=47 S= 46 (98%) R= 1 (2%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 2008 |
| | | n=70 S=6 (8,6%) R=64 (91,4%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| | | n=40 S= 22 (55%) R= 18 (45%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | n=15 S= 15 (100%) | Jorda- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | | 1995 n=94 S= 77 (82%) 1996 n=150 S= 135 (90%) 1997 n=111 S= 100 (90%) | Israel | Pute | Bock et al., 1998 |
| | Mikrodilution mit BHI + Pferdeserum 100 µl/Well | n=19 MHK ₅₀ = 64 MHK ₉₀ = >128 | Mexico | Pute, Broiler, Legehenne | Soriano et al., 2003 |
| | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 4 MHK ₉₀ = 8 | Deutsch land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---|---|-----------------|---------------------------------|--------------------------|
| Fluorchinolone | | | | | |
| Enrofloxacin | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =2 MHK ₉₀ =>8 | Deutsch land | Mastpute | Waldow, 2009 |
| Ciprofloxacin | Agardiffusion | n=30 S=30 (100%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=3 R=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=30 R= 2 (6,6%) S= 28 (93,4%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| Danofloxacin | Agardiffusion | n=30 S= 30 (100%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| Norfloxacin | Agardiffusion | n=30 R= 12 (40%) S= 18 (60%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| | | n=18 I= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=70 S=5 (7%) R=65 (93%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| | | 1995 n=94 S= 54 (57%) 1996 n=150 S= 128 (85%) 1997 n=111 S= 97 (87%) | Israel | Pute | Bock et al., 1998 |
| Flumequin | Agardiffusion | n=3 R=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=105 S= 6 (5,7%) I= 49 (46,7%) R= 50 (47,6%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=47 S=43 (91,5%) R= 4 (8,5%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---------------|--|------------------|--|---------------------------|
| Fluorchinolone | | | | | |
| Flumequin | Agardiffusion | n=70 S=36 (51%) R=34 (49%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| | | n=15 S= 15 (100%) | Jord- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| Flumequin | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =8 MHK ₉₀ =8 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | | n=45 MHK ₅₀ =32 MHK ₉₀ ≥64 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| Makrolide | | | | | |
| Erythromycin | Agardiffusion | N=30 S=27 (90%) R=3 (10%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=3 R=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=124 R= 0-2,2% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=30 R= 14 (46,6%) S= 18 (53,4%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| | | n=105 S= 4 (3,8%) I= 18 (17,1%) R= 83 (79,1%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=40 S= 10 (25%) R= 30 (75%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | n=15 R= 14 (93,3%) S= 1 (6,3%) | Jord- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | E-Test | n=12 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Nieder- lande | Broiler | van Veen et al., 2001 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---|--|--|---|--------------------------|
| Erythromycin | Makrodilution (Peptonwasser) | n= 12 MHK ₅₀ =1 MHK ₉₀ =8 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =>32 MHK ₉₀ =>32 | Deutsch land | Mastpute | Waldow, 2009 |
| | Mikrodilution mit MHB II | n=30 (Farm- Geflügel) MHK ₅₀ = 8 MHK ₉₀ = 32 | Ungarn | Pute, Huhn, Gans | Szabó et al., 2015 |
| | | n=6 (Wildvögel) MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 0,5 | Ungarn | Hühner- habicht, Rebhuhn, Sperber, Tauben | Szabó et al., 2015 |
| Tylosin | Agardiffusion | n=3 I=2 (66,7%) R=1 (33,3%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=105 S= 38 (36,2%) I= 51 (48,6%) R= 16 (15,2%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =2 MHK ₉₀ =4 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | | n=45 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | | n=12 MHK ₅₀ =4 MHK ₉₀ =8 | Nieder- lande | Broiler | van Veen et al., 2001 |
| | Spiramycin | Agardilution | n=45 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Belgien | Broiler |
| Agardiffusion | | N=30 S=4 (13,33%) R=26 (86,33%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=47 S=9 (18,8) R= 38 (81,2%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---|---|------------------|----------------------------|---------------------------|
| Tilmicosin | Agardilution | n=45 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | | n=12 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Nieder- lande | Broiler | van Veen et al., 2001 |
| Tilmicosin | Makrodilution (Peptonwasser) | n= 12 MHK ₅₀ =1 MHK ₉₀ =4 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 32 MHK ₉₀ = 32 | Deutsch land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |
| Tetrazykline | | | | | |
| Tetrazyklin | Agardiffusion | n=3 R=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=124 R= 13-42% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=30 R= 12 (40%) S= 18 (60%) | Iran | Pute, Wachtel, Taube | Mirzaie et al., 2011 |
| | | n=105 S=4 (3,8%) I=41 (39,1%) R=60 (57,1%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=47 S= 33 (69,4%) R= 14 (30,6%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |
| | | n=70 S= 22 (31%) R= 48 (69%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| | | n=40 S= 14 (35%) R= 26 (65%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | n=15 S= 15 (100%) | Jorda- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|----------------------|---|--|------------------|--|--------------------------|
| Tetrazyklin | Agardiffusion | 1995 n=94 S= 48 (51%) 1996 n=150 S= 80 (53%) 1997 n=111 S= 59 (53%) | Israel | Pute | Bock et al., 1998 |
| | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 16 MHK ₉₀ = 16 | Deutsch- land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =>16 MHK ₉₀ =>16 | Deutsch- land | Mastpute | Waldow, 2009 |
| Doxycyclin | Agardiffusion | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=70 S=70 (100%) | Pakistan | Broiler | Siddique et al., 2008 |
| | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ =8 MHK ₉₀ =16 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | | n=45 MHK ₅₀ =16 MHK ₉₀ =16 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | Makrodilution (Peptonwasser) | n= 12 MHK ₅₀ =0,5 MHK ₉₀ =0,5 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| | Mikrodilution mit MHB II | n=30 (Farm- Geflügel) MHK ₅₀ = 16 MHK ₉₀ = 32 | Ungarn | Pute, Huhn, Gans | Szabó et al., 2015 |
| | | n=6 (Wildvögel) MHK ₅₀ = 0,12 MHK ₉₀ = 0,5 | Ungarn | Habicht, Rebhuhn, Sperber, Tauben | Szabó et al., 2015 |
| Oxytetrazyklin | Agardiffusion | n=30 S=29 (96,66%) R= 1 (3,33%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|---------------------------------|---|--|------------------|---------------------------------|---------------------------|
| Oxytetracyklin | Agardiffusion | n=3 R=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=105 S=10 (9,5%) I=32 (30,5%) R=63 (60%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 S= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=40 S= 34 (85%) R= 6 (15%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | Makrodilution (Peptonwasser) | n= 12 MHK ₅₀ =0,5 MHK ₉₀ =1 | Türkei | Broiler | Ak and Turan, 2001 |
| | Mikrodilution mit BHI + Pferdeserum 100 µl/Well | n=19 MHK ₅₀ = 32 MHK ₉₀ = 64 | Mexico | Pute, Broiler, Legehennen | Soriano et al., 2003 |
| Sulfonamide | | | | | |
| Sulfmethoxazol +Trimethoprim | Agardiffusion | n=30 R= 30 (100%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=124 R= 75-100% (1996-2002) | USA | Pute | Malik et al., 2003 |
| | | n=105 R=105 (100%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=18 R= 18 (100%) | Indien | Legehennen | Murthy et al., 2008 |
| | | n=47 R= 47 (100%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |
| | | n=40 S= 5 (12,5%) R= 35 (87,5%) | Taiwan | Huhn, Taube | Tsai and Huang, 2006 |
| | | n=15 R= 15 (100%) | Jorda- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | Mikrodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ =4/76 MHK ₉₀ =8/152 | Deutsch- land | Mastpute | Waldow, 2009 |

