

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Resistenzlage veterinärpathogener *Enterobacteriaceae* unter besonderer  
Berücksichtigung der Fluorchinolone**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
doctor medicinae veterinariae  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Mirjam Grobbel**  
Tierärztin aus Lennestadt

Berlin 2009

Journal Nr.: 3342





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2009

© 2009 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-941703-57-5

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Resistenzlage veterinärpathogener *Enterobacteriaceae* unter besonderer  
Berücksichtigung der Fluorchinolone**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
doctor medicinae veterinariae  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Mirjam Grobbel**  
Tierärztin aus Lennestadt

Berlin 2009

Journal Nr.: 3342

Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs für Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Leo Brunberg

1. Gutachter: Prof. Dr. Lothar H. Wieler
2. Gutachter: Prof. Dr. Barbara Kohn
3. Gutachter: Prof. Dr. Karl-Hans Zessin

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): dogs, cats, horses, pigs, Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Klebsiella, Proteus, antibiotics, antiinfective agents, fluoroquinolones, susceptibility, drug resistance, Germany

Tag der Promotion: 09.12.2009

## Inhalt

1	Einleitung	- 5 -
2	Vorstellung der Publikationen	- 12 -
2.1	Publikation 1	- 12 -
2.1.1	Zusammenfassung	- 12 -
2.1.2	Erläuterungen	- 12 -
2.2	Publikation 2	- 14 -
2.2.1	Zusammenfassung	- 14 -
2.2.2	Erläuterungen	- 15 -
2.3	Publikation 3	- 16 -
2.3.1	Zusammenfassung	- 16 -
2.3.2	Erläuterungen	- 17 -
3	Diskussion	- 19 -
3.1	Resistenzraten	- 19 -
3.1.1	Resistenzen in aus Schweinen isolierten <i>Enterobacteriaceae</i>	- 21 -
3.1.1.1	Infektionen des Urogenitaltrakts (inklusive Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom)	- 21 -
3.1.2	Resistenzen in aus Pferden isolierten <i>Enterobacteriaceae</i>	- 23 -
3.1.2.1	Infektionen des Genitaltrakts	- 23 -
3.1.3	Resistenzen in aus Hunden und Katzen isolierten <i>Enterobacteriaceae</i>	- 25 -
3.1.3.1	Infektionen des Respirationstrakts	- 25 -
3.1.3.2	Infektionen des Urogenitaltrakts	- 26 -
3.1.3.3	Infektionen von Haut/Ohr/Maul	- 27 -
3.1.3.4	Infektionen des Gastrointestinaltrakts	- 29 -
3.1.4	Fluorchinolon-Resistenz	- 29 -
3.2	Aktivitätsvergleich der Fluorchinolone	- 32 -
4	Schlussfolgerung	- 34 -
5	Zusammenfassung	- 36 -
6	Summary	- 37 -
7	Literatur	- 38 -
8	Anhang	- 44 -

Diese kumulative Dissertation basiert auf drei Publikationen, welche in wissenschaftlich anerkannten Zeitschriften mit Gutachtersystem veröffentlicht wurden. Die Originalversionen dieser Publikationen liegen im Anhang vor.

**Publikation 1**

Grobbe, M., Lübke-Becker, A., Alešik, E., Schwarz, S., Wallmann, J., Werckenthin, C., Wieler, L. H.:

Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs, and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 391-401

**Publikation 2**

Grobbe, M., Lübke-Becker, A., Alešik, E., Schwarz, S., Wallmann, J., Werckenthin, C., Wieler, L. H.:

Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from various organ systems of horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 402-411

**Publikation 3**

Grobbe, M., Lübke-Becker, A., Wieler, L.H., Froyman, R., Friederichs, S., Filios, S.:

Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones.

Veterinary Microbiology, 124, 2007, 73-81



## 1 Einleitung

Im Laufe der Evolution haben viele Mikroorganismen Strategien entwickelt sich gegen Feinde, Konkurrenten oder Nachbarn im Ökosystem zu schützen. Als sehr effektiv hat sich in diesem Zusammenhang die Abgabe antimikrobiell wirksamer Substanzen in das umgebende Milieu herausgestellt. Antibiotikaresistenzen gab es also bereits lange vor der Nutzung dieser Mittel als Medikament. Nach der zufälligen Entdeckung des Penicillins durch Fleming 1928 und des erfolgreichen Einsatzes dieser Substanz während des zweiten Weltkriegs, wurde nach weiteren Mitteln zur effektiven Behandlung bakterieller Infektionen von Mensch und Tier gesucht (Demain, 1999). Bis Anfang der 1960er Jahre wurde so der Großteil der heute bekannten Antibiotikafamilien entdeckt (Taylor et al., 2008). Ab diesem Zeitpunkt konnten die bereits bekannten Mittel nur noch modifiziert werden, um so ihre Wirksamkeit zu erhöhen bzw. das von ihnen erfasste Erregerspektrum zu vergrößern. Es fanden nur verhältnismäßig kleine Veränderungen innerhalb der chemischen Grundstruktur statt, was dazu führte, dass zum Teil bereits Punktmutationen in einem einmal vorhandenen Resistenzgen ausreichen um den Mechanismus an eine Neuerung der Antibiotika anzupassen. Bedingt durch bakterielle Eigenschaften, wie die relativ kurzen Generationszeiten und die Möglichkeit der horizontalen Weitergabe von Genen, können sich einmal etablierte Resistenzen schnell über ganze Populationen verbreiten. Bildlich gesprochen gibt es einen Wettlauf zwischen der Antibiotika- und der Resistenzentwicklung. Diesen konnte die Medizin zwar lange für sich entscheiden und für einen Großteil der pathogenen Bakterien ist dies auch noch immer der Fall, jedoch gibt es mittlerweile auch Bakterien, welche so viele Resistenzmechanismen angehäuft haben, dass Infektionen mit ihnen praktisch nicht mehr behandelbar sind. Diese Entwicklung sorgt seit Jahren innerhalb der Fachkreise sowie auch in der Öffentlichkeit für Besorgnis (Leung, 2004; Miriagou et al., 2005; Elemam et al., 2009).

Um die Entwicklung von Resistenzen abschätzen und bewerten zu können ist es zwingend erforderlich, regelmäßige Untersuchungen der Bakterienpopulation durchzuführen und diese anhand von Vergleichsdaten aus früheren Jahren, anderen Fachrichtungen und internationalen Studien zu bewerten. Nur so ist es möglich, Trends früh zu erkennen und gegebenenfalls der weiteren Entwicklung entgegen wirken zu können (Masterton, 2008). In zahlreichen Ländern wurden Monitoringprogramme ins Leben gerufen, welche die Entwicklung und Tendenzen der Resistenzlage untersuchen (NARMS, 2004; NORM-VET, 2004; SVARM, 2006; Schwarz et al., 2007a; Wallmann et al., 2007; DANMAP, 2008). Der Großteil dieser Programme befasst sich mit aus Menschen isolierten Bakterien oder Indikatorbakterien aus nicht erkrankten, Lebensmittel liefernden Tieren bzw. Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Die Untersuchung von Bakterien welche aus Krankheitsgeschehen von Tieren isoliert wurden, spielte in vielen dieser Programme eine untergeordnete Rolle, da häufig die direkte Assoziation mit der Resistenzproblematik der Humanmedizin fehlt. Dennoch sollten diese

Bakterien in Monitoringprogrammen auf keinen Fall außer Acht gelassen werden. Zum einen gibt es durchaus die Möglichkeit der Übertragung resistenter Bakterien auf den Menschen und des Austausches von Resistenzgenen zwischen tierpathogenen und humanpathogenen Bakterien (Guardabassi et al., 2004; DeVincent et al., 2006; Schjorring et al., 2008), zum anderen hat auch unser Tierbestand ein Anrecht auf adäquate Behandlung bakterieller Infektionen. Um diese auch weiterhin gewährleisten zu können, ist die Kontrolle der Resistenzsituation essentiell. Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) hat aus diesem Grunde 2001 das German Resistance Monitoring veterinärpathogener Keime (*GERM-VET*) initiiert. Dieses Projekt befasste sich seitdem fortlaufend mit der Untersuchung häufig isolierter pathogener Bakterienspezies aus verschiedenen Infektionen bei Lebensmittel liefernden Tieren.

Auch die Hobbytiere Hund, Katze und Pferd dürfen bei diesen Untersuchungen nicht außer Acht gelassen werden, da sie häufig sehr engen Kontakt zu Menschen haben (Guardabassi et al., 2004). Die Übertragung resistenter Bakterien, wie auch der Resistenzgene dieser Bakterien zwischen menschlichen und Tier-Isolaten, wurde schon mehrfach berichtet, und Tiere können als Reservoir für resistente Bakterien dienen (Guardabassi et al., 2004; DeVincent et al., 2006; Nienhoff et al., 2009). Aus diesem Grunde wurde als Ergänzung zum *GERM-Vet* Anfang 2004 vom BVL gemeinsam mit dem Bundesverband für Tiergesundheit (BfT) und in Zusammenarbeit mit der Freien Universität Berlin, der Ludwig Maximilians Universität München und der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) Braunschweig (heute Teil des Friedrich Löffler Instituts) das BfT-GermVet ins Leben gerufen. Dieses zunächst als Einmalerhebung geplante Programm ergänzt wichtige Pathogene von Hund/Katze und Pferd zu dem bereits durch das *GERM-Vet* abgedeckte Erregerspektrum, sowie zusätzlich einige von Rind und Schwein, welche zuvor nicht untersucht wurden.

Im Zuge des BfT-GermVet wurden von Januar 2004 bis März 2006 von Veterinäruntersuchungsämtern, Universitäts- und Privat-Laboren insgesamt 3075 Stämme eingesandt und im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen gesammelt und asserviert. Diese wurden in 31 verschiedene Kombinationen aus Erreger, Infektionslokalisation und Tierart unterteilt (Tabelle 1) (Schwarz et al., 2007a). Von diesen Stämmen wurden 1626 unter Berücksichtigung von Vorbehandlungsstatus und geographischer Herkunft in die Untersuchung eingeschlossen. Die Resistenztestung der Stämme wurde in Instituten der Freien Universität Berlin (FU), Ludwig Maximilians Universität (LMU) München und der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft

<b>Tierart/ Infektionslokalisation</b>	<b>Untersuchte Bakterienspezies</b>	<b>Anzahl Stämme</b>
<b>Rinder</b>		<b>85</b>
Urogenitaltrakt	<i>Escherichia coli</i>	7
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	43
Nabelentzündung/Septikämie	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	35
<b>Schweine</b>		<b>322</b>
Urogenitaltrakt (inkl. MMA)	<i>Escherichia coli</i>	87
	koagulasepositive <i>Staphylococcus</i> spp.	46
	β-hämolysierende <i>Streptococcus</i> spp.	54
ZNS/Muskulatur	<i>Streptococcus suis</i>	77
	<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	12
Haut	koagulasepositive <i>Staphylococcus</i> spp.	44
Haut/Respirationstrakt	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	2
<b>Pferde</b>		<b>326</b>
Respirationstrakt	<i>Streptococcus equi</i>	77
	<i>Actinobacillus equuli</i>	9
Genitaltrakt	<i>Escherichia coli</i>	102
	<i>Klebsiella</i> spp.	36
	β-hämolysierende <i>Streptococcus</i> spp.	102

**Tabelle 1a** Übersicht der im Rahmen des BfT-GermVet in den Jahren 2004–2006 getesteten Isolate (Schwarz et al., 2007a). Grau unterlegt die an der Freien Universität Berlin untersuchten Isolate

<b>Tierart/ Infektionslokalisation</b>	<b>Untersuchte Bakterienspezies</b>	<b>Anzahl Stämme</b>
<b>Hunde und Katzen</b>		<b>899</b>
Respirationstrakt	<i>Escherichia coli</i>	28
	koagulasepositive <i>Staphylococcus</i> spp.	57
	$\beta$ -hämolyisierende <i>Streptococcus</i> spp.	21
	<i>Pasteurella multocida</i>	72
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	42
Urogenitaltrakt	<i>Escherichia coli</i>	100
	<i>Klebsiella</i> spp.	17
	<i>Proteus</i> spp.	37
	<i>Pseudomonas</i> spp.	34
	$\beta$ -hämolyisierende <i>Streptococcus</i> spp.	90
Haut/Ohr/Maul	<i>Proteus</i> spp.	30
	koagulasepositive <i>Staphylococcus</i> spp.	101
	$\beta$ -hämolyisierende <i>Streptococcus</i> spp.	79
	<i>Pasteurella multocida</i>	20
	<i>Pseudomonas</i> spp.	71
Gastrointestinaltrakt	<i>Escherichia coli</i>	100

**Tabelle 1b** Übersicht der im Rahmen des BfT-GermVet in den Jahren 2004-2006 getesteten Isolate (Schwarz et al., 2007a). Grau unterlegt die an der Freien Universität Berlin untersuchten Isolate

(FAL) Braunschweig durchgeführt. Im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen (IMT) der Freien Universität Berlin wurden die Stämme der Familie *Enterobacteriaceae* auf Ihre Empfindlichkeit gegenüber 32 antibiotischen Wirkstoffen getestet. Eine Übersicht über die Belegung der Mikrotiterplatten findet sich in Tabelle 2. Die Bestimmung wurde mittels Bouillon-Mikrodilution durchgeführt. Hierbei wurden die Standards des Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI) angewendet, welches momentan die einzigen international

angewendeten Richtlinien für aus Tieren isolierten Bakterien liefert (CLSI, 2002). Auch die Bewertung der Ergebnisse wurde nach CLSI Dokument M31-S2 durchgeführt (CLSI, 2004). Die Ergebnisse dieser Testung wurden in zwei Artikeln in der Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift (BMTW) im September 2007 publiziert (Grobbe et al., 2007a, b), gemeinsam mit den übrigen im BfT-GermVet und des zu dem Zeitpunkt aktuellen GERM-Vet Monitorings gewonnenen Daten (Schwarz et al., 2007a; Schwarz et al., 2007b; Schwarz et al., 2007c; Schwarz et al., 2007d; Werckenthin et al., 2007). Nach der Publikation und dem Auslaufen des BfT-GermVet wurden viele dieser Kombinationen aus Erreger, Infektionslokalisation und Tierart nun in das GERM-Vet Monitoring übernommen.

Die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. (PEG) gibt seit 1998 Berichte über die Deutschlandweite Resistenzsituation humanmedizinischer Isolate heraus. Ende 2008 wurden nun erstmals auch die Daten aus den GERM-Vet Studien, inklusive der hier vorgestellten, für diesen Resistenzatlas verwendet um so ein umfassendes Werk über Resistenzraten und den Verbrauch antibiotischer Substanzen in Deutschland zu generieren, den GERMAP Resistenzatlas 2008 (GERMAP, 2008). Solche Publikationen gibt es in den Skandinavischen Ländern und allen voran in Dänemark bereits seit einigen Jahren (DANMAP, 2008). In Deutschland war es ob der Größe des Landes, der Bevölkerungsdichte und der Tierbestandszahlen bislang nicht möglich, Human- und Veterinärmedizin sowie Pharmaindustrie in einem gemeinsamen Bericht zu vereinen.

Aufgrund der Kooperationsbereitschaft der beteiligten Institutionen konnte nun erstmals ein vollständiger Überblick für Deutschland gegeben werden, in dem auch die Daten der hier vorliegenden Publikationen 1 und 2 wiedergegeben werden (Grobbe, 2008a, b; Lübke-Becker, 2008a, b; Wieler, 2008a, b).

Im Zuge sowohl der Wahl der Testsubstanzen als auch der Datenauswertung zu diesem Projekt ist eine neue Fragestellung aufgekommen. Da sich die Mitglieder der einzelnen Antibiotikafamilien teilweise sehr ähnlich sind, wird für diese Familien eine Substanz angegeben, welche stellvertretend für alle Mitglieder getestet wird. Die so generierten Ergebnisse werden auf alle Substanzen der Familie übertragen. Für die Fluorchinolone wurde lange Zeit Enrofloxacin als Stellvertreter angegeben. Enrofloxacin ist ein Fluorchinolon mit veterinärmedizinischer Zulassung, welches Dank breitem Wirkungsspektrum und relativ guten pharmakokinetischen Eigenschaften häufig eingesetzt wird. Bis vor wenigen Jahren wurde diese Familie der Antibiotika in der Humanmedizin noch als Reservesubstanz genutzt, also ein Mittel, welches eingesetzt wurde um schwerwiegende Infektionen möglichst zuverlässig zu behandeln (Webster et al., 1988; Hendershot, 1995). Die Entwicklungen der letzten Jahre, vor

Testsubstanz	Plattenlayout	Testkonzentration [µg/ml]	
		von	bis
Amoxicillin/Clavulansäure (2/1)	NLV 31	0,015/0,07	32/16
Ampicillin	NLV 31	0,03	64
Cefoperazon	NLV 31	0,03	16
Cefquinom	NLV 31	0,008	16
Ceftiofur	NLV 31	0,008	16
Cephalothin	NLV 31	0,015	32
Cefazolin	NLV 31	0,015	32
Chloramphenicol	NLV32	0,25	128
Clindamycin	NLV 33	0,03	64
Colistin	NLV 33	0,015	32
Enrofloxacin	NLV32	0,008	16
Erythromycin	NLV 33	0,015	32
Florfenicol	NLV 33	0,03	64
Gentamicin	NLV32	0,06	128
Neomycin	NLV32	0,03	64
Oxacillin + 2 % NaCl	NLV 33	0,03	16
Penicillin G	NLV 31	0,015	32
Spectinomycin	NLV 33	0,25	512
Spiramycin	NLV32	0,06	128
Trimethoprim/Sulfamethoxazol (1/19)	NLV32	0,015/0,3	32/608
Sulfonamide	NLV 33	0,5	1024
Tetracyclin	NLV32	0,03	64
Tilmicosin	NLV 33	0,03	64
Tulathromycin	NLV32	0,03	64

**Tabelle 2** Übersicht der im BfT-GermVet genutzten Antibiotika (alphabetisch) und ihrer eingesetzten Konzentrationen zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

allein im Krankenhaus und der Intensivpflege, haben jedoch zu einem starken Anstieg der Resistenzraten nosokomialer Infektionserreger geführt, wodurch Fluorchinolone nur noch begrenzt zur Behandlung der betroffenen Patienten eingesetzt werden können. Angewendet werden die Fluorchinolone heute vor allem als orale Formulierungen in der ambulanten Behandlung (Karaca et al., 2005), und hier häufiger mit zunehmendem Alter des Patienten (Kern et al., 2008).

Im Rahmen des BfT-GermVet kam jedoch wiederholt die Frage nach der Vergleichbarkeit der verschiedenen Fluorchinolone auf. So sind vor allem zur Behandlung von Atemwegsinfektionen bei Nutztieren verschiedene Wirkstoffe dieser Familie zugelassen. Vor dem Hintergrund der großen Bedeutung dieser Substanz in der Humanmedizin und der daraus entstehenden Verpflichtung der Tierärzte verantwortungsvoll mit diesen Substanzen umzugehen, haben wir dies zum Anlaß genommen, die Wirksamkeit der für die Veterinärmedizin zugelassenen Fluorchinolone gegen einige der bedeutendsten Pathogene von Rind und Schwein zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede zwischen den Wirkstoffen ausmachen zu können. Eine Übersicht über die Belegung der Mikrotiterplatten findet sich in Tabelle 3. Die Ergebnisse dieser Studie wurden im September 2007 in Veterinary Microbiology veröffentlicht (Grobbe et al., 2007c).

Testsubstanz	Plattenlayout	Testkonzentration [µg/ml]	
		von	bis
Ciprofloxacin	NLV 40	0,002	4
Danofloxacin	NLV 40	0,002	4
Difloxacin	NLV 40	0,002	4
Enrofloxacin	NLV 40	0,002	4
Marbofloxacin	NLV 40	0,002	4
Norfloxacin	NLV 40	0,004	4

**Tabelle 3** Übersicht der in der Fluorchinolone Vergleichsstudie genutzten Antibiotika (alphabetisch) und ihrer eingesetzten Konzentrationen zur Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

## 2 Vorstellung der Publikationen

### 2.1 Publikation 1

#### **Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006**

Antimikrobielle Empfindlichkeit von *Escherichia coli* Isolaten der Tierarten Schwein, Pferd, Hund und Katze ermittelt im BfT-GermVet Monitoringprogramm 2004-2006

Publiziert in der Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift 120, Heft 9/10, Seiten 391–401 (2007)

DOI 10.2376/0005-9366-120-391

Eingegangen: 14.05.2007

Angenommen: 12.07.2007

Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Anhang.

#### **2.1.1 Zusammenfassung** (übernommen aus der Originalpublikation)

Diese Studie befasst sich mit den 417 im BfT-GermVet Projekt gesammelten und auf Ihre Antibiotikaempfindlichkeit untersuchte *E. coli*-Isolaten. Aus Lebensmittel liefernden Tieren stammen hiervon 87 Isolate, welche sämtlich aus Infektionen des Urogenitaltraktes (UGT) inkl. Mastitis-Metritis-Agalaktie-Komplex (MMA) von Schweinen isoliert wurden. Aus Genitaltraktinfektionen von Pferden stammen 102 der untersuchten Isolate. Aus Hunden und Katzen wurden *E. coli* Isolate aus den Infektionen des Respirationstraktes (n = 28), des UGT (n = 100) und des Gastrointestinaltraktes (GIT) (n = 100) in die Testung einbezogen. Unabhängig von der Herkunft der Stämme konnten am häufigsten Resistenzen gegen Sulfamethoxazol (18-59 %), Tetracyclin (14–54 %) und Ampicillin (9–14 %) festgestellt werden. Für Cephalothin wurden hohe Raten intermediärer Isolate beobachtet (39–46 %). Die Resistenzraten für Amoxicillin/Clavulansäure (1–4 %), Gentamicin (1–9 %) und Cefazolin (0–11 %) waren allgemein im niedrigen Bereich (Grobbel et al., 2007a).

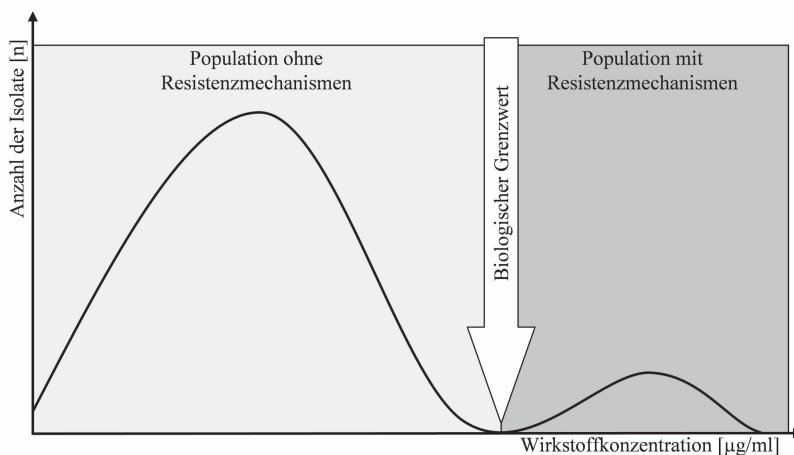
#### **2.1.2 Erläuterungen**

In der Publikation wird auch auf die Schwierigkeiten bei Resistenztestungen in der Veterinärmedizin eingegangen, welche darin bestehen, dass nicht für alle Wirkstoffe Grenzwerte verfügbar sind. Das CLSI ist eine der wenigen Institutionen welche



veterinärmedizinisch spezifische Grenzwerte angibt, jedoch sind auch deren Angaben nicht umfassend genug um das gesamte Spektrum der in der Veterinärmedizin zugelassenen Wirkstoffe abzudecken (CLSI, 2002, 2004). Teilweise sind die vorhandenen Grenzwerte nur für einige wenige Tierarten oder Organsysteme zulässig. So konnte die Bewertung resistent/intermediär/sensibel nicht für alle Wirkstoffe angegeben werden und es war erforderlich, die ausführlichen Ergebnistabellen in den Publikationen anzugeben. Anhand dieser Tabellen ist teilweise eine Abgrenzung der sensiblen von einer eventuellen resistenten Population möglich, und sie erlauben, wie im Falle von Enrofloxacin, eine grobe Aussage zur Resistenzsituation auch ohne Grenzwerte. Grafisch dargestellt sollte sowohl die sensible als auch die resistente Population eine normalverteilte Glockenkurve bilden (bimodale Verteilung). Geteilt werden die Populationen durch den so genannten biologischen Grenzwert, welcher die Population ohne Resistenzmechanismen von der mit Resistenzmechanismen abgrenzt (Abb. 1). Eine im Laufe eines Monitorings beobachtete Verschiebung der Glockenkurven auf der Konzentrations-Achse lässt Rückschlüsse über Resistenzentwicklungen zu, welche sich unter Umständen noch nicht in den Resistenzraten niederschlagen. Ähnlich verhält es sich mit dem  $MHK_{50}$ -Wert, welcher angibt bis zu welcher Konzentration 50 % der untersuchten Stämme sensibel sind.

**Abbildung 1** Schematische Darstellung einer bimodalen Verteilung der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) einer bakteriellen Testpopulation gegenüber einem antibiotischen Wirkstoff, inklusive Darstellung des biologischen Grenzwertes, welcher die Population mit Resistenzmechanismen von jener ohne Resistenzmechanismen trennt.



## 2.2 Publikation 2

### **Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from various organ systems of horses, dogs and cats as determined in the BfT – GermVet monitoring program 2004 – 2006**

Antimikrobielle Empfindlichkeit von *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. aus verschiedenen Organsystemen der Tierarten Pferd, Hund und Katze ermittelt im BfT-GermVet Monitoringprogramm 2004 - 2006

Publiziert in der Berliner und Münchener Tierärztlichen Wochenschrift 120, Heft 9/10, Seiten 402 - 411 (2007)

DOI 10.2376/0005-9366-120-402

Eingegangen: 14.05.2007

Angenommen: 19.07.2007

Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Anhang.

### **2.2.1 Zusammenfassung** (übernommen aus der Originalpublikation)

Diese Studie war ebenfalls Teil des BfT-GermVet und befasst sich mit der Empfindlichkeitstestung von *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. aus verschiedenen Organsystemen von Hobbytieren. Im Einzelnen wurden hier 36 *Klebsiella* Isolate aus dem Genitaltrakt von Pferden untersucht, 17 aus dem UGT von Hunden und Katzen. Auch bei den getesteten Isolaten aus dem Genus *Proteus* fielen die getesteten Zahlen mit 37 Isolaten aus dem UGT und 30 aus Hautinfektionen bei Hund und Katze eher gering aus.

Bei Isolaten der *Klebsiella* spp. konnten die höchsten Resistenzraten gegenüber Ampicillin (53–67 %), Sulfamethoxazol (19–29 %) und potenzierten Sulfonamiden (Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1/19 Kombination) (19–24 %) festgestellt werden. Des Weiteren wurden bei *Klebsiella* spp. aus dem UGT von Kleintieren 29 % Enrofloxacin-resistente Isolate beobachtet. Ähnlich hohe MHK-Werte konnten für diesen Wirkstoff bei keinem Isolat aus dem Genitaltrakt von Pferden nachgewiesen werden. *Proteus* spp. wiesen gegenüber Tetracyclin mit 90–92 % die höchsten Resistenzraten auf, was auf eine natürliche Resistenz zurückzuführen ist (Giguère, 2006). Weiterhin ergaben sich nicht zu vernachlässigende Resistenzraten gegenüber potenzierten Sulfonamiden (27–37 %), Sulfamethoxazol (24–37 %) und Chloramphenicol (24–37 %) (Grobbel et al., 2007b).

### 2.2.2 Erläuterungen

Wie in der Publikation erwähnt sind sowohl *Klebsiella* spp. als auch *Proteus* spp. in den untersuchten Organsystemen als opportunistische Erreger zu werten. Sie treten also teilweise in der autochtonen Mikrobiota dieser Organsysteme auf ohne Infektionen zu verursachen. Dies könnte ein Grund für die geringen Einsendungszahlen und die relativ hohen Resistenzraten gewesen sein, da diese Erreger häufig bei der bakteriologischen Erstuntersuchung als „unspezifisch“ einzustufen sind und erst in Gesellschaft oder nach der Beseitigung eines initialen Erregers die Entzündung aufrecht erhalten. Beide Bakteriengattungen können vor allem bei immunsupprimierten Individuen zu einer Infektion führen und sind im Zusammenhang mit nosokomialen Infektionen bekannt für die Anhäufung von Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika (Lockhart et al., 2007). Zusätzlich zu natürlichen Resistenzen wie der Tetracyclinresistenz in *Proteus* spp. und der Ampicillinresistenz in einigen *Klebsiella* spp. kommt es häufig zur Aufnahme von so genannten Resistenzplasmiden, welche eine ganze Anzahl verschiedener Resistenzgene tragen können (Yang et al., 2008). Wenn diese Erreger also in einer Infektion vorkommen, ob nun ursächlich oder als sekundärer Erreger hinzu gekommen, stellt die antibiotische Behandlung häufig ein Problem dar. Dieses kann bei einigen multiresistenten Stämmen sogar unlösbar werden. Deshalb ist ein Einbeziehen dieser Erreger in ein Resistenzmonitoring unabdingbar.

