

**Entwicklung von Methoden zur harmonisierten
Empfindlichkeitstestung von *Avibacterium gallinarum*,
Avibacterium paragallinarum, *Bordetella avium*, *Mycoplasma*
(„*Mycoplasma*“) *bovis* und *Mycoplasma*
(„*Mycoplasma*“) *gallisepticum* im Mikrodilutionsverfahren**

INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Franziska Elisabeth Gütgemann
Tierärztin aus Bonn
Gießen 2025
Aus dem Institut für Tierärztliche Nahrungsmittelkunde

Betreuerin: Prof. Dr. Corinna Kehrenberg, PhD, am FB Veterinärmedizin,
Professur für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz

**Entwicklung von Methoden zur harmonisierten
Empfindlichkeitstestung von *Avibacterium gallinarum* und
Avibacterium paragallinarum, *Bordetella avium*, *Mycoplasma*
(„*Mycoplasma*opsis“) *bovis* und *Mycoplasma*
(„*Mycoplasma*oides“) *gallisepticum* im Mikrodilutionsverfahren**

INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von
Franziska Elisabeth Gütgemann
Tierärztin aus Bonn
Gießen 2025

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Corinna Kehrenberg

2. Frau Prof. Dr. Christa Ewers

Tag der Disputation: 19.05.2025

Diese Arbeit wurde durch Mittel des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL), vertreten durch die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE), gefördert.

Meinen lieben Eltern

„Was ist das Schwerste von allem?

Was dir das Leichteste dünket:

*Mit den Augen zu sehn, was vor den Augen dir
lieget.“*

Johann Wolfgang von Goethe

X, 5, Xenien, aus dem Nachlass S 275

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Publikationsverzeichnis

Die vorliegende Dissertation basiert zu überwiegenden Teilen auf den folgenden Publikationen:

GÜTGEMANN¹, F.; HEUVELINK¹, A.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; BUTER, R.; JUNG, A.; FEBERWEE, A.; WIEGEL, J.; KUMM, F.; BRAUN, A.S.; YUE, M.; SORANIO-VARGAS, E.; SWANEPOEL, S.; BOTTLEDOORN, N.; KIRCHNER, M.; KEHRENBURG, C. (2023): Recommendation of a standardized broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium paragallinarum* and resistance monitoring. *J Clin Microbiol* e0101123. DOI: 10.1128/jcm.01011-23

¹Geteilte Erstautorenschaft

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; KUMM, F.; BRAUN, A.S.; YUE, M.; EISENBERG, T.; ENTORF, M.; PETERS, T.; KEHRENBURG, C. (2023): Toward a method for harmonized susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* by broth microdilution. *J Clin Microbiol* 61(8):e0190522. DOI: 10.1128/jcm.01905-22

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KUMM, F.; HEUVELINK, A.; YUE, M.; KEHRENBURG, C. (2022): Proposal of a method for harmonized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium gallinarum*. *J Clin Microbiol* 60(8):e0041922. DOI: 10.1128/jcm.00419-22.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, A.; JUNG, A.; BRAUN, A. S.; YUE, M.; KEHRENBURG, C. (2022): Development of a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella avium* using broth microdilution and detection of resistance genes. *J Appl Microbiol* 132(3):1775-1787. DOI: 10.1111/jam.15305.

Darüber hinaus basiert diese Dissertation auf dem folgenden wissenschaftlichen Manuskript, deren Veröffentlichung zeitnah erfolgen soll:

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; KUMM, F.; YUE, M.; MÖLLER PALAU-RIBES, F.; LIERZ, M.; KEHRENBURG, C.: Recommendation of a method for harmonized antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasmoides* (*'Mycoplasma'*) *gallisepticum* using broth microdilution.

Weiterhin wurden Teile der Dissertation in Form von wissenschaftlichen Abstracts, Vorträgen und Postern präsentiert. Soweit die entsprechenden Konferenzen und Kongresse während der SARS-CoV-2-Pandemie stattfanden, erfolgten sie größtenteils online.

Wissenschaftliche Vorträge:

KEHRENBURG, C.; MÜLLER, A.; JUNG, A.; HEUVELINK, A.; KUMM, F.; YUE, M.; GÜTGEMANN, F. (2022): Daten zur Resistenzsituation geflügelpathogener Bakterien: *B. avium*, *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *My. gallisepticum*. Vortrag anlässlich der Tagung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz im Rahmen des DVG-Vet-Congress, 13.10. – 15.10.2022, Berlin. Vorgetragen von KEHRENBURG, C.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y. KEHRENBURG, C. (2022): Entwicklung eines Bouillon-Mikrodilutionsverfahrens für eine harmonisierte antimikrobielle Empfindlichkeitstestung von *Mycoplasma* (*'Mycoplasmopsis'*) *bovis*. Vortrag anlässlich der 40. Arbeits- und Fortbildungstagung der Fachgruppe AVID „Bakteriologie“, 15.09.2022, Bad Staffelstein.

Ausgezeichnet mit dem Ernst-Forschner-Gedächtnispreis für den besten praxisbezogenen Vortrag.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; KEHRENBURG, C. (2022): Empfehlung einer harmonisierten Methode der Bouillon-Mikrodilution zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Mycoplasma* ('*Mycoplasma*moides') *gallisepticum*. Kurzvortrag anlässlich der 40. Arbeits- und Fortbildungstagung der Fachgruppe AVID „Bakteriologie“, 15.09.2022, Bad Staffelstein.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2021): Entwicklung einer Methode für eine harmonisierte Empfindlichkeitsprüfung von *Avibacterium* spp.. Vortrag anlässlich der Tagung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz im Rahmen des DVG-Vet-Congress, 19.11.2021, Berlin.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2021): Entwicklung von Methoden zur Empfindlichkeitstestung von *Avibacterium gallinarum* und *Avibacterium paragallinarum*, *Bordetella avium*, *Mycoplasma* („*Mycoplasma*mopsis“) *bovis* und *Mycoplasma* („*Mycoplasma*moides“) *gallisepticum* im Mikrodilutionsverfahren. Vortrag anlässlich der Sitzung des DVG-Arbeitskreises Antibiotikaresistenz, 25.06.2021, online.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2020): Development of a method for harmonized susceptibility testing of *B. avium* using broth microdilution and analysis of resistance genes. Videovortrag anlässlich des International Symposium on Zoonoses Research, 15.10.2020, online.

Wissenschaftliche Poster:

Kumm F, Gütgemann F, Müller A, Jung A, Kehrenberg C (2023): In-vitro-Empfindlichkeitsbestimmung von *Bordetella avium*: Untersuchungen zur Korrelation von Ergebnissen ermittelt mit harmonisierter Bouillon-Mikrodilutions- und Agardiffusionsmethode. 63. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 26.09. – 29.09.2023, Garmisch-Partenkirchen

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; PETERS, T.; KEHRENBURG, C. (2022): Empfehlung einer Methode zur standardisierten antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung von *Mycoplasma ('Mycoplasmosis') bovis* mittels Bouillon-Mikrodilution. Poster anlässlich der 62. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 25.10.-28.10.2022, Garmisch-Partenkirchen.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; PETERS, T.; KEHRENBURG, C. (2022): Recommendation of a method for harmonized antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma ('Mycoplasmosis') bovis* via bouillon microdilution. Poster anlässlich der Early Career Mycoplasma and Chlamydia Researcher Conference 2022, 18.10.2022, online.

KUMM, F.; GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2022): In-vitro-Empfindlichkeitsbestimmung von *Bordetella avium*: Untersuchungen zur Korrelation von Ergebnissen ermittelt mit harmonisierter Bouillon-Mikrodilutions- und Agardiffusionsmethode. Poster anlässlich der 40. Arbeits- und Fortbildungstagung der Fachgruppe AVID „Bakteriologie“, 15.09.2022, Kloster Banz.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KUMM, F.; HEUVELINK, A.; YUE, M.; KEHRENBURG, C. (2022): Development of a method for standardized antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium gallinarum* by broth microdilution and detection of antimicrobial resistance genes. Poster anlässlich der 74. Jahrestagung der Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), 05.09.-07.09.2022, Garmisch-Partenkirchen.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2021): Erarbeitung einer Methode zur standardisierten Empfindlichkeitstestung von *Bordetella avium*. Poster anlässlich der 61. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz der DVG, 28.9.-30.09.2021, Garmisch-Partenkirchen.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2021): Erarbeitung einer Methode zur standardisierten Empfindlichkeitstestung von *Bordetella avium*. Poster und Nominierung zum Poster Flash anlässlich der Tagung der DVG-Fachgruppe Bakteriologie und Mykologie, 14.06.-16.06.2021, online.

GÜTGEMANN, F.; MÜLLER, A.; CHURIN, Y.; JUNG, A.; KEHRENBURG, C. (2020): Development of a method for harmonized susceptibility testing of *B. avium* using broth microdilution and analysis of resistance genes. Poster anlässlich des International Symposium on Zoonoses Research, 15.10.2020, online.

Inhaltsverzeichnis

Publikationsverzeichnis	II
Inhaltsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	14
2. Literaturübersicht	16
2.1 Antimikrobielle <i>in-vitro</i>-Empfindlichkeitstestung	16
2.1.1 Methoden zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung	17
2.1.2 Fehlerquellen bei der Erstellung von Antibiogrammen	20
2.1.3 Prüfvorschriften antimikrobieller <i>in-vitro</i> -Empfindlichkeitstests	21
2.1.4 Qualitätssicherung und Interpretation von MHK-Werten	23
2.2 Antimikrobielle Therapie	26
2.2.1 Antimikrobielle Wirkstoffklassen.....	27
2.2.1.1 Einteilung antimikrobieller Wirkstoffe nach Wirkmechanismus und Zielstruktur.....	27
2.2.1.2 Einteilung antimikrobieller Wirkstoffe nach Wirksamkeit und Wirkungsspektrum.....	29
2.3 Antimikrobielle Resistenzen (AMR)	30
2.3.1 Intrinsische Resistenz	30
2.3.2 Extrinsische Resistenz und horizontaler Gentransfer	30
2.4 Identifizierung des Resistenzgenotyps	31
2.4.1 Die PCR-Methode	31
2.4.2 Die Mikroarray-Technik	32
2.4.3 Ganzgenomsequenzanalysen (WGS).....	33
2.5 <i>Bordetella avium</i>	33
2.5.1 Taxonomie, Epidemiologie und Symptomatik bei Infektionen	33
2.5.2 Bedeutung von <i>B. avium</i> -Infektionen bei Geflügel und Menschen	34

2.5.3	<i>In-vitro</i> -Kultivierung von <i>B. avium</i>	34
2.6	<i>Avibacterium paragallinarum</i> und <i>Avibacterium gallinarum</i>	35
2.6.1	Taxonomie, Epidemiologie und Symptomatik von <i>Avibacterium</i> spp.- Infektionen	35
2.6.2	Bedeutung von <i>Avibacterium</i> spp.-Infektionen bei Geflügel und Menschen	36
2.6.3	<i>In-vitro</i> -Kultivierung von <i>Av. gallinarum</i> und <i>Av. paragallinarum</i>	36
2.7	<i>Mycoplasma</i> <i>m</i>opsis <i>b</i>ovis und <i>Mycoplasma</i> <i>m</i>oides <i>g</i>allisepticum	37
2.7.1	Taxonomie und Eigenschaften von <i>Mycoplasma</i> spp.	37
2.7.1.1	Epidemiologie, Symptomatik und Bedeutung von <i>M. bovis</i>	38
2.7.1.2	Epidemiologie, Symptomatik und Bedeutung von <i>M. gallisepticum</i>	38
2.7.2	<i>In-vitro</i> -Kultivierung von <i>Mycoplasma</i> spp.	39
3.	Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsschrift	40
Publikation 1	41
Publikation 2	74
Publikation 3	110
Publikation 4	150
Manuskript 1	182
4.	Übergreifende Diskussion	220
1.	Erregerauswahl	220
1.1.	Akquise von Isolaten	220
1.1.1.	Auswahl von Testisolaten	221
1.1.1.1.	Makrorestriktionsanalysen von <i>Av. gallinarum</i> -, <i>Av. paragallinarum</i> -, <i>B.</i> <i>avium</i> - und <i>M. bovis</i> -Isolaten	222
2.	Medienauswahl für die zu testenden Bakterienspezies	224
2.1.	Medienvorauswahl für <i>Av. gallinarum</i> , <i>Av. paragallinarum</i> und <i>B. avium</i>	225
2.2.	Medienvorauswahl für <i>M. bovis</i> und <i>M. gallisepticum</i>	226
2.3.	Wachstumsexperimente	227

2.3.1. Wachstumsversuche mit <i>Av. gallinarum</i> , <i>Av. paragallinarum</i> und <i>B. avium</i>	231
2.3.1.1. Medienvorauswahl durch Bestimmung des sichtbaren Wachstums von <i>Av. gallinarum</i> und <i>Av. paragallinarum</i>	231
2.3.1.2. Erstellung von Wachstumskurven für <i>Av. gallinarum</i> , <i>Av. paragallinarum</i> und <i>B. avium</i>	232
2.3.2. Wachstumsversuche mit <i>M. bovis</i> und <i>M. gallisepticum</i>	234
3. Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die Bouillon-Mikrodilutionstestung	235
4. Austestung von Inkubationszeiten und –bedingungen und Bestimmung der Homogenität der MHK-Werte	236
4.1. Bestimmung der Homogenität der MHK-Werte von <i>Av. gallinarum</i> , <i>Av. paragallinarum</i> und <i>B. avium</i>	237
4.2. Bestimmung der Homogenität der MHK-Werte von <i>M. bovis</i> und <i>M. gallisepticum</i>	240
5. Eignung von Qualitätskontrollstämmen zur Qualitätskontrolle	242
6. Einfluss der Bezugsquelle von Medienbestandteilen auf die MHK-Werte	244
7. Bewertung und Literaturvergleich der antimikrobiellen Empfindlichkeit	245
7.1. Bewertung der MHK-Werte einer größeren Isolatsammlung	246
7.2. Literaturvergleich der Empfindlichkeitsdaten	248
8. Untersuchungen zum Resistenzgenotyp mittels PCR- und Ganzgenomsequenzanalysen	259
8.1. Korrelation zwischen den Ergebnissen der MHK-Bestimmungen und Resistenzgenanalysen	259
8.2. Untersuchungen zur genotypischen Resistenzlage von <i>Av. gallinarum</i> -, <i>Av. paragallinarum</i> - und <i>B. avium</i> -Isolaten	261
8.2.1. Ganzgenomsequenzanalysen zur weiterführenden Untersuchung der Resistenzsituation von <i>Av. paragallinarum</i>	264