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-----------------------|---|--|-----------------|--|--------------------------|
| Lincosamide | | | | | |
| Lincomycin | Agardilution | n=18 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Belgien | Huhn, Pute, Perlhuhn, Rebhuhn, Krähe | Devriese et al., 1995 |
| | | n=45 MHK ₅₀ ≥64 MHK ₉₀ ≥64 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | Agardiffusion | N=30 S=27 (90%) R=3 (10%) | Türkei | Pute, Broiler, Legehennen | Erganis et al., 2012 |
| | | n=105 S=2 (1,9%) R=103 (98,1%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ ≥8 MHK ₉₀ ≥8 | Deutsch land | Mastpute | Waldow, 2009 |
| Pleuromutiline | | | | | |
| Tiamulin | Agardiffusion | n=3 S=3 (100%) | Iran | Broiler | Asadpour et al., 2011 |
| | | n=105 S= 105 (100%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | Agardilution | n=45 MHK ₅₀ ≤0,12 MHK ₉₀ =0,25 | Belgien | Broiler | Devriese et al., 2001 |
| | Mikrodilution mit Pasteu- rellenbouillon 100 µl/Well | n=121 MHK ₅₀ = 0,5 MHK ₉₀ = 32 | Deutsch land | Pute, Huhn, Fasan | Popp, 2003 |
| | Mirkodilution mit MHB II + 3% lys. Pferdeblut 100 µl/Well | n= 88 MHK ₅₀ ≤0,5 MHK ₉₀ =2 | Deutsch land | Mastpute | Waldow, 2009 |

Anhang

Fortsetzung Tab. 5

| Wirkstoff/ Klasse | Testverfahren | Anzahl Isolate (n) Ergebnis | Land | Wirt | Referenz |
|-------------------------------|---------------|--|-----------------|---------------------------|---------------------------|
| Epoxyd-Antibiotika | | | | | |
| Fosfomycin | Mikrodilution | N=25 S=10 (40%) R=15 (60%) | Afrika | k.A. | Filtzgerald et al., 1998 |
| Polypeptid-Antibiotika | | | | | |
| Colistin | Agardiffusion | n=105 R=105 (100%) | Iran | Huhn, Pute, Broiler | Banani et al., 2004 |
| | | n=47 R= 47 (100%) | Frank- reich | Pute | Dudouyt et al., 1995 |
| | | n=15 R= 14 (93,3%) S= 1 (6,3%) | Jorda- nien | Broiler | El-Sukhon et al., 2002 |
| | | 1995 n=94 S= 2 (2%) 1996 n=150 S= 42 (28%) 1997 n=111 S= 25,5 (23%) | Israel | Pute | Bock et al., 1998 |

Tabelle 6: Auflistung der Ergebnisse der Identifizierung und Typisierung aller *R. anatipestifer*-Feldisolate (n=100)

| Isolat (GB-Nr.) | Herkunft | Cytochrom- oxidaseaktivität nachgewiesen? | Identifizierungs- profil (API20NE) | Serotyp |
|--------------------|-------------|---|--|---------|
| 772/05 (1) | Deutschland | Ja | 0010004 | NT |
| 772/05 (2) | Deutschland | Ja | 0010004 | NT |
| 772/05 (3) | Deutschland | Ja | 0010004 | NT |
| 772/05 (4) | Deutschland | Ja | 0010004 | NT |
| 84/07 (1) | Deutschland | Ja | 0010004 | 1 |
| 84/07 (2) | Deutschland | Ja | 0210004 | NT |
| 120/07 (1) | Deutschland | Ja | 0010004 | NT |
| 120/07 (2) | Deutschland | Ja | 0010004 | 6 |
| 120/07 (3) | Deutschland | Ja | 0010004 | 16 |
| 120/07 (4) | Deutschland | Ja | 0010004 | 2 |
| 120/07 (5) | Deutschland | Ja | 0210004 | 4 |
| 120/07 (6) | Deutschland | Ja | 0210004 | 1 |
| 871/07 (5) | Deutschland | Ja | *0210004 | NT |
| 871/07 (6) | Deutschland | Ja | *0210004 | NT |
| 1165/07 (2) | Deutschland | Ja | *0010004 | A |
| 1165/07 (3) | Deutschland | Ja | *0010004 | A |
| 1165/07 (8) | Deutschland | Ja | *0010004 | A |
| 1165/07 (9L) | Deutschland | Ja | *0010004 | A |
| 1165/07 (9H) | Deutschland | Ja | *0010004 | A |
| 1326/08 (1) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 1326/08 (2) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 1326/08 (3) | Deutschland | Ja | *0200004 | A |
| 455/10 (2) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (1) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (2) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (3) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (4) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (5) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (6) | Unbekannt | Ja | *0000004 | A |
| 708/12 (7) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (8) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (9) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (10) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (11) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (12) | Unbekannt | Ja | *0000004 | A |
| 708/12 (13) | Unbekannt | Ja | *0000004 | A |
| 708/12 (14) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (15) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (16) | Unbekannt | Ja | *0000004 | A |
| 708/12 (17) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (18) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (19) | Unbekannt | Ja | *0220004 | A |
| 708/12 (20) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |

Fortsetzung Tab. 6

| Isolat (GB-Nr.) | Herkunft | Cytochrom- oxidaseaktivität nachgewiesen? | Identifizierungspro- fil (API20NE) | Serotyp |
|--------------------|---------------|---|--|---------|
| 708/12 (21) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (22) | Unbekannt | Ja | *0010004 | A |
| 708/12 (23) | Unbekannt | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (24) | Unbekannt | Ja | *0000004 | A |
| 708/12 (25) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (26) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (27) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (28) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (29) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 708/12 (30) | Deutschland | Ja | *0210004 | A |
| 200/14 (1) | Thailand | Ja | *0010004 | 15 |
| 200/14 (2) | Bayern | Ja | *0000004 | 3 |
| 200/14 (3) | England | Ja | *0210004 | 17 |
| 200/14 (4) | Bayern | Ja | *0210004 | *17/7/4 |
| 200/14 (5) | Brandenburg | Ja | *0210004 | *17/7/4 |
| 200/14 (6) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (7) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | G1678K |
| 200/14 (8) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (9) | Mecklenburg | Ja | *0010004 | 7 |
| 200/14 (10) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 6 |
| 200/14 (11) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (12) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (13) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (14) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (15) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (16) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (17) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (18) | Niedersachsen | Ja | *0000004 | 1 |
| 200/14 (19) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (20) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (21) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (22) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | *17/7 |
| 200/14 (23) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (24) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (25) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (26) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (27) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 10 |
| 200/14 (28) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 12 |
| 200/14 (29) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |
| 200/14 (30) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (31) | Mecklenburg | Ja | *0010004 | Th67/13 |
| 200/14 (32) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (33) | Niedersachsen | Ja | *0010004 | 1 |

Fortsetzung Tab. 6

| Isolat (GB-Nr.) | Herkunft | Cytochrom- oxidaseaktivität nachgewiesen? | Identifizierungs- profil (API20NE) | Serotyp |
|--------------------|-------------------------|---|--|---------|
| 200/14 (34) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (35) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | Th67 |
| 200/14 (36) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (37) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (38) | Niederlande | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (39) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (40) | Sachsen | Ja | *0010004 | 7 |
| 200/14 (41) | Brandenburg | Ja | *0210004 | 1 |
| 200/14 (42) | Niedersachsen | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (43) | Brandenburg | Ja | *0020004 | 428 |
| 200/14 (44) | Sachsen- Anhalt | Ja | *0000004 | 6 |
| 200/14 (45) | Niedersachsen | Ja | *0000004 | 6 |
| 200/14 (46) | Brandenburg | Ja | *0210004 | 18 |
| 200/14 (47) | Niederlande | Ja | *0000004 | 1 |
| 200/14 (48) | Tschechien | Ja | *0210004 | *17/7 |
| 200/14 (49) | Nordrhein- Westfalen | Ja | *0000004 | 1 |
| 200/14 (50) | Frankreich | Ja | *0200004 | *6/7 |
| 200/14 (51) | Brandenburg | Ja | *0210004 | 7 |
| 200/14 (52) | Mecklenburg | Ja | *0210004 | 13 |
| 200/14 (53) | Brandenburg | Ja | *0000004 | 1 |
| 200/14 (54) | Brandenburg | Ja | *0210004 | *17/7 |
| 200/14 (56) | Brandenburg | Ja | *0000004 | 1 |

Tab.7: Auflistung der Ergebnisse der Identifizierung und Typisierung aller *O. rhinotracheale*-Feldisolat (n=100)

| Isolat (GB-Nr.) | Herkunft | Cytochrom- oxidaseaktivität nachgewiesen? | Identifizierungspro- fil (API20NE) | Seroty- p |
|--------------------|-------------|---|--|--------------|
| GB 398/09 | Deutschland | Ja | 0220004 | I |
| GB 462/09 | Deutschland | Ja | 0220004 | H |
| GB 566/09 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (2) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (3) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (4) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (5) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (6) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (7) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 566/09 (8) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 73/10 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 73/10 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 73/10 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |

Fortsetzung Tab. 7

| Isolat (GB-Nr.) | Herkunft | Cytochrom- oxidaseaktivität nachgewiesen? | Identifizierungspro- fil (API20NE) | Seroty- p |
|-----------------------|-------------|---|--|--------------|
| GB 73/10 (4) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 73/10 (5) | Deutschland | Ja | 0020000 | A |
| GB 73/10 (6) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 73/10 (7) | Deutschland | Nein | 0020000 | A |
| GB 73/10 (8) | Deutschland | Nein | 0220000 | A |
| GB 94/10 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | B |
| GB 94/10 (2) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 137/10 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 240/10 | Deutschland | Ja | 0020004 | NT |
| GB 316/10 | Deutschland | Ja | 0220004 | NT |
| GB 404/10 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | NT |
| GB 404/10 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | I |
| GB 455/10 | Deutschland | Nein | 0020000 | E |
| GB 488/10 | Deutschland | Ja | 0220004 | B |
| GB 610/10 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 610/10 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 610/10 (3) | Deutschland | Nein | 0020000 | E |
| GB 620/10 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 638/10 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 679/10 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 1736/10 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2134/10 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 2134/10 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 2134/10 (4) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 2525/10, 924-2 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | H |
| GB 2525/10, 924-6 (2) | Deutschland | Ja | 0220004 | NT |
| GB 2525/10, 925-1 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | I |
| GB 2525/10, 925-2 (4) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 56/11 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 57/11 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 57/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 105/11 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 105/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 105/11 (3) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 105/11 (4) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 105/11 (7) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 105/11 (8) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 105/11 (9) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 105/11 (10) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 105/11 (11) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 105/11 (12) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 105/11 (13) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 350/11 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |

Anhang

Fortsetzung Tab. 7

| Isolat (GB-Nr.) | Herkunft | Cytochrom- oxidaseaktivität nachgewiesen? | Identifizierungspro- fil (API20NE) | Seroty- p |
|--------------------|-------------|---|--|--------------|
| GB 350/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 351/11 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 351/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 351/11 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 351/11 (4) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 604/11 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | i |
| GB 1044/11 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 1044/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 1044/11 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 1044/11 (4) | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 1573/11 (11) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 1573/11 (12) | Deutschland | Ja | 0020004 | I |
| GB 1573/11 (13) | Deutschland | Nein | 0020000 | C |
| GB 1573/11 (15) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 1573/11 (16) | Deutschland | Ja | 0020004 | NT |
| GB 1573/11 (17) | Deutschland | Ja | 0220000 | C |
| GB 1573/11 (18) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2151/11 (1) | Deutschland | Nein | 0020000 | B |
| GB 2151/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2151/11 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2151/11 (4) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2151/11 (5) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2171/11 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2175/11 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2184/11 | Deutschland | Ja | 0020004 | E |
| GB 2221/11 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2221/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2221/11 (3) | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2228/11 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2310/11 | Deutschland | Ja | 0020004 | A |
| GB 2384/11 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2456/11 (1) | Deutschland | Ja | 0020004 | B |
| GB 2456/11 (2) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2492/11 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2517/11 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2543/11 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2548/11 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2562/11 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 2562/11 (2) | Deutschland | Ja | 0020004 | B |
| GB 2592/11 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 20/12 | Deutschland | Ja | 0220004 | A |
| GB 355/12 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | B |
| GB 355/12 (2) | Deutschland | Ja | 0220004 | B |
| GB 356/12 (1) | Deutschland | Ja | 0220004 | A |