## 2.3 Publikation 3

### Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones

Vergleichende Quantifizierung der in vitro Aktivität veterinärmedizinisch genutzter Fluorchinolone

Publiziert in Veterinary Microbiology Vol. 124, Seiten 73 - 81 (2007)

DOI 10.1016/j.vetmic.2007.03.017

Eingegangen: 09.01.2007

Angenommen: 22.03.2007

Die vollständige Originalpublikation befindet sich im Anhang.

#### 2.3.1 Zusammenfassung (Übersetzung der Originalpublikation)

Ziel dieser Studie war die Quantifizierung der Wirksamkeit der fünf für die Veterinärmedizin zugelassenen Fluorchinolone gegen einige der bedeutendsten Pathogene von Nutztieren. Hier wurde durch verschiedene Autoren immer wieder auf Unterschiede der sich sonst sehr ähnlichen Wirkstoffe hingewiesen. Probleme dieser Publikationen waren jedoch zum einen die Testung eines eingeschränkten Spektrums von Wirkstoffen und Pathogenen, und daraus resultierend eine schlechte Vergleichbarkeit der Studien. Um also Ergebnisse verschiedener Wirkstoffe oder verschiedener Pathogene aus Nutztieren bewerten zu können mussten mehrere Publikationen herangezogen werden. In der Resistenztestung ist Standardisierung aber der für die Vergleichbarkeit unerlässlich. Ohne strikte Standardisierung wird durch intra- und interlaboratorische Abweichungen in der Testung die Vergleichbarkeit bedeutend eingeschränkt. In der vorliegenden Studie ist also erstmals der direkte Vergleich der häufigsten Wirkstoffe und wichtiger Pathogene von Rind und Schwein möglich.

Die getesteten Isolate wurden von der Diagnostik des IMT, sowie der zwei privaten Labore von Dr. M. Vanrobaeys (Belgien) und Dr. R. Danguy (Frankreich) zur Verfügung gestellt. Im Einzelnen handelte es sich um 49 *Mannheimia haemolytica*, 60 *Pasteurella multocida*, 70 *E. coli*, 47 *Staphylococcus aureus*, 24 koagulasenegative Staphylokokken und 25 *Streptococcus dysgalactiae* und 24 *Streptococcus uberis* Stämme aus Rindern, sowie 15 *P. multocida*, 39 *Actinobacillus pleuropneumoniae*, 29 *Bordetella bronchiseptica* und 40 *Streptococcus suis* Stämme aus Schweinen.

Enrofloxacin wurde als Bezugssubstanz verwendet mit welcher die anderen Mittel verglichen wurden, da es das am häufigsten genutzte Fluorchinolon in der Veterinärmedizin

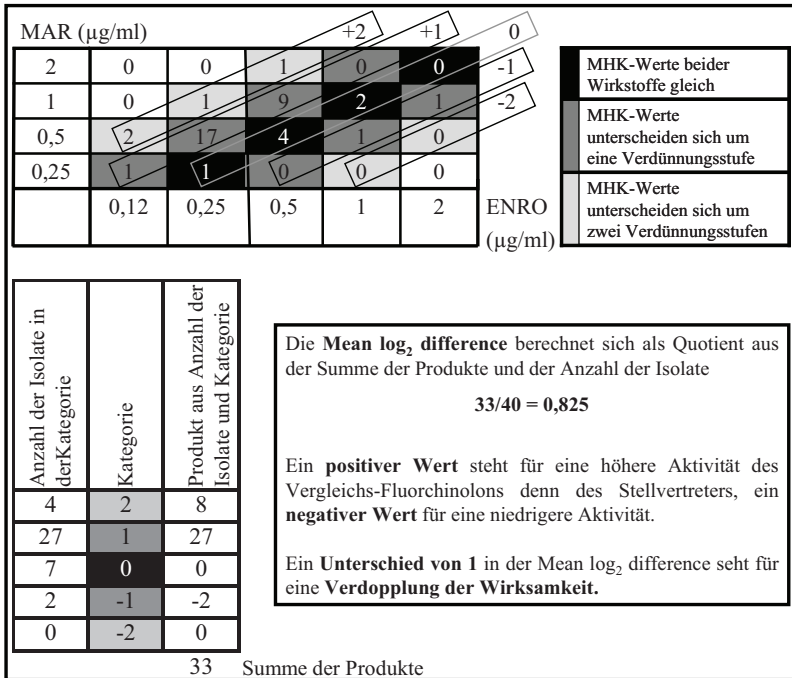
ist. Auch Ciprofloxacin wurde in die Testung einbezogen, da es bei Rindern einen Metaboliten im Abbau von Enrofloxacin darstellt.

Ciprofloxacin zeigte in den Testungen im Allgemeinen eine höhere Aktivität als Marbofloxacin, Difloxacin, Danofloxacin oder Norfloxacin und eine höhere in vitro Aktivität als Enrofloxacin gegen *M. haemolytica*, *P. multocida* und *E. coli*. Enrofloxacin hingegen hatte eine höhere in vitro Aktivität als Ciprofloxacin gegenüber *S. aureus*. Marbofloxacin zeigte höhere Aktivität als Enrofloxacin gegenüber *M. haemolytica*, *E. coli* und *B. bronchiseptica*, jedoch eine geringere gegenüber *P. multocida*, *S. aureus*, koagulasenegativen Staphylokokken, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* und *S. suis*. Danofloxacin hatte eine signifikant geringere Aktivität als Enrofloxacin gegenüber *P. multocida*, *E. coli*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* und *S. suis* (Grobbel et al., 2007c).

### 2.3.2 Erläuterungen

Eine statistisch gut auswertbare Möglichkeit des Wirksamkeitsvergleiches zweier Antibiotika ist die Ermittlung der Mean  $\log^2$  Differenz. Diese entspricht der durchschnittlichen Zahl an Verdünnungsstufen welche zwischen der MHK der Referenzsubstanz (hier Enrofloxacin) und der des Vergleichswirkstoffs liegen. Hierfür muss zunächst für jedes getestete Isolat einzeln festgestellt werden, wie viele Verdünnungsstufen zwischen der Referenz- und der Testsubstanz liegen. Ist die Referenzsubstanz wirksamer, bekommt die Differenz ein positives Vorzeichen (+), ist sie weniger wirksam bekommt die Differenz ein negatives Vorzeichen (-). Die Anzahl der Isolate in den entsprechenden Kategorien wird mit der Differenz der Verdünnungsstufen multipliziert, diese Produkte werden addiert und die resultierende Summe durch die Anzahl der untersuchten Isolate dividiert. Ein positives Ergebnis zeigt an, dass der Referenzwirkstoff (hier Enrofloxacin) wirksamer ist als der Vergleichswirkstoff, ein negatives Ergebnis spricht für eine geringere Wirksamkeit. Da wir mit 2-fachen Verdünnungen arbeiten entspricht eine Mean  $\log^2$  difference von 1 einer Verdopplung bzw. bei negativem Vorzeichen einer Halbierung der Wirksamkeit. Eine Musterrechnung ist in Abb. 2 am Beispiel der 40 untersuchten *S. suis* Isolate und dem Vergleichswirkstoff Marbofloxacin dargestellt.

**Abbildung 2** Schema der Berechnung der Mean log<sub>2</sub> difference



## 3 Diskussion

### 3.1 Resistenzraten

Sowohl *E. coli* als auch *Klebsiella* und *Proteus* spp. besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber Makroliden (Leclercq et al., 1991). Wie erwartet wiesen daher fast alle Isolate gegenüber Erythromycin, Spiramycin, Tilmicosin und Tulathromycin sehr hohe minimale Hemmkonzentrationen (MHK) auf. Ähnliches gilt auch für Clindamycin. Gegenüber den klassischen Penicillinen, wie Penicillin G und Oxacillin, konnten ebenfalls bei allen Isolaten MHK-Werte im resistenten Bereich beobachtet werden. Dies ist durch eine  $\beta$ -Laktamase bedingt, welche ebenfalls in fast allen Bakterien der Familie der *Enterobacteriaceae* vorkommt (Tenover, 2006). Aus diesem Grund werden die für diese Wirkstoffe ermittelten Daten nicht weiter diskutiert. Ähnlich verhält es sich spezifisch für einige Bakterienspezies wie für *Proteus* spp. und Tetracycline, sowie *Klebsiella* spp. und Ampicillin (Wille, 2007).

Die Auswertung der Resistenzraten ist durch die fehlende Verfügbarkeit verwendbarer Grenzwerte leider stark eingeschränkt. Um die Diskussion und den Vergleich der Werte dennoch zu ermöglichen wurden zusätzlich zu den veterinärspezifischen *Enterobacteriaceae*-Grenzwerten für Ampicillin, Enrofloxacin und Gentamicin, allgemein gültige Grenzwerte aus der Humanmedizin bzw. Grenzwerte für andere Bakterien als Staphylokokken oder Streptokokken für Amoxicillin/Clavulansäure, Tetracyclin, Chloramphenicol, Cephalothin, Cefazolin, Sulfamethoxazol und potenzierte Sulfonamide in die Auswertung einbezogen. Eine Sonderstellung nimmt auch in diesem Diskussionspunkt das Fluorchinolon Enrofloxacin ein. Für diesen Wirkstoff lag ein Grenzwert nur für *Enterobacteriaceae* aus dem Urogenitaltrakt und dem Respirationstrakt von Hunden vor. Da jedoch nur ein einziges Katzenisolat in dem Bereich lag welcher deutlich von der sensiblen Population abwich (vgl. Abb. 1), und dieses Isolat mit 16 $\mu$ g/ml eine sehr hohe MHK aufwies, wurden alle Isolate dieser Indikationen auf Grundlage des für Hunde geltenden Grenzwertes beurteilt. Für die *E. coli*-Isolate aus Schweinen und deren Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin wurden ebenfalls die humanmedizinischen Grenzwerte angewandt, da diese Kombination aus Tierart, Bakterienspezies und Infektionsort von dem veterinärmedizinischen Dokument nicht abgedeckt wurde. Da auch kein Grenzwert für die Erreger, die aus Katzen isoliert wurden vorhanden war, die Grenzwerte von Veterinär- und Humanmedizin sich derzeit um nur eine Konzentrationsstufe unterscheiden, und kein Katzenisolat in dieser Spanne lag, wurde auch hier der für Hunde geltende Grenzwert für die Hund/Katze Isolate angewandt. Für die Wirkstoffe Ceftiofur, Cefquinom, Cefoperazon, Tulathromycin, Neomycin, Spectinomycin, Florfenicol und Colistin waren keine CLSI-Grenzwerte vorhanden und somit auch keine Angabe von Prozentsätzen resistenter Isolate möglich. Um dennoch eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten wurden für alle Wirkstoffe MHK<sub>50</sub> und MHK<sub>90</sub> Werte angegeben. Dies entspricht der Konzentration eines Wirkstoffs bis zu der 50 bzw. 90 % der Isolate empfindlich

sind. Diese Werte machen die Ergebnisse verschiedener Studien ohne einheitliche Grenzwerte, jedoch mit ähnlichen Testbedingungen vergleichbar. So können beispielsweise Studien, welche ebenfalls nach CLSI Vorgaben untersucht haben, aber die humanmedizinischen Grenzwerte genutzt haben, mittels der MHK<sub>50</sub>/MHK<sub>90</sub> analysiert werden. Auch bei einer Veränderung der Grenzwerte, welche mit der Zeit unter anderem durch die Erweiterung der Indikationslisten gegeben ist, bleibt die Vergleichbarkeit dieser Grundwerte gegeben.

Die Schwierigkeit der Vergleichbarkeit der Daten mit denen anderer Studien soll an einigen Beispielen erläutert werden.

Wie wichtig eine kritische Diskussion der eigenen Ergebnissen aus anderen Studien ist, zeigt eine Resistenzhebung bei Bakterien aus Otitiden von Hunden (Lyskova et al., 2007). Obwohl in der gesamten Studie ebenfalls nach CLSI-Standard bewertet wurde, fallen hier grundlegende Probleme auf. So werden zunächst alle Gram-negativen Stäbchen für die Testung zu einer Gruppe zusammengefasst. Hierbei ist nicht klar, welche Bakterienspezies in die Testung eingegangen sind, es können jedoch nicht die zuvor in der Studie isolierten und beschriebenen Arten (v.a. *Enterobacteriaceae* und *Pasteurellaceae*) sein, da das Resistenzprofil mit diesen nicht übereinstimmt. So liegt z.B. bei keinem Isolat eine Clindamycin-Resistenz vor, obwohl diese sowohl bei *Enterobacteriaceae* als auch bei Pasteurellen natürlich vorhanden ist.

Ein weiteres Beispiel bietet die Studie von Cooke et al. aus dem Jahr 2002, in welcher es sich dem Titel nach um der Charakterisierung Fluorchinolon-resistenter *E. coli*-Isolate aus dem Urogenitaltrakt von Hunden handelt, welche des Weiteren jedoch auch Resistenzen der Isolate gegenüber anderen Antibiotika angibt (Cooke et al., 2002). In dieser Studie sind die Selektion der Proben und die Verwendung verschiedener Untersuchungsmethoden ein großes Problem für die Vergleichbarkeit der Daten. So werden alle direkt in der Klinik isolierten *E. coli* aus Harnproben verwendet, während aus anderen Praxen nur Enrofloxacin-resistente Isolate in die Testung gingen. Die Untersuchung der Klinikisolate erfolgt mittel Boillon-Mikrodilution während die anderen Isolate per Agardiffusion untersucht wurden. Die MHK-Werte wurden angeblich nach CLSI Kriterien ermittelt und ausgewertet, die angegebenen Grenzwerte überschritten jedoch die aktuell von der CLSI angegebenen um bis zu vier Verdünnungsstufen (CLSI, 2008). Über die Untersuchungs- und Auswertungskriterien der Isolate aus den umliegenden Praxen werden keinerlei Angaben gemacht. Die Auswertung der Resistenzdaten wird ohne jede Unterscheidung der internen und externen Isolate aufgeführt. Trotz der extrem hoch angesetzten Grenzwerte gibt es eine sehr hohe Anzahl an Resistenzen, welche nicht allein durch die Selektion der Isolate auf ihre Fluorchinolon-Resistenz zurückführbar ist, da auch 20 gegenüber diesem Wirkstoff sensible Isolate in die Testung einbezogen wurden. Zu hohe Grenzwerte sollten eigentlich zu einer falsch niedrigen Zahl der Resistenzen führen, es muss also von einer fehlerhaften Auswertung ausgegangen werden.



Studien wie diese von Lyskova und Cooke vermitteln ein falsches Bild der Resistenzlage. Eine vergleichende Diskussion der im BfT-GermVet ermittelten Daten mit Studien mit eingeschränkter Glaubwürdigkeit oder unklaren Methoden ist daher abzulehnen und erfolgt nur dort, wo keine seriösen Vergleichsdaten vorliegen unter kritischer Beleuchtung des Studiendesigns.

Schwierig gestaltet sich auch der Vergleich mit Studien nach anderem Standard. Hier muss beachtet werden, dass sich die Grenzwerte trotz teilweise sehr ähnlicher Testung extrem unterscheiden können. So arbeitet z.B. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), welches die für Europa gültige Richtlinie werden soll, mit epidemiologischen Grenzwerten (Cut-Off-Values) ähnlich dem in Abb.1 dargestellten biologischen Grenzwert. Dies macht einerseits die Erstellung von Grenzwerten leicht und auch die Handhabung wird vereinfacht, da der gleiche Grenzwert für alle Tierarten und Organsysteme herangezogen wird. Jedoch haben diese Daten einen geringen klinischen Aussagewert, da Pharmakodynamik und Pharmakokinetik der Wirkstoffe nicht berücksichtigt werden. Die beispielsweise vom CLSI angebotenen klinischen Grenzwerte (Breakpoints) beziehen hingegen diese pharmakologischen Gesichtspunkte mit ein. Hieraus resultieren unterschiedliche Grenzwerte für die gleichen Arten Bakterien von verschiedenen Tierarten sowie verschiedenen Organsystemen, und nur dies macht die Ergebnisse verwertbar für den klinischen Gebrauch. Nachteilig ist jedoch, dass bisher nicht für alle Indikationen Grenzwerte existieren. So konnte in den vorliegenden Publikationen für einen großen Teil der Isolate kein Grenzwert und somit auch keine Resistenzraten angegeben werden.

Ein weiterer kritischer Punkt ist der Vergleich der Daten mit solchen, welche in einem anderen Zeitraum ermittelt wurden. Dies wurde in den vorliegenden Publikationen zum Teil notwendig, da kaum andere Vergleichsdaten verfügbar waren. Prinzipiell sollten Resistenzdaten jedoch nur mit früheren Daten des gleich gestalteten Monitorings verglichen werden, um einen zeitlichen Verlauf der Resistenzentwicklung darstellen zu können. Auch beim Vergleich mit Daten aus anderen Ländern muss immer bedacht werden, dass unter Umständen die Zulassungslage eine andere ist, bzw. dass die Haltungsbedingungen der Tiere stark variieren können. Beide Aspekte haben Einfluss auf die Resistenzentwicklung.

### **3.1.1 Resistenzen in aus Schweinen isolierten *Enterobacteriaceae***

#### **3.1.1.1 Infektionen des Urogenitaltrakts (inklusive Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom)**

Da das BfT-GermVet ergänzende Daten zu dem bereits bestehenden GERM-Vet des BVL lieferte und bereits von dem bestehenden Monitoring erfasste Pathogene nicht aufgenommen wurden, beschränken sich die Daten von Bakterien porciner Herkunft auf *E. coli* aus dem Urogenitaltrakt (UGT) inklusive dem Mastitis-Metritis-Agalaktie-Syndrom (MMA). Diese

multifaktorielle puerperale Erkrankung betrifft nicht nur die Sauen, sondern kann zu Ferkelverlusten, verminderter Gewichtszunahme der Ferkel und Fruchtbarkeitsproblemen wie Brunstlosigkeit und Umrauschen führen. All diese Faktoren können eine große wirtschaftliche Rolle spielen. Zur Vorbeugung solcher Infektionen sollte auf jeden Fall auf ein gutes Futter- und Hygienemanagement der Betriebe geachtet werden. Ist die Infektionskrankheit jedoch ausgebrochen, sollte eine antibiotische Behandlung unter Beachtung der Resistenzlage eingeleitet werden. Einer der Haupterreger dieser Erkrankung ist *E. coli* (Korudzhinski et al., 1987; Gerjets et al., 2009).

Ein direkter Vergleich mit Daten aus dem GERM-Vet von Isolaten aus dem GIT von Schweinen zeigt allgemein niedrigere Resistenzraten in den Isolaten aus Infektionen des UGT (Schroeder et al., 2007). Ein Vergleich mit Daten anderer Monitoringprogramme aus dem gleichen Untersuchungszeitraum wird durch unterschiedliche Auswahl- und/oder Auswertungskriterien erschwert. So behandelt ein Großteil dieser Studien *E. coli* von Schweinen nur als Indikatorbakterien für Resistenz, wobei die Proben zu diesem Zweck entweder aus Kotproben gesunder Tiere oder aus Schweinefleisch gewonnen wurden (NARMS, 2004; NORM-VET, 2004; SVARM, 2005; DANMAP, 2006). Es handelt sich dementsprechend häufig um kommensale *E. coli*, also um Bakterien welche vom Überschuss des Wirtes leben ohne ihn zu schädigen (Kaper et al., 2004). Diese tragen häufig nur eine relativ geringe Anzahl Virulenz assoziierter Gene und lösen somit in einem Wirt mit gutem Immunstatus im Normalfall keine Infektion aus. In der Resistenztestung spielen diese Bakterien eine Rolle als mögliches Reservoir mobiler genetischer Elemente. Diese beinhalten häufig Resistenzgene und können zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien ausgetauscht werden, weshalb diese Bakterien als Indikator für Resistenzen angesehen werden (SVARM, 2008). Im Gegensatz zu kommensalen verfügen pathogene *E. coli* häufig über eine größere Anzahl von Virulenz assoziierten Genen, welche zum Beispiel die Adhäsion an den Wirtszellen, die Invasion oder verbesserte Eisenaquirierung vermitteln können. Diese Faktoren befähigen die entsprechenden Bakterienstämme eine Infektionskrankheit auszulösen. Da das BfT-GermVet auf eben diese pathogenen Krankheitserreger ausgerichtet ist, wurden nur aus erkrankten Tieren isolierte Bakterien in die Studie eingeschlossen. Hier ist die Ermittlung der Resistenzen essentiell um den Erfolg der Behandlung zu gewährleisten. Die in dem Monitoring ermittelten Daten kommen so auch dem Praktiker zugute, welcher sie neben eigenen praxisspezifischen Erfahrungen in seine primär kalkulierte Therapie einbeziehen kann.

Der DANMAP Report 2005 zeigt, dass es zwischen den Resistenzraten der Indikatorbakterien und der Isolate aus diagnostischen Proben innerhalb einer Tierart sehr große Unterschiede geben kann (Tetracyclin 28 % / 66 %, Chloramphenicol 2 % / 25 %) (DANMAP, 2006). Auch Boerlin et al. wiesen in *E. coli*-Isolaten aus Schweinen mit Durchfall höhere Resistenzraten nach, als in denen aus gesunden Tieren (Boerlin et al., 2005).

Nach Veröffentlichung der dieser Promotion zugrundeliegenden Publikationen wurden die Daten der ARBAO-II Studie (Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin) aus etwa dem gleichen Zeitraum veröffentlicht. Sie fasst die Resistenzdaten von *E. coli*-Isolaten erkrankter Schweine aus 12 Europäischen Staaten (B, DK, E, FIN, F, LV, NL, N, P, ES, S, CH) aus dem Zeitraum 2002 - 2004 zusammen (Hendriksen et al., 2008). Deutsche Vergleichsdaten wurden in die Studie nicht einbezogen. Zwischen den verschiedenen Ländern gab es sehr große Unterschiede in den Resistenzraten. Innerhalb eines Landes waren die Raten über die drei beobachteten Jahre hinweg jedoch relativ konstant. Ein Problem der Studie von Hendriksen et al. stellte jedoch die Datenerhebung dar, da die einzelnen Labore die Resistenztestung nach ihrer jeweils etablierten Methode durchgeführt hatten und nur die Daten zentral gesammelt und ausgewertet wurden. Auch variiert die Anzahl der einbezogenen Isolate von Land zu Land so stark (Portugal 33–45 Isolate pro Jahr, Frankreich 758–1448 Isolate pro Jahr), dass eine Verzerrung der Daten angenommen werden muss. So schwanken zum Beispiel die Resistenzraten für Ampicillin zwischen 7,0 % in Norwegen bis zu 72,3 % in Belgien, die für Tetracyclin zwischen 24,0 % in Norwegen bis zu 98,0 % in Portugal. Dies deckt sich zwar trotz der genannten Problematiken der Studie mit dem allgemeinen Nord-Süd Gefälle, welches für Resistenzen in Europa beobachtet wird (EARSS, 2008). Bei einem Vergleich der ARBAO-II-Studie mit den Raten des BfT-GermVet läge Deutschland im guten Mittelfeld resp. unteren Drittel. Dieser direkte Vergleich ist jedoch aufgrund der Unterschiede in Studiendesign und angewandten Methoden nicht zulässig. Hier wird einmal mehr deutlich, wie wichtig eine Vereinheitlichung der Resistenztestung in Europa ist, da so auch Länder übergreifende Vergleiche möglich wären.

### **3.1.2 Resistenzen in aus Pferden isolierten *Enterobacteriaceae***

#### **3.1.2.1 Infektionen des Genitaltrakts**

Bei Pferden spielen bei Infektionskrankheiten der enge Kontakt zu den Besitzern und die damit verbundene Gefahr der Übertragung resistenter zoonotischer Bakterien, die Tiergesundheit, aber auch wirtschaftliche Interessen eine Rolle. Sterilität oder gar Aborte bei Zuchtstuten können zu hohen finanziellen Verlusten durch Decktaxen und Tierarztkosten führen. Auch müssen diese Stuten mitunter dauerhaft aus dem Zuchtbetrieb entfernt werden. Dass diese Fertilitätsprobleme durch ansonsten klinisch inapparente Infektionen mit Enterobakterien verursacht werden können, ist schon seit längerem bekannt (Aurich, 2005). Weiterhin können diese Erreger während der Geburt an das Fohlen weitergegeben und hier sogar zur neonatalen Septikämie führen (Knottenbelt et al., 2007). Dennoch sind nur wenige Resistenzdaten über für Pferde pathogene Bakterien verfügbar. Die *E. coli*-Isolate aus dem equinen Genitaltrakt haben bislang nur in einem nationalen Resistenzmonitoringprogramm in Schweden Beachtung gefunden (SVARM, 2006). Nach der initialen Untersuchung im BfT-

GermVet wurden von Pferden isolierte Bakterien nun auch in das laufende BVL-GERMVet Monitoring aufgenommen, es liegen jedoch noch keine Daten aus den Folgejahren vor, so dass hier noch kein Verlauf dargestellt werden kann.

Ein Vergleich der Resistenzraten von *E. coli* und *Klebsiella* spp. aus dem equinen Genitaltrakt zeigt niedrigere Resistenzraten von Klebsiellen gegenüber Sulfonamiden (*E. coli* 28 % / *Klebsiella* spp. 19 %), Tetracyclin (*E. coli* 17 % / *Klebsiella* spp. 11 %), Chloramphenicol (*E. coli* 17 % / *Klebsiella* spp. 3 %), potenzierten Sulfonamiden (*E. coli* 16 % / *Klebsiella* spp. 11 %), Gentamicin (*E. coli* 10 % / *Klebsiella* spp. 0 %), Amoxicillin/Clavulansäure (*E. coli* 7 % / *Klebsiella* spp. 0 %) und Cephalothin (*E. coli* 6 % / *Klebsiella* spp. 0 %). Eine Auswertung der Daten für Enrofloxacin zeigt, dass keines der 36 *Klebsiella*-Isolate eine MHK > 0,06 µg/ml aufwies, während von den 102 getesteten *E. coli* elf Isolate diesen Wert überschritten, neun davon waren selbst durch die höchste hier eingesetzte Konzentration (16 µg/ml) nicht im Wachstum hemmbar.

Ein direkter Vergleich der Resistenzraten von *E. coli*-Isolaten aus dem Genitaltrakt von Stuten und aus dem gleichen Zeitraum war teilweise zwischen SVARM und BfT-GermVet möglich. In dem schwedischen Resistenzmonitoring wurden in den Jahren 2004-2006 473 *E. coli*-Isolate aus diagnostischem Untersuchungsmaterial aus dem Genitaltrakt von Stuten untersucht. Allgemein lagen die Resistenzraten der Isolate unter denen der deutschen (Tetracyclin 6-10 % / 17 %, Ampicillin 4-10 % / 18 %, Gentamicin 2-4 % / 9 %) (SVARM, 2007). Ein Vergleich der MHK-Werte ohne verfügbaren Grenzwert zeigte ebenfalls weniger schwedische als deutsche Isolate im MHK-Bereich  $\geq 0,25$  µg/ml für Enrofloxacin (3-5 % / 11 %). Die Daten des SVARM zeigen für 2007 nur noch 1 % resistenter Isolate gegenüber Fluorchinolonen. Dies ist der niedrigste Wert seit Beginn der Studienaufzeichnungen in 1992 bei allgemein konstantem Verbrauch dieser Substanzen in der Veterinärmedizin über diesen Zeitraum. Leider sind auch in dem schwedischen Monitoring die Zahlen nicht nach Tierarten aufgeschlüsselt. So ist hierbei nicht klar, welcher Anteil der eingesetzten Antibiotika hier auf die Behandlung von Pferden verwendet wurde oder welche Anzahl von Tieren behandelt wurde. Demnach können trotz der vorliegenden Daten keine Aussage über eine Korrelation der Entwicklungen von Antibiotikaverbrauch und -resistenz getroffen werden.

Ein Vergleich der Ergebnisse der *Klebsiella*-Isolate mit equiner Herkunft gestaltet sich noch schwieriger als jener der entsprechenden *E. coli*-Isolate. Hier stellt das BfT-GermVet die erste nationale Resistenzerhebung dieser Pathogene überhaupt dar. Vergleichsdaten sind dementsprechend rar. Eine amerikanische Studie von 1993 gibt MHK<sub>50</sub>- und MHK<sub>90</sub>-Werte für *Klebsiella pneumoniae* von Pferden an, welche im Allgemeinen eine bis vier Verdünnungsstufen über den hier ermittelten MHK-Werten für Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamicin, Tetracyclin und Spectinomycin lagen (Burrows et al., 1993). Eine weitere amerikanische Studie beschäftigte sich 2003 unter anderem auch mit Klebsiellen

von Pferden (Jacks et al., 2003), da in dieser Studie jedoch nur 10 Isolate getestet wurden und auch die Konzentrationsbreite der getesteten Antibiotika sehr klein war, ist ein direkter Vergleich der Werte abzulehnen.