9. Laborvergleichsstudie der entwickelten Methode für <i>B. avium</i>	264
5. Schlussfolgerung.....	267
6. Zusammenfassung	268
7. Summary.....	271
8. Literaturverzeichnis.....	274
9. Danksagung	314

Abkürzungsverzeichnis

<i>A.</i>	<i>Actinobacillus</i>
AMR	Antimikrobielle Resistenz (engl.: antimicrobial resistance)
AST	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung (engl.: antimicrobial susceptibility testing)
<i>B.</i>	<i>Bordetella</i>
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (engl.: brain heart infusion)
BSAC	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
BTK	Bundestierärztekammer
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
CAMHB	Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon (engl.: cation-adjusted Mueller Hinton broth)
CA-SFM	Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCU	Farbänderungseinheiten (engl.: color changing units)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRG	Commissie Richtlijnen Gevoeligheids-bepalingen
DIN	Deutsches Institut für Normung e. V.
DNS	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid, DNA)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>En.</i>	<i>Enterococcus</i>
ECOFF	Epidemiologischer Cut-Off-Wert
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (engl.: European Food Safety Authority)
ESBL	Beta-Laktamase mit erweitertem Wirkspektrum (engl.: extended-spectrum β -lactamase)
ESCMID	Europäische Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (engl.: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases)
EU	Europäische Union
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: fetal bovine serum)

G.	<i>Glaesserella</i>
h	Stunden
HTM	Haemophilus Test Medium
ISB	Isosensitest-Bouillon
k. A.	Keine definierten Angaben
KbE	Koloniebildende Einheiten (engl.: cfu, colony forming units)
LHB	Lysiertes Pferdeblut (engl.: lysed horse blood)
mE	Kleiner Fehler (engl.: minor error)
ME	Schwerwiegender Fehler (engl.: major error)
MHB	Mueller-Hinton-Bouillon
MHF-Y	Mueller-Hinton Fastidious Medium with Yeast Extract
MHK	Minimale Hemmkonzentration (engl.: MIC, minimal inhibitory concentration)
ml	Milliliter
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
M.	<i>Mycoplasma</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NGS	Next generation sequencing
nm	Nanometer
NWGA	Norwegian Working Group on Antibiotics
OIE	Weltorganisation für Tiergesundheit (franz.: Office International des Epizooties; seit Mai 2022 bekannt als World Organisation for Animal Health (WOAH))
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese (engl.: pulsed-field gel electrophoresis)
PPLO	Pleuropneumonia-like organism
QC	Qualitätskontrolle (engl.: quality control)
qPCR	Quantitative RT-PCR
RNS	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid, RNA)
RT-PCR	Echtzeit-PCR (engl.: real-time-PCR)
S.	<i>Staphylococcus</i>

SRGA	Swedish Reference Group for Antibiotics
spp.	Spezies (Pl.)
t	Zeit
T	Temperatur
TÄHAV	Verordnung über tierärztliche Hausapotheken
Tg	Tage
TMB	Test medium broth
UCC	Unit changing color
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: United States of America)
VetCAST	Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
VFM	Veterinary Fastidious Medium
VME	Sehr schwerwiegender Fehler (engl.: very major error)
WGS	Ganzgenomsequenzierung (engl: whole genome sequencing)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl.: World Health Organization)
WOAH	Weltorganisation für Tiergesundheit (engl.: World Organisation for Animal Health; bis Mai 2022 bekannt als Office International des Epizooties (OIE))

1. Einleitung

Antibiotika sind Arzneimittel, die das Wachstum von bakteriellen Krankheitserregern hemmen oder diese abtöten. Sie sind daher ein gängiges Mittel zur Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten in der Human- und Veterinärmedizin (PENG et al. 2014). Wenn Antibiotika zur Therapie bakterieller Infektionen eingesetzt werden, führt die Exposition jedoch zu einem Selektionsdruck bei den Bakterien. Dieser Selektionsdruck kann zu einer Entstehung oder Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen (AMR) führen (DAVIES und DAVIES 2010; CANTÓN und MOROSINI 2011; DAFALE et al. 2020; VELAZQUEZ-MEZA et al. 2022). Indem zuvor gegen den Erreger effektive Antibiotika ihre Wirksamkeit verlieren (BENGTSSON und GREKO 2014; VENTOLA 2015), ist neben einer eingeschränkten Wirkstoffwahl auch mit erhöhten Behandlungskosten zu rechnen. Ein übermäßiger oder unnötiger Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin ist daher kritisch zu betrachten (DACHE et al. 2021; VELAZQUEZ-MEZA et al. 2022; CANESCHI et al. 2023). Beachtenswert ist, dass resistente Erreger über viele unterschiedliche Wege (z.B. Mensch-Mensch, Tier-Mensch, Landwirtschaft-Umwelt) verbreitet werden können. In Krankenhäusern können resistente Erreger durch Patientenkontakt mit anderen Patienten oder medizinisches Personal übertragen werden (ZHOU et al. 2021; DING et al. 2023). Enger Kontakt mit antibiotisch behandelten Tieren kann dazu führen, dass sich Personen (z.B. Landwirte und Tierärzte) mit resistenten Krankheitserregern (z.B. ESBL/AmpC-produzierende *Escherichia coli*) infizieren oder mit diesen besiedelt werden (HUIJBERS et al. 2015; VELAZQUEZ-MEZA et al. 2022). Eine weitere Infektionsquelle für den Menschen sind Lebensmittel tierischen Ursprungs, die mit resistenten Krankheitserregern kontaminiert sind (VERRAES et al. 2013; FOUNOU et al. 2016; BERMAN et al. 2023). Neben einer Gefährdung des Tierwohls durch ausbleibende Therapieerfolge können resistente Erreger in der Nutztierhaltung zu wirtschaftlichen Verlusten durch eine Produktionseinschränkung bei lebensmittelliefernden Tieren (z.B. Geflügel, Rinder, Schweine) und deren Produkten (z.B. Eier, Fleisch, Milch) führen (BENGTSSON und GREKO 2014). Bekannte Übertragungsquellen von resistenten Bakterien sind tierische Exkremente, die landwirtschaftliche Böden verunreinigen und ins Grundwasser gelangen (HAUBE et al. 2014; DAHM et al. 2015). Aber auch Abwassersysteme von lebensmittelproduzierenden Betrieben, Stäube oder die Ableitung von Abluft haben sich als mögliche Vektoren für resistente Keime (z.B. Methicillin-resistente

Staphylococcus aureus, MRSA) erwiesen (FRIESE et al. 2013; EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS 2022; IBEKWE et al. 2023).

Da immer weniger neue Antibiotika auf den Markt kommen (WHO 2020), ist ein verantwortungsvoller Umgang mit den derzeit verfügbaren Wirkstoffen eine absolute Notwendigkeit. Dies erfordert in erster Linie eine Reduzierung des Stoffeinsatzes (DART 2020). Wenn eine Antibiotikabehandlung unvermeidlich ist, gilt es, den Wirkstoff gezielt einzusetzen. Eines der wichtigsten Instrumente dafür ist die Bestimmung des Empfindlichkeitsstatus von Krankheitserregern mittels standardisierter Methoden zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung (AST) (SILLEY et al. 2011; SILLEY 2012; VAN BELKUM et al. 2019). Die AST ermöglicht bei korrekter Durchführung und Auswertung die Auswahl des am besten geeigneten Antibiotikums im Falle einer klinisch manifestierten Infektionskrankheit (GAJIC et al. 2022). Das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) veröffentlicht international anerkannte Standards zur AST, die Diagnostiklaboren klare Prüfvorschriften zu den Methoden und deren Umsetzung geben. Diese Prüfvorschriften tragen dazu bei, die Qualität (Auswertung, Fehlerbehandlung, Interpretation, Reproduzierbarkeit) von Antibiogrammen zu sichern. Bedenklich ist jedoch, dass für viele veterinärmedizinische Infektionserreger noch keine anerkannten Standardverfahren vorliegen (SCHWARZ et al. 2010a). Diagnostiklabore greifen daher häufig auf unterschiedliche Methoden und Testparameter zur AST dieser Erreger zurück. Dabei ist zu bedenken, dass die Verwendung nicht standardisierter Methoden möglicherweise keine validen Ergebnisse liefert (BUTAYE et al. 1998; EGERVÄRN et al. 2007; LOOSE et al. 2020). Die Folge davon kann die Auswahl eines ungeeigneten Antibiotikums sein (KAHLMETER et al. 2003). Beispielsweise ist bekannt, dass die Inokulumdichte des zu testenden Bakterienisolats, die Inkubationsbedingungen oder die Zusammensetzung des Mediums die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK-Werte) beeinflussen (BUTAYE et al. 1998; FUCHS et al. 2001; LI et al. 2017; LOOSE et al. 2020).

Für die veterinärpathogenen Erreger *Avibacterium gallinarum* (*Av. gallinarum*), *Avibacterium paragallinarum* (*Av. paragallinarum*), *Bordetella avium* (*B. avium*), *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) und *Mycoplasma gallisepticum* (*M. gallisepticum*) liegen derzeit noch keine anerkannten Standardmethoden zur AST vor. Das Ziel dieser Arbeit war es deshalb, für diese in der Geflügel- oder Rinder-Primärproduktion

bedeutsamen Erreger geeignete AST-Methoden im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren zu erarbeiten, die zur Etablierung standardisierter Empfindlichkeitstests beitragen.

2. Literaturübersicht

2.1 Antimikrobielle *in-vitro*-Empfindlichkeitstestung

Die Geschichte der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung reicht bis in das 19. Jahrhundert zurück. Bereits 1889 untersuchte Martinus Willem Beijerinck (*1851, †1931) den Effekt von Auxinen auf das Bakterienwachstum und führte eine auxanographische Methode durch, die die Grundlage für die heutige Agardiffusion bildet (BEIJERINCK 1989; WHEAT 2001; ANWAR et al. 2022). Er versetzte Filterpapierstreifen mit verschiedenen Auxinen und legte sie dann auf die Oberfläche von beimpften Agarplatten. Nach der Bebrütung bewertete er die Position und Intensität des Bakterienwachstums in den Diffusionsbereichen, sodass er den Nährstoffbedarf des Bakteriums beurteilen konnte. Im Jahr 1928 entdeckte Alexander Fleming (*1881, †1955), dass ein mit *Penicillium* kontaminierter Nährboden das Wachstum von Staphylokokken inhibiert (WHEAT 2001; TAN und TATSUMURA 2015). Kurze Zeit später, im Jahr 1929, veröffentlichte Fleming seine ersten Erkenntnisse zur Empfindlichkeitstestung im flüssigen Nährmedium (FLEMING 1929). In den Folgejahren wurden weitere Studien veröffentlicht, die Methoden zur *in-vitro*-Empfindlichkeitsprüfung neu- oder weiterentwickelten. Eine Erkenntnis der Wissenschaft war, dass die Ergebnisse dieser Verfahren durch verschiedene Faktoren, wie dem Medium oder den Inkubationsbedingungen, beeinflussbar sind (WHEAT 2001; DOREY und LEES 2017; LI et al. 2017). Im Jahr 1961 wies die Weltgesundheitsorganisation (WHO) auf die Relevanz der Standardisierung von Empfindlichkeitstests hin (WHO 1961), um valide Ergebnisse als Entscheidungshilfe für die antimikrobielle Therapie bakterieller Infektionskrankheiten zu ermöglichen. Seither wurden verschiedene internationale und nationale Organisationen und Netzwerke wie das CLSI oder das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) gegründet, die unter anderem darauf abzielen, praktikable Prüfvorschriften zur AST zu veröffentlichen. Geeignete Standardmethoden zur AST von Infektionserregern sind in den letzten Jahrzehnten in den Mittelpunkt globaler Vorhaben gerückt, da zunehmend über den Nachweis resistenter Erreger berichtet wurde (VENTOLA 2015; WHO 2021).

2.1.1 Methoden zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung

In Abhängigkeit von der zu prüfenden Bakterienart, der Anzahl der zu testenden Isolate und den zu prüfenden Wirkstoffen sind unterschiedliche Verfahren der bakteriellen Empfindlichkeitsprüfung anwendbar.

2.1.1.1 Diffusionsverfahren

2.1.1.1.1 Agardiffusionstest

Eine einfache und schnelle Anfertigung eines Antibiogramms kann mittels Agardiffusionsverfahren erfolgen, wodurch qualitative Testergebnisse erzielt werden. Hierbei wird eine frisch bebrütete Bakteriensuspension auf ein festes Nährmedium (Agar) flächig ausplattiert (SELBITZ 2023a). Nach Belegen des Nährbodens mit Antibiotika-bestückten Filterpapieren (Testplättchen) mit definierter Konzentration diffundieren die Wirkstoffe aus dem Filterpapier in den Agar. Nach einer definierten Inkubationszeit erfolgt die Feststellung und Messung eines Hemmhofdurchmessers (mm), der im Falle einer Wachstumshemmung radial um das Plättchen auftritt. Die Bewertung der Resultate erfolgt anhand der Hemmhof-Durchmessergröße. Diese variiert unter anderem je nach der Spezies der zu testenden Bakterien und des Wirkstoffs. Obwohl das Agardiffusionsverfahren kostengünstig ist, hat es für die Routinediagnostik den Nachteil, dass die Ergebnisse nicht immer vollständig reproduzierbar sind (DANKMEIER et al. 2003; KOLBERT und SHAH 2005).

2.1.1.2 Dilutionsverfahren (Reihenverdünnungstests)

Im Rahmen des Dilutionsverfahrens werden in einem flüssigen (Bouillondilution) oder festen (Agardilution) Nährmedium geometrisch ansteigende oder abfallende Verdünnungsreihen hergestellt. Durch Beimpfen jeder Verdünnungsstufe mit einem normierten Inokulum an Bakterien können nach einer definierten Inkubationszeit qualitative Ergebnisse in Form von MHK-Werten abgelesen werden. Diese MHK-Werte stellen die geringsten Wirkstoffkonzentrationen dar, bei welcher ein sichtbares Bakterienwachstum des getesteten Erregers in der bebrüteten Bouillon oder auf dem bebrüteten Agar verhindert wird (CLSI 2013).