Tab. 20: Darstellung des Testbereiches (geringste bis höchste getestete Antibiotikakonzentration), sowie der Modalwerte (MHK_{Modal}), der MHK₅₀ und MHK₉₀ von 108 *R. anatipestifer*-Isolaten

| AB-Klasse | Wirkstoff | Testbereich | MHK _{Modal} | MHK ₅₀ | MHK ₉₀ |
|-----------------------|----------------------------------|--------------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Aminoglycoside | Gentamicin | 0,12 - 256 | 32 | 32 | 64 |
| | Neomycin | ≤ 0,03 - 64 | 64 | 32 | 64 |
| | Streptomycin | 0,25 - 256 | 32 | 32 | 64 |
| Amphenicole | Florfenicol | 0,12 - 256 | 1 | 1 | 1 |
| | Chloramphenicol | 0,5 - 256 | 4 | 4 | 64 |
| Carbapeneme | Imipenem | ≤ 0,015 - 32 | ≤ 0,06 | 0,12 | 0,5 |
| Cephalosporine | Cefquinome | ≤ 0,015 - 32 | ≤ 0,015 | ≤ 0,03 | 2 |
| | Ceftiofur | ≤ 0,03 - 64 | ≤ 0,03 | ≤ 0,03 | 0,12 |
| | Cefotaxim | ≤ 0,015 - 32 | ≤ 0,015 | ≤ 0,03 | 0,5 |
| | Cefoperazone | ≤ 0,06 - 32 | ≤ 0,06 | 0,25 | 8 |
| | Cephalothin | ≤ 0,06 - 128 | 0,25 | 0,5 | 8 |
| Fluorchinolone | Enrofloxacin | ≤ 0,015 - 16 | 2 | 2 | 4 |
| | Marbofloxacin | ≤ 0,015 - 16 | 1 | 1 | 2 |
| | Ciprofloxacin | ≤ 0,015 - 16 | 2 | 2 | 4 |
| | Nalidixinsäure | ≤ 0,06 - 128 | 128 | 128 | >128 |
| Makrolide | Spiramycin | ≤ 0,06 - 128 | 128 | 128 | >128 |
| | Tulathromycin | ≤ 0,06 - 32 | >32 | >32 | >32 |
| | Tilmycosin | ≤ 0,06 - 128 | >128 | 8 | >128 |
| Penicilline | Penicillin | ≤ 0,015 - 32 | 16 | 4 | 16 |
| | Ampicillin | ≤ 0,03 - 64 | 32 | 4 | 32 |
| | Amoxicillin/ Clavulansäure | ≤ 0,015 - 64 | 2 | 1 | 2 |
| Pleuromutilin | Tiamulin | ≤ 0,03 - 64 | ≤ 0,06 | ≤ 0,06 | 0,12 |
| Polymyxin | Colistin | ≤ 0,03 - 16 | >16 | >16 | >16 |
| Sulfonamide | Trimethoprim/ Sulfmethoxazole | ≤ 0,015 - 32 | 0,5 | 0,5 | 4 |
| Tetrazykline | Tetrazyklin | 0,12 - 256 | 16 | 8 | 16 |
| | Doxyzyklin | ≤ 0,06 - 128 | 0,5 | 1 | 4 |

Tab. 22: Ergebnisse von *R. anatipestifer* in der Bouillon-Mikrodilution aufgliedert nach Wirkstoffen

| Antimikrobieller Wirkstoff | Anzahl der Isolate mit MHK [mg/l] ^a : | | | | | | | | | | | | | | | [n] | |
|--|--|-------|-------|-------|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| | ≤0.015 | ≤0.03 | ≤0.06 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | | 512 |
| β-Lactame/Cephalosporine | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Amoxicillin/Clavulansäure (2:1) ^b | - | 5 | 3 | 2 | 5 | 12 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | | | | 108 |
| Ampicillin | | 5 | 4 | 3 | 4 | 4 | 18 | 5 | 13 | 8 | 18 | 22 | 3 | | | | 108 |
| Penicillin | 5 | 2 | 2 | 3 | 5 | 3 | 22 | 7 | 11 | 16 | 24 | 8 | | | | | 108 |
| Cefalothin | | | 3 | 6 | 17 | 6 | 4 | 3 | 10 | 5 | 1 | - | - | - | | | 55 |
| Cefoperazon | | | 29 | 12 | 15 | 7 | 1 | 5 | 5 | 24 | 8 | 2 | | | | | 108 |
| Cefotaxim | 46 | 14 | 3 | 6 | 27 | 9 | 2 | 1 | - | - | - | - | - | | | | 108 |
| Cefquinom | 47 | 9 | 6 | 4 | 3 | 3 | 15 | 17 | 3 | 1 | - | - | - | | | | 108 |
| Ceftiofur | | 60 | 27 | 16 | 1 | 2 | 2 | - | - | - | - | - | - | | | | 108 |
| Aminoglycoside | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Gentamicin | | | | - | - | 1 | 1 | 1 | 8 | 17 | 19 | 34 | 24 | 3 | - | | 108 |
| Neomycin | | - | - | - | - | - | - | 4 | 3 | 16 | 20 | 23 | 34 | 8 | | | 108 |
| Streptomycin | | | | | - | - | - | - | 1 | 16 | 12 | 37 | 34 | 6 | 2 | | 108 |
| Carbapenem | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Imipenem | 5 | 10 | 36 | 15 | 16 | 23 | 2 | 1 | - | - | - | - | | | | | 108 |
| Fenicole | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Chloramphenicol | | | | | 1 | 1 | - | 7 | 18 | 1 | 6 | 12 | 6 | 1 | - | | 53 |
| Florfenicol | | | 1 | - | 4 | 37 | 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | | 108 |