Parallel zu der Veröffentlichung der hier vorliegenden Daten wurde ein Artikel zu bakteriellen Infektionen des equinen Genitaltraktes und der Resistenzsituation der Erreger veröffentlicht (Frontoso et al., 2008). Bei diesen, in Italien gesammelten Proben, wurden neben  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken und *E. coli* auch *Klebsiella* spp. als Ursache für Sterilität und Aborte aufgeführt, ohne jedoch weiter auf die Resistenz dieser Isolate einzugehen. Detaillierte Resistenzraten wurden in der italienischen Studie für 64 nicht haemolisierende *E. coli* angegeben, welche für Ampicillin (48,4 %), Tetracyclin (43,8 %), Amoxicillin/Clavulansäure (15,6 %) und Gentamicin (15,6 %) zum Teil weit über den im BfT-GermVet festgestellten Werten lagen (18 %, 17 %, 1 %, 9 %), wohingegen die Werte für potenzierte Sulfonamide und die der Isolate mit MHK-Werten von  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$  für Fluorchinolone mit den hier gezeigten nahezu identisch waren. Die Resistenztestung erfolgte in der Studie nach der veterinärmedizinischen CLSI Vorgabe, jedoch wurden, anders als im BfT-GermVet, intermediär eingestufte Isolate bei der Beurteilung den sensiblen Isolaten zugeordnet. Da in der vorliegenden Studie jedoch nur gegenüber Cephalothin und Chloramphenicol intermediär eingestufte Isolate beobachtet wurden, und diese Wirkstoffe in der italienischen Studie nicht untersucht wurden, hatte die Abweichung in der Auswertung keine Auswirkung auf die Vergleichbarkeit der Studien. Eine prinzipielle Zuordnung der intermediär eingestuften Isolate zu den sensiblen wurde im BfG-GermVet abgelehnt, da davon ausgegangen werden muss, dass diese Isolate eine Art von Resistenzmechanismen besitzen müssen und bei einer Behandlung mit dem Antibiotikum die Gefahr des Therapieversagens bestünde (CLSI, 2002).

### **3.1.3 Resistenzen in aus Hunden und Katzen isolierten *Enterobacteriaceae***

#### **3.1.3.1 Infektionen des Respirationstrakts**

Aus dem Respirationstrakt von Hunden und Katzen wurden insgesamt 28 *E. coli*-Isolate in die Testung einbezogen. Diese Anzahl ist relativ gering, woraus jedoch nicht geschlossen werden darf, dass diese Erreger keine Rolle bei Infektionen dieses Organsystems spielen. Häufig kommt es erst nach viraler Vorschädigung der Atemwege zu einer bakteriellen Infektion, welche bei unsachgemäßer Behandlung zu chronischen Erkrankungen des Organsystems führen kann (Clercx et al., 2006). Frühere Studien fanden eine *E. coli* Beteiligung von 7,7 - 24,6 % in Infektionen des Respirationstrakts von Hunden und 14,3 % in dem von Katzen (Oluoch et al., 2001; Meier, 2004).

Die in der vorliegenden Studie ermittelten Resistenzraten für dieses Organsystem deckten sich in etwa mit den hier ermittelten Werten für Isolate aus dem UGT und GIT. Für die

Antibiotika Ampicillin und Sulfamethoxazole lagen die ermittelten Werte mit 39 % und 43 % jedoch deutlich höher (UGT 24 % und 18 %; GIT 14 % und 15 %), was jedoch durchaus durch eine Verzerrung aufgrund der geringen Anzahl an Isolaten zurückgeführt werden könnte.

Oluoch et al. führten in ihrer Studie von 2001 ebenfalls eine Resistenztestung der von ihnen isolierten *E. coli* aus Infektionen des Respirationstrakts durch. Da dort die Ergebnisse jedoch mittels Agardiffusion nach nicht näher benanntem Standard ermittelt und ohne weitere Aufteilung in die Organsysteme wiedergegeben wurden, ist ein direkter Vergleich der Daten nicht zulässig (Oluoch et al., 2001).

Die schweizer Studie von Meier et al. wies mittels Agardiffusion für *E. coli* von Hunden allgemein höhere Raten resistenter Isolate auf als sie in der hier vorliegenden Studie ermittelt wurden, ohne jedoch die Ergebnisse weiter nach Organsystemen zu unterteilen. So zeigten dort beispielsweise nur 7 % der im Rahmen des BfT-GermVet untersuchten *E. coli*-Isolate aus dem Respirationstrakt eine Resistenz gegenüber Enrofloxacin, während dies in der schweizer Studie bei 18 – 19 % der Isolate festgestellt wurde (Meier, 2004).

### 3.1.3.2 Infektionen des Urogenitaltrakts

Bei Hunden sind ein großer Teil der Erkrankungen des Harnapparats bakterielle Infektionen. Am häufigsten sind hier *E. coli* (30 %) die Auslöser, in 9 % können *Proteus* spp. nachgewiesen werden und auch *Klebsiella* spp. werden regelmäßig als Auslöser von Infektionen dieses Organsystems identifiziert (Haller et al., 2006). Ähnlich ist das Keimspektrum in den Infektionen des Genitaltrakts, wobei beim Hund besonders die Pyometra und die Junghundvaginitis hervor zu heben sind, welche häufig durch diese primär opportunistischen Bakterien ausgelöst werden (Arnold-Gloor et al., 2006). Bei Katzen stehen hingegen idiopathische Gründe und die Steinbildung als Auslöser von Harnwegsinfektionen im Vordergrund. Bakterielle Infektionen kommen im Vergleich zum Hund seltener vor, gleichzeitig können sie jedoch sowohl Auslöser als auch Folge von Steinbildungen sein (Neiger, 2003). Da wie bereits beschrieben neben *E. coli* auch andere *Enterobacteriaceae*-Gattungen häufige Infektionserreger im Urogenitaltrakt darstellen (Neiger, 2003; Meier, 2004; Haller et al., 2006), wurden neben 100 *E. coli* auch 37 *Proteus*- und 17 *Klebsiella*-Isolate in die Testung einbezogen. Ein Vergleich der Daten der verschiedenen Bakterienspezies zeigt, dass neben den natürlichen Resistenzunterschieden die *Klebsiella*-Isolate die höchsten Resistenzraten gegen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika aufweisen. Auch bei den übrigen Raten liegen *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. zum Teil deutlich über denen von *E. coli*. Eindrucksvollstes Beispiel ist hier Enrofloxacin, bei welchem nur 7 % der *E. coli* im resistenten Bereich liegen, während es bei *Proteus* spp. 22 % und bei *Klebsiella* spp. sogar 29 % sind.

Die *E. coli*-Daten konnten mit einer schwedischen Studie verglichen werden, welche sich mit Isolaten aus Harnproben und Pyometren von Hunden befasste (Hagman et al., 2005). Hier wurden unter vergleichbaren Testbedingungen zwischen 2004 und 2006 917 *E. coli*-Isolate untersucht. Niedrigere Resistenzraten der schwedischen Isolate im Vergleich zu den deutschen wurden für Ampicillin (10-22 % / 24 %), Chloramphenicol (0 % / 9 %), Tetracyclin (4-13 % / 15 %) und Sulfamethoxazol (8 % / 18 %) festgestellt. Die ermittelten Raten für potenzierte Sulfonamide, Enrofloxacin und Gentamicin hingegen entsprachen mit 14 %, 4-9 % und 0-2 % in etwa denen der vorliegenden Studie (potenzierte Sulfonamide 11 %, Enrofloxacin 7 %, Gentamicin 3 %). Eine Resistenzstudie aus der Schweiz (Lanz et al., 2003) untersuchte 93 *E. coli*-Isolate aus Hunden und Katzen mit Harnwegsinfektionen mit dem von der CLSI vorgegebenen Agardiffusions-Test. Die hierdurch ermittelten Resistenzraten für Amoxicillin/Clavulansäure, Cephalothin, Gentamicin, potenzierte Sulfonamide, Enrofloxacin, Tetracyclin und Chloramphenicol wichen zu maximal 3 % von den im BfT-GermVet ermittelten Werten ab, der Wert für die in der Schweiz ermittelte Ampicillin-Resistenz lag um 6 % unter dem der deutschen Isolate.

Obwohl *Proteus* spp. nach *E. coli* die am häufigsten isolierten Bakterien aus Infektionen des UGT bei Hunden darstellen (Cohn et al., 2003; Meier, 2004; Haller et al., 2006), gibt es keine vergleichbare Resistenzstudie für diese Pathogene. Auch für den humanen Urogenitaltrakt, wo diese Bakterienspezies ebenfalls relativ häufig isoliert wird (Murray et al., 2003), sind hier kaum Daten vorhanden. Dies zeigt um so mehr die Bedeutung der hier gewonnen Ergebnisse.

Die geringe Anzahl gesammelter und getesteter *Klebsiella*-Isolate ( $n = 17$ ) impliziert eine geringere Bedeutung dieser Erreger in Harnwegsinfektionen und schränkt die Aussagekraft ein. Dennoch zeigen auch hier die im Vergleich zu *E. coli* höheren Resistenzraten dieser opportunistischen Bakterienspezies die Notwendigkeit des Monitorings. Der Vergleich der gewonnen Daten mit denen aus anderen Studien gestaltet sich auch hier schwierig. Burrows et al. ermittelten unter ähnlichen wie den hier verwendeten Testbedingungen in einer Studie einer amerikanischen Kleintierklinik die MHK-Werte von 49 *K. pneumoniae*-Isolaten aus diagnostischen Proben von Hunden und Katzen (Burrows et al., 1993). Ohne weitere Einteilung der Isolationslokalisation wurden höhere  $MHK_{50}$ -Werte für Cephalothin (32 µg/ml), Tetracyclin (4 µg/ml), Sulfonamide ( $> 400$  µg/ml) und Spectinomycin (32 µg/ml) angegeben als die in der vorliegenden Studie ermittelten (Cephalothin 8 µg/ml, Tetracyclin 1 µg/ml, Sulfonamide 32 µg/ml, Spectinomycin 8 µg/ml). Eine Diskussion der  $MHK_{90}$ -Werte ist auf Grund der geringen Konzentrationsbreite der Vergleichsstudie nicht möglich.

### 3.1.3.3 Infektionen von Haut/Ohr/Maul

Bei Betrachtung der an Infektionen der Haut beteiligten Bakterien stößt man nach Staphylokokken und Streptokokken an dritter bis siebter Stelle auf *Proteus* spp. (Meier,

2004), weshalb 30 Isolate aus diesem Organsystem in das BfT-GermVet einbezogen wurden. Auch Isolate, die bei Otitis externa gewonnen wurden, wurden hier eingeschlossen. Von dieser Erkrankung sind etwa 6-20 % der Hund betroffen (Kohn et al., 2006). Neben anatomischen, immunologischen und parasitären Ursachen spielen Bakterien wie Pseudomonaden, Staphylokokken und auch *Proteus* spp. in diesem Krankheitsbild eine große Rolle (Meier, 2004). Aufgrund der vielfältigen Krankheitsursachen werden zur Behandlung häufig lokale Präparate mit einer Mischung aus Antibiotika, Antimykotika und/oder Corticosteroiden eingesetzt (Kohn et al., 2006).

Meier et al. konnten *Proteus* sp. in ca. 10 % der Ohr- und Hauttupfer von Hunden, jedoch nicht in Ohr- und Hauttupfer von Katzen nachweisen. Die schweizer Studie zeigte aufgesplittet nach Tierart für *Proteus* ssp. ähnliche Resistenzraten gegenüber Ampicillin (24-42 %), Chloramphenicol (24-32 %), Sulfamethoxazol (33-46 %) und potenzierten Sulfonamiden (26-42 %) wie sie in der vorliegenden Studie für Isoalte aus Haut und Ohr ermittelt wurden (Ampicillin 23 %, Chloramphenicol 37 %, Sulfamethoxazol 37 %, potenzierte Sulfonamide 37 %). Während im BfT-GermVet kein Isolat eine Resistenz gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure aufwies, wurde diese bei Meier et al. in 27-42 % der Isolate nachgewiesen. Anders sah es für Enrofloxacin aus, hier wurde in den Isolaten der vorliegenden Studie in 27 % eine Resistenz festgestellt, in denen aus der Schweiz nur in 4-17 % (Meier, 2004). Zu beachten ist bei diesem Vergleich jedoch, dass die Resistenzdaten der *Proteus*-Isolate der Vergleichsstudie nicht nach Organsystemen aufgeschlüsselt waren.

In einer kanadischen veterinärmedizinischen Universitätsklinik wurden Resistenzdaten von *Proteus* Isolaten aus Hunden mittels Agardiffusion nach CLSI ermittelt, jedoch ebenfalls ohne Angabe des Organsystems aus dem die Bakterien isoliert wurden (Authier et al., 2006). In der Studie wurden höhere Resistenzraten für Ampicillin (74 %) und niedrigere für potenzierte Sulfonamide (15 %) und Enrofloxacin (5 %) ermittelt als in der vorliegenden Studie. Beide Untersuchungen zeigten niedrige Resistenzraten (< 5 %) für Gentamicin und Amoxicillin/Clavulansäure.

Eine nach der Publikation der vorliegenden Daten veröffentlichte und eingangs bereits erwähnte Studie über Otitiserreger bei Hunden zeigte eine Beteiligung von *Proteus* spp. in 14,4 % der beobachteten Fälle (Lyskova et al., 2007). In der ebenfalls durchgeführten Resistenztestung wurden jedoch alle Gram-negativen Stäbchen zu einer Kategorie zusammengefasst. Die gewonnenen Daten zeigen insgesamt niedrige Resistenzraten, wobei jedoch nicht auszumachen ist, ob die *Proteus*-Isolate in die Testung einbezogen waren, zumal keine für *Proteus* spp. typische Tetracyclin-resistenten Isolate beobachtet wurden.

Die bereits bei Infektionen des UGT diskutierte Studie von Burrows et al. zeigt für *Proteus*-Isolate aus der Haut von Hunden mit einer MHK<sub>50</sub> gegenüber Ampicillin von 1 µg/ml deutlich niedrigere Werte als für die aus dem UGT mit 4 µg/ml (Burrows et al., 1993). Die



MHK<sub>50</sub>-Werte für Cephalothin, Chloramphenicol, Gentamicin und Spectinomycin waren vergleichbar mit den im BfT-GermVet ermittelten Werten.

### 3.1.3.4 Infektionen des Gastrointestinaltrakts

Die Frage nach der Beteiligung von *E. coli* an einer Erkrankung des Gastrointestinaltrakts ist selten eindeutig. Diese Bakterienspezies gehört zur autochthonen Flora des gesunden Intestinaltraktes, wodurch die Abgrenzung von kommensalen und pathogenen Stämmen noch erschwert wird. Die Bestimmung der von den Isolaten exprimierten Virulenzfaktoren könnte hier Aufschluß bringen, ist jedoch in der Praxis nicht in der alltäglichen Diagnostik durchführbar. Sancar et al. konnten jedoch 2004 in einer Studie mit Proben aus an Durchfall erkrankten Hunden in 20 von 23 isolierten *E. coli* Isolaten Virulenzfaktoren wie Toxine und Adhäsionsfaktoren feststellen, welche für entereropathogene *E. coli* charakteristisch sind (Sancar et al., 2004). Dies spricht für die kausale Beteiligung dieser Bakterienspezies bei einem Großteil dieser akuten Krankheitsgeschehen. Zudem kommt es im Gastrointestinaltrakt zum direkten Kontakt verschiedenster Bakterienspezies, wodurch die Möglichkeit der Übertragung mobiler genetischer Elemente gegeben ist und somit auch von Resistenzgenen (Scott, 2002).

Die ermittelten Resistenzraten von 100 *E. coli*-Isolaten aus dem GIT von Hunden und Katzen waren allgemein 1-3 % niedriger als die von den Isolaten aus dem UGT. Die Amoxicillinresistenz lag sogar um 10 % niedriger (UGT 24 %, GIT 14 %). Im Vergleich zu den Isolaten aus dem Respirationstrakt lagen die beobachteten Raten 2-25 % niedriger. Nur gegen Tetracyclin zeigten 3 % mehr Isolate aus dem GIT eine Resistenz als Isolate aus dem Respirationstrakt.

Ein Vergleich mit *E. coli* aus dem gesunden GIT norwegischer Hunde zeigt vergleichbare Resistenzraten für Sulfonamide und Gentamicin (NORM-VET, 2004). In der Tetracyclinresistenz zeigten sich hier jedoch deutliche Unterschiede (Norwegen 3 %, Deutschland 18 %). Diese Werte spiegeln sich in den Antibiotikaverbrauchszahlen der Veterinärmedizin wieder, bei welchen in Deutschland Tetracycline mit 53,2 % an erster Stelle stehen (Schneidereit, 2008), während sie in Norwegen im beobachteten Zeitraum nur 3,3 % der in der Veterinärmedizin eingesetzten Antibiotika ausmachten (NORM-VET, 2004).

### 3.1.4 Fluorchinolon-Resistenz

Da die Fluorchinolone eine große Bedeutung in der Humanmedizin einnehmen und mittlerweile in vielen Ländern ein Einsatzverbot für diese Wirkstoffe in der Veterinärmedizin gefordert wird bzw. teilweise auch schon durchgesetzt wurde, wie beispielsweise der Einsatz

bei Hühnern in den USA (Prescott, 2006), soll hier noch einmal besonders auf die Resistenzsituation gegenüber diesen Wirkstoffen im Vergleich mit humanmedizinischen Daten eingegangen werden.

Im nicht intensivmedizinischen Bereich der Humanmedizin sind laut GENARS (German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance) die Fluorchinolon-Resistenzraten in *E. coli* von 2002 bis 2006 von 9,3 auf 22,3 % gestiegen, bei *K. pneumoniae* von 2,6 auf 9,8 % und bei *Proteus mirabilis* von 2,9 auf 4,9 %. Laut EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) stieg der Anteil Fluorchinolon-resistenter Isolate von 1999 bis 2007 bei *E. coli* von 4,3 auf 28,9 % und bei *K. pneumoniae* von 2005–2008 von 5,7 auf 7,7 %, wobei in der Zwischenzeit aber auch Resistenzraten von über 12 % berichtet wurden. Die PEG-Resistenzstudie gibt im Zeitraum von 1995 bis 2004 einen Anstieg der Resistenzrate in *E. coli* von 5,2 auf 21,9 %, in *Proteus mirabilis* von 3,7 auf 8,2 % an. Für *K. pneumoniae* gehen die Werte von 3,6 % in 1995 über 1,1 % in 1998 auf 6,0 % in 2001, um dann 2004 erneut auf 5,2 % abzusinken (Kresken et al., 2008). Die in den hier vorliegenden Studien ermittelten Werte waren also nicht deckungsgleich zu den aktuellen Werten der Humanmedizin. Während die *E. coli* Isolate mit 2,3–9,8 % einen geringeren Anteil von Isolaten mit einer MHK > 0,5 µg/ml aufwiesen, lagen bei *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. mit 35,3 % und 22–27 % deutlich mehr Isolate in diesem Bereich als in der Humanmedizin resistent eingestuft wurden. Eine Ausnahme bildeten die *Klebsiella*-Isolate aus dem Genitaltrakt von Pferden, bei welchen kein Isolate mit einer MHK > 0,06 µg/ml nachgewiesen wurde. Eine Erklärung für die allgemein höheren Werte in *Klebsiella* und *Proteus* spp. könnte hier erneut die geringe Anzahl und der Vorbehandlungsstatus der Isolate aus der Veterinärmedizin sein. Sie stammten im Vergleich zu den *E. coli*-Isolaten häufiger aus vorbehandelten Tieren bzw. Tieren mit unbekanntem Vorbehandlungs-Status. Es könnte also davon ausgegangen werden, dass diese Isolate vermehrt erst nach fehlgeschlagener Erstbehandlung und somit nach Selektionierung resistenter Isolate gewonnen wurden.

Zieht man die veterinärmedizinischen Resistenzraten gegenüber Fluorchinolonen aus anderen Ländern zum Vergleich heran, so fallen deutliche Unterschiede auf. Die bereits zuvor erwähnte ARBAO II Studie zeigt ebenfalls extrem hohe Resistenzraten (bis zu 76 %) in Isolaten aus portugiesischen Schweinen, bei gleichzeitig niedrigen Raten (0–4 %) in aus Schweinen isolierten Bakterien aus Dänemark, Belgien, Finnland und der Schweiz (Hendriksen et al., 2008). Die in der vorliegenden Studie ermittelten Daten lägen mit 7-17 % also im europäischen Vergleich im guten Mittelfeld. Bei den extrem hohen Werten aus Portugal muss jedoch die geringe Zahl der untersuchten Isolate und die damit verbundene Verzerrung der Werte bedacht werden, was diese Aussage relativiert.

Betrachtet man die Menge der eingesetzten Antibiotika in Human- und Tiermedizin so ist der Fluorchinolon-Verbrauch im ambulanten Bereich der Humanmedizin mit knapp 25 t pro

Jahr deutlich höher als in der Tiermedizin mit knapp 4 t pro Jahr (Kern et al., 2008). Auch in der Tiermedizin selbst machten die Chinolone in den vergangenen Jahren mit 3,5–3,7 t nur etwa 0,5 % der angewendeten Antibiotika aus (Tabelle 8) (Schneidereit, 2008). Diese Daten allein reichen jedoch nicht aus um eine Aussage über den Verbrauch pro Tier zu treffen, und selbst wenn die Zahl der behandelten Tiere vorläge, müssten noch Alter, Gewicht, Tierart und auch die Erkrankung berücksichtigt werden, um ähnlich wie in der Humanmedizin eine Aussage über die verabreichten Tagesdosen tätigen zu können (Merle et al., 2009).

<b>Antibiotikagruppe</b>	<b>2003 (t)</b>	<b>2005 (t)</b>
Tetracycline	385,5	350,0
β-Laktame	155,2	199,2
Sulfonamide	71,7	97,5
Makrolide	38,6	52,6
Aminoglykoside	27,3	36,3
Polypeptide	23,4	21,8
Lincosamide	7,5	12,1
Pleuromutiline	6,8	6,4
Phenicolone	4,7	4,8
Chinolone	3,5	3,7
<b>Gesamt</b>	<b>724,2</b>	<b>784,4</b>

**Tabelle 4** Einsatz von Veterinärantibiotika in Deutschland.  
 Daten entnommen dem GERMAP 2008  
 (Schneidereit, 2008)

Da diese Zahlen nicht weiter nach Tierarten aufgeschlüsselt sind, muss davon ausgegangen werden, dass sie eher durch die Verordnungen in der konventionellen Nutztierhaltung geprägt sind und das Bild in der Hobbytierhaltung allein durchaus anders aussehen könnte (DeVincent et al., 2006). Hier wäre die Surveillance der Verbrauchszahlen gesondert nach Tierarten und Nutzungsrichtung notwendig um diese Unterschiede aufzeigen zu können. Es wären hierfür sowohl elektronischen Abgabeformulare in der Nutztierpraxis als auch eine Dokumentations- und Datenübermittlungspflicht eingesetzter Medikamente in Groß- und Kleintierpraxen notwendig. Obwohl eine Erfassung dieser Daten bei Lebensmittelliefernden Tieren von der

EU-Zoonosenrichtlinie gefordert wird, wird dieser bürokratische Mehraufwand momentan von den Tierärzten noch nicht unterstützt.

Das Bundesamt für Risikobewertung hat in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie, Pharmazie und Toxikologie der Universität Leipzig, sowie dem Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover das VetCAB (Veterinary Consumption of Antibiotics) ins Leben gerufen, welches der repräsentativen Erfassung von Verbrauchsmengen für Antibiotika bei Lebensmittel liefernden Tieren in Deutschland dienen soll. Ein Pilotprojekt läuft derzeit und befindet sich in der Auswertungsphase (Merle et al., 2009). Durch das tierärztliche Dispensierrecht gestaltet sich dies jedoch vergleichsweise schwierig, da die Zahlen von Industrie, Apotheken und Tierärzten gesammelt und ausgewertet werden müssen. In Ländern wie Dänemark und Schweden werden die Medikamente nur von den Apotheken ausgegeben, wodurch eine Erfassung der Daten leichter möglich ist und schon seit einigen Jahren praktiziert wird (DANMAP, 2008; SVARM, 2008).

Eine detaillierte Erfassung der Verbrauchsdaten und der zugehörigen behandelten Tiere wäre auch sinnvoll, um auf diese Weise möglich wäre eventuelle Dosierungsfehler aufzudecken. So bietet beispielsweise eine Unterdosierung von Antibiotika einen Selektionsvorteil für resistente Bakterien. Im Gegenzug führt eine Überdosierung von Antibiotika zu einer unverhältnismäßig hohen Belastung der Umwelt, was wiederum zur Selektionierung neuer Resistenzen führen kann (Lees et al., 2006). Eine Auswertung der über das VetCAB erhaltenen Daten zu diesen Zwecken ist aber zunächst nicht geplant.

### **3.2 Aktivitätsvergleich der Fluorchinolone**

Es ist es wichtig, Wirkungsweise und eventuelle Wirkungsunterschiede der verschiedenen Mitglieder der Fluorchinolone zu ermitteln. Nur so kann sichergestellt werden, dass nicht durch irrtümlichen Einsatz der falschen Fluorchinolone die Resistenzraten gegenüber diesen Wirkstoffen unnötig in die Höhe getrieben werden. Um dieser Stellvertreterfrage nachzugehen, wurde eine weitere Studie durchgeführt, in welcher ein Aktivitätsvergleich der für die Veterinärmedizin zugelassenen Fluorchinolone gegenüber verschiedenen Nutztierpathogenen untersucht wurde.

Da es nicht viele Studien gibt, welche sich mit den genannten Pathogenen von Rind und Schwein auseinandersetzen und diese bereits in der Publikation diskutiert wurden, soll hier kurz auf weitere Studien mit dem Fluorchinolone-Aktivitätsvergleich gegenüber anderen Pathogenen aus Tieren eingegangen werden, um so die Berechtigung der Schlussfolgerung aufzuzeigen.

In einer italienischen Studie konnte bei einem direkten Vergleich von Marbofloxacin und Enrofloxacin gegenüber von Hunden und Katzen gesammelten Bakterienisolaten ein signifikanter Unterschied beobachtet werden. In der Studie waren vor allem *Pseudomonas aeruginosa* und  $\beta$ -hämolisierende *Streptococcus* spp. empfindlicher gegenüber Marbofloxacin als gegenüber Enrofloxacin (Farca et al., 2007).

McKay et al. untersuchten in einer Studie mit 100 *P. aeruginosa*-Isolaten aus Otitiden von Hunden mittels Mikro Bouillondilution und Agardiffusion. Sie konnten ebenfalls eine geringere Empfindlichkeit der Isolate gegenüber Enrofloxacin beobachten als gegenüber Marbofloxacin und eine nochmals geringere Empfindlichkeit gegenüber Orbifloxacin (McKay et al., 2007). Die Schlussaussage dieser Studie deckt sich mit der hier ermittelten, indem auch hier deutlich gesagt wird, dass das Heranziehen einer Stellvertretersubstanz zu falsch-sensitiven Ergebnissen der Resistenztestung führen kann.

Peyrou et al. verglichen 2006 pharmakokinetische Parameter von Enrofloxacin und Marbofloxacin in Pferden (Peyrou et al., 2006). Sie beobachteten eine annähernd gleiche orale Bioverfügbarkeit beider Präparate, sahen jedoch deutliche Unterschiede in Clearance, Verteilungsvolumen und Ausscheidung. Dies spricht ebenfalls für die Festlegung unterschiedlicher klinischer Grenzwerte in der Resistenztestung, da unterschiedliche Dosierungen der Mittel notwendig sind, um am Infektionsort die gleiche Konzentration erreichen zu können.

Anhand der in der vorliegenden Studie gewonnenen Ergebnisse und der diskutierten Ergebnisse anderer Studien kann nun die Möglichkeit der Festsetzung eines Fluorchinolons als Stellvertretersubstanz für diese Wirkstofffamilie bewertet werden. In den CLSI Vorgaben wurde lange Zeit Enrofloxacin als Stellvertreter geführt. Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, dass die Benennung einer Stellvertretersubstanz für diese Familie nicht möglich ist, da sich die ermittelten Werte zum Teil hoch signifikant unterscheiden. Dies wurde mittlerweile auch in den CLSI-Normen berücksichtigt. Grenzwerte für weitere für die Veterinärmedizin zugelassene Fluorchinolone wurden ergänzt.

## 4 Schlussfolgerung

Bei Beachtung der gesammelten Daten der in den vorliegenden Studien durchgeführten Resistenzuntersuchungen im Zusammenhang mit den Antibiotika-Leitlinien sollte es in der Praxis möglich sein, die Zahl der falsch eingeschätzten Initialtherapien zu verringern, somit den Tieren Leiden zu ersparen, die Verwendung von Antibiotika auf ein notwendiges Mindestmaß zu beschränken und nicht zuletzt auch den Selektionsdruck auf die Bakterien so gering wie möglich zu halten.