2.1.1.2.1 Bouillondilutionstests

Eine der ersten Methoden der Bouillonverdünnung war die Bouillon-Makrodilution (Röhrchenverdünnungstest) (ERICSSON und SHERRIS 1971). Bei diesem Test

werden zweifache Verdünnungen (z.B. 0,25, 0,5, 1, 2, 4 µg/ml) eines Antibiotikums in einem flüssigen Nährmedium hergestellt und mit aufsteigender Konzentration auf verschiedene Reagenzröhrchen verteilt (RELLER et al. 2009). Diese Reagenzröhrchen werden mit einem standardisierten bakteriellen Inokulum beimpft und anschließend bebrütet. Nach der Inkubationszeit werden die Röhrchen auf sichtbares Bakterienwachstum untersucht, das durch eine Trübung angezeigt wird. Die Konzentration des ersten Röhrchens ohne sichtbare Trübung entspricht dem MHK-Wert. Aufgrund der aufwendigen Herstellung der Verdünnungsschritte der Wirkstoffkonzentrationen in den Reagenzröhrchen wird dieser Test nur noch selten in der Routine angewendet. Mit der Einführung schnellerer Methoden wurde die Bouillon-Makrodilution in der Routine weitgehend durch diese ersetzt (SCHUMACHER et al. 2018). Zu den schneller durchführbaren Methoden gehört die Bouillon-Mikrodilution, bei der die zweifachen Verdünnungen der Antibiotika in 96-Well-Mikrotiterplatten hergestellt werden. Anschließend erfolgt die Inokulation mit einer standardisierten Bakteriensuspension und die Bebrütung der Mikrotiterplatten. Nach der Inkubationszeit wird sichtbares Wachstum in Form von Trübungen oder Knopfbildungen in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte beobachtet. Ein Testergebnis mit *B. avium* ist in Abbildung 1 dargestellt. Vorteile dieser Methode bestehen darin, dass die gleichzeitige Prüfung mehrerer Antibiotika und Konzentrationen möglich ist und vorgefertigte Mikrotiterplatten-Layouts für bestimmte Anwendungen (z.B. für Großtiere, Kleintiere oder Mastitiserreger) kommerziell erhältlich sind (SELBITZ 2023a). Zudem weist die Bouillon-Mikrodilutionsmethode eine hohe intra- und interlaboratorische Reproduzierbarkeit der Ergebnisse auf (WALLMANN et al. 2005; RELLER et al. 2009). Aus diesen Gründen und weil der Einsatz photometrischer und EDV-gestützter Methoden eine weitestgehend automatisierte Empfindlichkeitstestung ermöglicht, gilt das Bouillon-Mikrodilutionsverfahren derzeit als Goldstandard (WALLMANN et al. 2006; LALLEMAND et al. 2016). Der Nachteil ist die vergleichsweise geringere Flexibilität der Wirkstoffauswahl bei vorgefertigten Mikrotiterplatten-Layouts und die hohen Anschaffungskosten (etwa zehn bis 22 Dollar, etwa neun bis 19 Euro) dieser Layouts (RELLER et al. 2009; SELBITZ 2023a).

Abbildung 1

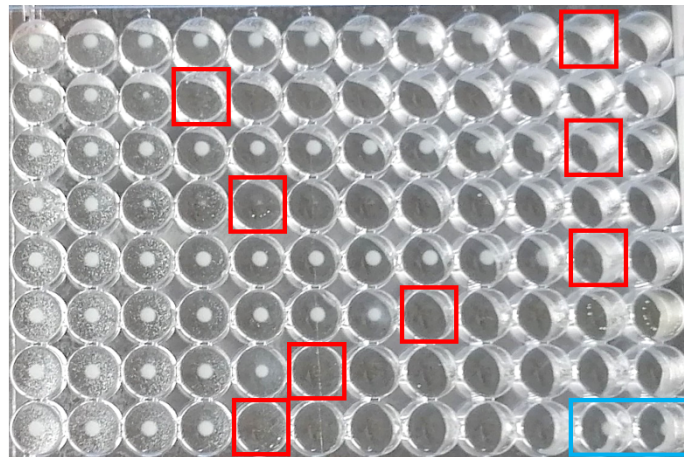


Abbildung 1: Ergebnis einer Bouillon-Mikrodilutionstestung von *B. avium* unter Verwendung von nicht supplementierter CAMHB und einer Inkubation für 20 h bei 35 ± 2 °C. Wachstum stellt sich als Knöpfchen in den Vertiefungen dar; Rot umrandete Vertiefungen visualisieren die MHK-Werte; Blau umrandete Vertiefungen visualisieren Wachstumskontrollen.

2.1.1.2.2 Agardilutionstests

Ein komplexes und weniger häufig verwendetes Dilutionsverfahren zur bakteriellen Empfindlichkeitstestung ist die Agardilution, bei der die Verdünnungsreihen in einem festen Nährboden angelegt werden. Hierzu werden bereits in der Herstellungsphase des Agars antimikrobielle Wirkstoffe in bekannten und seriellen Konzentrationen zugesetzt (SELBITZ 2023a). Anschließend werden die zu untersuchenden Isolate auf dem Agar (sub)kultiviert und ihre antimikrobielle Sensitivität ermittelt. Dieses Verfahren eignet sich besonders für die AST von Anaerobiern, da diese im Vergleich zu Aerobiern schwierige Kultivierungsbedingungen erfordern (CLSI 2018a; CLSI 2018b).

2.1.1.3 Epsilometer test (E-Test)

Der E-Test kombiniert die Agardiffusions- mit der Reihenverdünnungsmethode (SELBITZ 2023a). Anstelle eines Testplättchens wird ein mit einem bestimmten Antibiotikum imprägnierter Papierstreifen auf die mit dem zu testenden Erreger inokulierte Agaroberfläche gelegt. Die Konzentration des Antibiotikums nimmt vom Anfang bis zum Ende des Streifens exponentiell ab. Nach einer definierten Inkubationszeit wird das Ergebnis abgelesen, und dabei entspricht die MHK derjenigen Konzentration, bei der sich die Hemmhof-Ellipse mit dem Teststreifen schneidet. Von Nachteil ist, dass der E-Test anders als die Bouillon-Mikrodilution keine automatisierte

AST ermöglicht (SELBITZ 2023a). Während der E-Test im Vergleich zum Agar-Diffusionstest lange Zeit als aufwendiger galt (SELBITZ 2023a), wurden in jüngerer Zeit neue E-Test-Methoden (z.B. für *Enterobacterales*, *Helicobacter pylori*) veröffentlicht, die eine einfache Handhabung und reproduzierbare Ergebnisse ermöglichen sollen (MIFTAHUSSURUR et al. 2020; GOER et al. 2022).

2.1.2 Fehlerquellen bei der Erstellung von Antibiogrammen

Verschiedene Organisationen (z.B. CLSI, EUCAST) veröffentlichen internationale oder nationale Prüfvorschriften für die AST bakterieller Erreger. Diese geben Auskunft darüber, wie und unter welchen Bedingungen der Empfindlichkeitstest durchgeführt werden muss. Standards führen klare Anforderungen (z.B. an das zu verwendende Material und Bewertungskriterien) auf, während Richtlinien optional anwendbare Vorgehensweisen definieren (CLSI 2013). Abhängig von der zu testenden Bakterienart können sich die Methoden hinsichtlich des Nährmediums, der Inkubationsbedingungen (Atmosphäre, Temperatur, Inkubationszeit) und des einzupfendenden Inokulums unterscheiden. So sieht das CLSI zum Beispiel die Verwendung der Kationen-adjustierten Mueller-Hinton-Bouillon (CAMHB) für die standardisierte Bouillon-Mikrodilutionstestung von *Bordetella bronchiseptica* vor, während für *Histophilus somni* das Mueller-Hinton fastidious broth medium with yeast extract (MHF-Y) vorgeschrieben ist (CLSI 2023). Für standardisierte Bouillon-Mikrodilutionstests von *Enterobacterales* spezifiziert das CLSI eine Inkubation von 16 bis 20 h bei 35 ± 2 °C in Umgebungsluft (CLSI 2023). Im Gegensatz dazu sind für standardisierte AST von anspruchsvollen Erregern wie *H. somni* längere Inkubationszeiten (z.B. 20 bis 24 h) in einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre erforderlich (CLSI 2023). Neben diesen spezifischen Testparametern gibt es eine Reihe weiterer Faktoren, die bei falscher Handhabung eine Fehlerquelle darstellen können. Zu beachten sind zum Beispiel die Lagerungshinweise der verwendeten Produkte, etwa des zu testenden Wirkstoffs (CLSI 2024). Außerdem sollten die zu prüfenden Bakterienisolate nicht zu häufig subkultiviert und bei der Testung von Colistin nur Mikrotiterplatten aus unbehandeltem Polystyrol verwendet werden (CLSI 2024).

Eine wichtige Voraussetzung für das Erfassen von Fehlern bei der AST ist die Implementierung eines internen Qualitätskontrollsystems (engl.: quality control

system, QC) (SCHUG et al. 2022). Zu diesem Zweck werden entsprechend den Prüfvorschriften parallele Tests von Qualitätskontrollstämmen (QC-Stämme) durchgeführt. Weichen die Ergebnisse der QC-Stämme von den akzeptierten QC-Bereichen ab, liegen Hinweise auf Fehler in der Durchführung der AST vor. Aktuell sind in CLSI- und EUCAST-Dokumenten feste QC-Bereiche für verschiedene QC-Stämme (z.B. *E. coli* ATCC® 25922, *S. aureus* ATCC® 29213, *S. aureus* ATCC® 25923) festgelegt (EUCAST 2021; SCHUG et al. 2022; CLSI 2023). Weicht die Umsetzung der AST von den Angaben der Referenzmethode ab oder wird nicht auf die Vermeidung von Fehlern geachtet, ist anzunehmen, dass die Testergebnisse beeinflusst werden und kein Vergleich der gesammelten Empfindlichkeitsdaten zwischen verschiedenen Laboratorien möglich ist. Werden keine Korrekturmaßnahmen ergriffen, dürfte sich dies auch auf die klinische Bewertung der Ergebnisse auswirken, was wiederum die Empfehlung für den Arzneimitteleinsatz beeinflussen kann (KAHLMETER et al. 2003).

2.1.3 Prüfvorschriften antimikrobieller *in-vitro*-Empfindlichkeitstests

2.1.3.1 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)

Das bis 2000 als „National Committee for Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS) benannte CLSI veröffentlicht seit 1968 internationale Prüfvorschriften zur AST human- und veterinärpathogener Erreger (EINSTEIN und LEWIS II 2020). Diese sind von großer Bedeutung, um valide und vergleichbare Empfindlichkeitsdaten für relevante Erreger zu erhalten und einer Resistenzselektion vorzubeugen (CLSI 2013). Die gemeinnützige und multidisziplinäre Organisation setzt sich aus verschiedenen internationalen Mitgliedern zusammen, darunter Mitgliedsorganisationen und Wissenschaftler sowie Freiwillige aus Industrie und Gesundheitswesen. Das CLSI bildet verschiedene Ausschüsse, die Dokumente zu einer bestimmten Disziplin erarbeiten. Dazu gehört das „Antimicrobial Susceptibility Testing (AST) Subcommittee“, das sich mit der Erarbeitung von Dokumenten zu verschiedenen Aspekten der AST befasst. In einigen dieser Dokumente finden sich klare Anweisungen zum Material, zur Durchführung der Methodik, zu geeigneten QC-Stämmen sowie zu Referenzwerten für die einzusetzenden QC-Stämme. Das CLSI gibt auch klinische Grenzwerte für die Auswertung der AST an, wobei diese auf bestimmte Erreger-Wirkstoff-Kombinationen beschränkt und teilweise an Indikation, Organsystem oder Tierart gekoppelt sind. Derzeit gibt es insgesamt acht

veterinärmedizinische CLSI-Dokumente für die Prüfung von Bakterien von Tieren: VET01, VET01S, VET02, VET03, VET03 Supplement VET04, VET05, VET06, und VET09. Für die Testung von Bakterien von Tieren gilt das CLSI-Supplement VET01S (CLSI 2020; CLSI 2023), das unter anderem Prüfvorschriften für schnell wachsende Organismen wie *Enterobacterales* (z.B. *E. coli*) umfasst. Für die AST von selten isolierten oder anspruchsvollen Bakterien (z.B. *Bacillus* spp., *Brachyspira hyodysenteriae*, *Campylobacter jejuni/coli*) aus Tieren wurde das CLSI-Supplement VET06 veröffentlicht (CLSI 2017). Obwohl das CLSI-Dokument M43-A Bestimmungen für die AST humanpathogener *Mycoplasma* spp. (*Mycoplasma (M.) hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*) enthält, fehlen derzeit entsprechende Dokumente für die Testung veterinärpathogener Mykoplasmen.

2.1.3.2 EUCAST und VetCAST

Das im Jahr 1997 von der Europäischen Gesellschaft für klinische Mikrobiologie und Infektionskrankheiten (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, ESCMID) gegründete EUCAST hat zum Ziel, AST-Methoden für humanpathogene Erreger innerhalb der EU zu harmonisieren (GISKE et al. 2022; KAHLMETER et al. 2006). Ein weiteres Hauptziel des EUCAST besteht darin, in Europa gemeinsam mit der Europäischen Arzneimittel-Agentur (European Medicine Agency, EMA) klinische Grenzwerte für neue humanmedizinische Wirkstoffe zu erarbeiten. Das Netzwerk ist in einen Lenkungsausschuss und Präsidialausschuss, sowie mehrere Unterausschüsse und nationale AST-Ausschüsse geordnet. Neben europäischen Staaten wenden auch einige andere Länder wie Australien EUCAST-Dokumente an (EUCAST 2021). Da das EUCAST in seinen Arbeiten keine Erreger tierischer Herkunft berücksichtigt, gründete die ESCMID-Studiengruppe für Veterinärmikrobiologie im Jahr 2015 das Subkomitee „Veterinary Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing“ (VetCAST) (EUCAST 2021). Dieses befasst sich ausschließlich mit der AST von bakteriellen Krankheitserregern tierischen Ursprungs sowie zoonotischen Erregern (TOUTAIN et al. 2017). VetCAST untersteht den Strukturen des EUCAST und bestrebt innerhalb der EU die Vereinheitlichung von AST-Methoden und Festlegung von Grenzwerten für Erreger tierischen Ursprungs. Dazu arbeitet es eng mit europäischen Strukturen wie der EMA, dem Europäischem Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (European Center for Disease Prevention and Control, ECDC) und der Europäischen Behörde für

Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) zusammen (EUCAST 2021). Während einige EUCAST- und CLSI-Methoden identisch sind (MATUSCHEK et al. 2014), können sich andere in Bezug auf ihre Testparameter unterscheiden (CUSACK et al. 2019). Nachdem EUCAST die vom CLSI akzeptierten QC-Stämme und ihre QC-Bereiche ausgiebig auf ihre Eignung zur Qualitätskontrolle geprüft hat, hat es einige von ihnen übernommen (MATUSCHEK et al. 2014).