Fortsetzung Tab. 22

| Antimikrobieller Wirkstoff | Anzahl der Isolate mit MHK [mg/l] ^a : | | | | | | | | | | | | | | | [n] | |
|---|--|-------|-------|-------|------|-----|----|----|----|----|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|
| | ≤0.015 | ≤0.03 | ≤0.06 | 0.125 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | | 512 |
| Fluorchinolone | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Enrofloxacin | 25 | 9 | 1 | - | - | 1 | 6 | 43 | 19 | 3 | - | 1 | | | | | 108 |
| Ciprofloxacin | 27 | 7 | 1 | - | - | 1 | 6 | 42 | 20 | 3 | 1 | | | | | | 108 |
| Marbofloxacin | 7 | 26 | 2 | - | - | 5 | 43 | 17 | 6 | - | 1 | 1 | | | | | 108 |
| Nalidixinsäure | | | - | - | - | - | 1 | 1 | 27 | 4 | 3 | 5 | 12 | 38 | 17 | | 108 |
| Makrolide | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tilmicosin | | | 1 | 10 | 12 | 3 | 4 | 9 | 11 | 5 | 3 | 7 | 8 | 1 | 34 | | 108 |
| Pleuromutilin | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tiamulin | | 5 | 49 | 44 | 2 | - | 1 | - | - | 1 | 4 | 1 | 1 | | | | 108 |
| Polymyxyn | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Colistin | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 108 | | | | | 108 |
| Tetrazykline | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Doxycyclin | | | 2 | 3 | 2 | 31 | 29 | 27 | 12 | 2 | - | - | - | - | | | 108 |
| Tetrazyklin | | | | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 25 | 34 | 38 | 2 | - | - | - | | 108 |
| Sulfonamide | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Trimethoprim/Sulfmethoxazol (1:19) ^c | - | 2 | 8 | 16 | 18 | 22 | 9 | 19 | 13 | - | 1 | - | | | | | 108 |

Die grau hinterlegten Zellen kennzeichnen die nicht getesteten Bereiche.

^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

Tab. 23: Ergebnisse von *R. anatipestifer* in der Bouillon-Mikrodilution aufgliedert nach Wirtsspezies

| | | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--|------|------|------|------|-----|---|---|---|----|----|----|----|----------|-----|
| Antimikrobieller Wirkstoff | | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| Aminoglycoside | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GEN | Huhn | | | | - | - | - | - | - | 1 | 4 | 2 | 3 | - | 1 | - |
| | Pute | | | | - | - | - | - | - | 2 | 8 | 8 | 19 | 19 | 1 | - |
| | Ente | | | | - | - | - | 1 | - | 3 | 5 | 9 | 9 | 3 | 1 | - |
| | Unbek. | | | | - | - | 1 | - | 1 | 2 | - | 1 | 2 | 2 | - | - |
| | Gesamt | | | | - | - | 1 | 1 | 1 | 8 | 17 | 20 | 33 | 24 | 3 | - |
| NEO | Huhn | | - | - | - | - | - | - | - | - | 4 | 3 | 2 | 1 | 1 | |
| | Pute | | - | - | - | - | - | - | - | - | 7 | 9 | 12 | 25 | 4 | |
| | Ente | | - | - | - | - | - | - | 2 | 2 | 4 | 8 | 8 | 6 | 1 | |
| | Unbek. | | - | - | - | - | - | - | 3 | 1 | 1 | - | 1 | 1 | 2 | |
| | Gesamt | | - | - | - | - | - | - | 5 | 3 | 16 | 20 | 23 | 33 | 8 | |
| STR | Huhn | | | | | - | - | - | - | - | - | 2 | 3 | 4 | 1 | 1 |
| | Pute | | | | | - | - | - | - | - | 11 | 3 | 17 | 23 | 3 | - |
| | Ente | | | | | - | - | - | - | 2 | 3 | 5 | 12 | 6 | 2 | 1 |
| | Unbek. | | | | | - | - | - | - | - | 2 | 2 | 4 | 1 | - | - |
| | Gesamt | | | | | - | - | - | - | 2 | 16 | 12 | 36 | 34 | 6 | 2 |

Fortsetzung Tab. 23

| | | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|--------|--|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| Antimikrobieller Wirkstoff | | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| β-Lactame/Penicilline | | | | | | | | | | | | | | | | |
| AMP | Huhn | | - | - | 1 | 2 | - | 3 | 1 | - | 2 | - | 2 | - | | |
| | Pute | | - | 1 | - | - | - | 7 | 1 | 8 | 6 | 14 | 17 | 3 | | |
| | Ente | | 6 | 2 | 2 | 2 | 4 | 9 | 1 | 2 | - | 2 | 1 | - | | |
| | Unbek. | | - | 1 | - | - | - | - | 2 | 3 | - | 1 | 2 | - | | |
| | Gesamt | | 6 | 4 | 3 | 4 | 4 | 19 | 5 | 13 | 8 | 17 | 22 | 3 | | |
| AUG | Huhn | - | - | - | 2 | 3 | 1 | 1 | 3 | 1 | - | - | - | - | | |
| | Pute | - | - | 1 | - | 1 | 4 | 25 | 25 | 1 | - | - | - | - | | |
| | Ente | - | 6 | 3 | 2 | 5 | 12 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | | |
| | Unbek. | - | - | 1 | - | 4 | - | 1 | 3 | - | - | - | - | - | | |
| | Gesamt | - | 6 | 5 | 4 | 13 | 17 | 28 | 32 | 3 | - | - | - | - | | |
| PEN | Huhn | - | - | - | 1 | 2 | 1 | 3 | - | 2 | - | 2 | - | | | |
| | Pute | - | 1 | - | - | - | 1 | 7 | 2 | 7 | 13 | 19 | 7 | | | |
| | Ente | 6 | - | 2 | 2 | 2 | 2 | 12 | 1 | 1 | 2 | - | 1 | | | |
| | Unbek. | - | 1 | - | - | - | - | - | 4 | 1 | - | 3 | - | | | |
| | Gesamt | 6 | 2 | 2 | 3 | 4 | 4 | 22 | 7 | 11 | 15 | 24 | 8 | | | |
| Carbapeneme | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IMI | Huhn | - | 3 | 4 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | - | | | |
| | Pute | - | 3 | 13 | 6 | 15 | 19 | 1 | - | - | - | - | - | | | |
| | Ente | 6 | 3 | 16 | 5 | - | - | - | 1 | - | - | - | - | | | |
| | Unbek. | - | 1 | 3 | 2 | - | 3 | - | - | - | - | - | - | | | |
| | Gesamt | 6 | 10 | 36 | 14 | 16 | 23 | 2 | 1 | - | - | - | - | | | |