Es ist unerlässlich ein EU-weit einheitliches Programm zum Monitoring veterinärpathogener Bakterien zu initiieren. Solange dies nicht gegeben ist werden weiterhin Studien mit verschiedenen Designs parallel laufen, was die Vergleichbarkeit der Daten erheblich einschränkt. Sowohl die Sammlung der Testisolate als auch die Untersuchungsmethoden sollten international vereinheitlicht werden. Ein erster Schritt in diese Richtung stellt das EUCAST-Programm dar, welches Europaweit einheitliche Methoden und Grenzwerte für die Untersuchung von human- und tierpathogenen Bakterien zur Verfügung stellt. Wie bereits erwähnt sind diese jedoch mit geringem Nutzen für behandelnde Tierärzte, da nur biologische Grenzwerte verwendet werden.

Ein weiterer Faktor welcher benötigt wird um Resistenzdaten zuverlässig auswerten zu können, sind die Verbrauchszahlen der Antibiotika. Die Erfassung dieser Daten wird von der EU gefordert und entsprechende Programme sind in der Entwicklung, jedoch gilt dies nur für die Antibiotika welche bei lebensmittelliefernden Tieren eingesetzt werden. Hier wäre es notwendig detaillierte Angaben über die eingesetzten Mengen, Tierzahlen, Tierarten und behandelten Erkrankungen zu erhalten um Resistenzentwicklungen einschätzen und gegebenenfalls mit einer Änderung der Zulassungslage reagieren zu können. Durch diese Aufzeichnungen wäre es auf lange Sicht auch möglich die Dosierungen und Behandlungsregime zu kontrollieren, und somit die behandelnden Ärzte auf Fehldosierungen und die damit verbundene Gefahr der Resistenzentwicklung aufmerksam zu machen.

Momentan liegt auf der staatlichen Ebene das Hauptaugenmerk auf Antibiotikarückständen in Lebensmitteln, wo für die Überwachung umfangreiche Stichprobenpläne erarbeitet wurden. Auch hier sollte ein Umdenken stattfinden, denn die Übertragung der resistenten Bakterien stellt ein viel direkteres Risiko dar, und dies nicht nur über Lebensmittel sondern vor allem über den direkten Kontakt von Tier und Mensch. Eine umfassendere Förderung der Resistenzbeobachtung und -analyse sollte also sogar Priorität gegenüber der Rückstandskontrolle erhalten.

Da auch in der Veterinärmedizin nosokomiale Infektionen eine immer größere Rolle spielen, sollte ähnlich wie in der Humanmedizin ein getrenntes Resistenzmonitoring der verantwortlichen Erreger angestrebt werden. MRSA und ESBL kommen in Tieren genau wie

im Menschen vor. Sie bilden zum einen eine direkte Gefahr für das erkrankte Tier, zum anderen besteht aber auch hier das Übertragungsrisiko auf den Menschen. Auch wenn diese Übertragung nicht sehr häufig stattfindet, bzw. die Häufigkeit nicht abgeschätzt werden kann, so sind doch die Folgen einer solchen Infektion verheerend. Ein gesondertes Monitoring dieser Erreger, wie es bereits seit Jahren in der Humanmedizin durchgeführt wird, wäre in der Veterinärmedizin ebenso wünschenswert. Hierfür wäre es jedoch zunächst erforderlich die Tierärzte weiter über nosokomiale Infektionen aufzuklären und Ihnen die Wichtigkeit der Erfassung dieser Bakterien und ihrer Resistenz aufzuzeigen.

## 5 Zusammenfassung

### **Resistenzlage veterinärpathogener *Enterobacteriaceae* unter besonderer Berücksichtigung der Fluorchinolone**

Die Entwicklung und Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen in Bakterien stellt ein immer größer werdendes Problem in Human- und Veterinärmedizin dar. Eine Abschätzung der Resistenzlage, auch in Tieren welche engen Kontakt zum Halter haben, ist aus mehrerlei Hinsicht von Bedeutung. Sie ermöglicht sowohl eine Behandlung der Tiere im Krankheitsfall, als auch die Abschätzung einer eventuellen Gefährdung für den Menschen. Die vorliegenden Studien haben im Rahmen des BfT-GermVet gezeigt, dass die Resistenzraten in aus erkrankten Hobbytieren isolierten *E. coli* im allgemeinen niedriger sind als die vergleichbarer Isolate aus Menschen. Für *Enterobacteriaceae* der Genera *Proteus* und *Klebsiella* sind allgemein höhere Resistenzraten bekannt. Hier zeigten sich in der vorliegenden Studie dennoch niedrigere Werte als in der Humanmedizin, mit der Ausnahme der Resistenzraten gegenüber Fluorchinolonen. Gegenüber diesem Wirkstoff wiesen *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. mit bis zu 29 % resistenter Isolate höhere Raten auf als in der Humanmedizin berichtet wurden, *E. coli* war jedoch deutlich sensibler.

Die große Bedeutung der Fluorchinolone gab auch Anlass zum Aktivitätsvergleich verschiedener Fluorchinolone *in vitro*, um Fehldiagnosen in der Resistenztestung gegenüber diesen Wirkstoffen zu minimieren. Dieser Vergleich zeigte zum Teil deutliche Unterschiede, wobei zusätzlich Variationen zwischen den verschiedenen Bakterienspezies beobachtet werden konnten. Eine Festlegung einer Stellvertretersubstanz für Fluorchinolone ist also abzulehnen.

Die hier durchgeführten Studien sind nur eine erste Erhebung der Resistenzsituation in pathogenen Bakterien von Hobbytieren in Deutschland. Um Veränderungen in der Antibiotikaempfindlichkeit dieser Bakterien sehen zu können, möglichst noch bevor sie sich in den Resistenzraten niederschlagen, ist jedoch eine weitere regelmäßige Untersuchung notwendig. Durch die Übernahme in das GERM-Vet Programm ist diese Beobachtung für einige der untersuchten Kategorien gewährleistet, so daß in Zukunft auch die Entwicklung der Antibiotikaresistenz in Bakterien von Hunden, Katzen und Pferden in Deutschland exakt verfolgt werden kann.



## 6 Summary

### **Resistance situation in veterinary pathogenic bacteria of the *Enterobacteriaceae* family with special consideration of the fluoroquinolones**

Development and spread of bacteria resistant to antimicrobial agents is a major concern to human and veterinary health. Estimation of the resistance situation especially in animals with close contact to their owners is thereby of great importance. On one hand it allows a proper therapy of diseased animals; on the other hand it also gives us the opportunity to estimate a possible hazard to human health. The present part of the BfT-GermVet study shows that percentages of resistant bacteria from animals are generally lower than those of comparable isolates from humans. Enterobacteriaceae from the genera *Proteus* and *Klebsiella* are known to contribute to high percentages of resistant isolates. The present study though shows lower percentages than those known from human medicine with exception of those for Fluoroquinolones. Here percentages of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. with up to 29 % were notably higher than those from humans, while those for *E. coli*-isolates were notably lower.

The important role of Fluoroquinolones also generated the idea to compare the in vitro activity of different Fluoroquinolones in order to minimize false diagnoses in the detection of antimicrobial resistance against these agents. This comparison shows clear differences between the agents, with additional variations between the different bacterial species. The determination of a single Fluoroquinolone as a representative for the whole family is thereby not acceptable.

The present studies are only cornerstones in the monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from companion animals in Germany. Further investigations of these bacteria are needed to show changes in their antimicrobial susceptibility before they have to be classified as resistant. A first step already taken is the inclusion in the GERM-Vet Program. This ensures detailed observations of pathogenic bacteria from dogs, cats and horses in Germany.

## 7 Literatur

- Arnold-Gloor, S., M. Hubler, I. Reichler (2006):** Weiblicher Geschlechtsapparat. In: P. Suter und B. Kohn, eds. *Praktikum der Hundeklinik*. Berlin: Paul Parey Verlag, 859-899
- Aurich, C., ed. (2005):** Reproduktionsmedizin beim Pferd - Gynäkologie, Andrologie, Geburtshilfe. Parey Bei Mvs. C. Aurich
- Authier, S., D. Paquette, O. Labrecque, S. Messier (2006):** Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart, *Can Vet J*, **47**, 774-778
- Boerlin, P., R. Travis, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, N. Janecko, H. Lim, V. Nicholson, S. A. McEwen, R. Friendship, M. Archambault (2005):** Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario, *Appl Environ Microbiol*, **71**, 6753-6761
- Burrows, G. E., R. J. Morton, W. H. Fales (1993):** Microdilution antimicrobial susceptibilities of selected gram-negative veterinary bacterial isolates, *J Vet Diagn Invest*, **5**, 541-547
- Clercx, C., P. Suter (2006):** Erkrankungen des Respirationsapparates. In: P. Suter und B. Kohn, eds. *Praktikum der Hundeklinik*. Berlin: Paul Parey Verlag, 450-521
- CLSI (2002):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 2nd Edition. NCCLS document M31-A2. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (2004):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard; Informational supplement (May 2004). NCCLS document M31-S1. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- CLSI (2008):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard - Third Edition. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, PA, U.S.A.
- Cohn, L. A., A. T. Gary, W. H. Fales, R. W. Madsen (2003):** Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts, *J Vet Diagn Invest*, **15**, 338-343
- Cooke, C. L., R. S. Singer, S. S. Jang, D. C. Hirsh (2002):** Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections, *J Am Vet Med Assoc*, **220**, 190-192
- DANMAP: DANMAP 2005 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark;**  
[http://www.danmap.org/pdffiles/danmap\\_2005.pdf](http://www.danmap.org/pdffiles/danmap_2005.pdf); 2007-07-12
- DANMAP: DANMAP 2007 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark;**  
<http://www.danmap.org/>; 2008-09-01
- Demain, A. L. (1999):** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl Microbiol Biotechnol*, **52**, 455-463
- DeVincent, S. J., R. Reid-Smith (2006):** Stakeholder position paper: companion animal veterinarian, *Prev Vet Med*, **73**, 181-189
- EARSS: The European Antimicrobial Resistance Surveillance System;**  
<http://www.rivm.nl/earss/>; 02.07.2009
- Elemam, A., J. Rahimian, W. Mandell (2009):** Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature, *Clin Infect Dis*, **49**, 271-274

- Farca, A. M., P. Cavana, P. Robino, P. Nebbia (2007):** In vitro antimicrobial activity of marbofloxacin and enrofloxacin against bacterial strains isolated from companion animals, *Schweiz Arch Tierheilkd*, **149**, 265-271
- Frontoso, R., E. De Carlo, M. P. Pasolini, K. van der Meulen, U. Pagnini, G. Iovane, L. De Martino (2008):** Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems, *Res Vet Sci*, **84**, 1-6
- Gerjets, I., N. Kemper (2009):** Coliform mastitis in sows: A review, *Journal of Swine Health and Production*, **17**, 97-105
- GERMAP, eds. (2008):** GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH
- Giguère, S. (2006):** Tetracyclines and Glycylcyclines. In: S. Giguère, J. F. Prescott, J. D. Baggot, R. D. Walker and P. M. Dowling, eds. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Ames: Blackwell Publishing, 231-240
- Grobbe, M., A. Lübke-Becker, E. Alešik, S. Schwarz, J. Wallmann, C. Werckenthin, L. H. Wieler (2007a):** Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 391-401
- Grobbe, M., A. Lübke-Becker, E. Alešik, S. Schwarz, J. Wallmann, C. Werckenthin, L. H. Wieler (2007b):** Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from various organ systems of horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 402-411
- Grobbe, M., A. Lübke-Becker, L. H. Wieler, R. Froyman, S. Friederichs, S. Filios (2007c):** Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones, *Vet Microbiol*, **124**, 73-81
- Grobbe, M. (2008a):** Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Hund/Katze - Infektionen des Respirationstraktes - *Escherichia coli*. In: M. Kresken, J. Wallmann and W. V. Kern, eds. GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 113-114
- Grobbe, M. (2008b):** Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Hund/Katze - Infektionen des Urogenitaltraktes - *Escherichia coli* und andere *Enterobacteriaceae*. In: M. Kresken, J. Wallmann and W. V. Kern, eds. GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 116
- Guardabassi, L., S. Schwarz, D. H. Lloyd (2004):** Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria, *J Antimicrob Chemother*, **54**, 321-332
- Hagman, R., C. Greko (2005):** Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs, *Vet Rec*, **157**, 193-196
- Haller, M., P. Suter (2006):** Harnapparaterkrankungen, Nephrologie, Urologie. In: P. Suter and B. Kohn, eds. *Praktikum der Hundeklinik*. Berlin: Paul Parey Verlag, 797-837
- Hendershot, E. F. (1995):** Fluoroquinolones, *Infect Dis Clin North Am*, **9**, 715-730

- Hendriksen, R. S., D. J. Mevius, A. Schroeter, C. Teale, E. Jouy, P. Butaye, A. Franco, A. Utinane, A. Amado, M. Moreno, C. Greko, K. D. Stark, C. Berghold, A. L. Myllyniemi, A. Hoszowski, M. Sunde, F. M. Aarestrup (2008):** Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002 - 2004: the ARBAO-II study, *Acta Vet Scand*, **50**, 19
- Jacks, S. S., S. Giguere, A. Nguyen (2003):** In vitro susceptibilities of *Rhodococcus equi* and other common equine pathogens to azithromycin, clarithromycin, and 20 other antimicrobials, *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 1742-1745
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, H. L. Mobley (2004):** Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat Rev Microbiol*, **2**, 123-140
- Karaca, Y., N. Coplur, A. Gozalan, O. Oncul, B. E. Cital, B. Esen (2005):** Co-trimoxazole and quinolone resistance in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections over the last 10 years, *Int J Antimicrob Agents*, **26**, 75-77
- Kern, W. V., H. Schröder (2008):** Antibiotikaverbrauch in der Humanmedizin. In: M. Kresken, J. Wallmann and W. V. Kern, eds. GEMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 11-16
- Knottenbelt, D. C., N. Holdstock, J. Madigan, eds. (2007):** Neonatologie der Pferde. Urban & Fischer Bei Elsevier.
- Kohn, B., L. Brunnberg (2006):** Ohrenkrankheiten. In: P. Suter und B. Kohn, eds. Praktikum der Hundeklinik. Berlin: Paul Parey Verlag, 392-405
- Korudzhiski, N., G. Bozhkova, G. V. Gulubinov, I. Dzhurova, S. Georgiev (1987):** Microbial etiology of the MMA syndrome (mastitis-metritis-agalactia) in swine raised commercially, *Vet Med Nauki*, **24**, 11-15
- Kresken, M., E. Straube (2008):** Antibiotikaresistenz in der Humanmedizin - Extraintestinale Infektionen - *Escherichia coli* und andere *Enterobacteriaceae*. In: M. Kresken, J. Wallmann and W. V. Kern, eds. GEMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 48-55
- Lanz, R., P. Kuhnert, P. Boerlin (2003):** Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland, *Vet Microbiol*, **91**, 73-84
- Leclercq, R., P. Courvalin (1991):** Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria, *Antimicrob Agents Chemother*, **35**, 1273-1276
- Lees, P., D. Concordet, F. Aliabadi, P.-L. Toutain (2006):** Drug Selection and Optimization of Dosage Schedules To Minimize Antimicrobial Resistance. In: F. M. Aarestrup, ed. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Washington, DC: 49-71
- Leung, R.:** Super-Resistant Superbugs;  
<http://www.cbsnews.com/stories/2004/04/30/60minutes/main614935.shtml>; 2009-07-06

- Lockhart, S. R., M. A. Abramson, S. E. Beekmann, G. Gallagher, S. Riedel, D. J. Diekema, J. P. Quinn, G. V. Doern (2007):** Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004, *J Clin Microbiol*, **45**, 3352-3359
- Lübke-Becker, A. (2008a):** Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Hund/Katze - Infektionen von Haut, Ohr und Maul - *Proteus* spp. In: M. Kresken, J. Wallmann und W. V. Kern, eds. GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 113-114
- Lübke-Becker, A. (2008b):** Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Pferde - Infektionen des Genitaltraktes - *Klebsiella* spp. In: M. Kresken, J. Wallmann und W. V. Kern, eds. GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 121
- Lyskova, P., M. Vydralova, J. Mazurova (2007):** Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, **54**, 559-563
- Masteron, R. (2008):** The importance and future of antimicrobial surveillance studies, *Clin Infect Dis*, **47 Suppl 1**, S21-31
- McKay, L., C. D. Rose, J. L. Matousek, L. S. Schmeitzel, N. M. Gibson, J. M. Gaskin (2007):** Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis, *J Am Anim Hosp Assoc*, **43**, 307-312
- Meier, C. (2004):** Beitrag zur Bedeutung von bakteriellen Infektionserregern bei Hund und Katze – Eine Auswertung der bakteriologischen Untersuchungsbefunde des Instituts für Veterinärbakteriologie. Dissertation, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, 79 S.
- Merle, R., P. Hajek, C. Gravenhorst, Y. Mollenhauer, M. Robanus, A. Käsbohrer, F. R. Ungemach, L. Kreienbrock (2009):** Consumption of Antibiotics in Livestock in Germany: a Feasibility Study, DVG-Fachgruppentagung Epidemiologie und Dokumentation - Krankheitsdynamik in Populationen - Bedeutung von Surveillance- und Impfprogrammen- 2.-4.09.2009 Gießen
- Miriagou, V., E. Tzelepi, G. L. Daikos, P. T. Tassios, L. S. Tzouveleakis (2005):** Panresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, *J Antimicrob Chemother*, **55**, 810-811
- Murray, P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, eds. (2003):** Manual of Clinical Microbiology, 8th Edition. ASM Press. Washington D.C.
- NARMS: The National Antimicrobial Resistance Monitoring System 2004;** <http://www.fda.gov/cvm/2004NARMSExeRpt.htm>; 2007-07-12
- Neiger, R. (2003):** Krankheiten der Nieren und ableitenden Harnwege. In: M. C. Horzinek, V. Schmidt und H. Lutz, eds. Krankheiten der Katzen. Enke, 387-426
- Nienhoff, U., K. Kadlec, I. F. Chaberny, J. Verspohl, G. F. Gerlach, S. Schwarz, D. Simon, I. Nolte (2009):** Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between humans and dogs: two case reports, *J Antimicrob Chemother*, **64**, 660-662
- NORM-VET: NORM: Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway;** [http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesenteret/NORM\\_NORM-VET\\_2004.pdf](http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesenteret/NORM_NORM-VET_2004.pdf); 2007-07-12

- Oluoch, A. O., C. H. Kim, R. M. Weisiger, H. Y. Koo, A. M. Siegel, K. L. Campbell, T. J. Burke, B. C. McKiernan, I. Kakoma (2001):** Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998), *J Am Vet Med Assoc*, **218**, 381-384
- Peyrou, M., A. Bousquet-Melou, V. Laroute, A. Vrins, M. Y. Doucet (2006):** Enrofloxacin and marbofloxacin in horses: comparison of pharmacokinetic parameters, use of urinary and metabolite data to estimate first-pass effect and absorbed fraction, *J Vet Pharmacol Ther*, **29**, 337-344
- Prescott, J. F. (2006):** History of Antimicrobial Usage in Agriculture: an Overview. In: F. M. Aarestrup, ed. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington: ASM Press, 19-27
- Sancak, A. A., H. C. Rutgers, C. A. Hart, R. M. Batt (2004):** Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea, *Vet Rec*, **154**, 101-106
- Schjorring, S., C. Struve, K. A. Krogfelt (2008):** Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine, *J Antimicrob Chemother*, **62**, 1086-1093
- Schneidereit, M. (2008):** Antibiotikaverbrauch in der Veterinärmedizin. In: M. Kresken, J. Wallmann und W. V. Kern, eds. *GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland*. Rheinbach: Antinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 25-28
- Schroeer, U., H. Kaspar, J. Wallmann (2007):** National resistance monitoring by the BVL 2004/2005: Quantitative resistance level (MIC) of *Escherichia coli*, isolated from calves and swine suffering from enteritis, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **120**, 431-441
- Schwarz, S., E. Alešík, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, J. Wallmann, C. Werckenthin, L. H. Wieler (2007a):** The BfT-GermVet monitoring program-aims and basics, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 357-362
- Schwarz, S., E. Alešík, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, C. Werckenthin, L. H. Wieler, J. Wallmann (2007b):** Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* from dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 423-430
- Schwarz, S., E. Alešík, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, C. Werckenthin, L. H. Wieler, J. Wallmann (2007c):** Antimicrobial susceptibility of streptococci from various indications of swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 380-390
- Schwarz, S., E. Alešík, C. Werckenthin, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, L. H. Wieler, J. Wallmann (2007d):** Antimicrobial susceptibility of coagulase-positive and coagulase-variable Staphylococci from various indications of swine, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 372-379
- Scott, K. P. (2002):** The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract, *Cell Mol Life Sci*, **59**, 2071-2082
- SVARM (2005):** Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Report 2005; <http://soapimg.icecube.snowfall.se/strama/svarm2005.pdf>; 2007-07-12
- SVARM (2006):** Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Report 2005; <http://soapimg.icecube.snowfall.se/strama/svarm2006.pdf>; 2007-07-12
- SVARM (2007):** Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Report 2007, Swedish National Veterinary Institute

- SVARM (2008):** Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Report 2008, Swedish National Veterinary Institute
- Taylor, P. L., G. D. Wright (2008):** Novel approaches to discovery of antibacterial agents, *Anim Health Res Rev*, 1-10
- Tenover, F. C. (2006):** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am J Med*, **119**, S3-10; discussion S62-70
- Wallmann, J., U. Schroer, H. Kaspar (2007):** Quantitative resistance level (MIC) of bacterial pathogens (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*) isolated from chickens and turkeys: national resistance monitoring by the BVL 2004/2005, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 452-463
- Webster, A., H. Goya (1988):** Quinolones in the treatment of serious infections, *Rev Infect Dis*, **10 Suppl 1**, S225-233
- Werckenthin, C., E. Alešik, M. Grobbel, A. Lubke-Becker, S. Schwarz, L. H. Wieler, J. Wallmann (2007):** Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from dogs and cats as well as *Arcanobacterium pyogenes* from cattle and swine as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, **120**, 412-422
- Wieler, L. H. (2008a):** Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Hund/Katze - Enteritis - *Escherichia coli*. In: M. Kresken, J. Wallmann und W. V. Kern, eds. GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 119
- Wieler, L. H. (2008b):** Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Lebensmittel liefernde Tiere - Schwein - Metritis-Mastitis-Agalaktie - *Escherichia coli*. In: M. Kresken, J. Wallmann und W. V. Kern, eds. GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence Gesellschaft für klinisch-mikrobiologische Forschung und Kommunikation mbH, 100
- Wille, B. (2007):** Einsatz von Antibiotika aus mikrobiologischer Sicht (Teil III), *Krankenhaus-Hygiene + Infektionsverhütung*, **29**, 170-173
- Yang, H., H. Chen, Q. Yang, M. Chen, H. Wang (2008):** The High Prevalence of Plasmid-mediated Quinolone Resistance Genes (qnr) and aac(6')-Ib-cr in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* from Nine Teaching Hospitals in China, *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 4268-4273

## 8 Anhang

### 8.1 Publikation 1

Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs, and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 391-401



Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120,  
391–401 (2007)  
DOI 10.2376/0005-9366-120-391

© 2007 Schlütersche  
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG  
ISSN 0005-9366

Korrespondierende Autorin:  
grobbel.mirjam@vetmed.fu-berlin.de

Eingegangen: 14.05.2007  
Angenommen: 12.07.2007

## Summary

## Zusammenfassung

U.S. Copyright Clearance Center  
Code Statement:  
0005-9366/2007/12009-391 \$15.00/0

<sup>1</sup>Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin,  
Freie Universität Berlin

<sup>2</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin,  
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

<sup>3</sup>Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft,  
Neustadt-Mariensee

<sup>4</sup>Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin

## Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004–2006

### *Antimikrobielle Empfindlichkeit von Escherichia coli* Isolaten der Tierarten Schwein, Pferd, Hund und Katze ermittelt im BfT-GermVet Monitoringprogramm 2004–2006

Mirjam Grobbel<sup>1</sup>, Antina Lübke-Becker<sup>1</sup>, Eva Alešik<sup>2</sup>, Stefan Schwarz<sup>2</sup>,  
Jürgen Wallmann<sup>3</sup>, Christiane Werckenthin<sup>3</sup>, Lothar H. Wieler<sup>4</sup>

A total of 417 isolates of *Escherichia coli* collected from five animal species/organ system combinations from swine [urinary/genital tract (UGT) incl. mastitis metritis agalactia syndrome], horses [genital tract (GT)] and dogs/cats [respiratory tract (RT), UGT and gastrointestinal tract (GIT)] were analysed quantitatively for their susceptibility against different antimicrobial agents by determination of minimum inhibitory concentrations. Regardless of which animal species the strains originated from, resistance appeared most frequently against sulfamethoxazole (18–59 %), tetracycline (14–54 %), and ampicillin (14–39 %). High percentages of intermediate isolates were observed for cephalothin (39–46 %). In general, low prevalences of resistance were detected for amoxicillin/clavulanic acid (1–4 %), gentamicin (1–9 %), and cefazolin (0–11 %). Generally speaking, the antimicrobial resistance situation among *E. coli* isolates from horses and small animals is relatively good.

**Keywords:** *in-vitro* susceptibility testing, antimicrobial agents, *Escherichia coli*, interpretive criteria, swine, horse, dog, cat, minimum inhibitory concentration

Insgesamt wurden 417 *Escherichia coli* Isolate aus fünf Indikationen von Schwein [Urogenitaltrakt (UGT) inkl. Mastitis-Metritis-Agalaktie Komplex], Pferd [Genitaltrakt (GT)] und Hund und Katze [Respirationstrakt (RT), UGT und Gastrointestinaltrakt (GIT)] auf ihre Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen getestet. Unabhängig von der Herkunft der Stämme konnten am häufigsten Resistenzen gegen Sulfamethoxazol (18–59 %), Tetracyclin (14–54 %) und Ampicillin (14–39 %) festgestellt werden. Für Cephalothin wurden hohe Raten intermediärer Isolate beobachtet (39–46 %). Die Resistenzraten für Amoxicillin/Clavulansäure (1–4 %), Gentamicin (1–9 %) und Cefazolin (0–11 %) waren allgemein im niedrigen Bereich. Im Allgemeinen ist die Resistenzlage von *E. coli*-Isolaten von Pferden und Kleintieren in Deutschland als günstig einzuschätzen.

**Schlüsselwörter:** *In-vitro*-Empfindlichkeitsbestimmung, Antibiotika, *Escherichia coli*, Grenzwerte, Schwein, Pferd, Hund, Katze, minimale Hemmkonzentration

## Introduction

The enterobacterial species *Escherichia coli* is well known as part of the physiological intestinal microflora, however, there are many serious infections caused by defined pathogenic isolates of this species. Due to the organs affected, these pathogenic *E. coli* strains are categorized in either intestinal *E. coli* or extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC). Currently, three ExPEC pathogens are defined, namely new-born meningitis *E. coli* (NMEC), avian pathogenic *E. coli* (APEC), and uropathogenic *E. coli* (UPEC) (Wirth et al., 2006; Ewers et al., 2007). UPEC, which are defined by the possession of specific virulence-associated factors (Ngeleka et al., 2002; Le Bouguenec, 2005), and mainly assigned to specific serovars, are the most frequently isolated bacteria in infections of the urinary tract of humans (Kaper et al., 2004). In pigs, cattle, horses as well as in cats and dogs, UPEC are of major importance for infections of the urinary/genital tract (Beutin, 1999). In horses, infections of the genital tract (GT) are a common reason for reduced conception rates. Second to  $\beta$ -haemolytic streptococci, *E. coli* are the most frequently isolated bacteria in infections of the equine GT, and some studies have detected even higher prevalences of *E. coli* than of streptococci (Albihn et al., 2003). ExPECs are also frequently isolated from the respiratory tract (RT) of dogs and cats (Meier, 2004) and are known as a cause of infections of this organ system (Oluoch et al., 2001).

Antimicrobial agents are particularly used to treat extraintestinal infections caused by *E. coli*. In small animals, *E. coli* infections are commonly treated with aminopenicillins (amoxicillin, ampicillin), cephalosporins, potentiated sulfonamides (trimethoprim/sulfamethoxazole 1/19 combination), phenicols, aminoglycosides and fluoroquinolones. In swine, ampicillin, spectinomycin, sulfonamides, and tetracycline are most frequently used (White, 2006). As compared to small animals, the treatment of such infections in horses with antimicrobial agents differs. In Germany approval for treatment of infections of the genital tract of horses with *E. coli* is only given for amoxicillin, gentamicin, kanamycin, dihydrostreptomycin, spectinomycin, and trimethoprim/sulfonamide combination ([www.vetidata.de](http://www.vetidata.de)).