2.1.3.3 Nationale Prüfvorschriften

Neben international tätigen Organisationen (z.B. CLSI) erlassen einige Organisationen Prüfvorschriften zur AST von Bakterien, die auf nationaler Ebene gelten. Beispiele sind das "Deutsche Institut für Normung e.V." (DIN) in Deutschland, das "Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie" (CA-SFM) in Frankreich, die "British Society for Antimicrobial Chemotherapy" (BSAC) in Großbritannien, die "Commissie Richtlijnen Gevoeligheids-bepalingen" (CRG-Richtlinien) der Niederlande, die "Norwegian Working Group on Antibiotics" (NWGA) in Norwegen oder die "Swedish Reference Group for Antibiotics" (SRGA) in Schweden (KAHLMETER 2014). Allerdings können sich die nationalen Dokumente hinsichtlich der empfohlenen Grenzwerte unterscheiden (KAHLMETER 2014; SCHWARZ et al. 2010a und 2010b). So liegt beispielsweise der Grenzwert für Gentamicin-resistente *E. coli* in Großbritannien nach BSAC bei 1 µg/ml, während er nach der französischen Prüfvorschrift 8 µg/ml beträgt (KAHLMETER 2014). Auch im Hinblick auf die empfohlenen AST-Methoden und Testparameter weichen die Angaben auf nationaler Ebene teilweise voneinander ab (SILLEY 2012). Daraus lässt sich ableiten, dass der Vergleich von Empfindlichkeitsdaten zwischen verschiedenen Ländern unter Verwendung nationaler Prüfvorschriften im Gegensatz zur Verwendung international gültiger Prüfvorschriften weniger geeignet ist.

2.1.4 Qualitätssicherung und Interpretation von MHK-Werten

Die Qualitätssicherung bei MHK-Bestimmungen durch Festsetzung von Bewertungskriterien ist eine zentrale Voraussetzung für die valide Interpretation von antimikrobiellen Empfindlichkeitsdaten.

2.1.4.1 Qualitätskontrollstämme (QC-Stämme)

Bei der Durchführung eines Antibiogramms können viele Fehler auftreten, die einen enormen Einfluss auf die MHK-Werte und damit gegebenenfalls auf die Wahl des

Wirkstoffes zur Therapie haben (CLSI 2018a). Zur Vermeidung dieses Problems nehmen QC-Stämme eine wichtige Funktion im Rahmen der Qualitätskontrolle (engl.: quality control, QC) der Testungen ein. Für QC-Stämme liegen in den entsprechenden Standards definierte Testbedingungen und QC-Bereiche vor (CLSI 2020). Unter anderem dient der Stamm *E. coli* ATCC® 25922 als QC-Stamm für viele CLSI-zugelassene Standardmethoden (CLSI 2020). Indem QC-Stämme parallel zum Bakterienkollektiv entsprechend der vorgegebenen Richtlinien getestet werden, geben sie einen Hinweis auf die korrekte Durchführung der Testungen. Sind für eine Methode noch keine validierten QC-Stämme verfügbar oder werden keine QC-Stämme mitgeführt, sind die Ergebnisse als unsicher einzustufen (SCHWARZ et al. 2010a; CLSI 2018a). Weichen die Ergebnisse eines etablierten QC-Stammes bei einer MHK-Bestimmung von seinen im Standard definierten QC-Bereichen ab, sind Fehler in der Durchführung der Testungen oder Kontaminationen der verwendeten Medien auszuschließen (KING und BROWN 2001).

2.1.4.2 Validierung einer Testmethode gegen eine Referenzmethode

Führen Unterschiede zwischen den Ergebnissen einer Referenzmethode und der zu prüfenden Methode zu einer interpretativen oder kategorischen Änderung der Ergebnisse, sind drei Arten von Fehlern zu unterscheiden: geringfügige Fehler (minor errors, mEs), schwerwiegende Fehler (major errors, MEs) und sehr schwerwiegende Fehler (very major errors, VMEs) (HUMPHRIES et al. 2018). Ein Beispiel ist die Validierung einer neuen Bouillon-Mikrodilutionsmethode gegenüber einer bereits national oder international anerkannten Referenzmethode. Wenn ein Isolat nach der Referenzmethode gemäß seiner MHK als intermediär, nach der neuen Bouillon-Mikrodilutionsmethode aber als empfindlich oder resistent eingestuft wurde, liegt ein mE vor. Ein ME besteht, wenn ein Isolat nach den Ergebnissen der neuen Methode als empfindlich eingestuft wird, die MHK infolge der Referenzmethode jedoch eine resistente Einstufung vorsieht. Der größte Fehler liegt bei einem VME vor, wenn ein Isolat infolge der Ergebnisse der Referenzmethode als empfindlich eingestuft wurde, während dasselbe Isolat auf der Grundlage der Ergebnisse der neuen Methode als resistent gilt. Zu beachten ist allerdings, dass eine solche Überprüfung der mit einer neuen Methode erzielten Ergebnisse nur möglich ist, wenn für den Erreger bereits ein Referenzverfahren bzw. eine anerkannte Prüfvorschrift vorliegt. Dieses ist aber für einige bakterielle Erreger nicht der Fall.

2.1.4.3 Interpretationskriterien zur Bewertung der antimikrobiellen Empfindlichkeit

Zur Bewertung von Ergebnissen antimikrobieller Empfindlichkeitsprüfungen sind spezifische Interpretationskriterien notwendig.

2.1.4.4 Klinische Grenzwerte

Klinische Grenzwerte (engl.: breakpoints) ermöglichen die Einstufung eines Bakterienisolats als klinisch „empfindlich“, klinisch „intermediär“ oder klinisch „resistent“ (CLSI 2020), was bei der Auswahl des am besten geeigneten Antibiotikums hilfreich ist. Ist ein Bakterienisolat gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff als resistent eingestuft, ist davon auszugehen, dass bei Anwendung dieses Wirkstoffs kein Therapieerfolg zu erzielen sein wird (SILLEY 2012; CLSI 2020). Der Therapieerfolg eines Wirkstoffes bei einem als intermediär eingestuften Bakterienisolats gilt als unsicher, weshalb bei Verfügbarkeit ein besser geeigneter Wirkstoff angewendet werden sollte. Dagegen gilt der therapeutische Erfolg als sicher, wenn das Bakterienisolat als sensibel gegenüber dem verwendeten Wirkstoff eingestuft wurde (CLSI 2020). Da die Entwicklung spezies- und wirkstoffspezifischer Grenzwerte auf komplexen Datensätzen (z.B. MHK-Verteilung großer Populationen klinischer Isolate) und Eigenschaften des Wirkstoffes (z.B. pharmakokinetische und pharmakodynamische Parameter) basiert und sehr kosten- und zeitaufwendig ist, stehen derzeit noch nicht für jede Erreger-Wirkstoff-Organsystem-Kombination klinische Grenzwerte zur Verfügung (ARBEITSKREIS ANTIBIOTIKARESISTENZ; WALLMANN et al. 2015).

2.1.4.5 Epidemiologische Cut-Off-Werte (ECOFFs)

Ein epidemiologischer Cut-Off-Wert (ECOFF) fungiert als Abgrenzung zwischen MHK-Werten einer „Wildtyp“-Population (keine antimikrobielle Resistenz, niedrige MHK-Werte) und „Nicht-Wildtyp“-Population (erworbene antimikrobielle Resistenz, erhöhte MHK-Werte) (WALLMANN et al. 2014; WALLMANN et al. 2015). Dabei umfassen erworbene Resistenzen etwa das spontane Auftreten resistenzvermittelnder Mutationen (Veränderungen des Erbgutes) oder den Erwerb antimikrobieller Resistenzgene. ECOFFs beruhen auf den Empfindlichkeitsdaten von Isolaten unterschiedlicher Herkunft (Region, Isolationszeitpunkt) und berücksichtigen keine Faktoren zur Beurteilung der In-vivo-Wirksamkeit (z.B. Wirkstoffverteilung oder Anreicherung im Zielgewebe). Im Gegensatz zu klinischen Grenzwerten geben ECOFFs daher keinen direkten Hinweis auf die klinische Eignung eines Antibiotikums,

sondern eher auf die Resistenzentwicklung innerhalb einer untersuchten bakteriellen Population (SILLEY et al. 2011; WALLMANN et al. 2014).

2.1.4.6 MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte

Zur Beurteilung der Empfindlichkeit eines Testkollektivs mit einer definierten Isolatanzahl „n“ können die MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte kalkuliert werden. Der MHK₅₀-Wert definiert die Wirkstoffkonzentration, bei welcher 50 % der untersuchten Isolate einer Bakterienpopulation sichtbar im Wachstum gehemmt sind (SCHWARZ et al. 2010a). Er entspricht dem mittleren MHK-Wert (Modalwert). Die MHK₅₀ entspricht bei einer geraden Isolatanzahl dem MHK-Wert an Position $n \times 0,5$ (SCHWARZ et al. 2010b). Bei einer ungeraden Isolatanzahl ist die MHK₅₀ die Konzentration $(n + 1) \times 0,5$. Der MHK₉₀-Wert definiert hingegen die Wirkstoffkonzentration, bei der 90 % der untersuchten Isolate einer Bakterienpopulation sichtbar gehemmt sind (SCHWARZ et al. 2010a). Die MHK₉₀ ist demnach bei gerader Isolatanzahl die Konzentration $n \times 0,9$ (SCHWARZ et al. 2010b). Bei einer ungeraden Anzahl von Isolaten entspricht die MHK₉₀ der Konzentration des nächsthöheren Wertes. Liegen die MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte mehrere Verdünnungsstufen auseinander, könnte dies ein Hinweis für eine stattgefundene Resistenzentwicklung innerhalb der Population sein. Allerdings ist zu beachten, dass die Signifikanz dieser Werte mit der steigenden Zahl der Isolate zunimmt. Diese Parameter sind daher nicht für die Interpretation kleiner Testpopulationen geeignet (SCHWARZ et al. 2010b).

2.2 Antimikrobielle Therapie

Antibiotika sind ein wichtiger Bestandteil im Kampf gegen bakterielle Krankheitserreger, die die Gesundheit von Mensch und Tier gefährden. Grundsätzlich sollte zu Beginn einer antimikrobiellen Therapie eine eindeutige Indikation vorliegen, die die Verabreichung von antimikrobiellen Wirkstoffen an das zu behandelnde Tier notwendig erscheinen lässt (BURCHARD et al. 2008; LEEKHA et al. 2011; BTK 2015). Dabei werden unter anderem der klinische Gesundheitszustand des Tieres, die zeitliche Notwendigkeit der Therapie (z.B. als lebensrettende Maßnahme im Falle eines schweren Krankheitsverlaufes), die zu erwartende Erfolgsquote der Antibiotikabehandlung und, falls vorhanden, nationale Leitlinien für den sorgfältigen Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen (z.B. Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln der Bundestierärztekammer e.V.)

berücksichtigt (BURCHARD et al. 2008; BTK 2015). In Deutschland gilt seit 2018 eine partielle AntibioGrammpflicht gemäß der Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV 2018). Nach §12c gilt eine AntibioGrammpflicht (insbesondere für Nutztiere) unter anderem dann, wenn eine Therapie mit Cephalosporinen der dritten oder vierten Generation oder Fluorchinolonen erfolgen soll. Da jedoch in vielen Fällen der verursachende Infektionserreger zu Beginn der antimikrobiellen Therapie noch nicht feststeht, wird oft zunächst ein Wirkstoff eingesetzt, dessen Wirksamkeit aufgrund einer empirisch begründeten Annahme über den Erreger, seine Antibiotikaempfindlichkeit und die aktuelle Resistenzsituation beurteilt wird (BURCHARD et al. 2008). Sobald die Ergebnisse der Speziesidentifizierung des ursächlichen bakteriellen Erregers und der antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung vorliegen, sollte die Therapie sofort und möglichst mit einem gezielten engen Wirkungsspektrum angepasst werden (BTK 2015).

2.2.1 Antimikrobielle Wirkstoffklassen

Seit der industriellen Herstellung von Penicillin Ende der 1940er Jahre wurden verschiedene Antibiotika entdeckt und zur antimikrobiellen Therapie von Infektionskrankheiten weiterentwickelt (BURCHARD et al. 2008; ADEDEJI 2016). Zu den in der Geflügel- und Rinderindustrie am häufigsten verwendeten Antibiotikaklassen gehören Aminoglykoside, β -Lactame, Makrolide, Sulfonamide, Tetracykline und Chinolone (MARSHALL und LEVY 2011; PALMA et al. 2020).

2.2.1.1 Einteilung antimikrobieller Wirkstoffe nach Wirkmechanismus und Zielstruktur

Antibiotika können nach ihrem Wirkmechanismus und ihrer Zielstruktur klassifiziert werden. Die für die Veterinärmedizin wichtigsten und in dieser Arbeit berücksichtigten Wirkstoffklassen sowie ihre Zielstruktur sind in Tabelle 1 zusammengefasst (BURCHARD et al. 2008; SELBITZ 2023a; HUTCHINGS et al. 2019).