Fortsetzung Tab. 23

| Antimikrobieller Wirkstoff | | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| | | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 |
| Cephalosporine | | | | | | | | | | | | | | | |
| CEQ | Huhn | 5 | 3 | 2 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | | |
| | Pute | 20 | 2 | 1 | - | 1 | 1 | 14 | 14 | 3 | 1 | - | - | | |
| | Ente | 19 | 4 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | | |
| | Unbek. | 1 | 1 | - | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | - | - | - | - | | |
| | Gesamt | 45 | 10 | 5 | 4 | 3 | 3 | 16 | 18 | 3 | 1 | - | - | | |
| XNL | Huhn | | 8 | 2 | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | Pute | | 23 | 22 | 11 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | | |
| | Ente | | 24 | 2 | 2 | - | 2 | 1 | - | - | - | - | - | | |
| | Unbek. | | 5 | 3 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | Gesamt | | 60 | 29 | 14 | 1 | 2 | 2 | - | - | - | - | - | | |
| FOT | Huhn | 5 | 4 | - | - | 2 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | Pute | 20 | 2 | - | 5 | 23 | 6 | 1 | - | - | - | - | - | | |
| | Ente | 20 | 6 | 1 | - | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | - | | |
| | Unbek. | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | - | - | - | - | - | - | | |
| | Gesamt | 46 | 14 | 3 | 6 | 27 | 9 | 2 | 1 | - | - | - | - | | |
| FOP | Huhn | | | 5 | - | 3 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | - | | |
| | Pute | | | 14 | 2 | 5 | 1 | - | 2 | 5 | 23 | 4 | 1 | | |
| | Ente | | | 11 | 8 | 6 | 2 | - | 2 | - | - | 1 | 1 | | |
| | Unbek. | | | - | 2 | - | 3 | - | 1 | - | 1 | 2 | - | | |
| | Gesamt | | | 30 | 12 | 14 | 7 | - | 6 | 5 | 24 | 8 | 2 | | |
| CEP* 2 | Huhn | | | 1 | 1 | 2 | 4 | 1 | - | 1 | - | - | - | - | |
| | Pute | | | - | 1 | 5 | 1 | 1 | 2 | 9 | 3 | - | - | - | |
| | Ente | | | 2 | 5 | 10 | 1 | 2 | 1 | - | 2 | 1 | - | - | |
| | Unbek. | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Gesamt | | | 3 | 7 | 17 | 6 | 4 | 3 | 10 | 5 | 1 | - | - | |

Fortsetzung Tab. 23

| Antimikrobieller Wirkstoff | | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--|------|------|------|------|-----|----|----|----|---|----|----|----|-----|-----|
| | | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| Fluorchinolone | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CIP | Huhn | 8 | - | 1 | - | - | - | - | 2 | - | - | - | | | | |
| | Pute | 6 | 1 | - | - | - | - | - | 34 | 15 | 1 | - | | | | |
| | Ente | 13 | 5 | - | - | - | - | 2 | 2 | 6 | 2 | 1 | | | | |
| | Unbek. | - | 1 | - | - | - | 1 | 4 | 3 | - | - | - | | | | |
| | Gesamt | 27 | 7 | 1 | - | - | 1 | 6 | 41 | 21 | 3 | 1 | | | | |
| ENR O | Huhn | 7 | 2 | - | - | - | - | - | 2 | - | - | - | | | | |
| | Pute | 6 | 1 | 1 | - | - | - | - | 36 | 12 | 1 | - | | | | |
| | Ente | 12 | 5 | 1 | - | - | - | 1 | 1 | 8 | 2 | - | 1 | | | |
| | Unbek. | - | 1 | | - | - | 1 | 4 | 3 | - | - | - | | | | |
| | Gesamt | 25 | 9 | 2 | - | - | 1 | 5 | 42 | 20 | 3 | - | 1 | | | |
| MAR | Huhn | 2 | 7 | - | - | - | - | 2 | - | - | - | - | | | | |
| | Pute | 1 | 6 | - | - | - | - | 35 | 12 | 2 | - | 1 | | | | |
| | Ente | 4 | 12 | 2 | - | - | - | 2 | 5 | 5 | - | - | 1 | | | |
| | Unbek. | - | 1 | - | - | - | 5 | 3 | - | - | - | - | | | | |
| | Gesamt | 7 | 26 | 2 | - | - | 5 | 42 | 17 | 7 | - | 1 | 1 | | | |
| NAL | Huhn | | | - | - | - | - | - | - | 9 | - | - | - | - | 2 | |
| | Pute | | | - | - | - | - | - | | 6 | 1 | - | 3 | 8 | 24 | 15 |
| | Ente | | | - | - | - | - | - | 1 | 13 | 3 | 1 | 1 | 4 | 7 | 1 |
| | Unbek. | | | - | - | - | - | - | - | - | - | 2 | 1 | 1 | 5 | |
| | Gesamt | | | - | - | - | - | - | 1 | 28 | 4 | 3 | 5 | 13 | 38 | 16 |

Anhang

Fortsetzung Tab. 23

| Antimikrobieller Wirkstoff | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--|------|------|------|------|-----|----|----|---|----|----|----|----|-----------|-----|-----------|
| | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 | |
| Makrolide | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SPI* ¹ | Huhn | | | - | - | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Pute | | | - | - | - | - | - | - | - | 1 | 3 | - | 1 | 8 | 22 |
| | Ente | | | - | - | - | - | 3 | 2 | - | - | - | - | - | 1 | 1 |
| | Unbek. | | | - | - | - | - | - | 1 | - | 1 | - | - | 1 | 2 | 4 |
| | Gesamt | | | - | - | - | - | 4 | 3 | - | 2 | 3 | - | 2 | 11 | 27 |
| TIL | Huhn | | | - | - | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1 | - | - | - | 1 |
| | Pute | | | - | 1 | - | - | 1 | 3 | 4 | 1 | 3 | 6 | 8 | 1 | 29 |
| | Ente | | | 1 | 9 | 10 | - | 2 | 3 | 5 | 1 | - | - | - | - | |
| | Unbek. | | | - | 1 | 1 | 2 | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | 3 |
| | Gesamt | | | 1 | 11 | 12 | 3 | 4 | 9 | 11 | 4 | 4 | 7 | 8 | 1 | 33 |
| TUL* ² | Huhn | | | - | - | - | - | - | - | - | 1 | - | - | 9 | | |
| | Pute | | | - | - | - | 1 | - | - | - | 1 | - | - | 20 | | |
| | Ente | | | - | - | - | - | 1 | 1 | 3 | 4 | 5 | 1 | 9 | | |
| | Unbek. | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | |
| | Gesamt | | | - | - | - | 1 | 1 | 1 | 3 | 6 | 5 | 1 | 38 | | |
| Phenicole | | | | | | | | | | | | | | | | |
| FFN | Huhn | | | | - | - | 4 | 7 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Pute | | | | - | - | 15 | 42 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Ente | | | | 1 | 2 | 17 | 11 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Unbek. | | | | 1 | 2 | 1 | 5 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | Gesamt | | | | 2 | 4 | 37 | 65 | - | - | - | - | - | - | - | |