*E. coli* is often described as highly resistant to several antimicrobial agents and there are various monitoring programs dealing with resistance among isolates collected from food producing animals (NARMS, 2004; NORM-VET, 2004; DANMAP, 2006; SVARM, 2006; Wallmann, 2006). Samples in those studies were often taken at slaughtering or from meat products and the corresponding *E. coli* isolates were mainly considered to be part of the commensal flora. Only a few nation-wide resistance studies have been implemented with isolates obtained from diseased cattle and swine, and even less studies deal with those of companion animals (Lanz et al., 2003; SVARM, 2006). Therefore, we concentrated in the BfI-GermVet study on isolates from diseased animals, to gain insight into the susceptibility status of pathogenic *E. coli* among various animal species and indications.

An additional aspect in this study is the opportunity to compare resistance patterns of intestinal pathogenic *E. coli* and ExPEC from the same animal species under identical test conditions, as this is an excellent basis for epidemiological follow-up studies.

## Material and Methods

Of the *E. coli* isolates collected in the period from January 2004 to March 2006 within the BfI-GermVet project, 417 isolates from five different animal species/organ system combinations were selected for determination of their antimicrobial susceptibility. In general, all animals from which the strains had been isolated, showed clinical signs typical for an infectious disease of the respective organ system, as outlined by Schwarz et al. (Schwarz et al., 2007). In addition to the data presented in this article, seven *E. coli* isolates from bovine UGT were collected and tested. However, due to the small number of isolates, the results are not reported.

From UGT infections (incl. MMA) in pigs, 87 isolates were chosen for susceptibility testing. To avoid a bias via inclusion of copy-isolates, only one sample per farm was taken during a six-month period. Of the isolates tested, a single isolate originated from a piglet, 49 from young pigs, two from feeding pigs, and 35 from breeding pigs.

A total of 238 *E. coli* isolates were collected from infections of the GT of horses, and 102 isolates with wide geographical distribution as reflected by stock numbers in the German federal Länder (Statistisches Bundesamt, 2005) were chosen for determination of the susceptibility status. The majority of these bacteria (88 isolates) were taken from mares, only one isolate originated from a stallion, the remaining 13 isolates were collected without any information about the gender of the infected animal.

A total of 228 *E. coli* isolates from three different organ systems of dogs and cats were tested. Results from dogs and cats are summarized and categorised as "small animals". From RT infections of small animals, it was only possible to collect 28 *E. coli* isolates, therefore each isolate originating from this organ system of diseased animals was included (5 pre-treated, 17 not pre-treated, 6 unknown status). Of these isolates, 17 were from dogs and 11 from cats. A total of 100 isolates were selected from the UGT (72 from dogs, 28 from cats) and GIT (56 from dogs, 44 from cats) respectively, all of which were isolated from animals that were not pre-treated.

For identification, the isolates were cultured on CHROMagar Orientation (BBL, Paris, France) and in addition every 5<sup>th</sup> isolate was confirmed by the API 20E System (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France).

Based on the recommendations given in the CLSI document M31-A2 (NCCLS, 2002) and by the working group "antimicrobial resistance" of the Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) (Schwarz et al., 2003), *in vitro* susceptibility testing was performed by broth microdilution. The MIC data obtained were evaluated on the basis of the interpretive criteria listed in the CLSI document M31-S1 (NCCLS, 2004).

## Results and Discussion

Specific breakpoints for veterinary pathogenic *Enterobacteriaceae* were available for interpretation of the results of ampicillin, enrofloxacin, and gentamicin. Breakpoints adopted from human medicine and applicable to "organisms other than staphylococci" or "organisms other than streptococci" were used for either amoxicillin/clavulanic acid or tetracycline, chloramphenicol, and potentiated sulfonamides (trimethoprim/sulfonamide 1/19 combination), respectively. Finally, breakpoints from

human medicine applicable to bacteria not further specified served in the classification of MIC values of cephalothin, cefazolin, sulfamethoxazole, and gentamicin (determined for isolates from swine). For ceftiofur, cefquinome, cefoperazone, tulathromycin, neomycin, spectinomycin, florfenicol, and colistin, no CLSI-approved breakpoints are currently available for the tested bacteria/organ system/animal species combination. For all antimicrobial agents, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were calculated. The detailed results are given in Tables 1–5.

Breakpoints for enrofloxacin are available only for *Enterobacteriaceae* from infections of the UGT and the RT of dogs. Because there was only a single feline isolate with an enrofloxacin MIC of 16 µg/ml, we classified the complete small animal results in these indications on the basis of breakpoints for canine isolates.

The veterinary-specific breakpoints for gentamicin are only given for *E. coli* from dogs and horses. For *E. coli* from other animal species, breakpoints are adopted from human medicine, which are one dilution step lower than those for dogs and horses. Again, all MIC data obtained from small animal isolates were categorized on the basis of the breakpoints for canine isolates since there were no isolates from cats that showed MICs of 2 or 4 µg/ml.

*E. coli* are known to be naturally resistant against macrolides (Leclercq and Courvalin, 1991). As expected, the MIC values of erythromycin, spiramycin, tilmicosin, and tulathromycin were equal to or even higher than the highest concentration tested for nearly all isolates. The same phenomenon was observed for clindamycin. Against the classical penicillins (penicillin G and oxacillin), many *E. coli* strains showed high tolerance, and this is known to be due to β-lactamases and changes in the outer cell membrane (Tenover, 2006).

#### Porcine *E. coli*

##### Infections of the urogenital tract (incl. MMA)

Among the 87 *E. coli* isolates collected from swine with infections of the UGT, highest percentages of resistance were detected for sulfamethoxazole (59 %), tetracycline (54 %), potentiated sulfonamides (41 %), and ampicillin (38 %) (Tab. 1). Lower prevalence of resistance was detected for chloramphenicol (17 %) and cephalothin (14 %) while resistance to cefazolin (2 %), gentamicin (2 %), and amoxicillin/clavulanic acid (1 %) occurred rarely. One isolate was seen to grow in the highest enrofloxacin concentration tested, whereas another showed a high MIC at 4 µg/ml (Tab. 1). For cephalothin, a high percentage (41 %) of intermediate isolates was detected, while an additional isolate was intermediate for chloramphenicol.

These prevalences of resistance are lower than those found in the corresponding GERM-Vet program among *E. coli* from the GIT of swine (Schröder et al., 2007). A direct comparison with results from other European monitoring programs dealing with resistance in *E. coli* from swine is hindered for several reasons. In those studies, samples were either collected from healthy swine at slaughter and the corresponding *E. coli* isolates were considered as indicator bacteria (SVARM, 2004; NORM-VET, 2004; DANMAP, 2006; SVARM, 2006) or from diseased swine without information about antimicrobial pre-treatment (NORM-VET, 2004) or the affected organ system (DANMAP, 2006). In addition, different standards, methods, and/or breakpoints were used. As shown in the DANMAP report 2005, isolates from

diagnostic submissions demonstrated higher percentage of resistant strains than indicator bacteria from healthy pigs (e. g. tetracycline 66 % vs. 28 %, chloramphenicol 25 % vs. 2 %) (DANMAP, 2006). As well a Canadian study delineated higher prevalence of resistance against various antimicrobial agents in ETEC and non-ETEC from pigs with diarrhea than in *E. coli* isolated from healthy finisher pigs (Boerlin et al., 2005).

#### Equine *E. coli*

##### Infections of the genital tract

Among the 102 *E. coli* isolates, collected from the genital tract of horses, highest percentages of resistance of approximately 28 % were detected for cephalothin and sulfamethoxazole (Tab. 2). Moderate percentages of resistance were detected for ampicillin (18 %), tetracycline (17 %), chloramphenicol (17 %), potentiated sulfonamides (16 %), and gentamicin (10 %). For cefazolin and amoxicillin/clavulanic acid, low prevalence of resistance was seen with 6 % and 7 %, respectively. Nine isolates grew in the presence of the highest enrofloxacin concentration tested. Again, a high percentage of isolates showed intermediate results for cephalothin (40 %). For amoxicillin/clavulanic acid (5 %), chloramphenicol (5 %), and gentamicin (1 %) low numbers of intermediate isolates were observed.

Only limited data on resistance of *E. coli* from horses are actually available from nationwide studies. The Swedish resistance monitoring program SVARM included *E. coli* collected from diagnostic samples of the genital tract of mares (SVARM, 2006). The methods and interpretive criteria used by SVARM are mainly based on CLSI standards. The prevalence of resistance to tetracycline, as calculated by using identical breakpoints, is lower in Swedish isolates (4 %) than in German isolates (17 %). A further comparison of MIC values showed lower percentages of strains in the higher MIC values of ampicillin (4 % versus 18 % of isolates with MICs ≥ 16 µg/ml) and gentamicin (2 versus 10 % of isolates with MICs ≥ 16 µg/ml) for Swedish strains than for those from Germany.

#### Canine and feline *E. coli*

##### Infections of the respiratory tract

Results obtained from the 28 *E. coli* isolates are shown in Table 3. As this is a relatively small test population, the prevalences of resistance might not be representative and should therefore be considered with care. Only resistances to sulfamethoxazole (43 %), ampicillin (39 %), and cephalothin (21 %) were observed in more than 20 % of the isolates. Moderate percentages of resistance in the interval between 10 and 20 % were detected for potentiated sulfonamides (18 %), chloramphenicol (14 %), tetracycline (14 %), and cefazolin (11 %). For enrofloxacin, gentamicin, and amoxicillin/clavulanic acid, resistance was observed only sporadically in one or two isolates. Intermediate isolates were detected for cephalothin (46 %) and amoxicillin/clavulanic acid (7 %).

The low number of collected isolates implicates a small number of respiratory tract infections caused by *E. coli* in these animals, although former studies described *E. coli* to be involved in 7.7–24.6 % of respiratory tract infections of dogs and in 14.3 % of those of cats (Olouch et al., 2001; Meier, 2004). In one of the publications cited, susceptibility testing was performed by agar disc diffusion and the results are given without further differentiation con-

**TABLE 1:** MIC data of *Escherichia coli* from urinary/genital tract infections (incl. MMA) of swine (n = 87). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values (µg/ml)													susceptible		intermediate		resistant		MIC <sub>50</sub> [µg/ml]	MIC <sub>90</sub> [µg/ml]											
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048			[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]			
Penicillin G <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	33	37					54	62	0	0	33	38	4	4	≥ 128	≥ 64			
Ampicillin <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	5	35	12	2	0	0	0	33																	
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	86																				
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	1	14	43	28	0	1																				
Cephalexin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	7	32	36	10	2																					
Cefazolin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	9	61	14	1	0	0	2																			
Cefepime <sup>4</sup>	0	0	0	1	4	32	14	6	10	7	4	1	2																			
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	0	0	1	32	39	13	0	1	0	0	0	1																			
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	2	35	41	8	0	0	0	0	0	0	0	0																			
Tetracycline <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	32	8	0	0	0	3	9	35																	
Erythromycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	23	63																		
Trimicosin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	43	38	3																	
Spiramycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	17	55	13																	
Tulathromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	1	3	39	36	7	1	0	0	0																	
Clindamycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	24	58																	
Gentamicin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	27	49	9	0	0	1	1	0	0																	
Neomycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	12	61	8	0	0	0	4	1	1																	
Spectinomycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	36	8	7	10	5	2															
Chloramphenicol <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	2	45	24	1	2	3	3	7																		
Florfenicol <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	7	60	17	1	0	0	2																		
Enrofloxacin <sup>3</sup>	1	20	44	13	0	3	4	0	0	1	0	0	1																			
Colistin <sup>4</sup>	0	0	0	0	2	75	10	0	0	0	0	0	0	0																		
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>	2	14	24	1	2	7	1	0	0	1	10	19	4	2	0	0	0	0	0	51	36	41										
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>	2	14	24	1	2	7	1	0	0	0	0	0	0	36						51	59											

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for *Enterobacteriaceae* according to CLSI document M31-S1.  
<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacteriaindication combination.  
<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.  
<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.  
<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.

**TABLE 2:** MIC data of *Escherichia coli* from genital tract infections of horses (n = 102). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values (µg/ml)												susceptible			intermediate			resistant			MIC <sub>50</sub> (µg/ml)							
	0.005	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	[n]	[%]		[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]	
Penicillin G <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	59	29					84	82	0	0	18	18			32	≥ 64
Ampicillin <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	13	30	37	4	0	0	0	18														≥ 128
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	102																		≥ 32
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	2	16	51	27	5	1	0							96	94	5	5	1	1			4/2	8/4
Cephalexin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	2	30	41	24	5								32	31	41	40	23	23			16	32
Ceftazolin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	11	74	9	1	4	3	0							95	93	4	4	3	3			2	4
Cefepime <sup>4</sup>	0	0	6	48	22	6	3	4	2	0	7																	0.12	4
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	3	48	41	9	1	0	0	0	0	0	0	0															0.25	0.5
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0															0.03	0.06
Tetracycline <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	1	63	21	0	0	0	7	10						85	83	0	0	17	17			1	64
Erythromycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	36	61														≥ 64	≥ 64
Trimethoprim <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	7	67	23	1													32	64
Spiromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	21	68	10													128	128
Tulathromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	2	11	37	48	4	0	0	0														4	4
Clindamycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	8	41														64	≥ 128
Gentamicin <sup>16</sup>	0	0	0	0	0	0	26	52	14	1	2	0	0	5	1					92	90	1	1	9	9			1	2
Neomycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	2	15	72	4	0	1	0	1	5	2														1	2
Specinomycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	34	46	10	1	8	0	0	1											16	32
Chloramphenicol <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	6	33	46	5	0	0	1	11						85	83	5	5	12	12			8	≥ 256
Florentinol <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	3	6	65	24	0	1	0	3														4	8
Ertapenem <sup>3</sup>	0	30	46	15	0	1	0	1	0	0	0	0	9															0.03	0.25
Colistin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	91	9	2	0	0	0	0	0	0														0.25	0.5
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>	2	39	35	4	5	1	0	0	0	0	0	0	0	16						86	84							0.06/1.19	≥ 64/1216
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>	2	39	35	4	5	1	0	0	0	0	0	0	0	16						29	73	72						16	≥ 2048

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for *Enterobacteriaceae* according to CLSI document M31-S1.

<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than *Staphylococcus*" according to CLSI document M31-S1.

<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacteriostatic combination.

<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.

<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.

<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.

<sup>16</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacillus* spp. from not further specified sites of infection from horses according to CLSI document M31-S1.

**TABLE 3:** MIC data of *Escherichia coli* from respiratory tract infections of dogs/cats ( $n = 28$ ). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values ( $\mu\text{g/ml}$ )																susceptible			intermediate		resistant		MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	0.005	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	[n]	[%]	[n]	[%]			[n]	[%]	[n]	[%]		
Penicillin G <sup>3</sup>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	9	12						17	61	0	0	11	39	4		32	$\geq 64$		
Ampicillin <sup>1</sup>		0	0	0	1	0	2	10	3	1	0	0	0	0	11															$\geq 128$	
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	28																	$\geq 32$	
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>		0	0	0	0	0	1	7	10	7	2	0	1							25	89	2	7	1	4	4/2	16/8				
Cephalexin <sup>5</sup>		0	0	1	0	0	0	0	0	1	7	13	2	4						9	32	13	46	6	21	16				$\geq 64$	
Cefazolin <sup>5</sup>		0	0	0	0	0	4	16	4	1	0	1	2						25	89	0	0	3	11	2					32	
Cefoperazon <sup>4</sup>		0	1	11	5	0	2	3	0	1	0	5																		0.25	
Ceftiofur <sup>3</sup>		0	0	0	0	18	7	2	0	0	0	0	1																	0.12	
Cefquinome <sup>4</sup>		0	14	10	2	1	0	0	0	0	0	0	1							24	86	0	0	4	14	1				0.03	
Tetracycline <sup>5</sup>		0	0	0	0	0	0	19	4	0	0	1	0	3																$\geq 128$	
Erythromycin <sup>3</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	14																$\geq 64$	
Trimicocin <sup>3</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	11	0															64	
Spiramycin <sup>4</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	21	1															128	
Tildipramycin <sup>4</sup>		0	0	0	0	0	3	15	9	1	0	0	0	0																2	
Clindamycin <sup>3</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	11																	$\geq 128$
Gentamicin <sup>18</sup>		0	0	0	0	5	17	4	0	0	0	1	1	0	0					26	93	0	0	2	7	1					
Neomycin <sup>4</sup>		0	0	0	0	4	17	3	1	0	0	1	2	0																1	32
Spectinomycin <sup>3</sup>		0	0	0	0	0	0	0	0	10	12	2	0	1	2	1	0														256
Chloramphenicol <sup>6</sup>		0	0	0	0	0	3	10	11	0	0	0	1	3						24	86	0	0	4	14	8				$\geq 256$	
Furazolidone <sup>3</sup>		0	0	0	0	0	0	1	22	3	0	1	1	0																4	8
Enrofloxacin <sup>17</sup>	1	8	15	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2							26	93	0	0	2	7	0.03	0.06				
Colistin <sup>4</sup>		0	0	0	0	27	1	0	0	0	0	0	0	0																0.25	
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>		0	0	0	0	0	0	0	2	4	9	1	0	0	0	0	0	0	12	16	57									$\geq 2048$	
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>		0	6	10	4	2	1	0	0	0	0	0	5							23	82									$\geq 64/1216$	

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for Enterobacteriaceae according to CLSI document M31-S1.

<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than *Staphylococci*" according to CLSI document M31-S1.

<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacteri/indication combination.

<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.

<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.

<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.

<sup>17</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* and "other organisms" from skin, respiratory tract and urinary-genital tract infections of dogs and for not further specified bacteria from skin infections of cats according to CLSI document M31-S1

<sup>18</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from not further specified sites of infection from dogs according to CLSI document M31-S1.

**TABLE 4:** MIC data of *Escherichia coli* from urinary/genital tract infections of dogs/cats ( $n = 100$ ). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values (µm)																susceptible			intermediate			resistant			MIC <sub>50</sub> [µg/ml]	MIC <sub>90</sub> [µg/ml]				
	0.005	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]	[%]			[n]	[%]		
Penicillin G <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	55	28						76	76	0	0	24	24				32	≥ 64	
Ampicillin <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	9	50	16	1	0	0	0	24														2	≥ 128	
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100																	≥ 32	≥ 32	
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	31	45	21	2	1	0						97	97	2	2	1	1			41	64		
Cephalexin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	4	46	39	8	3							50	50	39	39	11	11			8	32		
Ceftazoxime <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	29	56	10	2	2	0	1							97	97	2	2	1	1			2	4		
Ceftriaxone <sup>4</sup>	0	0	0	2	35	51	11	0	1	0	0	0	0															0.12	2		
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	37	47	10	2	1	0	0	0	0	0	0	0															0.25	0.5		
Tetracycline <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	56	28	0	1	0	1	3	11						84	84	1	1	15	15			1	≥ 128		
Erythromycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	42	55														≥ 64	≥ 64		
Trimoxin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	49	42	6													32	64		
Spiramycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	63	21														128	≥ 256	
Tulathromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0													4	8		
Clindamycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	26	74														≥ 128	≥ 128	
Gentamicin <sup>18</sup>	0	0	0	0	0	0	10	68	18	1	0	0	1	0	1					96	96	1	1	3	3			1	2		
Neomycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	10	71	13	1	0	0	2	2	1														1	2	
Spectinomycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	65	1	0	7	0	4	0											16	128	
Chloramphenicol <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	73	3	0	0	0	7			90	90	3	3	7	7			8	8		
Florfenicol <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	2	65	32	1	0	0	0														4	8	
Ertapenem <sup>17</sup>	0	22	56	9	2	0	4	0	0	0	0	3	4																0.03	0.5	
Colistin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	92	7	1	0	0	0	0	0	0														0.25	0.25	
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>	0	28	52	5	1	3	0	0	0	3	20	37	16	5	0	1	0	0		82	82							18	18	16	≥ 2048
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>	0	28	52	5	1	3	0	0	0	0	0	0	0	11						89	89							11	11	0.08/1.19	≥ 64/1216

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for Enterobacteriaceae according to CLSI document M31-S1.  
<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than staphylococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacterial/indication combination.  
<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.  
<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.  
<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>17</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* and "other organisms" from skin, respiratory tract and urinary-genital tract infections of dogs and for not further specified bacteria from skin infections of cats according to CLSI document M31-S1.  
<sup>18</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from not further specified sites of infection from dogs according to CLSI document M31-S1.

**TABLE 5:** MIC data of *Escherichia coli* from gastrointestinal tract infections of dogs/cats ( $n = 100$ ). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values ( $\mu\text{g/ml}$ )																susceptible [n]	intermediate [n]	resistant [n]	resistant [%]	MIC <sub>50</sub> [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MIC <sub>90</sub> [ $\mu\text{g/ml}$ ]								
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256							512	1024	2048					
Penicillin G <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	67	21						86	86	0	0	14	14			32		$\geq 64$
Ampicillin <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	7	53	25	1	0	0	0	14															$\geq 128$
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	99																		$\geq 32$
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	0	1	24	60	13	2	0	0																8/4
Cephalexin <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	7	41	43	8	1																	16
Cefazolin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	33	59	6	2	0	0	0	0																2
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	1	0	2	50	38	8	1	0	0	0	0	0																	1
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	3	63	30	2	0	0	2	0	0	0	0	0																	0.25
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	3	63	30	2	0	0	2	0	0	0	0	0																	0.06
Tetracycline <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	45	53															64
Erythromycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	45	53															$\geq 64$
Trimicosin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	53	41	2														64
Spiramycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	75	13													$\geq 256$
Tulathromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	69	23	3	0	0	0														8
Clindamycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	24	74															$\geq 128$
Gentamicin <sup>18</sup>	0	0	0	0	0	0	3	77	19	0	0	0	0	1	0	0														2
Neomycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	9	74	12	4	0	0	0	1	0															2
Spectinomycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	69	4	2	3	0	2	1												32
Chloramphenicol <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	1	12	79	3	0	0	1	4																8
Florfenicol <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	1	1	73	25	0	0	0	0																8
Ertapenem <sup>3</sup>	0	17	70	9	1	0	0	1	0	0	0	1	1																	0.06
Colistin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	84	16	0	0	0	0	0	0	0																0.5
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>	0	32	50	4	2	3	1	0	0	0	6	13	35	22	9	0	0	0	15	85	85									$\geq 2048$
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>	0	32	50	4	2	3	1	0	0	0	6	13	35	22	9	0	0	0	15	85	85									0.59/5.5

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for *Enterobacteriaceae* according to CLSI document M31-S1.

<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than *Staphylococcus*" according to CLSI document M31-S1.

<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacterium/indication combination.

<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.

<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.

<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than *Streptococcus*" according to CLSI document M31-S1.

<sup>18</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from not further specified sites of infection from dogs according to CLSI document M31-S1.



cerning the different organ systems (Oluoch et al., 2001). Thus, a direct comparison of these results with those determined in the present study is not appropriate.

#### **Infections of urinary/genital tract**

The complete data determined for 100 isolates tested from the urinary/genital tract from dogs/cats are listed in Table 4. Ampicillin resistance (24 %) was detected most frequently, followed by resistance to sulfamethoxazole (18 %), tetracycline (16 %), cephalothin (11 %) and potentiated sulfonamides (11 %). For chloramphenicol (9 %), enrofloxacin (7 %), gentamicin (4 %), cefazolin (3 %), and amoxicillin/clavulanic acid (2 %), resistance was observed in less than 10 % of the test population. A considerable number of isolates classified as intermediate for cephalothin (39 %) was detected whereas isolates classified as intermediate to other antimicrobial agents such as, chloramphenicol (3 %), cefazolin (2 %), gentamicin (1 %), and tetracycline (1 %), occurred rarely.

A Swedish study on antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from pyometra and urine samples from dogs (Hagman and Greko, 2005), which used similar test conditions, revealed lower percentages of resistance for ampicillin (10–22 %), chloramphenicol (0 %), tetracycline (4–13 %), and sulfamethoxazole (8 %) than determined in our study. In contrast, resistances to potentiated sulfonamides, enrofloxacin and gentamicin were observed at almost the same frequency of 14 %, 4–9 %, and 0–2 %, respectively.

A resistance study from Switzerland (Lanz et al., 2003) examined the susceptibility of 93 UGT isolates from diseased dogs and cats by agar disc diffusion based on CLSI standards. In this study, resistances to amoxicillin/clavulanic acid, cephalothin, gentamicin, potentiated sulfonamides, enrofloxacin, tetracycline and chloramphenicol showed high congruency (not more than 3 % difference in the prevalences), only ampicillin resistance was 6 % lower than that observed in our study.

#### **Infections of the gastrointestinal tract**

Table 5 summarizes the complete results for all 100 *E. coli* isolates from GIT infections in dogs and cats. Moderate prevalences of resistance were found for tetracycline (18 %), sulfamethoxazole (15 %), and ampicillin (14 %). Resistance to cephalothin (9 %), chloramphenicol (8 %), amoxicillin/clavulanic acid (2 %), and gentamicin (1 %) was detected in less than 10 % of the isolates. Single isolates showed MICs of enrofloxacin of either 16 µg/ml or  $\geq 32$  µg/ml (Tab. 5). Intermediate isolates were observed for cephalothin (43 %), chloramphenicol (3 %), and amoxicillin/clavulanic acid (2 %).

*E. coli* isolates from the gastrointestinal tract of dogs have also been investigated for their susceptibility in a national resistance monitoring in Norway (NORM-VET, 2004). In this study, faecal samples were taken from dogs that suffered from a first time skin infection, but otherwise considered healthy. Virtually the same prevalences of isolates resistant to sulfamethoxazole and gentamicin were seen in the NORM-VET study and our study. However, the Norwegian isolates showed resistance to oxytetracycline in only 3 % of the isolates, whereas 18 % of the German isolates were resistant to tetracycline, which was used as the class representative for tetracyclines in the BfT-GermVet study.

## **Concluding remarks**

In general, the differences in resistance patterns of *E. coli* isolated from the five different animal species and organ system combinations tested in the BfT-GermVet study were negligible. In all combinations, resistance occurred most frequently against sulfamethoxazole (15–59 %), tetracycline (14–54 %), and ampicillin (14–39 %). Prevalence of resistance among small animal isolates from the urinary/genital tract in general was higher than those among isolates from the gastrointestinal tract (except tetracycline). This is most obvious for ampicillin resistance with 24 % vs. 14 %.

In this study, we decided to determine antimicrobial susceptibility only of *E. coli* isolates originating from diseased animals. Thus, although the BfT-GermVet study implicates the isolation of pathogenic *E. coli*, it did not include the identification of pathovar-specific virulence associated factors or serotypes of the isolates. Even though different pathovars can occur within groups of animals and even in a single individual at the same time, only one isolate was tested for each stock and individual, shedding light on resistance situation of merely a part of the whole *E. coli* population (Ngeleka et al., 2002; Berge et al., 2005; Anderson et al., 2006). However, the primary goal of this monitoring study was not the definition of pathovars, but the determination of MIC data to gain insight into the susceptibility status of such pathogenic *E. coli* isolates. We are currently performing further analyses to i) define the pathotypes of each single strain, and ii) to compare the resistance rates between the different populations, and in particular commensal and pathogenic *E. coli*. To our knowledge, this topic has not been addressed appropriately so far, and we are only aware of one publication, simply comparing resistance rates between these two entities, finding significant differences (Boerlin et al., 2005). However, whether this difference was due to the sampling strategy or due to functional differences in horizontal gene transfer of the single strains, was not determined.

It is generally accepted, that the weakly clonal *E. coli* population of diseased animals differs from that of healthy animals, although even healthy animals may be transiently infected with *E. coli* pathovars. So far this has only been shown for intestinal pathogenic *E. coli* (Schierack et al., 2006; Zweifel et al., 2006). We therefore anticipate differences between *E. coli* from healthy vs. sick animals, and therefore, to determine the resistance of pathogenic isolates, it is very important to collect *E. coli* from diseased animals only. Other projects focus on foodborne diseases and for this purpose isolates are collected from swine and cattle during slaughter or even from meat products. A considerable difference in resistance rates from indicator bacteria and bacteria isolated from infections can be observed in the DANMAP report 2005 (DANMAP, 2006).

A former German nationwide program for resistance determination has a collection of data over a period of several years (Trolldenier, 1995, 1996; Trolldenier et al., 2000), including *E. coli* of cattle, swine, horses, dogs and cats. In that project susceptibility data from about 30 different laboratories were compiled retrospectively. Values were determined by disc diffusion, collection of data was not based on a representative sampling plan and previous antibiotic treatment of sick animals could not be excluded. Due to these facts, the data cannot be compared to those determined in the current study.

An Europe-wide examination of antimicrobial resistance also dealt with *E. coli*, but results are not directly comparable to the data of the present study, because only bovine mastitis isolates from German sources were included and the isolates from swine were from faecal samples of healthy swine (Bywater, 2004).