Tabelle 1: Übersicht relevanter Antibiotikawirkstoffklassen unter Angabe von Beispielen und der Zielstruktur

Wirkstoffklasse	Beispiele für Wirkstoffe	Zielstruktur (Wirkmechanismus)
Aminoglykoside	Gentamicin, Neomycin, Streptomycin	ribosomale 30S-Untereinheit (Inhibition der ribosomalen Proteinsynthese)
β -Laktame	Carbapeneme, Cephalosporine, Penicilline	Zellwand (Inhibition der Peptidoglykan-Synthese)
Chinolone	Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Enrofloxacin, Marbofloxacin), Nalidixinsäure	Gyrase-DNS-Komplex (Inhibition der DNS-Spiralisierung, -Replikation und -Transkription)
Diaminopyrimidine	Trimethoprim	Inhibition der Folsäuresynthese
Glykopeptide	Vancomycin	D-Ala-D-Ala-Enden des Lipids II (Inhibition der Zellwandsynthese)
Lincosamide	Lincomycin	ribosomale 50S-Untereinheit (Inhibition der ribosomalen Proteinsynthese)
Makrolide	Erythromycin, Tilmicosin, Tulathromycin	ribosomale 50S-Untereinheit (Inhibition der ribosomalen Proteinsynthese)
Polymyxine	Colistin	Zellmembran (Zerstörung der Zellmembran)
Sulfonamide	Sulfamethoxazol	Inhibition der Folsäuresynthese
Tetrazykline	Doxyzyklin, Oxytetrazyklin, Tetrazyklin	ribosomale 30S-Untereinheit (Inhibition der ribosomalen Proteinsynthese)

2.2.1.2 Einteilung antimikrobieller Wirkstoffe nach Wirksamkeit und Wirkungsspektrum

Neben ihrem Wirkmechanismus und ihrer Zielstruktur lassen sich Antibiotika auch hinsichtlich ihrer Wirksamkeit und dem Wirkungsspektrum einteilen. Die Wirksamkeit von Antibiotika kann in bakterizide und bakterio-statische Antibiotika unterteilt werden (BERNATOVÁ et al. 2013; GIGUÈRE et al. 2013; SELBITZ 2023a). Bakterizide Wirkstoffe hemmen das bakterielle Wachstum und bewirken das Absterben der Zelle (SELBITZ 2023a). Primäre (Synonym: absolute) bakterizide Antibiotika sind solche, die sowohl ruhende als auch proliferierende Bakterienzellen abtöten (SELBITZ 2023a). Sekundäre (Synonym: degenerative) bakterizide Wirkstoffe wie β -Laktame sind solche, die nur proliferierende Bakterienzellen abtöten (SELBITZ 2023a). Beispiele für bakterizide Wirkstoffklassen sind Aminoglykoside, Fluorchinolone und Polymyxine (BURCHARD et al. 2008; BERNATOVÁ et al. 2013; GIGUÈRE et al. 2013; SELBITZ 2023a). Zu den bakterio-statischen Antibiotika gehören solche, die die Bakterienzelle nicht abtöten, sondern lediglich eine reversible Wachstumshemmung bewirken (BERNATOVÁ et al. 2013; SELBITZ 2023a). Zu den bakterio-statischen Wirkstoffklassen zählen unter anderem Makrolide, Sulfonamide und Tetrazykline (BURCHARD et al. 2008; BERNATOVÁ et al. 2013; GIGUÈRE et al. 2013; SELBITZ 2023a). Das Wirkungsspektrum von Antibiotika wird nach einem breiten und einem engen Wirkungsspektrum unterschieden (SELBITZ 2023a). Wirkstoffe mit breitem Wirkungsspektrum (Breitbandantibiotika oder Breitspektrumantibiotika) (z.B. Fluorchinolone, Makrolide, Tetrazykline) sind gegen viele verschiedene Erreger wirksam und werden in der Regel eingesetzt, wenn eine Antibiotikatherapie angezeigt ist, der kausale Erreger aber noch nicht identifiziert werden konnte (SELBITZ 2023a). Im Gegensatz zu Breitspektrumantibiotika wirken Wirkstoffe mit engem Wirkungsspektrum (Schmalspektrumantibiotika) nur gegen bestimmte Bakterien und nicht gegen die gesamte Mikrobiota des zu behandelnden Tieres. Ist der kausale Erreger identifiziert, ist daher eine sofortige Umstellung der Therapie durch den gezielten Einsatz eines Wirkstoffs mit engem Wirkungsspektrum angezeigt, um einer Resistenzselektion entgegenzuwirken (BTK 2015; MELANDER et al. 2018). Ein Beispiel für ein Antibiotikum mit engem Wirkungsspektrum ist Penicillin G aus der Gruppe der Benzylpenicilline, das nur gegen Gram-positive Bakterien wirkt (BURCHARD et al. 2008; SELBITZ 2023a).

2.3 Antimikrobielle Resistenzen (AMR)

Antimikrobielle Wirkstoffe haben unterschiedliche Angriffsstellen in den Bakterienzellen. Zu den Hauptangriffsstellen der Wirkstoffe zählen die bakterielle Zellwandsynthese und Zellwand, der bakterielle Folsäurestoffwechsel, die DNS-Replikation und DNS-abhängige RNS-Polymerase sowie die Proteinsynthese (KAPOOR et al. 2017). Viele Bakterien sind jedoch in der Lage, eine Widerstandsfähigkeit gegen antimikrobielle Wirkstoffe zu entwickeln. Die gängigsten Hauptgruppen der unterschiedlichen Resistenzmechanismen sind die eingeschränkte Wirkstoffaufnahme oder der aktive Efflux des Wirkstoffs, die Veränderung der Angriffsstelle und die Inaktivierung des Wirkstoffs (REYGAERT 2018).

2.3.1 Intrinsische Resistenz

Intrinsische Resistenz bei Bakterien ist eine Eigenschaft, die bei allen Bakterien derselben Art vorhanden ist. Bei Bakterien kann die intrinsische Resistenz beispielsweise auf eine besondere Beschaffenheit der Zellwand zurückzuführen sein, die zu einer verringerten Membranpermeabilität der äußeren Membran führt oder auf der Expression von Effluxpumpen basiert (REYGAERT 2018). Allerdings kann intrinsische Resistenz auch induziert werden, etwa durch die Aufregulation von Multidrug-Efflux-Pumpen (FAJARDO et al. 2008; COX und WRIGHT 2013). In diesem Fall kommen die verursachenden Gene natürlicherweise vor, werden aber erst nach Exposition gegenüber dem antimikrobiellen Wirkstoff exprimiert (REYGAERT 2018). Die Struktur von Bakterien kann ihnen auch eine intrinsische Resistenz verleihen. So verfügen beispielsweise Mykoplasmen über keine Zellwand, weshalb Antibiotika, die die Zellwand angreifen (z.B. β -Lactam-Antibiotika), gegen Mykoplasmen nicht wirksam sind (BÉBÉAR et al. 2011).

2.3.2 Extrinsische Resistenz und horizontaler Gentransfer

Extrinsische Resistenzen entstehen durch Veränderungen des Genoms. Sie können entweder erworben werden (z.B. Mutationen bestimmter Gene infolge von Selektion) oder durch die Übertragung von Resistenzgenen entstehen (horizontaler Gentransfer). Letzteres geschieht meist über die drei Wege: Konjugation, Transduktion oder Transformation. Die Konjugation erfolgt durch eine F-pilusvermittelte Übertragung von konjugativen (oder mobilisierbaren) Plasmiden oder Transposons von einem Spenderbakterium auf das Empfängerbakterium (TENOVER 2001; VIROLLE et al.

2020). Dieser Weg kann als Mittel zur schnellen Anpassung dienen, da über ihn verschiedene metabolische Eigenschaften übertragen werden können. Neben AMR-Genen können auch Gene für die Biofilmbildung, Resistenz gegen Schwermetalle oder Virulenzgene über diesen Weg übertragen werden (DAVISON 1999; CABEZÓN et al. 2015; GRAF et al. 2019; VIROLLE et al. 2020). Eine durch Bakteriophagen vermittelte Übertragung von DNS-Fragmenten wird als Transduktion bezeichnet (CHIANG et al. 2019). Bakteriophagen sind Bakterienzellen infizierende Viren (CLOKIE et al. 2011). Da bei der Transduktion mit der Phagen-Erbinformation auch AMR-Gene mitübertragen werden können, kann das infizierte Bakterium auf diesem Wege entsprechende Resistenzgene erhalten (CHEN et al. 2022). Im Rahmen der Transformation erfolgt eine bakterielle Aufnahme freier DNS aus der Umwelt (BURMEISTER 2015; BORODOVICH et al. 2022). Dies setzt ein Stadium der natürlichen Kompetenz der Empfängerbakterien voraus, ermöglicht aber auch die Aufnahme von Resistenzgenen.

2.4 Identifizierung des Resistenzgenotyps

Die Bestimmung des Resistenzgenotyps trägt dazu bei, spezifische Resistenzmechanismen in Bakterien zu identifizieren (ZANKARI et al. 2012). Zur Identifizierung des Resistenzgenotyps eignen sich verschiedenste Methoden. Im Folgenden sind drei gängige Methoden näher beschrieben: die PCR-Methode, die Mikroarray-Technologie und Ganzgenomsequenzierung (WGS, whole genome sequencing; next generation sequencing, NGS).

2.4.1 Die PCR-Methode

Die traditionelle PCR-Methode basiert auf einer exponentiellen Amplifikation von Ziel-DNS-Sequenzen unter Verwendung von Vorwärts- und Rückwärtsprimern und mittels einer DNS-Polymerase. Entscheidend dafür ist, dass die DNS-Sequenz des Zielgens bekannt sein muss (FLUIT et al. 2001; ANJUM et al. 2017; GALHANO et al. 2021). Vorteile der herkömmlichen PCR sind die kostengünstige Durchführung und die Möglichkeit, größere DNS-Fragmente mit einer hohen Sensitivität nachzuweisen (ANJUM et al. 2017; GALHANO et al. 2021). Nachteilig ist, dass in der Regel mit der herkömmlichen PCR keine Punktmutationen innerhalb der Zielgene nachgewiesen werden können (ANJUM et al. 2017). Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Methoden erfordert die schnelle Echtzeit-PCR (Real-Time-PCR, qPCR) keine

Agarosegele und führt zu einer schnelleren Detektion (ANJUM et al. 2017). Von Vorteil ist auch, dass die RT-PCR einzelne Punktmutationen im Zielgen nachweisen kann, sofern sequenzspezifische DNS-Sonden verwendet werden, die speziell auf den Mutationsbereich ausgerichtet sind oder eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt wird (ANJUM et al. 2017). Ein Nachteil wiederum ist, dass die qPCR entgegen der herkömmlichen PCR nur DNS-Fragmente einer begrenzten Größe (bis zu 150 bp) nachweisen kann und kostenintensiver ist (ANJUM et al. 2017; GALHANO et al. 2021). Mit der Multiplex-PCR (konventionelle oder qPCR) können mehrere Ziel-DNS-Fragmente simultan amplifiziert werden, sodass mit nur einem PCR-Assay mehrere Resistenzgene (z.B. ESBL-Resistenzgene wie *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}* oder *bla_{TEM}*,) gleichzeitig bestimmt werden können (STROMMENDER et al. 2003; ANJUM et al. 2017; RAJIVGANDHI et al. 2018; GALHANO et al. 2021). Aufgrund der einfachen Anwendung von PCR-Methoden werden diese routinemäßig in mikrobiologischen Laboratorien für den schnellen Nachweis von Resistenzgenen in klinischen Isolaten sowie für epidemiologische Resistenzstudien von Isolaten eingesetzt (KEHRENBURG et al. 2001; KEHRENBURG et al. 2006; BÖCKELMANN et al. 2009; SEEDY et al. 2017; PENG et al. 2021).

2.4.2 Die Mikroarray-Technik

Bei der Mikroarray-Technik werden sogenannte Mikroarrays (auch Chips genannt) genutzt, deren Oberfläche mit bekannten und unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Fragmenten einzelsträngiger DNS oder RNS beschichtet sind (TREVINO et al. 2007; BUMGARNER 2014). In vielen Fällen tragen solche Mikroarrays alle exprimierten Gene eines Organismus (REINARD 2010). Auf den Array wird dann eine DNA- oder RNA-Probe aufgebracht, die mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist. Ist eine komplementäre Nukleinsäuresequenz vorhanden, kommt es zu einer Hybridisierung und die Probe bindet an das fluoreszenz-markierte Trägermaterial, sodass eine Farbmischung entsteht (CARTER et al. 2008; REINARD 2010; GOVINDARAJAN et al. 2012). Von Vorteil ist, dass mit der Mikroarray-Methode das Genom mehrerer hundert Isolate vergleichend untersucht werden kann (CASSONE et al. 2006; ANJUM et al. 2017; GALHANO et al. 2021). Im Vergleich zu PCR-Methoden sind Mikroarray-Assays allerdings in der Regel teurer und zeitaufwändiger (ROHDE et al. 2017; GALHANO et al. 2021). Darüber hinaus sind die Ergebnisse dadurch begrenzt, dass die zu untersuchenden Genomregionen bekannt

sein müssen, sodass die Mikroarray-Methode in den letzten Jahren weitgehend durch WGS-Analysen ersetzt wurden (GALHANO et al. 2021).

2.4.3 Ganzgenomsequenzanalysen (WGS)

Im Rahmen von WGS-Analysen werden die Nukleotidsequenzen der zu untersuchenden Proben möglichst umfassend bestimmt und anschließend analysiert (z.B. mit bekannten DNS-Sequenzen verglichen). Zur Generierung von WGS-Daten kommen spezielle Sequenzierungsplattformen (z.B. Illumina, Oxford Nanopore oder Ion Torrent) zum Einsatz, die im Gegensatz zur enzymatischen Sanger-Sequenzierungstechnik größere Datenmengen erzeugen (VEENEMANS et al. 2014; ANJUM et al. 2017; GALHANO et al. 2021). Durch die Verwendung von Softwareprogrammen (z.B. AMRFinderPlus, ResFinder) lassen sich Resistenzgene in den sequenzierten Bereichen auffinden (CLAUSEN et al. 2016; GALHANO et al. 2021). Ein großer Vorteil von WGS-Analysen ist daher die Fähigkeit, mehr oder weniger automatisiert viele verschiedene Resistenzgene gleichzeitig nachzuweisen und zwischen verschiedenen Genvarianten zu differenzieren (RAMANATHAN et al. 2017; GALHANO et al. 2021). WGS-Analysen waren viele Jahre lang sehr kostenintensiv, was einen routinemäßigen Einsatz in mikrobiologischen Laboratorien nicht zuließ. Allerdings hat sich das Kosten-Nutzen-Verhältnis in den letzten Jahren deutlich verbessert und es stehen inzwischen verschiedene benutzerfreundliche Softwareprogramme für die Auswertung von WGS-Daten zur Verfügung, so dass WGS-Analysen zunehmend auch von kleineren Laboren für den Nachweis von Resistenzgenen genutzt werden können (GALHANO et al. 2021; PIETSCH et al. 2022).