Fortsetzung Tab. 23

| Antimikrobieller Wirkstoff | | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------|--|------|------|------|------|-----|----|---|----|----|----|----|------------|-----|-----|
| | | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| Pleuromutiline | | | | | | | | | | | | | | | | |
| TIA | Huhn | | - | 5 | 5 | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | | |
| | Pute | | - | 29 | 22 | - | - | - | - | - | - | 4 | 1 | 1 | | |
| | Ente | | 3 | 10 | 16 | 1 | - | - | - | - | 1 | - | - | - | | |
| | Unbek. | | 3 | 5 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | Gesamt | | 6 | 49 | 44 | 1 | - | 1 | - | - | 1 | 4 | 1 | 1 | | |
| Polymyxin | | | | | | | | | | | | | | | | |
| COL | Huhn | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 11 | | |
| | Pute | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 57 | | |
| | Ente | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 31 | | |
| | Unbek. | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 9 | | |
| | Gesamt | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 108 | | |
| Potenzierte Sulfonamide | | | | | | | | | | | | | | | | |
| SXT | Huhn | | - | - | 1 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 1 | - | - | - | | |
| | Pute | | - | - | 1 | 6 | 8 | 12 | 6 | 16 | 8 | - | - | - | | |
| | Ente | | - | 2 | 6 | 5 | 5 | 7 | - | 2 | 3 | - | 1 | - | | |
| | Unbek. | | - | - | - | 4 | 2 | 2 | 1 | - | - | - | - | - | | |
| | Gesamt | | - | 2 | 8 | 16 | 19 | 22 | 9 | 19 | 12 | - | 1 | - | | |

Fortsetzung Tab. 23

| Antimikrobieller Wirkstoff | | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) / Anzahl | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------|--------|--|------|------|------|------|-----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| | | ≤0.015 | 0.03 | 0.06 | 0.12 | 0.25 | 0.5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 64 | 128 | 256 |
| Tetrazykline | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CHL * ¹ | Huhn | | | | | | - | - | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Pute | | | | | | - | - | 2 | 12 | - | 5 | 10 | 6 | - | - |
| | Ente | | | | | | - | - | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | - | - | - |
| | Unbek. | | | | | | 2 | - | 2 | 4 | - | - | 1 | - | - | - |
| | Gesamt | | | | | | 2 | - | 7 | 18 | 1 | 6 | 12 | 6 | - | - |
| DOX | Huhn | | | - | - | - | 4 | 5 | 2 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Pute | | | - | - | - | 10 | 14 | 21 | 11 | 1 | - | - | - | - | - |
| | Ente | | | 2 | 2 | 3 | 13 | 10 | 1 | - | - | - | - | - | - | - |
| | Unbek. | | | - | 1 | - | 4 | - | 3 | 1 | - | - | - | - | - | - |
| | Gesamt | | | 2 | 3 | 3 | 31 | 29 | 27 | 12 | 1 | - | - | - | - | - |
| TET | Huhn | | | | - | - | - | 1 | - | 5 | 4 | 1 | - | - | - | - |
| | Pute | | | | - | - | - | - | - | 2 | 22 | 32 | 1 | - | - | - |
| | Ente | | | | 2 | 3 | 1 | - | 1 | 16 | 7 | 1 | - | - | - | - |
| | Unbek. | | | | - | - | 1 | - | - | 3 | 1 | 4 | - | - | - | - |
| | Gesamt | | | | 2 | 3 | 2 | 1 | 1 | 26 | 34 | 38 | 1 | - | - | - |

*¹=Gegenüber diesen Wirkstoffen wurden nur 52 Isolate getestet (1 Hühnerisolat, 35 Putenisolate, 7 Entenisolate, 9 Isolate unbekannter Geflügelspezies)

*²=Gegenüber diesen Wirkstoffen wurden nur 56 Isolate getestet (10 Hühnerisolate, 22 Putenisolate, 24 Entenisolate)

Abkürzungen: AMP=Ampicillin, AUG=Amoxicillin/Clavulansäure, CEP= Cephalothin, CEQ=Cefquinome, CHL=Chlortetrazyklin, CIP=Ciprofloxacin, COL=Colistin, DOX=Doxycyclin, ENRO=Enrofloxacin, FFN=FLorfenicol, FOP=Cefoperazone, FOT=Cefotaxim, GEN=Gentamicin, IMI=Imipenem, MAR=Marbofloxacin, NAL=Nalidixinsäure, NEO=Neomycin, PEN=Penicillin, SPI=Spiramycin, STR=Streptomycin, SXT=Trimethoprim/Sulfamethoxazole, TET=Tetrazyklin, TIA=Tiamulin, TIL=Tilmicosin, TUL=Tulathromycin, XNL=Ceftiofur

Tab. 24: MHK-Werte der Referenzstammsammlung für die einzelnen geprüften Wirkstoffe

| Referenz- stamm/ Wiederholung | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-------|------------|-----------|--------|------|-----|-------|-------|-----|-----|-----|-------|------------|-----|
| | AMP | AUG | CEQ | CEP | CIP | CLI | COL | DOX | ENRO | ERY | FAZ | FFN | FOP | FOT | GEN |
| DSMZ 1103 (1) | 8 | 4 | 0.06 | 16 | 0.015 | - | 1 | 2 | 0.03 | - | - | 8 | 0.25 | 0.12 | 0.5 |
| DSMZ 1103 (2) | 4 | 4 | 0.03 | 16 | ≤0.008 | - | 1 | 2 | 0.015 | - | - | 4 | 0.12 | 0.03 | 0.5 |
| DSMZ 1103 (3) | 4 | 4 | 0.06 | 16 | 0.015 | - | 1 | 2 | 0.03 | - | - | 8 | 0.25 | 0.06 | 0.5 |
| DSMZ 1103 (4) | 4 | 4 | 0.06 | 16 | ≤0.008 | - | 1 | 2 | 0.015 | - | - | 8 | 0.25 | 0.12 | 0.5 |
| DSMZ 2569 (1) | 1 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | - | - | 0.12 | 0.5 | 0.5 | - | 2 | 2 | 0.5 |
| DSMZ 2569 (2) | 1 | 0.5 | 1 | 0.25 | 0.5 | 0.12 | - | - | 0.12 | 0.5 | 0.5 | - | 2 | 2 | 1 |
| DSMZ 2569 (3) | 0.5 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.12 | - | - | 0.12 | 0.5 | 0.5 | - | 2 | 2 | 0.5 |
| DSMZ 2569 (4) | 1 | 0.5 | 1 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | - | - | 0.12 | 0.5 | 0.5 | - | 2 | 2 | 1 |
| DSMZ 15868 (1) | ≤0.03 | ≤0.03 | ≤ 0.015 | ≤ 0.06 | 0.015 | - | >16 | 0.12 | 0.015 | - | - | 1 | ≤0.06 | ≤ 0.015 | 4 |
| DSMZ 15868 (2) | ≤0.03 | ≤0.03 | ≤ 0.015 | ≤ 0.06 | 0.015 | - | >16 | ≤0.06 | 0.03 | - | - | 0,5 | ≤0.06 | ≤ 0.015 | 4 |
| DSMZ 15868 (3) | 0.06 | 0.06 | 0.03 | - | 0.03 | - | >16 | 0.12 | 0.03 | - | - | 1 | 0.03 | 0.06 | 8 |
| DSMZ 15868 (4) | 0.06 | 0.06 | 0.25 | - | 0.03 | - | >16 | 0.12 | 0.03 | - | - | 1 | 0.03 | 0.06 | 8 |