Taking into account the guidelines for prudent use of antimicrobial agents given by the "Bundestierärztekammer" and the "Arbeitsgemeinschaft der leitenden Veterinärbeamteten" (Bundestierärztekammer, 2000), the data presented in this study can provide information about treatment options for bacterial infections caused by *E. coli*. However, we strongly emphasize that these data can not and should not replace the duty of bacteriological examination and susceptibility testing prior to administration of antimicrobial agents.

The results of the BfT-GermVet study provide for the first time an overview of the susceptibility status of *E. coli*

from selected indications of horses, dogs and cats in Germany, determined by an internationally accepted methodology. Furthermore, susceptibility data for *E. coli* from indications of swine not yet tested in the GERM-Vet program were provided. Thus, data of this study complement the data from the GERM-Vet program of the BfT in a suitable and relevant manner (Kaspar et al., 2007; Schröder et al., 2007; Wallmann et al., 2007).

#### Acknowledgements

We thank the Bundesverband für Tiergesundheit (BfT) for initiation and continuous support during the course of this monitoring program. We particularly thank Andrea Schmidt for excellent technical assistance. Special acknowledgements are given to the numerous colleagues working in the various diagnostic laboratories which provided bacterial isolates for the BfT-GermVet program.

## References

- Albihn, A., V. Baverud, U. Magnusson (2003):** Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet. Scand.* **44**, 121–129.
- Anderson, M. A., J. E. Whitlock, V. J. Harwood (2006):** Diversity and distribution of *Escherichia coli* genotypes and antibiotic resistance phenotypes in faeces of humans, cattle, and horses. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6914–6922.
- Anonymous (2000):** Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln. Dtsch. Tierärztl. **48** (Suppl. 11/02). Schlütersche GmbH, & Co KG, Hannover.
- Berge, A. C., E. R. Atwill, W. M. Sischo (2005):** Animal and farm influences on the dynamics of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Prev. Vet. Med.* **69**, 25–38.
- Beutin, L. (1999):** *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.* **30**, 285–298.
- Boerlin, P., R. Travis, C. L. Gyles, R. Reid-Smith, N. Janeco, H. Lim, V. Nicholson, S. A. McEwen, R. Friendship, M. Archambault (2005):** Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6753–6761.
- Bywater, R. J. (2004):** Veterinary use of antimicrobials and emergence of resistance in zoonotic and sentinel bacteria in the EU. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**, 361–363.
- DANMAP (2006):** DANMAP 2005 – Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark, Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme; [www.danmap.org/pdfFiles/Danmap\\_2005.pdf](http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2005.pdf), 2007-07-12.
- Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiebling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laturnus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, L. H. Wieler (2007):** Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* **297**, 163–176.
- Hagman, R., C. Greko (2005):** Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from bitches with pyometra and from urine samples from other dogs. *Vet. Rec.* **157**, 193–196.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, H. L. Mobley (2004):** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 123–140.
- Kaspar, H., U. Schröder, J. Wallmann (2007):** National resistance monitoring by the BfT: Quantitative resistance level (MIC) of *Pasteurella multocida*, isolated from swine between 2004 and 2006. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120**, 442–451.
- Lanz, R., P. Kuhnert, P. Boerlin (2003):** Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* **91**, 73–84.
- Le Bouguenec, C. (2005):** Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**, 471–478.
- Leclercq, R., P. Courvalin (1991):** Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1273–1276.
- Meier, C. (2004):** Beitrag zur Bedeutung von bakteriellen Infektionserregern bei Hund und Katze – Eine Auswertung der bakteriologischen Untersuchungsbefunde des Instituts für Veterinärbakteriologie. Dissertation, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, 79 S.
- NARMS (2004):** NARMS 2004, National Antimicrobial Resistance Monitoring System; <http://www.fda.gov/cvm/NARMSReport2004.htm>; 2007-07-12.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. 2nd Edition. CLSI document M31–A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, U.S.A.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004):** Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard. Informational supplement (May 2004). NCCLS document M31–S1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, U.S.A.
- Ngeleka, M., L. Brereton, G. Brown, J. M. Fairbrother (2002):** Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh-*, *pap-*, *pil-*, and *tuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* **46**, 143–152.

- NORM-VET (2004):** NORM: Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway; [http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesentere/NORM\\_NORM-VET\\_2004.pdf](http://www.vetinst.no/Arkiv/Zoonosesentere/NORM_NORM-VET_2004.pdf); 2007-07-12.
- Nluoch, A. O., C. H. Kim, R. M. Weisiger, H. Y. Koo, A. M. Siegel, K. L. Campbell, T. J. Burke, C. M. McKiernan, I. Kakoma (2001):** Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990–1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **218**, 381–384.
- Schierack, P., H. Steinruck, S. Kleta, W. Vahjen (2006):** Virulence factor gene profiles of *Escherichia coli* isolates from clinically healthy pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6680–6686.
- Schröder, U., H. Kaspar, J. Wallmann (2007):** National resistance monitoring by the BVL 2004/2005: Quantitative resistance level (MIC) of *Escherichia coli*, isolated from calves and swine suffering from enteritis. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120**, 431–441.
- Schwarz, S., A. Böttner, H. M. Haféz, C. Kehrenberg, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, G. Luhofer, A. Richter, W. Traeder, K.-U. Waldmann, J. Wallmann, C. Werckenthin (2003):** [Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: methods for *in-vitro* susceptibility testing and their suitability with regard to the generation of the most useful data for therapeutic applications]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **116**, 353–361.
- Schwarz, S., E. Alešik, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, J. Wallmann, C. Werckenthin, L. H. Wieler (2007):** The BfT-GermVet monitoring program – aims and basics. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120**, 357–362.
- Statistisches Bundesamt (2005):** Land und Forstwirtschaft, Fischerei: Viehbestand und tierische Erzeugung, Statistisches Bundesamt, Fachserie 3, Reihe 4, 2005.
- SVARM (2006):** Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Report 2005, Swedish National Veterinary Institute; <http://soaping.icecube.snowfall.se/strama/svarm2005.pdf>; 2007-07-12.
- Tenover, F. C. (2006):** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* **119**, S3–10; discussion S62–70.
- Trolldenier, H. (1995):** [The resistance behavior of significant veterinary bacterial agents in the year 1992 (ranking in sequence)]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **108**, 127–132.
- Trolldenier, H. (1996):** [Development of resistance in infectious agents of agricultural animals in Germany (1990–1994) – a review]. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* **103**, 256–260.
- Trolldenier, H., D. Klarmann, P. Krabisch, J. Rohde, A. Steiner, J. Ver-spohl (2000):** [Sensitivity of bovine and equine streptococci to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, cefotaxime) in the agar diffusion and E-test]. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **113**, 234–245.
- VETIDATA:** [www.vetidata.de](http://www.vetidata.de); 2007-04-24.
- Wallmann, J. (2006):** Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *Int. J. Med. Microbiol.* **296** Suppl. **41**, 81–86.
- Wallmann, J., U. Schröder, H. Kaspar (2007):** National resistance monitoring by the BVL 2004/2005: Quantitative resistance level (MIC) of bacterial pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp.) isolated from chickens and turkeys. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120**, 452–463.
- White, D. G. (2006):** Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In: F. M. Aarestrup, eds. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*. Washington, D.C.: ASM Press 145–166.
- Wirth, T., D. Falush, R. Lan, F. Colles, P. Mensa, L. H. Wieler, H. Karch, P. R. Reeves, M. C. Maiden, H. Ochman, M. Achtman (2006):** Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol. Microbiol.* **60**, 1136–1151.
- Zweifel, C., S. Schumacher, L. Beutin, J. Blanco, R. Stephan (2006):** Virulence profiles of Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pig at slaughter. *Vet. Microbiol.* **117**, 328–332.

**Corresponding author:**

Mirjam Grobbel  
 Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
 Philippstr. 13, 10115 Berlin  
 Tel. +49 30 2093 6153, Fax: +49 30 2093 6067  
 e-mail: grobbel.mirjam@vetmed.fu-berlin.de

## 8.2 Publikation 2

Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from various organ systems of horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 402-411

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120,  
402–411 (2007)  
DOI 10.2376/0005-9366-120-402

© 2007 Schlütersche  
Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG  
ISSN 0005-9366

Korrespondierende Autorin:  
grobbel.mirjam@vetmed.fu-berlin.de

Eingegangen: 14.05.2007  
Angenommen: 19.07.2007

## Summary

U.S. Copyright Clearance Center  
Code Statement:  
0005-9366/2007/12009-402 \$15.00/0

<sup>1</sup>Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Fachbereich Veterinärmedizin,  
Freie Universität Berlin

<sup>2</sup>Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin,  
Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität München

<sup>3</sup>Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft,  
Neustadt-Mariensee

<sup>4</sup>Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), Berlin

## Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from various organ systems of horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004–2006

*Antimikrobielle Empfindlichkeit von Klebsiella spp. und Proteus spp. aus verschiedenen Organsystemen der Tierarten Pferd, Hund und Katze ermittelt im BfT-GermVet Monitoringprogramm 2004–2006*

Mirjam Grobbel<sup>1</sup>, Antina Lübke-Becker<sup>1</sup>, Eva Alešik<sup>2</sup>, Stefan Schwarz<sup>2</sup>,  
Jürgen Wallmann<sup>3</sup>, Christiane Werckenthin<sup>4</sup>, Lothar H. Wieler<sup>1</sup>

A total of 120 isolates of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. collected from horses and small animals (dogs and cats) were screened for their susceptibility to 24 different antimicrobial agents. *Klebsiella* spp. were included from infections of the genital tract (GT) of horses (36 isolates) and the urinary/genital tract (UGT) from dogs and cats (17 isolates), while *Proteus* spp. were from small animal (dogs and cats) infections of the UGT (37 strains) and the skin (incl. ear/mouth) (30 isolates). In *Klebsiella* spp. resistance appeared most frequently to ampicillin (53–67 %), sulfamethoxazole (19–29 %) and potentiated sulfonamides (trimethoprim/sulfamethoxazole 1/19 combination) (19–24 %). A further 29 % of enrofloxacin resistant *Klebsiella* isolates were observed for the UGT of small animals. From the GT of horses for this antimicrobial agent there was no isolate detected with a comparably high minimum inhibitory concentration (MIC) value. In *Proteus* spp. highest percentages of resistance occurred against tetracycline (90–92 %). Due to drug efflux proteins, high MIC values against this antimicrobial agent have been frequently reported in literature. In *Proteus* spp. relevant resistance percentages also occurred for potentiated sulfonamides (27–37 %), sulfamethoxazole (24–37 %) and chloramphenicol (24–37 %).

**Keywords:** *in-vitro* susceptibility testing, antimicrobial agents, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., interpretive criteria, horse, dog, cat, minimum inhibitory concentration

## Zusammenfassung

Insgesamt 120 Isolate von *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. von Pferden und Kleintieren (Hunden und Katzen) wurden auf ihre Empfindlichkeit gegenüber 24 verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen untersucht. *Klebsiella* spp. wurden für die Tierart/Organsystem Kombinationen Pferd Genitaltrakt (36 Isolate) und Hund/Katze Urogenitaltrakt (17 Isolate) geprüft, ebenso *Proteus* Isolate aus Infektionen des Urogenitaltrakts (37 Isolate) und der Haut (inkl. Ohr/Maul) (30 Isolate) von Kleintieren. Bei *Klebsiella* spp. konnten die höchsten Resistenzraten gegenüber Ampicillin (53–67 %), Sulfamethoxazol (19–29 %) und potenzierten Sulfonamiden (Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1/19 Kombination) (19–24 %) festgestellt werden. Des Weiteren wurden bei *Klebsiella* spp. aus dem Urogenitaltrakt von Kleintieren 29 % Enrofloxacin-resistente Isolate beobachtet. Ähnlich hohe MHK-Werte konnten für diesen Wirkstoff bei keinem Isolat aus dem Genitaltrakt von Pferden nachgewiesen werden. *Proteus* spp. wiesen gegenüber Tetracyclin mit 90–92 % die höchsten Resistenzraten auf. Diese hohen MHK-Werte sind in der Literatur häufig beschrieben worden und durch Efflux-Proteine begründet. Weiterhin ergaben sich nicht zu vernachlässigende Resistenzraten gegenüber potenzierten Sulfonamiden (27–37 %), Sulfamethoxazol (24–37 %) und Chloramphenicol (24–37 %).

**Schlüsselwörter:** In-vitro-Empfindlichkeitsbestimmung, Antibiotika, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., Grenzwerte, Pferd, Hund, Katze, minimale Hemmkonzentration

## Introduction

*Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. are members of the *Enterobacteriaceae* family, hence defined as Gram-negative facultatively anaerobic rods or coccobacilli (Murray et al., 2003). Members of the genus *Klebsiella* are non-motile bacteria with a capsule and prevalent mucoid colony morphology. They are observed as part of the physiological vaginal microflora in horses and dogs (Selbitz, 1992), but can also cause infections in this organ system (Albihn et al., 2003; Meier, 2004). In horses, clinical inapparent infections of the genital tract (GT) are a frequent cause of infertility or abortion. *Proteus* spp. are part of the commensal skin flora and the environment. A typical morphological feature of this genus is the swarming motility on solid media (Selbitz, 1992). *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis* are frequently isolated from urinary tract infections and dermatitis of small animals (Meier, 2004).

Previous studies have shown that *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. are often resistant to a number of antimicrobial agents, leading to problems in the treatment of infections in animals as well as in humans. In human medicine, multiresistant strains of *Klebsiella* spp. are known to cause severe nosocomial infections, and production of extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) is commonly reported (Jones, 2001). *Proteus* spp. are also a frequent cause of hospital acquired infections in humans (Huang et al., 2006) with unfavourable resistance patterns. To date, there are only few studies in veterinary medicine dealing with resistance in this genus.

A limited number of antimicrobial agents is approved for the treatment of infections of the genital tract from horses by members of the *Enterobacteriaceae* family in Germany. These include amoxicillin, gentamicin, kanamycin, dihydrostreptomycin, spectinomycin, and trimethoprim/sulfonamide combinations ([www.vetidata.de](http://www.vetidata.de)). In small animals, extraintestinal infections caused by *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. are treated with aminopeni-

cillins (amoxicillin, ampicillin), cephalosporins, potentiated sulfonamides, phenicols, aminoglycosides and fluoroquinolones analogous to those caused by *E. coli* (White, 2006). Local treatment is preferred for otitis externa, and for this purpose different antimicrobial agents (e.g. chloramphenicol, gentamicin, polymyxin B or marbofloxacin) are combined with corticosteroids and/or antifungal agents in formulations for external application.

## Material and Methods

Out of the *Klebsiella* isolates collected between January 2004 and March 2006 for the BfT-GermVet monitoring project, 36 obtained from infections of the GT of horses and 17 from the urinary/genital tract (UGT) of dogs and cats were examined for their antimicrobial susceptibility. The major part of *Klebsiella* isolates from horses originated from mares (33 isolates), whereas only three were isolates from stallions. This reflects the fact that infections of the GT mostly occur among females due to anatomical conditions. Isolates from the UGT of small animals included those from dogs (3 male, 7 female) and cats (4 male, 3 female). Only one isolate was sampled from the GT, the others originated from urinary tract infections.

A total of 67 *Proteus* isolates from small animals were examined for their antimicrobial susceptibility. Only five of the 37 isolates from the UGT originated from cats (2 male, 3 female), the other 32 were isolated from dogs (3 male, 29 female). Twelve isolates were collected from infections of the GT of bitches, while the remaining isolates originated from urinary tract infections. For three isolates, antimicrobial pre-treatment of the animal was reported. Twenty-nine isolates were collected from hosts without pre-treatment and for five isolates no information about the pre-treatment status was available.



**TABLE 2:** MIC data of *Klebsiella* spp. from urinary/genital tract infections of dogs/cats (n = 17). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values (µg/ml)																susceptible				intermediate		resistant		MIC <sub>50</sub> [µg/ml]	MIC <sub>90</sub> [µg/ml]					
	0.005	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]			[%]	[n]	[%]		
Penicillin G <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	7	8							5	29	3	18	9	53	32	≥ 128	≥ 32	≥ 64		
Ampicillin <sup>1</sup>	0	0	0	0	0	0	1	2	3	2	3	4								5	29	3	18	9	53	32	≥ 128	≥ 32	≥ 64		
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17								14	82	0	0	3	18	21	32/16	≥ 32	≥ 64		
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	0	3	8	3	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	12	71	2	12	3	18	8	8	≥ 64	≥ 64	≥ 64	
Cephalexin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	3	7	2	0	1	0	4							12	71	1	6	4	24	2	1	≥ 32	≥ 64	≥ 64	
Cefeprozol <sup>4</sup>	0	0	0	2	3	1	2	3	3	0	1	0	2							13	76	1	6	3	18	1	0.25	≥ 32	≥ 32	≥ 32	
Ceftiofur <sup>3</sup>	0	0	6	6	1	1	0	0	1	0	0	0	2							13	76	1	6	3	18	1	0.08	≥ 32	≥ 32	≥ 32	
Cefquinome <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	3	7	2	1	1	0	0	2	1					13	76	1	6	3	18	1	0.08	≥ 32	≥ 32	≥ 32	
Tetracycline <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	15						13	76	1	6	3	18	1	0.64	≥ 64	≥ 64	≥ 64	
Erythromycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	14					15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 128	≥ 128	≥ 128	≥ 128	
Trimoxin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	14						15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
Spiramycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	14						15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
Tulathromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	1	1	6	4	1	2	1	1						15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
Clindamycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	4	6	6					15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
Gentamicin <sup>18</sup>	0	0	4	10	1	0	0	0	0	0	1	1	0							15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
Neomycin <sup>4</sup>	0	0	0	3	10	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0					15	88	0	0	2	12	0.5	≥ 256	≥ 256	≥ 256	≥ 256	
Spectinomycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	6	0	0	1	0	1	0	13	76	1	6	3	18	4	8	128	≥ 128	≥ 128	≥ 128
Chloramphenicol <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	1	6	6	0	1	1	0	1	1						13	76	1	6	3	18	4	8	128	≥ 128	≥ 128	≥ 128
Florfenicol <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	4	4	5	1	1	1	0							11	65	1	6	5	29	0.03	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	
Erofloxacin <sup>17</sup>	0	1	8	1	0	1	0	1	0	0	1	3								11	65	1	6	5	29	0.03	≥ 32	≥ 32	≥ 32	≥ 32	
Golisin <sup>4</sup>	0	0	0	0	15	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0					12	71	0	0	5	29	0.25	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	≥ 2048	
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	4	0	0	0	0	0	0	5	29	0	0	4	24	0.08/1.19	≥ 64/1216	≥ 64/1216	≥ 64/1216	≥ 64/1216	
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>	0	1	9	2	0	0	1	0	0	0	0	0	4							13	76	0	0	4	24	0.08/1.19	≥ 64/1216	≥ 64/1216	≥ 64/1216	≥ 64/1216	

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for Enterobacteriaceae according to CLSI document M31-S1.  
<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than staphylococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacterial/indication combination.  
<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.  
<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.  
<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>17</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* and "other organisms" from skin, respiratory tract and urinary-genital tract infections of dogs and for not further specified bacteria from skin infections of cats according to CLSI document M31-S1.  
<sup>18</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from not further specified sites of infection from dogs according to CLSI document M31-S1.



**TABLE 3:** MIC data of *Proteus* spp. from urinary/genital tract infections of dogs/cats ( $n = 37$ ). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values ( $\mu\text{mM}$ )													susceptible			intermediate			resistant			MIC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	MIC <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	[n]	[%]	[n]			[%]	[n]	[%]
Penicillin G <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	9	14	5	0	0	0	9				28	76	1	3	8	22		2	$\geq 64$
Ampicillin <sup>1</sup>	0	0	0	0	2	22	4	0	0	0	0	1	0	1	7											0.5	$\geq 128$
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37						37	100	0	0	0	0		$\geq 32$	$\geq 32$
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>	0	0	0	0	0	13	20	2	1	0	0	0	0	0	21				34	92	2	5	1	3		10.5	2/1
Cephalexin <sup>5</sup>	0	0	0	0	0	1	16	15	1	2	0	1	0	1	1				33	89	3	8	1	3		4	8
Ceftazidim <sup>6</sup>	0	0	0	0	0	1	7	25	0	3	0	1	0	1	1											0.25	0.5
Cefoperazon <sup>4</sup>	0	4	23	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0											0.03	0.06
Ceftiofur <sup>7</sup>	0	0	0	32	4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0											0.06	0.12
Tetracycline <sup>8</sup>	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	29	4	0	0				3	8	0	0	34	92		32	64
Erythromycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37												$\geq 64$	$\geq 64$
Trimoxin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37											$\geq 128$	$\geq 128$
Spliamycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	37										$\geq 256$	$\geq 256$
Tulathromycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	36												$\geq 128$	$\geq 128$
Clindamycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	32												$\geq 128$	$\geq 128$
Gentamicin <sup>16</sup>	0	0	0	0	0	6	21	8	0	0	0	0	1	0	1				35	95	0	0	2	5		1	2
Neomycin <sup>4</sup>	0	0	0	0	6	25	0	1	2	2	1	0	0	0	0											2	16
Specinomycin <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	6	14	3	0	5	7	2											32	512
Chloramphenicol <sup>6</sup>	0	0	1	1	10	14	2	0	5	2	2	0	0	0	0				26	70	2	5	9	24		8	128
Florfenicol <sup>3</sup>	0	0	0	0	0	0	4	23	10	0	0	0	0	0	0											2	4
Enrofloxacin <sup>17</sup>	0	0	0	5	18	6	0	0	0	3	4	1	0	0	0				29	78	0	0	8	22		0.12	8
Colistin <sup>4</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	36													$\geq 64$	$\geq 64$
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>	0	1	13	10	1	0	1	6	5	16	0	0	0	0	0				9	28	76					32	$\geq 2048$
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>	0	1	13	10	1	0	1	0	0	0	0	10							27	73						0.12/2.38	$\geq 64/1216$

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for Enterobacteriaceae according to CLSI document M31-S1.

<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than staphylococci" according to CLSI document M31-S1.

<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacteriostatic combination.

<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.

<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for not further specified bacteria according to CLSI document M31-S1.

<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.

<sup>17</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Staphylococcus* spp., Enterobacteriaceae and "other organisms" from skin, respiratory tract and urinary-genital tract infections of dogs and for not further specified bacteria from skin infections of cats according to CLSI document M31-S1.

<sup>16</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa from not further specified sites of infection from dogs according to CLSI document M31-S1.

**TABLE 4:** MIC data of *Proteus* spp. from infections of skin/ear/mouth from dogs/cats (n = 30). Breakpoints available for calculation of percentages of resistance are indicated by bold lines. For detailed information see footnotes below the table.

Antimicrobial Agent(s)	MIC values (µg/ml)															susceptible					intermediate		resistant		MIC <sub>50</sub> (µg/ml)	MIC <sub>90</sub> (µg/ml)							
	0.005	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	[n]	[%]	[n]	[%]	[n]			[%]						
Penicillin G <sup>3</sup>																				19	63	4	13	7	23					2	≥ 64		
Ampicillin <sup>1</sup>																				19	63	4	13	7	23					1	≥ 128		
Oxacillin + 2% NaCl <sup>3</sup>																				30	100	0	0	0	0					≥ 32	≥ 32		
Amoxicillin/clavulanic acid <sup>2</sup>																				30	100	0	0	0	0					10/0.5	2/1		
Cephalexin <sup>5</sup>																				27	90	0	0	0	3	10				2	8		
Ceftazolin <sup>5</sup>																				27	90	0	0	0	3	10				4	4		
Cefoperazon <sup>4</sup>																															0.25	0.5	
Ceftriaxol <sup>3</sup>																															0.03	0.06	
Cefixim <sup>3</sup>																															0.06	0.12	
Tetracycline <sup>5</sup>																				0	0	0	3	10	27	90				32	32		
Erythromycin <sup>3</sup>																															≥ 64	≥ 64	
Trimicasin <sup>3</sup>																															≥ 128	≥ 128	
Spiramycin <sup>4</sup>																															≥ 256	≥ 256	
Tulathromycin <sup>4</sup>																															≥ 128	≥ 128	
Clindamycin <sup>3</sup>																															≥ 128	≥ 128	
Genitamicin <sup>18</sup>																															1	2	
Neomycin <sup>4</sup>																																2	32
Spectinomycin <sup>3</sup>																																64	512
Chloramphenicol <sup>6</sup>																																8	128
Florfenicol <sup>3</sup>																																2	4
Enrofloxacin <sup>17</sup>																																0.12	4
Colistin <sup>4</sup>																																≥ 64	≥ 64
Sulfamethoxazole <sup>5</sup>																																32	≥ 2048
Trimethoprim/sulfamethoxazole <sup>6</sup>																																0.25/4.75	≥ 64/1216

<sup>1</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for *Enterobacteriaceae* according to CLSI document M31-S1.  
<sup>2</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than staphylococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>3</sup> no CLSI-approved breakpoints available for this bacterial/indication combination.  
<sup>4</sup> no CLSI-approved breakpoints available at all.  
<sup>5</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>6</sup> Breakpoints adopted from human medicine valid for "organisms other than streptococci" according to CLSI document M31-S1.  
<sup>17</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* and "other organisms" from skin, respiratory tract and urinary-geital tract infections of dogs and for not further specified bacteria from skin infections of cats according to CLSI document M31-S1.  
<sup>18</sup> Veterinary-specific breakpoints valid for *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from not further specified sites of infection from dogs according to CLSI document M31-S1.

Of the 30 *Proteus* isolates from skin infections (incl. ear/mouth), only one originated from a male cat, the remaining were collected from dogs (17 female, 12 male). A total of 21 *Proteus* isolates were collected from otitis externa, nine from further infections of the skin. Antimicrobial pre-treatment of the host was reported for four isolates, 19 isolates were collected from animals without pre-treatment and for the remaining seven the status of pre-treatment was unknown.

For identification purpose, the isolates were cultured on CHROMagar Orientation (BBL, Paris, France) and from those with typical morphology on this medium, every 5<sup>th</sup> isolate was confirmed by the API 20E System (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France) in addition. Isolates without typical morphology were identified by the API 20E System (bioMérieux, Marcy L'Étoile, France).

Based on the recommendations given in the CLSI document M31-A2 (NCCLS, 2002) and by the working group "antimicrobial resistance" of the Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG) (Schwarz et al., 2003), *in-vitro* susceptibility testing was performed by broth microdilution. The MIC data obtained were evaluated on the basis of the interpretive criteria listed in the CLSI document M31-S1 (NCCLS, 2004).

## Results and Discussion

Specific breakpoints for veterinary pathogenic *Enterobacteriaceae* are available for the interpretation of the results of ampicillin, enrofloxacin and gentamicin. Breakpoints adopted from human medicine for organisms "other than staphylococci", "other than streptococci", or without further specification of bacterial species, were applied for amoxicillin/clavulanic acid, tetracycline, chloramphenicol, potentiated sulfonamides, cephalothin, ceftazolin and sulfamethoxazole. For ceftiofur, ceftquinome, cefoperozan, tulathromycin, neomycin, spectinomycin, florfenicol and colistin, no CLSI-approved breakpoints are currently available for the tested bacteria/organ system/animal species combination. For each antimicrobial agent, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were calculated and detailed results are given in the respective tables (Tab. 1–4).

Breakpoints for enrofloxacin are available only for *Enterobacteriaceae* from infections of the UGT in dogs and infections of the skin of dogs and cats. For feline isolates, MICs showed a clear bimodal distribution ( $\leq 0.12$  µg/ml or  $\geq 4$  µg/ml), corresponding to the distribution patterns of susceptible and resistant canine isolates. Therefore, all small animal results in these indications were classified on the basis of breakpoints for canine isolates.

The veterinary specific breakpoints for gentamicin are only valid for dogs and horses (susceptible:  $\leq 2$  µg/ml, intermediate: 4 µg/ml, resistant:  $\geq 8$  µg/ml). For *Enterobacteriaceae* from other animal species, there are breakpoints adopted from human medicine, which differ by one dilution step from those for dogs and horses (s:  $\leq 4$  µg/ml, i: 8 µg/ml, r:  $\geq 16$  µg/ml). Again, all MIC data obtained from small animal isolates were categorized on the basis of the breakpoints for canine isolates since there were no isolates from cats that showed MICs of 2 or 4 µg/ml.

Like *E. coli*, *Klebsiella* spp. as well as *Proteus* spp. are known to be naturally resistant against macrolides (Leclercq and Courvalin, 1991). As expected, the MIC values of erythromycin, spiramycin, tilmicosin, and

tulathromycin were equal to or even higher than the highest concentration tested for nearly all isolates. The same phenomenon was observed for clindamycin. With regard to the classical penicillins (penicillin G and oxacillin), many enterobacterial isolates showed high tolerance, which is known to be due to  $\beta$ -lactamases and changes in the outer cell membrane (Tenover, 2006).

Due to the fact that the number of isolates from the genera *Klebsiella* and *Proteus* was rather small, and since further differentiation of these isolates was not based on the sampling plan as outlined (Schwarz et al., 2007), the data are not displayed for the different species. Thus, some results may be influenced by unequal properties of indole-negative and indole-positive *Proteus* spp. as well as of various *Klebsiella* spp. As stated in the literature, differences in resistance patterns can occur within these genera (Murray et al., 2003).