2.5 *Bordetella avium*

2.5.1 Taxonomie, Epidemiologie und Symptomatik bei Infektionen

Die Gram-negative Bakterienspezies *Bordetella avium* gilt bei Puten als Haupterreger des Putenschnupfens [aviäre Bordetellose, engl.: turkey coryza oder *B. avium* rhinotracheitis (BART)] (REGISTER und JACKWOOD 2020). Die Übertragung von *B. avium* erfolgt überwiegend per Tröpfchen- und Schmierinfektion (SIMMONS und GRAY 1979), wobei die primären Angriffsziele die zilientragenden Epithelzellen der oberen respiratorischen Wege sind (ARP und CHEVILLE 1984; REGISTER und JACKWOOD 2020). Nach einer Inkubationszeit von sieben bis zehn Tagen treten bei

erkrankten Putenküken im Alter von zwei bis sechs Wochen Konjunktivitiden, Tracheobronchitiden und auch Pneumonien auf (HINZ et al. 1978; SIMMONS und GRAY 1979; PANIGRAHY et al. 1981; KNAB et al. 2018), was sich durch Dyspnoe, Husten und Nasenausfluss äußert (KNAB et al. 2018; REGISTER und JACKWOOD 2020). Ältere Puten erkranken an einem trockenen Husten (KELLY et al. 1986). Infektionen wurden auch bei wildlebenden Puten und anderen Vogelarten wie Enten, Gänsen und Hühnern beschrieben (RAFFEL et al. 2002; ODUGBO et al. 2006).

2.5.2 Bedeutung von *B. avium*-Infektionen bei Geflügel und Menschen

Derzeit ist *B. avium* einer der wichtigsten geflügelpathogenen Erreger in Putenzucht- und Putenmastbeständen (CLARK und FROEBEL 2020; EHSAN et al. 2020). Obwohl die Mortalität gering ist, können Putenbestände angesichts der extrem hohen Morbidität von etwa 80 – 100 % innerhalb weniger Wochen durchseuchen (SAIF et al. 1980; REGISTER und JACKWOOD 2020). Zudem können bereits in frühen Mastperioden Sekundärinfektionen mit *E. coli* auftreten, die die Mortalität auf bis über 40 % erhöhen (SAIF et al. 1980; BOYCOTT et al. 1984). Im Zuge dessen kann es zu massiven Einbußen bei der Futtermittelverwertung und Mastleistung kommen, was hohe ökonomische Verluste impliziert (REGISTER und JACKWOOD 2020). Erst seit Beginn des 21. Jahrhunderts ist bekannt, dass *B. avium* einen opportunistischen Krankheitserreger für Menschen darstellt und bei diesen zu respiratorischen Symptomen führen kann (SPILKER et al. 2008; HARRINGTON et al. 2009).

2.5.3 *In-vitro*-Kultivierung von *B. avium*

Zur Anzucht von *B. avium* auf festen Nährmedien empfehlen die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) und die Culture Collection of Gothenburg (CCUG) Columbia-Blut-Agar oder Trypton-Soja-Agar (TSA). Zur Flüssigkultur eignen sich Trypton-Soja-Bouillon (TBS) oder Hirn-Herz-Infusions-Bouillon (BHI). Ein optimales Wachstum wird bei einer Inkubation bei 35 bis 37 °C für 24 h unter aeroben Verhältnissen erreicht. Der Erreger erscheint auf festen Nährböden meist als kleine (0,2 – 1 mm im Durchmesser) und transparente Kolonien (KERSTERTS et al. 1984; REGISTER und JACKWOOD 2020). Zusätzlich werden ein rauer Kolonietyp mit trockener Oberfläche und gezacktem Rand sowie ein rund-konvexer Kolonietyp mit schleimiger Oberfläche beschrieben (JACKWOOD et al. 1991). Zur Speziesidentifizierung sind biochemische Parameter und

speziesspezifische PCR-Assays verfügbar (TURKYILMAZ et al. 2009; REGISTER und JACKWOOD 2020).

2.6 *Avibacterium paragallinarum* und *Avibacterium gallinarum*

2.6.1 Taxonomie, Epidemiologie und Symptomatik von *Avibacterium* spp.-Infektionen
Av. paragallinarum (ehemals *Haemophilus paragallinarum*) und *Av. gallinarum* (ehemals *Pasteurella gallinarum*) bilden seit 2005 gemeinsam mit *Av. avium* (ehemals *P. avium*) und *Av. volantium* (ehemals *P. volantium*), sowie seit 2007 mit *Av. endocarditidis* die Gattung *Avibacterium* (BLACKALL et al. 2005; BISGAARD et al. 2007). BLACKALL et al. (2005) fanden hohe Sequenzähnlichkeiten (bis zu 98,1 %) zwischen verschiedenen *Avibacterium* spp., was eine zuverlässige Speziesdifferenzierung anhand von 16S rRNS-Gen-Sequenzanalysen erschwert. Zwar können biochemische Tests einen diagnostischen Hinweis zur Speziesbestätigung von *Av. gallinarum* oder *Av. paragallinarum* liefern, bieten aber alleine nur unverlässliche Ergebnisse (EWERS und WIELER 2015).

Als Primärerreger der *Coryza contagiosa gallinarum* (infectious coryza, IC; ansteckender Hühnerschnupfen) führen Infektionen mit *Av. paragallinarum* bei Hühnern aller Altersklassen zu akuten respiratorischen Symptomen der oberen Atemwege (z.B. Konjunktivitis, mukoider oder seröser Nasenausfluss) (CLOTHIER et al. 2019; ARMOUR 2020). Ein chronischer Krankheitsverlauf wird durch Sekundärinfektionen (z.B. mit *M. gallisepticum*) begünstigt und führt als Teil des Komplexes der chronischen respiratorischen Erkrankungen (chronic respiratory disease, CRD) z.B. zu entzündlichen Ödemen im Bereich des Infraorbitalsinus („Eulenkopf“) (EWERS und WIELER 2015).

Opportunistische Infektionen mit *Av. gallinarum* wurden vor allem bei Hühnern beschrieben (CHRISTENSEN et al. 2002). Der Erreger wurde jedoch auch von einem afrikanischen Perlhuhn, einer deutschen Pute, gesunden Enten und Gänsen isoliert (MUSHIN et al. 1977; MOHAN et al. 2000; MUHAIRWA et al. 2001; BISGAARD et al. 2005). Krankheitsausbrüche mit *Av. gallinarum* sind selten und in der Regel mit anderen Faktoren (z.B. Sekundärinfektionen mit geflügelpathogenen Mykoplasmen) verbunden (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Bei Geflügel gehen klinische *Av. gallinarum*-Infektionen mit respiratorischen Symptomen wie Husten und Niesen, sowie periorbitalen Schwellungen und Keratokonjunktivitis einher (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020).

2.6.2 Bedeutung von *Avibacterium* spp.-Infektionen bei Geflügel und Menschen

Beim Geflügel gehen durch *Av. paragallinarum* ausgelöste Krankheitsausbrüche mit einer geringen Mortalität und hohen Morbidität einher, wobei eine Korrelation zwischen der Sterblichkeitsrate und dem Alter der betroffenen Hühner besteht (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Bei einem kalifornischen *Av. paragallinarum*-Ausbruch bei älteren Legehennen wurde eine erhöhte Mortalität von 48 % und ein Rückgang der Legeleistung von 75 % auf 15,7 % ermittelt (BLAND et al. 2002). Hohe wirtschaftliche Verluste in der Geflügelindustrie entstehen durch *Av. paragallinarum* nicht nur aufgrund schlechter Lege- und Wachstumsleistungen, sondern auch infolge teurer Bekämpfungsmaßnahmen wie Vakzinierungsprogrammen (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Für Menschen ist *Av. paragallinarum* apathogen. Obwohl *Av. gallinarum* keine schweren wirtschaftlichen Verluste in der Geflügelindustrie verursacht, kann der Erreger mit anderen Geflügelpathogenen (z.B. *E. coli*, *Mycoplasma synoviae*) zu einer erhöhten Sterblichkeit bei Geflügel führen (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Diese beträgt bei Hühnern bis zu 34 % (DROUAL et al. 1992), bei Puten bis zu 26 % (BISGAARD et al. 2005). Drei Fallberichte aus der Humanmedizin über Patienten mit akuter Endokarditis, Gastroenteritis oder neonataler Meningitis wurden mit *Av. gallinarum* assoziiert (AL FADEL SALEH et al. 1995; ARASHIMA et al. 1999; AHMED et al. 2002). Ob *Av. gallinarum* tatsächlich auch humanpathogen ist, wurde wegen einer möglichen Fehlidentifikation des Erregers bisher nicht ausreichend bestätigt (FREDERIKSEN und TØNNING 2001).

2.6.3 *In-vitro*-Kultivierung von *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum*

Av. paragallinarum ist den hämophilen Mitgliedern der *Avibacterium* spp. zuzuordnen. Einige *Av. paragallinarum*-Isolate sind auf den Zusatz von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD, reduzierte Form NADH, V-Faktor) angewiesen (FALCONI-AGAPITO et al. 2015; BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Unter Zusatz weiterer Medienkomponenten wie hitzeinaktiviertem Hühnerserum oder 1 – 1,5 % NaCl wurde eine Wachstumsförderung beobachtet (PAGE 1962; RIMLER et al. 1977; JEONG et al. 2017; BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Zur Anzucht von *Av. paragallinarum* auf festen Nährmedien eignet sich Kochblutagar (Schokoladenagar) oder die Nutzung des sogenannten Ammenphänomens. Hierzu

erfolgt die Kultivierung des Erregers in der Hämolysezone NAD-produzierender *Staphylococcus* spp. (DSMZ). Nach einer Inkubation über 24 – 48 h bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ erscheinen in der Regel ca. 0,3 mm große, teils irisierende Kolonien mit tautropfenähnlichem Aussehen (HINZ 1976; RIMLER 1979; BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Anders als *Av. paragallinarum* ist die Spezies *Av. gallinarum* nicht hämophil und benötigt keine komplexen Medienzusätze (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020). Während sich zur Anzucht in der Flüssigkultur BHI oder TSB Bouillon eignen, kann eine Anzucht auf festen Nährmedien mittels Blutagarplatten erfolgen (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; CARTER 1984; DSMZ). Dazu eignet sich eine Inkubation über 24 h bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 – 10 % CO₂ (DSMZ). Die bis zu 1,5 mm großen sowie glattglänzenden Kolonien bilden typischerweise ein graugelbes Pigment (BLACKALL et al. 2005; BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020).

2.7 *Mycoplasma* spp. und *Mycoplasma* spp.

2.7.1 Taxonomie und Eigenschaften von *Mycoplasma* spp.

Mykoplasmen gehören zu der zellwandfreien Klasse der *Mollicutes* (lat. *mollis* = „weich“, *cutis* = „Haut“) (SELBITZ 2023b; BENEDETTI et al. 2020), die sich in die folgenden fünf Ordnungen aufteilt: *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales*, *Haloplasmatales*, *Mycoplasmatales* und *Mycoplasmodales* (FREUNDT 1955; FREUNDT et al. 1984; ROBINSON und FREUNDT 1987; ANTUNES et al. 2008; GUPTA et al. 2019). *Mycoplasmatales* werden durch *Mycoplasmataceae* und *Spiroplasmataceae* gebildet (FREUNDT 1955; SKRIPAL 1983), wobei Mykoplasmen den *Mycoplasmataceae* zuzuordnen sind. Basierend auf den Ergebnissen von Genomsequenzanalysen wurde in den vergangenen Jahren eine Neuordnung der Klasse *Mollicutes* vorgeschlagen, die die Begründung neuer Ordnungen, Familien und Gattungen beinhaltet (MUNSON et al. 2023; GUPTA und OREN 2020; GUPTA et al. 2018; SELBITZ 2023b). Dies betrifft auch die zwei in dieser Arbeit einbezogenen Erreger *M. bovis* (ehemals *Mycoplasma bovis*, neu *Mycoplasma bovis* comb. nov.) und *M. gallisepticum* (ehemals *Mycoplasma gallisepticum*, neu *Mycoplasma gallisepticum* comb. nov.) (MUNSON et al. 2023). Da derzeit Uneinigkeit über die korrekte Bezeichnung verschiedener Mykoplasmen herrscht, wurde in dieser Arbeit die alte Bezeichnung *Mycoplasma* mit der Abkürzung „M.“ gewählt.

Das Fehlen der Zellwand begründet die pleomorphe Form dieser bisher als kleinsten (0,15 – 0,3 µm im Durchmesser) bekannten freilebenden Bakterien (NIKFARJAM und FARZANEH 2011; BENEDETTI et al. 2020). Darüber hinaus ist dieses morphologische Merkmal der fehlenden Zellwand ursächlich für die intrinsische Resistenz von Mykoplasmen gegenüber zellwandangreifenden Wirkstoffen wie β -Laktamen (BÉBÉAR et al. 2011). Als meist parasitäre, intra- und extrazelluläre Erreger infizieren Mykoplasmen eine Vielzahl von Wirbeltieren. Die in dieser Arbeit behandelten *Mycoplasma* spp. sind entweder vogelassoziiert (*M. gallisepticum*) oder an Rinder angepasst (*M. bovis*). Vor diesem Hintergrund werden beide Spezies im Folgenden getrennt behandelt.

2.7.1.1 Epidemiologie, Symptomatik und Bedeutung von *M. bovis*

Die Übertragung des weltweit vorkommenden rinderpathogenen Erregers *M. bovis* kann über vielfältige Wege stattfinden. Über die Aufstallung subklinisch infizierter Rinder erfolgt eine Einschleppung von *M. bovis* in zuvor *M. bovis*-freie Bestände (GONZALEZ et al. 1992). Eine anschließende horizontale Übertragung z.B. über (gefrorenes) Sperma infizierter Bullen, Milch, Genitalsekrete oder Lochien kann zur weiteren Verbreitung des Erregers innerhalb oder außerhalb einer Herde beitragen (MAUNSELL et al. 2011; DUDEK et al. 2020). *M. bovis* ist insbesondere für therapieresistente Mastitiden bei Milchvieh und seine Beteiligung an der multifaktoriellen bovinen Atemwegserkrankung (BRD) bei Kälbern bekannt (PARDON et al. 2020; GELGIE et al. 2022). Mit *M. bovis*-infizierte Rinder können zudem in Abhängigkeit von ihrem Alter Arthritiden, Endokarditiden und Otitiden zeigen (DUDEK et al. 2020). Infolgedessen verursacht *M. bovis* erhebliche ökonomische Verluste in der Milch- und Fleischindustrie (DUDEK et al. 2020; GELGIE et al. 2022). Für Menschen ist *M. bovis* apathogen.