Fortsetzung Tab. 24

| Referenz- stamm/ Wiederholung | Minimale Hemmkonzentration (mg/l) | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------|------|-------|-----|-----|------|--------|------|-------|------|------|------|------|-----|-----|-------|
| | IMI | LINC | MAR | NAL | NEO | OXA | PEN | PIRL | STREP | SXT | TET | TIA | TIL | TUL | TYL | XNL |
| DSMZ 1103* ¹ (1) | 0.12 | - | 0.03 | 2 | 1 | - | >32 | - | 8 | 0.12 | 1 | >64 | 128 | 16 | - | 0.5 |
| DSMZ 1103 (2) | 0.12 | - | 0.015 | 2 | 2 | - | >32 | - | 4 | 0.06 | 1 | 64 | 64 | 16 | - | 0.25 |
| DSMZ 1103 (3) | 0.12 | - | 0.015 | 2 | 2 | - | >32 | - | 8 | 0.06 | 2 | >64 | 64 | 16 | - | 0.5 |
| DSMZ 1103 (4) | 0.12 | - | 0.015 | 2 | 2 | - | >32 | - | 4 | 0.06 | 1 | >64 | 64 | 8 | - | 0.5 |
| DSMZ 2569* ² (1) | - | 1 | 0.25 | - | - | 0.25 | 1 | 0.5 | - | 0.06 | 0.5 | - | 2 | 16 | 2 | 1 |
| DSMZ 2569 (2) | - | 1 | 0.5 | - | - | 0.25 | 1 | 0.5 | - | 0.06 | 0.5 | - | 2 | 16 | 2 | 1 |
| DSMZ 2569 (3) | - | 1 | 0.25 | - | - | 0.25 | 0.5 | 0.5 | - | 0.06 | 0.5 | - | 2 | 16 | 2 | 1 |
| DSMZ 2569 (4) | - | 1 | 0.5 | - | - | 0.25 | 1 | 0.5 | - | 0.06 | 0.5 | - | 2 | 16 | 2 | 1 |
| DSMZ 15868* ³ (1) | 0.03 | - | 0.03 | 8 | 8 | - | ≤0.015 | - | 16 | 0.5 | 0.25 | 0.12 | 0.12 | 4 | - | ≤0.03 |
| DSMZ 15868 (2) | ≤0.01 5 | - | 0.03 | 8 | 4 | - | ≤0.015 | - | 8 | 0.25 | 0.25 | 0.06 | 0.12 | 4 | - | ≤0.03 |
| DSMZ 15868 (3) | 0.03 | - | 0.03 | 8 | 4 | - | 0.03 | - | 16 | 0.25 | 0.5 | 0.12 | 0.12 | - | - | 0.12 |
| DSMZ 15868 (4) | 0.03 | - | 0.03 | 8 | 4 | - | 0.03 | - | 16 | 0.25 | 0.5 | 0.12 | 0.12 | - | - | 0.12 |

*1 = DSMZ 1103 – *E. coli* Referenzstamm

*2 = DSMZ 2569 – *S. aureus* Referenzstamm

*3 = DSMZ 15868 – *R. anatipestifer* Referenzstamm

Publikationsverzeichnis

1. GASCHE, S., HAUCK, R., MANKERTZ, J., KASPAR, H., HAFEZ, M.H. (Nov. 2012).
Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009-2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz
2. GASCHE, S., HAUCK, R., MANKERTZ, J., KASPAR, H., HAFEZ, M.H. (April 2013).
Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009-2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz
3. GASCHE, S., HAUCK, R., MANKERTZ, J., KASPAR, H., HAFEZ, M.H. (Okt. 2013).
Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009-2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz
4. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H.M. (März 2014). Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009-2012) von *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz
5. 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
6. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H.M. (Nov. 2014). Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland (2009-2012) von *Ornithobacterium rhinotracheale* und *Riemerella anatipestifer* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz
7. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H.M. (2015). Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland von *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale* beim Nutzgeflügel. Sitzung der DVG Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz

8. GASCHE, S., KASPAR, H., WALLMANN, J., HAFEZ, H.M. (Sept. 2015) Untersuchung des Resistenzverhaltens von aktuellen Isolaten aus Deutschland von *Riemerella anatipestifer* und *Ornithobacterium rhinotracheale* beim Nutzgeflügel 34. Jahrestagung der DVG-Fachgruppe „AVID“, Kloster Banz.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. H. M. Hafez bedanken. Einerseits für das hochinteressante Dissertationsthema und andererseits für die Möglichkeit alle Bereiche des Instituts für die Entstehung dieser Arbeit zu nutzen. Seine offene und freundliche Art hat mir auch in schweren Zeiten geholfen meinen Weg weiter zu gehen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. R. Hauck für jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele anregende Diskussionen. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv und professionell begleitet und hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Fr. Dr. H. Kaspar und Herrn Dr. J. Wallmann (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) für die Unterstützung dieser Arbeit in Form von unzähligen fachlichen Gesprächen, Anregungen und Informationen in Bezug auf die Durchführung bzw. Auswertung der Ergebnisse der Resistenztestung, sowie für das zur Verfügung stellen von Bakterienstämmen und der Sensitivität MHK-Platten. Besonderer Dank gilt beiden auch für das wiederholte Korrekturlesen und die konstruktive Kritik.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Prof. Dr. Th. Hiepe für die jederzeit großzügige Hilfsbereitschaft bei der Doktorarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Instituts für Geflügelkrankheiten. Jederzeit gewährten sie mir bei der Planung und Durchführung der vorliegenden Arbeit außerordentlich sachkundige, erfahrene und wertvolle Unterstützung. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen der Arbeit beigetragen.

Den Mitarbeitern des Bundesinstituts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit möchte ich für die Einarbeitung in die Methodik zur Resistenzbestimmung danken, sowie für die angenehme und herzliche Zusammenarbeit während der Hospitation in ihrem Labor.

Ein großes Dankeschön gilt meinen ehemaligen bzw. aktuellen Mitdoktoranden für die entspannte Zusammenarbeit bei zahlreichen internen und externen Veranstaltungen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinem Vater und meinen Großeltern, die mir mein Studium ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben. Dank gebührt ihnen auch, dass sie mir in schwierigen Situationen ein Stück Lebenserfahrung mit auf den Weg gegeben haben.

Bei der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung bedanke ich mich für die finanzielle Förderung des Forschungsprojektes.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt zu haben.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 23.08.2017

Stefanie Gasche



9 783863 878771
mbvberlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-877-1