### Equine *Klebsiella* spp. Infections of the genital tract

A total of 36 isolates were tested and the detailed results are given in Table 1. The highest percentage of resistant isolates occurred against ampicillin with 67 %, followed by sulfamethoxazole (19 %), tetracycline (11 %), potentiated sulfonamides (11 %), ceftazolin (6 %) and chloramphenicol (3 %). All isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid 2/1 and gentamicin. Intermediate isolates were observed for ampicillin (22 %) and ceftazolin (6 %). None of the isolates from this infection site showed distinctive multiresistance patterns in contrast to isolates from small animals.

In a study in the USA in 1993, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values were determined for *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses (Burrows et al., 1993). In general, the results of the present study showed one to four steps lower MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, tetracycline and spectinomycin than those presented by Burrows et al. (1993). Both studies revealed MIC<sub>50</sub> values higher than 16 µg/ml for ampicillin. Another study gave MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for *Klebsiella* isolates (Jacks et al., 2003), but due to the limited number of isolates (n = 10) and the narrow range of concentrations tested in that study, a direct comparison of the values is not appropriate.

### Canine and feline *Klebsiella* spp. Infections of the urinary/genital tract

Results obtained from 17 *Klebsiella* isolates originating from the UGT of diseased small animals are shown in Table 2. Due to the low number of isolates tested, the percentages of resistance must be considered with care.

Approximately 53 % of the isolates were found to be resistant to ampicillin. The percentage of enrofloxacin resistant (29 %, 5 isolates) as well as of intermediate (6 %, 1 isolate) isolates was remarkably high. More than 20 % of the 17 isolates were resistant against sulfamethoxazole (29 %), ceftazolin (24 %) and potentiated sulfonamides (24 %). Resistance to ceftazolin, tetracycline, chloramphenicol and amoxicillin/clavulanic acid was seen in 18 % of the isolates. Two isolates showed resistance against gentamicin (12 %).

For ampicillin (18 %), cephalothin (12 %), ceftazolin (6 %), tetracycline (6 %) and chloramphenicol (6 %) additional intermediate isolates were observed.

It is noteworthy that we identified two multiresistant strains (1 from a dog, 1 from a cat) from Lower Saxony,

which showed MIC values among or above the highest tested concentration for all  $\beta$ -lactam antibiotics and the amoxicillin/clavulanic acid combination. Additionally both isolates showed highest MIC values against gentamicin, enrofloxacin, sulfamethoxazole, and potentiated sulfonamides. Only for tetracycline, neomycin and colistin, MIC values of  $\leq 2 \mu\text{g/ml}$  were detected.

A strain isolated from a cat in Bavaria also showed high MIC values for ampicillin, cephalothin, ceftazolin, amoxicillin/clavulanic acid, enrofloxacin, sulfamethoxazole and potentiated sulfonamides. In contrast to the above mentioned isolates, a lower MIC was clearly detected for ceftquinome and gentamicin, as well as distinctly higher MIC values against neomycin, spectinomycin, tetracycline and chloramphenicol.

Moreover, the present study showed lower MIC<sub>50</sub> values of *Klebsiella* isolates from dogs and cats against cephalothin, tetracycline and spectinomycin than the study from Burrows et al. dealing with *Klebsiella pneumoniae* only (Burrows et al., 1993). Because all MIC<sub>50</sub> values in that study were in the highest tested concentration, a direct comparison of MIC<sub>90</sub> values between both studies was not possible.

#### Canine and feline *Proteus* spp.

After *E. coli*, *Proteus* spp. are the most frequently isolated bacteria from urinary tract infections in dogs (Cohn et al., 2003; Meier, 2004) and 3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> in quantity ranking of pathogenic bacteria in infections of the ear and skin (Meier, 2004). This is comparable with the ranking of isolation frequencies shown for isolates of human origin in Europe (Murray et al., 2003).

#### Infections of the urinary/genital tract

Results obtained from the 37 *Proteus* isolates of this indication are shown in Table 3. Ninety-two percent of the isolates showed resistance against tetracycline. Resistance percentages ranging from 20 to 30 % were determined for potentiated sulfonamides (27 %), chloramphenicol (24 %), sulfamethoxazole (24 %), enrofloxacin (22 %) and ampicillin 22 %. Less than 10 % of the isolates were resistant to gentamicin (5 %), ceftazolin (3 %) and cephalothin (3 %). For ceftazolin (8 %), chloramphenicol (5 %), cephalothin (5 %) and ampicillin (3 %) one to three isolates were classified as intermediate. No isolate showed resistance to amoxicillin/clavulanic acid.

#### Infections of skin/ear/mouth

The complete results obtained for 30 *Proteus* isolates from infections of the skin (incl. ear/mouth) of dogs/cats are listed in Table 4. There again, tetracycline resistant isolates represented a high percentage (90 %), while the remaining 10 % were intermediate to this antimicrobial drug. Around 37 % of the isolates were found to be resistant against sulfamethoxazole, potentiated sulfonamides, and chloramphenicol. Resistance was also observed for enrofloxacin (27 %), ampicillin (23 %), cephalothin (10 %), ceftazolin (10 %), and gentamicin (7 %). All isolates were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid. The prevalence of intermediate isolates for ampicillin, chloramphenicol and gentamicin were found to be 13 % for the former and 3 % for the latter two antimicrobial agents.

Meier (2004) tested *Proteus* isolates from various infection sites from dogs and cats. She generally found com-

parable patterns of resistance against ampicillin (24–42 %), chloramphenicol (34–42 %), sulfonamides (33–46 %), and trimethoprim/sulfonamide (26–42 %) as we observed in this study. A higher percentage of isolates showed resistance to amoxicillin/clavulanic acid (27–42 %), while a lower percentage was detected for resistance against enrofloxacin (4–17 %).

Observation of resistance prevalence in a Canadian veterinary teaching hospital, performed by agar disc diffusion according to CLSI standards, gave current data for *Proteus* spp. from dogs without further differentiation of the infection site (Authier et al., 2006). That study showed higher percentages of resistant isolates than observed in the present study for ampicillin (74 %), but lower ones for potentiated sulfonamides (15 %) and enrofloxacin (5 %). In both studies similarly low values < 5 % were detected against gentamicin and amoxicillin/clavulanic acid.

Burrows and co-workers determined MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for *Proteus mirabilis* of canine origin (Burrows et al., 1993). Obvious differences in comparison with the results of the present study were seen only in the MIC<sub>50</sub> value for ampicillin with 4  $\mu\text{g/ml}$  vs. 0.5  $\mu\text{g/ml}$  in isolates from the UGT and 1  $\mu\text{g/ml}$  in those from the skin. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values for cephalothin, chloramphenicol, gentamicin, tetracycline and spectinomycin were generally equal to those in the present study from UGT and skin infections caused by *Proteus* spp.

#### Concluding remarks

In *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp., prevalence of resistance was considerably high for several antimicrobial agents. However, we were unable to detect large differences in resistance patterns between the different organ systems of small animals. Taking into account the small number of tested isolates for each organ system these results are not representative, but allow an insight into resistance of these bacterial species from animal origin.

*Klebsiella* isolates from the GT of horses showed lower percentages of resistance and/or in general lower MIC<sub>90</sub> values than those from the UGT of small animals. In equine isolates, prevalence of ampicillin resistance appeared to be lower, a finding which is possibly due to differences in resistance patterns among the various *Klebsiella* species. Highest percentages of resistant isolates occurred against ampicillin (53–67 %), sulfamethoxazole (19–29 %), and potentiated sulfonamides (19–24 %). Two isolates from small animal UGT showed resistance to all tested  $\beta$ -lactam antibiotics and four additional antimicrobial drugs.

*Proteus* isolates from the skin of small animals generally showed higher percentages of resistant isolates than those from the UGT. Next to tetracycline, most resistant isolates were observed for potentiated sulfonamides (27–37 %), sulfamethoxazole (24–37 %) and chloramphenicol (24–37 %). We did not find *Proteus* isolates resistant against the combination amoxicillin/clavulanic acid. One UGT isolate and one skin isolate showed resistance against potentiated sulfonamides and at the same time susceptibility to sulfamethoxazole (32 resp. 64  $\mu\text{g/ml}$ ).

In small animals, *Klebsiella* (29 %) and *Proteus* (22–27 %) isolates showed considerably high percentages of enrofloxacin resistance (MIC  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ), while none of the 36 isolates from horses showed a MIC value

higher than 0.06 µg/ml. In *Proteus* isolates high enrofloxacin MIC values (17 isolates) were frequently associated with resistance to chloramphenicol (15 isolates), sulfonamides (14 isolates) and potentiated sulfonamides (13 isolates). An American study, dealing with fluoroquinolone resistance of isolates from urinary tract infections of dogs, including 154 isolates of *Proteus mirabilis* and 77 of *Klebsiella* spp., collected during a ten year period, showed only low (< 5 %) prevalences of resistance for both genera (Cohn et al., 2003).

Owing to high resistance prevalences of this bacterial species in human medicine, it is particularly important to determine the prevalence of antimicrobial resistance in these bacterial species in animals and especially pets, as these could possibly be a reservoir of antimicrobial resistant bacteria (Guardabassi et al., 2004).

We strongly emphasize that the present study can not and should not replace the duty of bacteriological examination and susceptibility testing prior to administration of antimicrobial agents. Nevertheless the results of this

study provide for the first time an insight into the susceptibility status of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from selected organ infection sites of horses, dogs and cats in Germany. Thus, these data constitute a suitable and relevant complement to the data obtained from the GERM-Vet program of the BVL (Kaspar et al., 2007; Schröder et al., 2007; Wallmann et al., 2007). However, due to a lack of prior studies, a conclusion about general trends of the susceptibility of the tested veterinary pathogens cannot be drawn.

#### Acknowledgements

We thank the Bundesverband für Tiergesundheit (BfT) for initiation and continuous support during the course of this monitoring program. We particularly thank Andrea Schmidt for excellent technical assistance. Special acknowledgements are given to the numerous colleagues working in the various diagnostic laboratories which provided bacterial strains for the BfT-GermVet monitoring program.

## References

- Albihn, A., V. Baverud, U. Magnusson (2003): Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Vet. Scand.* **44**, 121–129.
- Anonymous (2000): Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln. Dtsch. Tierärztebl. **48** (Suppl. 111/2). Schlütersche GmbH & Co KG, Hannover.
- Authier, S., D. Paquette, O. Labrecque, S. Messier (2006): Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. *Can. Vet. J.* **47**, 774–778.
- Burrows, G. E., R. J. Morton, W. H. Fales (1993): Microdilution antimicrobial susceptibilities of selected gram-negative veterinary bacterial isolates. *J. Vet. Diagn.* **5**, 541–547.
- Cohn, L. A., A. T. Gary, W. H. Fales, R. W. Madsen (2003): Trends in fluoroquinolone resistance of bacteria isolated from canine urinary tracts. *J. Vet. Diagn. Invest.* **15**, 338–343.
- Guardabassi, L., S. Schwarz, D. H. Lloyd (2004): Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria: J. Antimicrob. Chemother. **54**, 321–332.
- Huang, S. S., M. H. Lee, H. S. Leu (2006): Bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **39**, 496–502.
- Jacks, S. S., S. Giguere, A. Nguyen (2003): In vitro susceptibilities of *Rhodococcus equi* and other common equine pathogens to azithromycin, clarithromycin, and 20 other antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1742–1745.
- Jones, R. N. (2001): Resistance patterns among nosocomial pathogens: trends over the past few years. *Chest* **119**, 397S–404S.
- Kaspar, H., U. Schröder, J. Wallmann (2007): National resistance monitoring by the BVL: Quantitative resistance level (MIC) of *Pasteurella multocida*, isolated from swine between 2004 and 2006. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120**, 442–451.
- Leclercq, P., P. Courvalin (1991): Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1273–1276.
- Meier, C. (2004): Beitrag zur Bedeutung von bakteriellen Infektionserregern bei Hund und Katze – Eine Auswertung der bakteriologischen Untersuchungen des Instituts für Veterinärbakteriologie. Dissertation, Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, 79 pp.
- Murray, P. R., E. J. Baron, J. H. Jorgensen, eds. (2003): *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. ASM Press, Washington D.C.: P. R. Murray.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard 2nd Edition. CLSI document M31–A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, U.S.A.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2004): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard; Informational supplement (May 2004). NCCLS document M31–S1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA, U.S.A.
- Schröder, U., H. Kaspar, J. Wallmann (2007): National resistance monitoring by the BVL 2004/2005: Quantitative resistance level (MIC) of *Escherichia coli*, isolated from calves and swine suffering from enteritis. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* **120**, 431–441.

- Schwarz, S., A. Böttner, H. M. Hafez, C. Kehrenberg, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, G. Luhofer, A. Richter, W. Traeder, K.-H. Waldmann, J. Wallmann, C. Werckenthin (2003):** [Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: methods for in-vitro susceptibility testing and their suitability with regard to the generation of the most useful data for therapeutic applications]. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 116, 353–361.
- Schwarz, S., E. Alešik, M. Grobbel, A. Lübke-Becker, J. Wallmann, C. Werckenthin, L. H. Wieler (2007):** The BfT-GermVet monitoring program – aims and basics. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 357–362.
- Selbitz, H. J., ed. (1992):** Lehrbuch der veterinärmedizinischen Bakteriologie. Fischer. Jena; Stuttgart: H.-J. Selbitz.
- Tenover, F. C. (2006):** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am. J. Med. 119, S3–10; discussion 62–70.
- VETIDATA:** www.vetidata.de; 2007-04-24
- Wallmann, J., U. Schröer, H. Kaspar (2007):** National resistance monitoring by the BVL 2004/2005: Quantitative resistance level (MIC) of bacterial pathogens (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella* sp.) isolated from chickens and turkeys. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 452–463.
- White, D. G. (2006):** Antimicrobial Resistance in Pathogenic *Escherichia coli* from Animals. In: F. M. Aarestrup, eds. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Washington, D.C.: ASM Press 145–166.

**Corresponding author:**

Mirjam Grobbel  
Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen  
Philippstr. 13, 10115 Berlin  
Tel. +49 30 2093 6153, Fax: +49 30 2093 6067  
e-mail: grobbel.mirjam@vetmed.fu-berlin.de

### **8.3 Publikation 3**

Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones.  
Veterinary Microbiology, 124, 2007, 73-81



## Comparative quantification of the *in vitro* activity of veterinary fluoroquinolones

M. Grobbel<sup>a,\*</sup>, A. Lübke-Becker<sup>a</sup>, L.H. Wieler<sup>a</sup>, R. Froyman<sup>b</sup>,  
S. Friederichs<sup>b</sup>, S. Filios<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institute of Microbiology and Epizootics, Free University Berlin, Philippstrasse 13, 10115 Berlin, Germany

<sup>b</sup> Bayer HealthCare AG, Animal Health, 51368 Leverkusen, Germany

Received 9 January 2007; received in revised form 5 March 2007; accepted 22 March 2007

### Abstract

The aim of this study was to compare the *in vitro* antimicrobial activity of the veterinary fluoroquinolones against a panel of recently isolated porcine and bovine bacterial pathogens. The study used enrofloxacin as a benchmark against which other agents were compared, being the most common fluoroquinolone used in treatment of bovine and porcine infections. The activity of ciprofloxacin was also assessed as it is the main metabolite of enrofloxacin in cattle. Enrofloxacin and ciprofloxacin generally showed higher antibacterial activity, in terms of MIC<sub>50</sub> values, for most pathogen species when compared with marbofloxacin, difloxacin, danofloxacin and norfloxacin. Ciprofloxacin showed significantly greater *in vitro* antibacterial activity than enrofloxacin against *M. haemolytica*, *P. multocida* and *E. coli*, whereas enrofloxacin showed greater activity than ciprofloxacin against *S. aureus*. Marbofloxacin was significantly more active than enrofloxacin against *M. haemolytica*, *E. coli* and *B. bronchiseptica* but less active against *P. multocida*, *S. aureus*, coagulase negative Staphylococci, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* and *S. suis*. Danofloxacin was significantly less active than enrofloxacin against *P. multocida*, *E. coli*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* and *S. suis*. Enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin showed the highest *in vitro* activities against most bovine pathogens tested and the porcine pathogens also showed a high degree of sensitivity to enrofloxacin. These data facilitate further pharmacokinetic/pharmacodynamic comparison of fluoroquinolones currently used in veterinary medicine.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Veterinary antibiotics; Fluoroquinolone activity; Enrofloxacin; Ciprofloxacin

### 1. Introduction

The use of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) analyses is of increasing importance during the development of new antimicrobial agents, to optimise treatment strategies (McKellar et al., 2004)

\* Corresponding author. Tel.: +49 30 2093 6153;

fax: +49 30 2093 6067.

E-mail address: [grobbel.mirjam@vetmed.fu-berlin.de](mailto:grobbel.mirjam@vetmed.fu-berlin.de) (M. Grobbel).



and reduce the development of antibiotic resistant bacterial strains (Lathers, 2002). PK characterisation involves defining parameters such as the area under the concentration time-curve (AUC) and the maximum plasma concentration ( $C_{\max}$ ) (Coulet et al., 2002). The most commonly used PD parameter is minimum inhibitory concentration (MIC), which is key to the derivation of therapeutic AUC/MIC and  $C_{\max}$ /MIC ratios. PK and PD components can be combined experimentally either by integration or by modelling (Kietzmann et al., 2004; McKellar et al., 2004; Toutain and Lees, 2004).

Fluoroquinolones are important therapeutic agents in veterinary medicine, having a broad range of antimicrobial activity (Brown, 1996). They act by inhibiting the action of the topoisomerase gene products thereby disrupting DNA replication (Hawkey, 2003). Many studies assess the MICs of fluoroquinolones against veterinary pathogen collections, to compare the efficacy of the different agents. However, such studies have a number of limitations: (1) most do not consider the full panel of veterinary fluoroquinolones (Cruz et al., 1997; De Oliveira et al., 2000; Yoshimura et al., 2001, 2002a,b; Zhao et al., 2005); (2) studies often use differing methodologies, introducing variability into the absolute MIC values attained (Gombert and Aulicino, 1985; Koeth et al., 2000; Wallmann et al., 2006) even when using procedures standardised according to the Clinical and Laboratory Standards Institute ([CLSI] NCCLS, 2002); (3) a number of fluoroquinolone resistance monitoring studies do not accurately determine true *in vitro* potencies, as antibiotic concentrations at the lower end of the sensitivity range were not used (Watts et al., 1997; Mevius and Hartman, 2000; Yoshimura et al., 2001); (4) MIC values should be determined for a large group of isolates for each type of organism, minimising the impact of any variation between isolates (Lees et al., 2004; Toutain and Lees, 2004). To overcome these limitations in the background data we assessed the *in vitro* antimicrobial activities of a range of fluoroquinolones relevant to veterinary practice, comprising enrofloxacin and the comparators ciprofloxacin, danofloxacin, difloxacin, marbofloxacin and norfloxacin. Though not licensed for use in veterinary medicine the inclusion of ciprofloxacin was considered important, as it is the main enrofloxacin metabolite in cattle.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Minimum inhibitory concentration testing

MIC values were determined using the microbroth dilution method in accordance with the CLSI guidelines (NCCLS, 2002). Sensititre microtitre plates (MCS Diagnostics, Swalmen, Netherlands) were coated with 11 or 12 two-fold dilutions of the fluoroquinolones: enrofloxacin (0.002–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), ciprofloxacin (0.002–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), danofloxacin (0.002–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), difloxacin (0.002–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), norfloxacin (0.004–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and marbofloxacin (0.002–4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 2.2. Bacterial strains

Ten bovine and porcine pathogen species, comprising 422 isolates were tested. The isolates were collected between 2001 and 2005 from sources in Germany, Belgium and France and comprised: 49 bovine respiratory *Mannheimia haemolytica* isolates; 60 bovine respiratory and 15 porcine respiratory *Pasteurella multocida* isolates; 50 bovine mastitis and 20 bovine intestinal *Escherichia coli* isolates; 47 bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates; 24 bovine mastitis isolates of coagulase negative *Staphylococci*; 25 bovine mastitis *Streptococcus dysgalactiae* isolates; 24 bovine mastitis *Streptococcus uberis* isolates; 39 porcine respiratory *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates; 29 porcine respiratory *Bordetella bronchiseptica* isolates; 40 *Streptococcus suis* isolates from porcine septicaemia and associated conditions. As the study was not designed to assess the incidence of resistance to fluoroquinolones, any isolate that was not sensitive to an antibiotic in the concentration range tested was deemed resistant and excluded from the analyses. Control strains *E. coli* ATCC 25922 and *S. aureus* ATCC 29213 were tested concomitantly as part of each antibiotic sensitivity assay.

### 2.3. Data analysis

Statistical analyses were carried out using the SAS software (release 8.2). Pairwise comparisons of *in vitro* MIC activities were made for enrofloxacin versus the comparator fluoroquinolones. The mean differ-

ences (log<sub>2</sub>) between the MICs of veterinary fluoroquinolones were considered for each of the 10 bacterial test species. The mean log<sub>2</sub> difference was determined for each bacterial species, in terms of how many two-fold dilution steps difference there was between MIC values for the fluoroquinolones being considered. The number of isolates was multiplied by each log<sub>2</sub> difference, and the sum of these was divided by the total number of isolates. Wilcoxon Signed Rank tests were used to determine whether the mean differences between fluoroquinolone MICs were statistically different from zero.

3. Results

The *in vitro* sensitivity of 422 bacterial isolates, covering important porcine and bovine pathogens, to six fluoroquinolones was determined. The MIC data from individual isolates were pooled, for each pathogen species, and used to determine their MIC<sub>50</sub> values. It was considered appropriate to pool MIC data for porcine and bovine *P. multocida* isolates and mammary and intestinal *E. coli* isolates, as previous studies indicate that the intrinsic antibiotic susceptibility is comparable for all isolates of a particular bacterial species irrespective of their host (Jones and Erwin, 1998; Carbone et al., 2001; Yoshimura et al., 2001; Fera et al., 2002). The MIC values for each pathogen species are presented in Table 1. It should be noted that, as ciprofloxacin is a metabolite of enrofloxacin that does not achieve clinically relevant concentrations in porcine subjects, the MIC<sub>50</sub> data for *A. pleuropneumoniae*, *B. bronchiseptica* and *S. suis* are included solely for the sake of completion. However, further analyses considering the susceptibility of these organisms to ciprofloxacin have been omitted. MIC<sub>90</sub> values are not reported for this study as they were not considered representative of the fluoroquinolone susceptibility of the native bacterial population, as subpopulations with reduced sensitivity may have emerged as a result of increased exposure over recent years. Any shift in fluoroquinolone susceptibility is likely to impact on MIC<sub>90</sub> but not MIC<sub>50</sub> values and so the former were not considered pertinent to this comparative assessment of fluoroquinolone potency in native pathogen populations.

Table 1  
Distribution of minimum inhibitory concentration (µg/mL) values

Organism	Enrofloxacin		Ciprofloxacin		Marbofloxacin		Danofloxacin		Difloxacin		Norfloxacin	
	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range	MIC <sub>50</sub>	Range
<i>M. haemolytica</i> (n = 49)	0.03	0.016–0.25	0.008	0.008–0.06	0.03	0.016–0.12	0.03	0.03–0.25	0.12	0.06–0.25	0.03	0.03–0.25
<i>P. multocida</i> (n = 75)	0.008	0.004–0.03	0.008	0.002–0.016	0.016	0.004–0.03	0.016	0.008–0.06	0.016	0.008–0.06	0.03	0.016–0.12
<i>E. coli</i> (n = 70)	0.03	0.008–0.5	0.016	0.004–0.25	0.016	0.008–0.25	0.03	0.016–0.5	0.12	0.03–2.0	0.06	0.016–0.5
<i>S. aureus</i> (n = 47)	0.12	0.016–2.0	0.12	0.03–4.0	0.25	0.03–8.0 <sup>a</sup>	0.12	0.016–4.0	0.25	0.03–8.0 <sup>a</sup>	0.5	0.06–8.0 <sup>a</sup>
Coughlase negative	0.12	0.06–1.0	0.12	0.03–1.0	0.25	0.12–1.0	0.12	0.06–1.0	0.25	0.12–2.0	0.5	0.12–2.0
Staphylococci (n = 24)	0.5	0.5–1.0	0.5	0.25–1.0	1.0	0.5–1.0	0.5	0.5–1.0	2.0	1.0–2.0	1.0	1.0–8.0 <sup>a</sup>
<i>S. dysgalactiae</i> (n = 25)	0.5	0.25–1.0	0.5	0.25–2.0	1.0	0.5–1.0	0.5	0.5–1.0	2.0	0.5–4.0	2.0	1.0–8.0 <sup>a</sup>
<i>S. uberis</i> (n = 24)	0.016	0.008–0.12	0.008	0.004–0.25	0.016	0.008–0.5	0.03	0.016–0.25	0.06	0.016–0.12	0.03	0.004–0.06
<i>A. pleuropneumoniae</i> (n = 39)	0.25	0.06–0.5	0.25	0.12–0.5	0.25	0.12–0.5	0.5	0.12–0.5	2.0	1.0–4.0	2.0	0.5–4.0
<i>B. bronchiseptica</i> (n = 29)	0.25	0.12–2.0	0.5	0.12–4.0	0.5	0.25–2.0	0.5	0.25–1.0	1.0	0.5–4.0	2.0	1.0–8.0 <sup>a</sup>
<i>S. suis</i> (n = 40)	–	0.016–0.008	–	0.004–0.008	–	0.008–0.03	–	0.016–0.06	–	0.06–0.12	–	0.008–0.03
ATCC 25922	–	0.06–0.12	–	0.12–0.25	–	0.12–0.25	–	0.12–0.25	–	0.12–0.25	–	0.5

<sup>a</sup> For isolates in which the MIC was above 4.0 µg/mL an arbitrary value of 8.0 µg/mL was attributed.

For most pathogen species tested the distribution of MIC values was restricted to a range of three to five doubling dilutions; only with *E. coli* was there a broader range (seven doubling dilutions). Certain isolates of *M. haemolytica* (one isolate), *A. pleuropneumoniae* (one isolate) and *S. aureus* (two isolates) had MIC values notably higher than the mean MIC<sub>50</sub> for most test fluoroquinolones. In general enrofloxacin and ciprofloxacin showed highest antibacterial activity for most pathogen species tested.

### 3.1. Susceptibility of individual isolates

The comparative sensitivity profile of all isolates of a particular pathogen species was assessed. The MIC values for all isolates of each bacterial species were depicted graphically as checkerboard plots, assessing enrofloxacin versus each comparator fluoroquinolone. This allowed the number of isolates that were more or less sensitive to enrofloxacin or the comparator fluoroquinolone to be identified. These plots indicated full cross-sensitivity between the different fluoroquinolones within each bacterial species, which was apparent as corresponding increases or decreases in MIC values with the different fluoroquinolones for the individual isolates.

Table 2 summarises the number of isolates of each of the pathogen species that showed lower, comparable or higher MIC values than enrofloxacin for each of the test fluoroquinolones. General trends when considering the comparative fluoroquinolone sensitivity indicated that ciprofloxacin was more active

against a notable proportion of isolates than enrofloxacin for *M. haemolytica* (49 isolates of 49) and *E. coli* (54 of 70). However, enrofloxacin showed greater activity than ciprofloxacin against a notable proportion of isolates of *S. aureus* (33 isolates of 47). Enrofloxacin showed greater activity than marbofloxacin against a notable proportion of isolates of coagulase negative Staphylococci (21 isolates of 24), *S. aureus* (40 of 47), *S. suis* (31 of 40), *S. uberis* (18 of 24), *S. dysgalactiae* (15 of 25) and *P. multocida* (45 of 75). In contrast marbofloxacin was more active than enrofloxacin against *M. haemolytica* (37 isolates of 49) and *B. bronchiseptica* (17 of 29). Enrofloxacin showed greater activity than danofloxacin against a high proportion of *A. pleuropneumoniae* (32 isolates of 39) and *P. multocida* (53 of 75) isolates. Enrofloxacin showed greater activity than difloxacin for all isolates of *E. coli*, *B. bronchiseptica* and coagulase negative Staphylococci, and against at least 85% of isolates for the other pathogen species. Enrofloxacin showed greater activity than norfloxacin for all isolates of *B. bronchiseptica*, *S. uberis*, *S. suis*, coagulase negative Staphylococci and *S. dysgalactiae* and against most isolates of *E. coli* (60 isolates of 70), *S. aureus* (46 of 47) and *P. multocida* (74 of 75).