2.7.1.2 Epidemiologie, Symptomatik und Bedeutung von *M. gallisepticum*

Eine Übertragung des vogelpathogenen Erregers *M. gallisepticum* erfolgt sowohl horizontal (z.B. aerogen oder als Schmier- und Tröpfcheninfektion) als auch vertikal (ARMOUR 2020). *M. gallisepticum*-Infektionen werden bei Hühnern (ähnlich wie *Av. paragallinarum*) dem CRD-Komplex zugeordnet (KAMARUZAMAN et al. 2021), der sich klinisch manifestiert oder auch subklinisch verläuft. Das Ausmaß der Symptome hängt von Faktoren wie dem Auftreten von Sekundärinfektionen (z.B. mit *E. coli* oder

dem Newcastle Disease Virus), der Virulenz des Erregers und den Haltungsbedingungen ab (ARMOUR 2020). Insbesondere Stress der Tiere erhöht das Risiko für schwerere Krankheitsverläufe, die mit Augen- und Nasenausfluss, Konjunktividen, Husten und Niesen einhergehen (MAROUF et al. 2022). Im Vergleich zu Hühnern reagieren Puten wesentlich empfindlicher auf *M. gallisepticum*-Infektionen. An der Infektiösen Sinusitis erkrankte Puten zeigen eine respiratorische Symptomatik, die durch Husten und Dyspnoe gekennzeichnet ist (ARMOUR 2020; YADAV et al. 2021). Als Folge der Erkrankung beeinträchtigt *M. gallisepticum* die Legeleistung, die Mastgewinne und die Schlupfraten und gilt als einer der weltweit wirtschaftlich wichtigsten Infektionserreger in Hühner- und Putenbeständen (ARMOUR 2020). Daneben sind auch notwendig werdende Präventions- und Bekämpfungsmaßnahmen für die hohen finanziellen Verluste durch *M. gallisepticum* verantwortlich (ARMOUR 2020). Dies veranlasste die Weltorganisation für Tiergesundheit (World Organisation for Animal Health, WOAH) (gegründet als Office International des Epizooties, OIE) dazu, *M. gallisepticum* auf der Liste bedeutender Krankheiten aquatischer und terrestrischer Tiere zu führen (WOAH 2022). Humanpathogen ist *M. gallisepticum* nicht.

2.7.2 *In-vitro*-Kultivierung von *Mycoplasma* spp.

Angesichts des anspruchsvollen Wachstums von Mykoplasmen ist deren Kultivierung nur in speziellen Laboren mit umfangreicher Ausstattung durchführbar. Zum Wachstum sind komplexe Spezialnährmedien erforderlich, die DNS, Hefeextrakte, Peptone und Tierseren enthalten (SELBITZ 2023b). In flüssigen Nährmedien zeigen die meisten *Mycoplasma* spp. keine sichtbare Trübung, sodass zur sichtbaren Wachstumsdetektion bebrüteter Kulturen Farbindikatoren zum Einsatz kommen. Wenn fermentative *Mycoplasma* spp. ein im Nährmedium verwertbares Substrat (z.B. Glukose) verstoffwechseln, entstehen saure oder basische Metaboliten (z.B. Laktat) (RAZIN et al. 1998). Durch die Zugabe eines pH-Indikators wird ein Farbwechsel des Mediums ersichtlich, der durch eine pH-Änderung verursacht wird (HANNAN 2000). Für die Anzucht von *M. bovis* und *M. gallisepticum* empfiehlt die DSMZ die SP4-Z-Bouillon und den SP4-Z-Agar. Auf festen Nährmedien bilden Mykoplasmen kleine (etwa <1 mm im Durchmesser) „spiegeleiförmige“ Kolonien, sodass zur Quantifizierung der Kolonien ein Stereomikroskop erforderlich sein kann (SELBITZ 2023b). Erschwerend kommt hinzu, dass Mykoplasmen vergleichbar lange

Inkubationszeiten und eine mit CO₂ angereicherte Atmosphäre bei 37 °C benötigen (DSMZ). Die DSMZ empfiehlt für *M. bovis* und *M. gallisepticum* eine Inkubationszeit von 2 – 3 Tg.

3. Zielsetzung der vorliegenden Dissertationsschrift

Zu Beginn der Arbeit gab es keine national oder international anerkannten Methoden zur standardisierten antimikrobiellen Empfindlichkeitsprüfung für die folgenden fünf veterinärmedizinisch bedeutsamen Bakterienspezies:

- *Avibacterium gallinarum*
- *Avibacterium paragallinarum*
- *Bordetella avium*
- *Mycoplasma bovis*
- *Mycoplasma gallisepticum*

Dies ist jedoch von großer Bedeutung, da die Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV) in bestimmten Fällen (z.B. bei Wechsel des Antibiotikums im Verlauf einer Behandlung, bei Behandlung mit Cephalosporinen der dritten oder vierten Generation oder Fluorchinolonen) die Durchführung eines Empfindlichkeitstests für die antimikrobielle Therapie von Nutztieren wie Geflügel oder Rinder fordert.

Ziel dieser Doktorarbeit war es daher, im Rahmen des vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) geförderten Projektes „Standardisierung der Antibiotikaresistenzdiagnostik; Empfehlungen der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft“, geeignete Methoden oder Testsysteme zur quantitativen Empfindlichkeitsbestimmung (Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration, MHK) für diese fünf veterinärmedizinisch bedeutsamen Bakterienspezies zu erarbeiten.

Publikation 1

Gütgemann F, Müller A, Churin Y, Jung A, Braun AS, Yue M, Kehrenberg C. Development of a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella avium* using broth microdilution and detection of resistance genes. J Appl Microbiol. 2022 Mar;132(3):1775-1787.

doi: 10.1111/jam.15305

Copyright notice

Authors publishing in an ASM Open Access journal retain copyright of their paper.

Development of a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella avium* using broth microdilution and detection of resistance genes

Franziska Gütgemann¹, Anja Müller¹, Yury Churin¹, Arne Jung², Ann S Braun¹; Min Yue^{3,4}; Corinna Kehrenberg^{1*}

¹Institute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 92, 35392 Giessen, Germany

²Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hannover Foundation, Hannover, Germany

³Institute of Preventive Veterinary Science and Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou 310058, China

⁴Hainan Institute of Zhejiang University, Sanya 572025, China

*Corresponding author

E-Mail: corinna.kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de

Keywords: *aadA1*; *dfrB1*; *floR*; *sul1*; *sul2*; *tet(A)*; CAMHB; CLSI; antibiotics; harmonization; minimal inhibitory concentration values

Abstract

Aims

In response to a request from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the objective of this study was to develop a harmonized method for broth microdilution susceptibility testing of *Bordetella (B.) avium*, the major causative agent of infectious coryza in poultry.

Methods and Results

To find a suitable test medium, growth curves with four epidemiologically unrelated *B. avium* isolates were created in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB), CAMHB + 2.5% lysed horse blood and veterinary fastidious medium. All isolates showed good growth in CAMHB, therefore MIC values were determined using this medium and the homogeneity of the values was determined. An essential MIC agreement of 99.7% was calculated. Testing of a larger strain collection (n=49) for their susceptibility to 24 antimicrobials confirmed the suitability of the tested method and revealed some isolates with elevated MICs of florfenicol (n=1), streptomycin (n=2), tetracyclines (n=5), and trimethoprim/sulfamethoxazole (n=6). PCR assays detected the resistance genes *aadA1*, *dfrB1*, *floR*, *sul1*, *sul2* and *tet(A)*.

Conclusions

The method used enables easy reading and a good reproducibility of MIC values for *B. avium*.

Significance and Impact of Study

Application of the tested method allows harmonized resistance testing of *B. avium* and identification of isolates with elevated MIC values.

Keywords: antibiotics, minimal inhibitory concentration values, CAMHB, CLSI, harmonization, *aadA1*, *dfrB1*, *floR*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)*.

Introduction

The gram-negative bacterium *Bordetella avium* (*B. avium*) plays a major economic role across the globe being the most important causative agent of the highly contagious bordetellosis in turkeys and other poultry (also termed turkey coryza or *B. avium* rhinotracheitis, or BART), along with the closely related pathogen *B. hinzii* (Register and Kunkle 2009; Beach et al. 2012; Register and Jackwood 2020). A 2018 report by the U.S. Animal Health Association's Subcommittee on Turkey Health ranked *B. avium* as the sixth most important issue facing the U.S. turkey production industry (Clark 2018). Of particular importance, 2-6-week-old turkeys show acute respiratory symptoms after infection with *B. avium*, such as sneezing, beak breathing, tracheal collapse, submandibular oedema and conjunctivitis because of protracted inflammation, while older turkeys suffer from a dry cough (Panigrahy et al. 1981; Kelly et al. 1986; Knab et al. 2018; Register and Jackwood 2020). Although mortality is quite low, coming in at mostly less than 10%, the rapid spread of *B. avium* leads to a high morbidity of about 80–100% within herds (Saif et al. 1980; Knab et al. 2018; Register and Jackwood 2020). Thought to be transmitted to humans via contaminated poultry meat or other avian reservoirs (Register and Jackwood 2020), opportunistic *B. avium* infections have been detected in humans who previously suffered from pneumonia, with symptoms similar to those of *B. pertussis* or *B. bronchiseptica* infections; patients with cystic fibrosis are also vulnerable (Spilker et al. 2008; Harrington et al. 2009; Lavrenko et al. 2020).

To treat *B. avium* infections and the frequently associated secondary pathogens, such as *Escherichia* (*E.*) *coli* in poultry, antimicrobial agents like tetracyclines and penicillins have been used for several decades (Ficken 1983; Kelly et al. 1986; Register and Jackwood 2020). Because every use of antimicrobial agents also favours resistance selection, it is particularly important to monitor the susceptibility status of *B. avium*. However, there are only six studies so far that have investigated the susceptibility status of the pathogen. Three of them have used disk diffusion as a method and have examined the susceptibility of 2, 4 and 19 *B. avium* isolates, respectively (Malik et al. 2005; Szabó et al. 2015; Erfan et al. 2018). One of these studies and three further studies tested the antimicrobial susceptibility of *B. avium* (also) by broth microdilution (Mortensen et al. 1989; Blackall et al. 1995; Beach et al. 2012; Szabó et al. 2015). However, the broth microdilution methods performed in these

studies differ widely, for example, in the choice of the test medium, inoculum density or incubation conditions.

Because there is currently no harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *B. avium* and the methods described differ widely, laboratories may use completely different methods, and the results are not comparable between them (Register and Jackwood 2020). Therefore, it is highly recommended to harmonize antimicrobial susceptibility testing for this pathogen (CLSI 2017). Furthermore, it is necessary to know the susceptibility status of a pathogen to achieve a targeted treatment of diseased animals. To achieve this, approved methods for testing the pathogen must be available. To address the problem when it comes to *B. avium*, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) has already requested the development of harmonized antimicrobial susceptibility testing for this species (CLSI 2017). Hence, the aim of the current study was to evaluate a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *B. avium* using the broth microdilution method and to determine the antimicrobial susceptibility status of a strain collection of epidemiologically unrelated isolates.

Materials and methods

B. avium isolates included in the study and species confirmation

Between 2019 and 2020 a total of 48 *B. avium* field isolates were collected, originating from different geographical regions in Germany, Poland, the Netherlands and unknown countries (Fig 1). These isolates were provided by various veterinary practices and clinics, diagnostic laboratories and federal institutions. The field isolates originated from different poultry species such as turkeys, chickens and wild waterfowl as well as from exotic birds and unknown species; they were isolated between 2002 and 2020 based on one isolate per flock and year. The *B. avium*-type strain ATCC 35086 (Culture Collection University of Gothenburg, Gothenburg, Sweden) was obtained as a reference for method evaluation. All 49 *B. avium* isolates were incubated for culturing at 37° C for 24 ± 2 h in ambient air on a Columbia blood agar containing 5% defibrinated sheep blood (Oxoid Limited, Basingstoke, UK), casein soybean peptone (CASO) agar as an alternative to blood agar plates when they were not available (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) or in a brain-heart infusion broth (BHI) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Genomic DNA of all 49 *B. avium* isolates was isolated from overnight cultures by boiling. For this purpose, overnight cultures were suspended in 300 µl bidistilled water. This suspension was then heated at 99 °C for 15 min and centrifuged (13000 x g) for 2 min. Afterwards, the species of the isolates were confirmed by a previously described species-specific polymerase chain reaction (PCR) assay (Turkyilmaz et al. 2009).

Macrorestriction analysis

To examine the clonality of the 49 *B. avium* isolates, their relationship was investigated by macrorestriction analysis, which was followed by pulsed-field gel-electrophoresis (PFGE), here based on a previously published protocol (Ribot et al. 2006). The restriction enzyme *SpeI* (*BcuI*) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) was used to enzymatically digest the DNA of *B. avium* isolates into about 34 fragments. XbaI digested DNA from *Salmonella* Typhimurium LT2 was used as a marker. The digested DNA of all the isolates was separated within 20 h in a CHEF DR II system (BioRad, Munich, Germany) at 6 volts, starting at an initial time of 6.8 s and ending at a final time of 35.2 s. Band patterns were evaluated using BioNumerics software (version 7.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). For the cluster analysis, the Dice coefficient was applied with a setting of 0.5% optimization and 1% position tolerance.

Growth curves

Growth experiments were performed in three different media recommended by the CLSI: cation-adjusted Mueller Hinton broth (CAMHB) (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) for bacteria isolated from animals such as *Enterobacterales* (CLSI 2020); CAMHB plus 2.5% lysed horse blood (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) for fastidious organisms like *Streptococcus* spp.; and veterinary fastidious medium (VFM) prepared according to CLSI specifications for *Histophilus somni* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (CLSI 2020). To find a suitable medium for antimicrobial susceptibility testing of *B. avium*, the growth of four epidemiologically unrelated isolates (*B. avium*-type strain ATCC 35086 and field isolates no. 10, 14 and 15) was investigated in two independent growth experiments in the three test media. For this, the turbidity of overnight cultures in 0.9% saline solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was adjusted to the 0.5 McFarland standard using the McFarland densitometer DEN-1B (Biosan SIA, Riga, Latvia). A volume of 50 µl of this bacterial

suspension was then added to 5 ml of 0.9% saline solution. To achieve a starting concentration of approximately 1×10^3 cfu ml⁻¹, 50 µl were suspended into 50 ml of the respective test medium. The inoculated media were subsequently incubated at $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Within the first 24 h, the optical density was measured every 4 h and thereafter at 32 and 48 h, each time at 600 nm with a UV-visible spectrometer (Spectrophotometer UV5, Mettler Toledo). In addition, the bacterial counts (cfu ml⁻¹) were determined by culture-based enumeration at eight of the measuring points mentioned above (0, 4, 8, 12, 16, 24, 32 and 48 h). For this purpose, 10-fold serial dilutions were prepared, which were spread in duplicate on CASO agar plates. Agar plates were then incubated at $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 ± 2 h until the colonies were counted.