### 3.2. Overall fluoroquinolone sensitivities of test bacterial species

Pairwise comparisons of the *in vitro* MIC activities were performed for each bacterial isolate, by determining the number of two-fold dilution steps

Table 2  
Number of pathogen isolates with test fluoroquinolone MIC values higher (>), equal (=) or lower (<) than those for enrofloxacin

Organism	Number of isolates														
	Ciprofloxacin			Marbofloxacin			Danofloxacin			Difloxacin			Norfloxacin		
	>	=	<	>	=	<	>	=	<	>	=	<	>	=	<
<i>M. haemolytica</i> (n = 49)	0	0	49	0	12	37	6	42	1	46	2	0	6	34	9
<i>P. multocida</i> (n = 75)	2	40	33	45	29	1	53	21	1	72	2	1	74	1	0
<i>E. coli</i> (n = 70)	2	14	54	6	31	33	21	48	1	70	0	0	60	10	0
<i>S. aureus</i> (n = 47)	33	12	2	40	7	0	13	31	3	40	7	0	46	1	0
Coagulase negative Staphylococci (n=24)	10	11	3	21	3	0	5	19	0	24	0	0	24	0	0
<i>S. dysgalactiae</i> (n = 25)	0	22	3	15	10	0	4	20	1	23	2	0	25	0	0
<i>S. uberis</i> (n = 24)	4	17	3	18	6	0	8	16	0	23	1	0	24	0	0
<i>A. pleuropneumoniae</i> (n = 39)	1	8	30	16	22	1	32	7	0	38	1	0	25	0	14
<i>B. bronchiseptica</i> (n = 29)	6	20	3	3	9	17	9	19	1	29	0	0	29	0	0
<i>S. suis</i> (n = 40)	19	20	1	31	7	2	16	22	2	39	1	0	40	0	0

Table 3  
Mean log<sub>2</sub> differences and activity ranking of antibiotic sensitivities for test fluoroquinolones compared with enrofloxacin

Organism	log <sub>2</sub> difference in sensitivity vs. enrofloxacin: mean ± standard error											
<i>M. haemolytica</i>	Ranking	CIP	>	MAR	>	NOR,		ENR,		DAN	>	DIF
	Difference	-2.00 ± 0.07***		-0.78 ± 0.07***		-0.06 ± 0.08		-		0.10 ± 0.05		1.17 ± 0.07***
<i>P. multocida</i>	Ranking	CIP,	>	ENR,	>	MAR,		DAN,		DIF	>	NOR
	Difference	-0.43 ± 0.07***		-		0.63 ± 0.07***		0.72 ± 0.06***		1.16 ± 0.06***		1.91 ± 0.07***
<i>E. coli</i>	Ranking	CIP	>	MAR,	>	ENR,		DAN		NOR	>	DIF
	Difference	-0.91 ± 0.08***		-0.39 ± 0.08***		-		0.31 ± 0.06***		1.16 ± 0.08***		2.16 ± 0.07***
<i>S. aureus</i>	Ranking	ENR,	>	DAN	>	CIP,		MAR,		DIF	>	NOR
	Difference	-		0.21 ± 0.08		0.72 ± 0.09***		1.00 ± 0.08***		1.02 ± 0.08***		2.00 ± 1.3***
Coagulase negative Staphylococci	Ranking	ENR,	>	DAN,	>	CIP		MAR,		DIF	>	NOR
	Difference	-		0.21 ± 0.08		0.29 ± 0.14		1.08 ± 0.12***		1.33 ± 0.10***		1.87 ± 0.17***
<i>S. dysgalactiae</i>	Ranking	CIP,	>	ENR,	>	DAN		MAR,		DIF	>	NOR
	Difference	-0.12 ± 0.07		-		0.12 ± 0.09		0.60 ± 0.10***		1.04 ± 0.09***		1.88 ± 0.11***
<i>S. uberis</i>	Ranking	ENR,	>	CIP,	>	DAN		MAR		DIF	>	NOR
	Difference	-		0.17 ± 0.17		0.33 ± 0.10*		0.75 ± 0.09***		1.67 ± 0.13***		2.37 ± 0.17***
<i>A. pleuropneumoniae</i>	Ranking	ENR,	>	NOR,	>	MAR,		DAN		DIF	>	NOR
	Difference	-		0.33 ± 0.22		0.49 ± 0.12**		0.92 ± 0.08***		1.69 ± 0.11***		2.37 ± 0.17***
<i>B. bronchiseptica</i>	Ranking	MAR,	>	ENR,	>	DAN		NOR		DIF	>	NOR
	Difference	-0.52 ± 0.14*		-		0.34 ± 0.12		2.90 ± 0.82***		3.03 ± 0.14***		2.37 ± 0.17***
<i>S. suis</i>	Ranking	ENR,	>	DAN	>	MAR		DIF		NOR	>	NOR
	Difference	-		0.35 ± 0.09**		0.82 ± 0.11***		1.78 ± 0.08***		2.82 ± 0.12***		2.37 ± 0.17***

Abbreviations – ENR: enrofloxacin, CIP: ciprofloxacin, MAR: marbofloxacin, DAN: danofloxacin, DIF: difloxacin, NOR: norfloxacin. \**p* ≤ 0.01, \*\**p* ≤ 0.001, \*\*\**p* ≤ 0.0001 difference compared with enrofloxacin. A negative value indicates that the comparator has greater activity than enrofloxacin; a positive value indicates that enrofloxacin has greater activity than the comparator agent. For ranking purposes a mean log<sub>2</sub> difference of 0.6 was considered relevant.

(log<sub>2</sub> steps) between the MIC value for enrofloxacin and each comparator fluoroquinolone. These were used to determine the mean log<sub>2</sub> difference in sensitivity of each pathogen species to enrofloxacin compared with each comparator. Differences in the mean log<sub>2</sub> sensitivities comparing each antibiotic pair for the different pathogen species are presented and ranked according to *in vitro* activity in Table 3. As inter-laboratory variations can be excluded in this study a mean log<sub>2</sub> difference of 0.6 was considered relevant for ranking purposes, as a decrease of this magnitude would have a notable impact on PK/PD assessment criteria lowering AUC/MIC and C<sub>max</sub>/MIC by 25%.

Ciprofloxacin showed significantly greater *in vitro* antibacterial activity than enrofloxacin against *M. haemolytica*, *P. multocida* and *E. coli*. In contrast enrofloxacin showed significantly greater activity than ciprofloxacin against *S. aureus*. Marbofloxacin was more active than enrofloxacin against *M. haemolytica*, *E. coli* and *B. bronchiseptica* but less active against *P. multocida*, *S. aureus*, coagulase negative Staphylococci, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* and *S. suis*. Danofloxacin was significantly less active than enrofloxacin against *P. multocida*, *E. coli*, *S. uberis*, *A. pleuropneumoniae* and *S. suis* and showed comparable activity against the remaining pathogen species. Difloxacin showed significantly less antibacterial activity than enrofloxacin for all pathogen species. Norfloxacin showed significantly less antibacterial activity than enrofloxacin for all pathogen species apart from *M. haemolytica* and *A. pleuropneumoniae*.

#### 4. Discussion

This study assessed the *in vitro* activity of all currently relevant veterinary fluoroquinolones used to target a range of bovine and porcine pathogens. This study used enrofloxacin as a benchmark against which other agents were compared, as enrofloxacin represents the most common fluoroquinolone used in the treatment of bovine and porcine infections and is also currently used as the reference fluoroquinolone in commercially available veterinary antibiotic disc sensitivity assays. Comparison of the mean fluoroquinolone MIC<sub>50</sub> values for the different pathogen species showed that, in

general, enrofloxacin and ciprofloxacin had greatest antibacterial activity. Ranking of the *in vitro* susceptibility to the different fluoroquinolones is presented and allows estimation of the possible PK/PD relevance of the data, to help guide veterinary practitioners as to the most efficacious fluoroquinolone to use when targeting particular pathogen species.

The study determined the MIC values for each isolate of each pathogen species and the findings, in general, resulted in comparable MIC<sub>50</sub> estimates to those published in the substantive literature (Barry et al., 1984; Stamm et al., 1986; Jones et al., 1988; Phillips and King, 1988; Prescott and Yelding, 1990; Cruz et al., 1997; Watts et al., 1997; Jones and Erwin, 1998; De Oliveira et al., 2000; Mevius and Hartman, 2000; Carbone et al., 2001; Orden et al., 2001; Fera et al., 2002; Yoshimura et al., 2002a,b; Zhao et al., 2005). It should be noted that none of the previous studies consider either the broad range of pathogen species used in this study or comprehensively assess their susceptibility to all applicable veterinary fluoroquinolones. The use of a panel of recent pathogen isolates from various geographical locations allows the generation of population MIC<sub>50</sub> values for each microbial species. This is advantageous as it accounts for the distribution of MIC values encountered in native microbial populations and avoids the potential errors associated with analyses based on single values (Toutain and Lees, 2004).

The MIC ranges seen in some previous studies extended to considerably higher antimicrobial concentrations than those in this study (Watts et al., 1997; De Oliveira et al., 2000; Mevius and Hartman, 2000; Orden et al., 2001), which is likely to reflect the inclusion of microbial strains with reduced fluoroquinolone susceptibility that have been isolated when sampling previously treated animals. This study did not aim to address the question of the prevalence of fluoroquinolone resistance, and pathogen isolates with MIC values outside of the expected range in all antibiotics tested were deemed resistant and excluded from the analyses. Rather, we aimed to consider fluoroquinolone susceptibility in terms of native pathogen populations and preferentially reported MIC<sub>50</sub> values, to ensure the validity of the data for use in PK/PD analyses. The rationale for not using MIC<sub>90</sub> values was that these have been subject to a gradual increase following the introduction of

fluoroquinolones into veterinary medicine. In the late 1980s, before common use of fluoroquinolones, MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values in pathogen populations were very close (Barry et al., 1984; Nix and DeVito, 1987), usually within one doubling dilution. However, the exposure of veterinary microorganisms to fluoroquinolones has meant that MIC<sub>90</sub> values have subsequently diverged from MIC<sub>50</sub> levels. The inclusion of antibiotic resistant pathogen isolates and/or the preferential use of MIC<sub>90</sub> data could have considerable impact on PK/PD parameters (Bhavnani et al., 2002).

Comparison of the sensitivities of individual pathogen isolates to enrofloxacin and ciprofloxacin highlighted notable differences in the MIC<sub>50</sub> profiles, in particular when considering *E. coli* and *S. aureus*. Our data showed 54 of 70 *E. coli* isolates to be at least one log<sub>2</sub> step more sensitive to ciprofloxacin than enrofloxacin; conversely 33 of 47 *S. aureus* isolates were more sensitive to enrofloxacin than ciprofloxacin. This difference is reflected in the MIC<sub>50</sub> values for each agent in the case of *E. coli* (0.016 µg/mL for ciprofloxacin and 0.03 µg/mL for enrofloxacin) but not for *S. aureus* (0.12 µg/mL for both agents). Higher sensitivity of *E. coli* ATCC 25922 to ciprofloxacin and of *S. aureus* ATCC 29213 to enrofloxacin was also noted both in our data and in other reports (Riddle et al., 2000). Previous studies have shown limited evidence for preferential activity for ciprofloxacin against *E. coli* (Zhao et al., 2005) but a more consistent body of evidence indicates that *S. aureus* is more susceptible to enrofloxacin (Watts et al., 1997; Jones and Erwin, 1998).

Of note is the observation that certain of our bovine and porcine pathogen species showed comparable fluoroquinolone sensitivities to those reported for the test organisms isolated from other hosts. In particular, for human and avian *E. coli* (Jones and Erwin, 1998), feline *B. bronchiseptica* (Carbone et al., 2001) and *P. multocida* (Fera et al., 2002) strains the mean and range MIC<sub>50</sub> values for enrofloxacin and ciprofloxacin were very similar to those seen with our isolates. Further, analysis of our data shows bovine and porcine *P. multocida* isolates to have similar antibiotic sensitivity profiles (data not shown).

The clinical relevance of our data to improving treatment efficacy assumes that appropriate fluoroquinolone concentrations are achieved in the *in vivo*

setting. As such, to further increase our understanding of the comparative activity of the fluoroquinolones, MIC data needs to be considered from a PK/PD perspective. These parameters are both fluoroquinolone and animal-species specific, and accurate assessment requires detailed understanding of the PK profile of each test fluoroquinolone in bovine and porcine subjects. For example, in a number of animal species, including cattle, enrofloxacin is metabolised to produce clinically relevant levels of ciprofloxacin. Following subcutaneous administration in calves McKellar et al. (1999) and De Lucas et al. (2006) showed the proportion of enrofloxacin converted to ciprofloxacin in plasma, when considered in terms of the AUC, to be approximately 50:50% and 54:46%, respectively. This is an important consideration as our *in vitro* data show ciprofloxacin to have greatest potency against *M. haemolytica*. When treating respiratory tract infections in cattle with enrofloxacin *M. haemolytica* is likely to be exposed to therapeutically relevant levels of the enrofloxacin/ciprofloxacin combination. An additional consideration during treatment of bovine respiratory disease is that in a substantial number of cases there is concurrent infection with *P. multocida* and *M. haemolytica* (Mosier, 1997). In such cases our *in vitro* fluoroquinolone activity data suggest that treatment with enrofloxacin is preferential to use of any other fluoroquinolone, as enrofloxacin and ciprofloxacin have the highest *in vitro* activity against *P. multocida*.

## 5. Conclusions

This is the first study to directly compare the *in vitro* sensitivities of a large panel of clinically relevant bovine and porcine pathogen isolates, against all veterinary fluoroquinolones and under identical laboratory conditions. The study overcomes the limitations associated with previous *in vitro* susceptibility studies by: (a) considering the entire spectrum of relevant fluoroquinolones, (b) using a consistent standardised methodology as recommended by the CLSI and (c) testing an appropriate range of antibiotic dilutions for all pathogen species. The data showed enrofloxacin and/or its metabolite ciprofloxacin to have a high level of *in vitro* activity against all bovine

pathogens tested. The porcine pathogens tested also showed a high degree of sensitivity to enrofloxacin. However, this detailed comparative study of population MIC<sub>50</sub> values for a range of veterinary pathogen isolates needs to be interpreted in terms of achievable bovine and porcine tissue concentrations for each drug, to facilitate treatment selection (Coulet et al., 2002).

### Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. M. Vanrobaeys (Belgium) and Dr. R. Danguy (France) for their help in providing local pathogen isolates.

### References

- Barry, A.L., Jones, R.N., Thornsberry, C., Ayers, L.W., Gerlach, E.H., Sommers, H.M., 1984. Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin, and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother* 25, 633–637.
- Bhavnani, S.M., Ambrose, P.G., Jones, R.N., 2002. Pharmacodynamics in the evaluation of drug regimens. *Ann. Pharmacother.* 36, 530–532.
- Brown, S.A., 1996. Fluoroquinolones in animal health. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 19, 1–14.
- Carbone, M., Pennisi, M.G., Masucci, M., De Sarro, A., Giannone, M., Fera, M.T., 2001. Activity and postantibiotic effect of marbofloxacin, enrofloxacin, difloxacin and ciprofloxacin against feline *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Vet. Microbiol.* 81, 79–84.
- Coulet, M., Van Borssum Waalkes, M., Cox, P., Lohuis, J., 2002. *In vitro* and *in vivo* pharmacodynamic properties of the fluoroquinolone ibafloxacin. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 25, 401–411.
- Cruz, A.D., de Magalhaes Lopes, C.A., Modolo, J.R., Gotschalk, A.F., 1997. Comparative *in vitro* study on the susceptibility and emergence of mutants resistant to danofloxacin and ciprofloxacin among *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Revista de Microbiol.* 28, 61–64.
- De Lucas, B.J.J., Rodriguez, F.C., Gonzalez, G.F., Soler, C.S., Froyman, R., Fraatz, K., San Andres, L.M., 2006. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of Baytril 5% and 10% in cattle. In: Proceedings of the XXI<sup>th</sup> World Buiatrics Congress. PS4-123.
- De Oliveira, A.P., Watts, J.L., Salmon, S.A., Aarestrup, F.M., 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* 83, 855–862.
- Fera, M.T., Losi, E., Pennisi, M.G., Masucci, M., Giannone, M., Maugeri, T.L., Carbone, M., 2002. Potency and postantibiotic effect of four fluoroquinolones against feline *Pasteurella multocida* isolates. *Vet. Rec.* 151, 180–181.
- Gombert, M.E., Aulicino, T.M., 1985. Comparison of agar dilution, microtitre broth dilution and tube macrodilution susceptibility testing of ciprofloxacin against several pathogens at two different inocula. *J. Antimicrob. Chemother* 16, 709–712.
- Hawkey, P.M., 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother* 51, 29–35.
- Jones, R.N., Aldridge, K.E., Barry, A.L., Fuchs, P.C., Gerlach, E.H., Pfaller, M.A., Washington II, J.A., 1988. Multicenter *in vitro* evaluation of lomefloxacin (NY-198, SC-47111), including tests against nearly 7,000 bacterial isolates and preliminary recommendations for susceptibility testing. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 10, 221–240.
- Jones, R.N., Erwin, M.E., The Quality Control Study Group, 1998. *In vitro* susceptibility testing and quality control parameters for sarafloxacin (A-56620): a fluoroquinolone used for treatment and control of colibacillosis in poultry. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 55–64.
- Kietzmann, M., Boettner, A., Hafez, H.M., Kehrenberg, C., Klarman, D., Krabisch, P., Kuehn, T., Luhofer, G., Richter, A., Schwarz, S., Traeder, W., Waldmann, K.-H., Wallmann, J., Werckenthin, C., 2004. Antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals: considerations concerning the determination of breakpoints-clinical pharmacological view. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 117, 81–87.
- Koeth, L.M., King, A., Knight, H., May, J., Miller, L.A., Phillips, I., Poupard, J.A., 2000. Comparison of cation-adjusted Mueller-Hinton broth with Iso-Sensitest broth for the NCCLS broth microdilution method. *J. Antimicrob. Chemother* 46, 369–376.
- Lathers, C.M., 2002. Clinical pharmacology of antimicrobial use in humans and animals. *J. Clin. Pharmacol.* 42, 587–600.
- Lees, P., Cunningham, F.M., Elliott, J., 2004. Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 397–414.
- McKellar, Q., Gibson, I., Monteiro, A., Bregante, M., 1999. Pharmacokinetics of enrofloxacin and danofloxacin in plasma, inflammatory exudate, and bronchial secretions of calves following subcutaneous administration. *Antimicrob. Agents Chemother* 43, 1988–1992.
- McKellar, Q.A., Sanchez Bruni, S.F., Jones, D.G., 2004. Pharmacokinetic/pharmacodynamic relationships of antimicrobial drugs used in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 27, 503–514.
- Mevius, D.J., Hartman, E.G., 2000. *In vitro* activity of 12 antibiotics used in veterinary medicine against *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves in the Netherlands. *Tijdschr Diergeneesk.* 125, 147–152.
- Mosier, D.A., 1997. Bacterial pneumonia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 13, 483–493.
- NCCLS, 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved standard. National Committee on Clinical Veterinary Standards, Document M13-A2. NCCLS, Wayne, PA.
- Nix, D.E., DeVito, J.M., 1987. Ciprofloxacin and norfloxacin, two fluoroquinolone antimicrobials. *Clin. Pharm.* 6, 105–117.
- Orden, J.A., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Cid, D., Diez, R., Martínez, S., de la Fuente, R., 2001. Quinolone resistance in potentially

- pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from healthy ruminants. J. Antimicrob. Chemother 48, 421–424.
- Phillips, I., King, A., 1988. Comparative activity of the 4-quinolones. Rev. Infect. Dis. 10, S70–S76.
- Prescott, J.F., Yelding, K.M., 1990. *In vitro* susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. Can. J. Vet. Res. 54, 195–197.
- Riddle, C., Lemons, C.L., Papich, M.G., Altier, C., 2000. Evaluation of ciprofloxacin as a representative of veterinary fluoroquinolones in susceptibility testing. J. Clin. Microbiol. 38, 1636–1637.
- Stamm, J.M., Hanson, C.W., Chu, D.T., Bailer, R., Vojtko, C., Fernandes, P.B., 1986. *In vitro* evaluation of A-56619 (difloxacin) and A-56620: new aryl-fluoroquinolones. Antimicrob. Agents Chemother 29, 193–200.
- Toutain, P.L., Lees, P., 2004. Integration and modelling of pharmacokinetic and pharmacodynamic data to optimize dosage regimens in veterinary medicine. J. Vet. Pharmacol. Ther. 27, 467–477.
- Wallmann, J., Bottner, A., Goossens, L., Hafez, H.M., Hartmann, K., Kaspar, H., Kehrenberg, C., Kietzmann, M., Klarmann, D., Klein, G., Krabisch, P., Kuhn, T., Luhofer, G., Richter, A., Schulz, B., Schwarz, S., Sigge, C., Traeder, W., Waldmann, K.H., Werckenthin, C., for the Working Group Antimicrobial Resistance of the German Veterinary Society, Zschiesche, E., 2006. Results of an interlaboratory test on antimicrobial susceptibility testing of bacteria from animals by broth microdilution. Int. J. Antimicrob. Agents 27, 482–490.
- Watts, J.L., Salmon, S.A., Sanchez, M.S., Yancey Jr., R.J., 1997. *In vitro* activity of premarloxacin, a new extended-spectrum fluoroquinolone, against pathogens of veterinary importance. Antimicrob. Agents Chemother 41, 1190–1192.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Endoh, Y.S., Kojima, A., 2001. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from cattle and pigs. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 48, 555–560.
- Yoshimura, H., Ishimaru, M., Kojima, A., 2002a. Minimum inhibitory concentrations of 20 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine intramammary infections in Japan. J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health 49, 457–460.
- Yoshimura, H., Takagi, M., Ishimura, M., Endoh, Y.S., 2002b. Comparative *in vitro* activity of 16 antimicrobial agents against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Vet. Res. Commun. 26, 11–19.
- Zhao, S., Maurer, J.J., Hubert, S., De Villena, J.F., McDermott, P.F., Meng, J., Ayers, S., English, L., White, D.G., 2005. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of avian pathogenic *Escherichia coli* isolates. Vet. Microbiol. 107, 215–224.



## 8.4 Abkürzungen

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
<i>A. pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>
ARBAO	Antimicrobial Resistance in in Bacteria of Animal Origin
AUG2	Amoxicillin/Clavulansäure 2/1
B	Belgien
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit e.V.
BfT-GermVet	Ergänzungsprogramm des BfT für das German Resistance Monitoring veterinärpathogener Bakterien
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
CH	Schweiz
CHL	Chloramphenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
D	Deutschland
DAN	Danofloxacin
DIF	Difloxacin
DK	Dänemark
E	England inkl. Wales
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ENRO	Enrofloxacin
ES	Spanien
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
F	Frankreich
FAL	Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft
FIN	Finnland
FU	Freie Universität Berlin
GEN	Gentamicin

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
GERM-Vet	German Resistance Monitoring veterinärpathogener Bakterien
GIT	Gastrointestinaltrakt
GT	Genitaltrakt
Hobbytiere	Pferde, Hunde und Katzen
inkl.	inklusive
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kleintiere	Hunde und Katzen
KT	Kleintier (Hunde und Katzen)
LMU	Ludwig Maximilian Universität München
LV	Litauen
<i>M. haemolytica</i>	<i>Mannheimia haemolytica</i>
MAR	Marbofloxacin
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MMA	Mastitis-Metritis-Agalaktie-Komplex
N	Norwegen
NL	Niederlande
NOR	Norfloxacin
OXA	Oxacillin + 2 % Natrium Chlorid
P	Portugal
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.
PEN	Penicillin G
Pfd	Pferd
S	Schweden
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. dysgalactiae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>
<i>S. suis</i>	<i>Streptococcus suis</i>
SMX	Sulfamethoxazol

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
sp.	Spezies (singular)
spp.	Spezies (plural)
ssp.	Subspezies
Sw	Schwein
SXT	Trimethoprim/Sulfamethoxazol 1/19
t	Tonnen
TET	Tetracyclin
UGT	Urogenitaltrakt

## 8.5 Publikationen im Zusammenhang mit dieser Dissertation

### Originalarbeiten in Zeitschriften mit Gutachtersystem

**Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Wieler, L.H., Froyman, R., Friederichs, S., Filios, S.:**

Comparative quantification of the in vitro activity of veterinary fluoroquinolones.

Veterinary Microbiology, 124, 2007, 73-81

**Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Alešík, E., Schwarz, S., Wallmann, J., Werckenthin, C., Wieler, L. H.:**

Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from swine, horses, dogs, and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 391-401

**Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Alešík, E., Schwarz, S., Wallmann, J., Werckenthin, C., Wieler, L. H.:**

Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella* spp. and *Proteus* spp. from various organ systems of horses, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 402-411

**Schwarz, S., Alešík, E., Grobbel, M., Lübke-Becker, A., Wallmann, J., Werckenthin, C., Wieler, L. H.:**

The BfT-GermVet monitoring program - aims and basics.

Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, 120 (9/10), 2007, 357-362

## **Buchbeiträge**

### **Grobbel, M.**

Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Hund/Katze - Infektionen des Respirationstraktes - *Escherichia coli*

GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland, Vol. 1, ISBN 978-3-00-025097-2, October 2008, Pages 113-114

### **Grobbel, M.**

Antibiotikaresistenz in der Veterinärmedizin - Nicht Lebensmittel liefernde Tiere - Hund/Katze - Infektionen des Urogenitaltraktes - *Escherichia coli* und andere *Enterobacteriaceae*

GERMAP 2008 - Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch - Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland, Vol. 1, ISBN 978-3-00-025097-2, October 2008, Page 116

## **Vorträge**

### **Grobbel, M., A. Lübke-Becker, E. Alešík, H. Kaspar, S. Schwarz, C. Werckenthin, J. Wallmann und L. H. Wieler**

Empfindlichkeitsprüfung von *Escherichia coli* Isolaten von Hobbytieren der BfT-GermVet Studie 2004-2006

Der 27. DVG Kongress 12.-14. April 2007 Berlin: Tierseuchenbekämpfung im Spannungsfeld zwischen Wissenschaft und öffentlichen Interesse, Programm, Vorträge und Poster, Berlin 12. - 14. April 2007, ISBN 978-3-939902-26-3

### **Grobbel, M., A. Lübke-Becker, L. H. Wieler, R. Froyman, S. Friederichs and S. Filios**

In vitro potency of veterinary fluoroquinolones against important porcine pathogens

2nd International Bayer Pig Symposium, Durban, South Africa, 21.06.2008

## 8.6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken ohne deren Zutun diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Zunächst geht mein Dank an Herrn Prof. Lothar H. Wieler für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Räumlichkeiten, die Anregung neuer Betrachtungswinkel des Themas, vor allem aber für die immerwährende Unterstützung und Motivation während meiner Promotionszeit.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. Antina Lübke-Becker bedanken, für die direkte Betreuung der Arbeit, die Weitergabe ihres Wissens, ihre Geduld und die Beantwortung jeder noch so dumm gestellten Frage.

Für die Initiierung sowie Finanzierung des BfT-GermVet-Projektes bedanke ich mich beim Bundesverband für Tiergesundheit e.V., und hier besonders bei Herrn Dr. Schneiderei und Frau Dr. Sigge.

Für die Sammlung und Weiterleitung der Test-Isolate und die Einführung in die MHK-Testung, sowie die gute Zusammenarbeit über diese Punkte hinaus möchte ich mich bei Dr. Jürgen Wallmann, Dr. Heike Kaspar und Dr. Ulrike Steinacker vom GERM-Vet (BVL) bedanken.

Bei Prof. Dr. Stefan Schwarz und Dr. Christiane Werckenthin möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Hilfestellungen im Rahmen des BfT-GermVet bedanken.

Bei Dr. Robrecht Froyman und dem Team von Bayer Healthcare bedanke ich mich für die Finanzierung der Fluorchinolon-Vergleichsstudie und die Hilfe bei der Datenauswertung und der Publikation.

Nach den offiziellen Danksagungen möchte ich nun vor allem meinen Eltern danken, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben, egal wie knapp es manchmal war. Auch Oma

Kallenhardt und Oma Bentfeld danke ich für die Geduld und die dezenten Hinweise auf einen zügigen Abschluß des Vorhabens.

Bei Petra, Silvia und Tanja bedanke ich mich herzlich für die Telefonseelsorge während der Promotionszeit. Die Flatrate wird sich aber sicherlich auch weiterhin rechnen.

Bei allen ehemaligen Kollegen im IMT möchte ich mich für die herzliche und familiäre Arbeitsatmosphäre während meiner Promotionszeit bedanken. Dies gilt vor allem natürlich der Diagnostikteam-Familie, welche mich 5 Jahre lang in ihre Mitte aufgenommen hat, aber auch meinen Büro-Mitbewohnern, welche alle Stimmungshochs und -tiefs beim Schreiben fast ohne zu verzweifeln mitgemacht haben. Auch den Damen aus der ZIV und der Nährbodenküche, welchen keiner meiner Extra-Wünsche zuviel war möchte ich ganz herzlich danken.

## **8.7 Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne unzulässige fremde Hilfe und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Mirjam Grobbel

Berlin, den 08. September 2009





**ISBN 978-3-941703-57-5**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**  
**35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375**  
**e-mail: [info@divg.net](mailto:info@divg.net) · Homepage: <http://www.divg.de>**