To compile the growth curves using Microsoft Excel software, the statistical averages of cfu ml⁻¹ and the standard deviations of both repetitions were calculated after counting colonies at two dilution steps. Only those dilutions containing 5-200 cfu ml⁻¹ were evaluated.

Method validation of broth microdilution

To verify the suitability of CAMHB as a test medium for *B. avium* and assess the homogeneity of minimal inhibitory concentration (MIC) values, five independent replicates of broth microdilution testing, here following CLSI guidelines, were performed (CLSI 2020). For these experiments, four *B. avium* isolates (isolates 6, 10, 14 and 15), which were as unrelated as possible according to macrorestriction results, were used in addition to the type strain ATCC 35086. The direct colony suspension method was used for inoculum preparation. In brief, the colonies were selected from an overnight culture of *B. avium* on blood agar plates (incubation at $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 ± 2 h) and were suspended in 0.9% saline solution to achieve a 0.5 McFarland standard. A volume of 100 µl of this suspension was then diluted into 19.9 ml of CAMHB to yield approximately 5×10^5 cfu ml⁻¹. Using a multichannel pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 50 µl of the suspension was then added to each well of the microtiter plates (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK). A total of 24 antimicrobial agents per isolate were tested. Twenty of these agents are currently licenced for food-producing animals. MICs were read after sealing and incubation for 20 h (± 10 min) at the CLSI-specified temperature of $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ in an aerobic atmosphere.

Quality control was performed using *E. coli* control strain ATCC 25922. The inoculum densities were checked by means of culture-based enumerations in which 10-fold serial dilutions were prepared.

Antimicrobial susceptibility testing of a larger strain collection

After method validation, another 44 *B. avium* field isolates were tested for antimicrobial susceptibility using the broth microdilution method evaluated in the current study to assess the suitability of the method for a larger strain population. Following testing, the MIC₅₀ and MIC₉₀ values were calculated for this strain collection. The MIC₅₀ value defines the lowest concentration of an antimicrobial agent at which 50% of the test collective is visibly inhibited, while the MIC₉₀ value defines the lowest concentration at which 90 % of the test collective is visibly inhibited.

Following broth microdilution susceptibility testing, *B. avium* isolate 21 was tested for the presence of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs), here according to CLSI guidelines (CLSI 2021).

Comparison of the MICs obtained with the medium from different CAMHB manufacturers

To exclude differences between the MICs obtained in CAMHB from different manufactures, susceptibility of the five tested *B. avium* isolates was additionally analysed in CAMHB from another manufacturer (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). The obtained MIC values were compared with those obtained from the method validation.

Resistance gene analysis

Based on the results of the antimicrobial susceptibility testing, 39 *B. avium* isolates with elevated MIC values against at least one antimicrobial agent compared with the other isolates were included in the resistance gene analysis. For this, previously described primers and associated PCR assays were used to verify the presence of antimicrobial resistance genes. Thus, the presence of the tetracycline resistance genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(L)*, *tet(M)* and *tet(O)* and the sulfonamide resistance genes *sul1*, *sul2* and *sul3* was investigated (Prüller et al. 2015b). In addition, PCR-based detection of streptomycin-resistance-mediating genes *strA*, *strB*, *aadA1* and *aadA2* was performed as well as an analysis of the β -lactamase-encoding genes

*bla*_{BOR-1}, *bla*_{OXA-1-like} and *bla*_{OXA-2}, *bla*_{ROB}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} (Randall et al. 2004; Dallenne et al. 2010; Prüller et al. 2015b). Isolates with higher MICs for quinolones were also tested for the plasmid-encoded resistance genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* (Kehrenberg et al. 2006; Vredenburg et al. 2014). In addition, the occurrence of trimethoprim resistance genes *dfrA1/15/16*, *dfrA5/14*, *dfrA7/17* and *dfrB1/2/3* was analysed (Frech et al. 2003; Prüller et al. 2015b).

Results

Clonal relationship of *B. avium* isolates

Figure 1 illustrates the genetic relationship and origin of all 49 *B. avium* isolates tested in the current study, including their phenotypic and genotypic antimicrobial resistance profiles. *BcuI* macrorestriction analyses revealed a partially high clonality of the isolates. There were three major clusters containing a minimum of 6 and maximum of 15 genetically indistinguishable isolates exhibiting equal numbers and identical band sizes. Although eight isolates formed four additional clusters consisting of two isolates each, the remaining 11 *B. avium* isolates had unique patterns. Thus, four test isolates that were distinguishable according to these results could be selected for the growth experiments and one additional test isolate for the broth microdilution method validation. Selection was based on choosing one representative from each of the larger clusters and additional isolates that differed in fragment patterns so that they were considered unrelated. To define unrelated isolates, the criterion of >6 bands difference was used (Tenover et al. 1995). All isolates also differed in their year of isolation and origin: Isolate 14 was isolated from waterfowl (Muscovy duck), and the other four test isolates originated from turkeys (n = 2) and laying hens (n = 2) (Fig. 1).

Growth curves of *B. avium* in three different test media

Both repetitions of the growth experiments obtained comparable results. At each time point, the standard deviation of both growth trials was calculated and visualized in the growth curves (Fig. 2; Supplemental material Fig. S1 – S3). Looking at the optical density (OD) values, after 20 h at 35 ± 2 °C, a mean OD₆₀₀ value of about 0.054 of the four test isolates was measured in CAMHB, while the values in blood-containing media CAMHB + 2.5 % LHB and VFM were higher, with mean OD₆₀₀ values of about 0.142 and 0.079, respectively (Fig. S4–S7). However, the culture-based enumeration

revealed very good growth of all test isolates to $>10^7$ cfu ml⁻¹ after 20 h of incubation in all media (Fig. 2; Fig. S1–S3). Therefore, the commercially available, easy-to-produce and CLSI-approved CAMHB was selected for subsequent antimicrobial susceptibility testing of *B. avium*.

Suitability of the test method and susceptibility status of the field isolates

Table 2 illustrates the calculated exact MIC agreements (MIC values that match the MIC mode of each isolate) and the essential MIC agreements (MIC mode accepting a deviation of ± 1 log₂ dilution steps), which were used to evaluate homogeneity (Prüller et al. 2017; CLSI 2018a). Overall, the MIC values of the five tested *B. avium* isolates demonstrated good reproducibility in CAMHB after an incubation period of 20 h at 35° C \pm 2°C (Tab. 1). For a single antimicrobial agent (imipenem), an exact MIC agreement of 100% (five identical MICs) was calculated, while for 16 of the tested antimicrobial agents an exact MIC agreement of $\geq 80\%$ was shown. The lowest exact MIC agreements were seen for doxycycline, neomycin and tilmicosin with percentages of 68%. Nevertheless, 23 out of the 24 antimicrobials tested showed an essential MIC agreement of 100%. Only for tiamulin was there a slightly lower essential MIC agreement of 92%. Thus, for the MIC mode accepting a deviation of a single dilution step, 99.7% of MICs were homogeneous.

Because the five *B. avium* isolates used for method validation provided easily readable and reproducible MICs, a larger *B. avium* strain collection was tested to evaluate the suitability of the method for current and older field isolates originating from different poultry species. Table 3 shows all MICs obtained for the isolates and the MIC₅₀ and MIC₉₀ values calculated. Because there are currently no published MIC breakpoints for *B. avium*, a classification of the isolates as susceptible, intermediate or resistant could not be performed. However, a bimodal distribution of the MICs was observed for some antimicrobial agents, for example florfenicol, streptomycin, tetracyclines and trimethoprim/sulfamethoxazole. Five *B. avium* isolates had elevated MICs (compared with the other isolates) against two to three different classes of antimicrobials. Isolates 12 and 17 were found to have higher MICs of tetracyclines (doxycycline 8 – 16 µg ml⁻¹; tetracycline 128 µg ml⁻¹) and trimethoprim/sulfamethoxazole (2/38–4/76 µg ml⁻¹) (Tab. 2). Isolates 10, 11 and 24 showed elevated MICs against three of the following four classes of antimicrobials: tetracyclines (doxycycline 4–16 µg ml⁻¹; tetracycline 64–128 µg ml⁻¹; n = 3),

streptomycin (128- \geq 1024 $\mu\text{g ml}^{-1}$, n = 2), florfenicol (32 $\mu\text{g ml}^{-1}$; n = 1) or trimethoprim/sulfamethoxazole (1/19- \geq 64/1216 $\mu\text{g ml}^{-1}$; n = 3). These three isolates were regarded as phenotypically multidrug resistant (Müller et al. 2018).

An almost unimodal distribution of MICs was found for most of the remaining antimicrobial agents tested, such as for fluorquinolones (e.g., ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin), macrolides (e.g., tilmicosin, tulathromycin), aminoglycosides (e.g., neomycin, gentamicin) or cephalotin. However, isolate 21 had higher MICs of ampicillin (2 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and amoxicillin/clavulanic acid (2/1 $\mu\text{g ml}^{-1}$) compared with the other 48 isolates which exhibited MICs between 0.06 and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin and 0.06/0.03 and 0.5/0.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ amoxicillin/clavulanic acid. Isolate 21 also had slightly higher MICs for third- and fourth-generation cephalosporins such as cefotaxime (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$), cefquinome (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and ceftiofur (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$), whereas the other 48 *B. avium* isolates partially showed lower MICs for the antimicrobials cefotaxime (0.12-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$), cefquinome (0.5-8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and ceftiofur (0.25-4 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Another isolate (3) showed elevated MICs of penicillin (16 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and cefquinome (8 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Moreover, isolate no. 21, with an MIC of 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nalidixic acid, also had MICs at the right edge of the distribution for fluoroquinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin and marbofloxacin; MIC of 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$), and all isolates with tilmicosin MIC of \geq 64 $\mu\text{g ml}^{-1}$ also exhibited MIC values at the right edge of the distribution for tulathromycin (32 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Because isolate 21 presented slightly elevated MICs for some beta-lactam antibiotics, including third- and fourth-generation cephalosporins, this isolate was additionally tested by the CLSI-approved broth microdilution test for detecting extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *E. coli* (CLSI 2021). For this, the MIC values of cefotaxime and ceftazidime were tested with and without the addition of 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ clavulanic acid. Because the MIC value for ceftazidime alone was \leq 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and in the presence of clavulanic acid, the MIC values were not reduced by the required three 2-fold dilution steps, so ESBL production could not be confirmed according to the criteria indicative for ESBL production in *Klebsiella* spp. and *E. coli*. The MIC values of the quality control strains *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *E. coli* ATCC 25922 were within the ranges recommended by CLSI (CLSI 2021).

MIC comparison using CAMHB from different manufacturers

A comparison of results from two manufacturers showed that the MICs of the five *B. avium* isolates used for validation were at maximum one dilution level below the lowest previously determined values, when CAMHB from another manufacturer (Becton Dickinson) was used (Table S8). Thus, for a few antibiotics (gentamicin, neomycin, tulathromycin, and trimethoprim/sulfamethoxazole), the MIC values deviated from the MIC mode by two dilution steps.

PCR amplification of antimicrobial resistance genes

Whole-cell DNA from 39 *B. avium* isolates with (in some cases only moderately) elevated MICs compared with the majority of isolates (Tab. 3) was analysed by PCR assays for the presence of various resistance genes. The selection of isolates also considered the antimicrobial resistance mechanisms and occurrence of specific resistance genes for the antibiotic classes. Overall, the resistance genes *tet(A)* and *sul2* were detected in both *B. avium* isolates (isolates 12 and 17) with elevated MICs of tetracycline ($\geq 64 \mu\text{g ml}^{-1}$) and trimethoprim/sulfamethoxazole ($4/76 \mu\text{g ml}^{-1}$; $2/38 \mu\text{g ml}^{-1}$), while three resistance genes were identified in isolates 10, 11, and 24, which were previously classified as phenotypic multidrug resistant (Fig. 1). These multidrug resistant isolates harbored *tet(A)* and *sul1* or *sul2* (mediating elevated MICs to tetracyclines and sulfonamides, respectively); in addition, they carried *dfxB1/2/3* (trimethoprim resistance), *aadA1* (aminoglycoside resistance) or the florfenicol resistance gene *floR* (Fig. 1).

Although isolates 10 and 11 (with MIC values of $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ and $\geq 1024 \mu\text{g ml}^{-1}$ for streptomycin) were tested for the presence of four streptomycin resistance-mediating genes, only isolate 10 with a MIC of $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ was found to harbor *aadA1*. No β -lactamase-encoding genes were detected in isolate 21, which showed a MIC of $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ for cefotaxime, ceftiofur and cefquinome, and in isolate 3, with a MIC of $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ cefotaxime. Sulfonamide and trimethoprim resistance genes were detected at MIC values of $\geq 1/19 \mu\text{g ml}^{-1}$ trimethoprim/sulfamethoxazole ($n = 6$), though one of three isolates with a MIC of $1/19 \mu\text{g ml}^{-1}$ did not carry any of the resistance genes tested.

Discussion

So far, only a few studies have analysed the antimicrobial susceptibility of *B. avium* using broth microdilution (Mortensen et al. 1989; Blackall et al. 1995; Beach et al. 2012;

Szabó et al. 2015). Comparing these, some differences in the performance of broth microdilution are noticeable regarding inoculum preparation, the use of test media and incubation conditions. These discrepancies in methodology can make it difficult to compare the MIC results between laboratories. Therefore, a suitable standard medium and comparable, harmonized test conditions for antimicrobial susceptibility testing of *B. avium* are required.

In two independent growth experiments, the growth of *B. avium* was tested in three different media, which were already recommended by the CLSI: CAMHB is a commercially available medium that leads to only a few interactions with antimicrobial agents, such as sulfonamides, trimethoprim or tetracyclines, and it shows little batch-dependent variation (CLSI 2018b). It is recommended for the antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals such as *Enterobacterales*, while CAMHB + 2.5% LHB is recommended for fastidious organisms such as *Streptococcus* spp. (CLSI 2020). For other fastidious organisms such as *Histophilus somni* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*, VFM is recommended (CLSI 2020). Because *B. avium* was in a CLSI request for data on fastidious organisms, the latter two media were included in the growth experiments of the current study. A Mueller-Hinton broth without the addition of cations can influence the activity of various antimicrobial agents, such as aminoglycosides (CLSI 2018b), fluoroquinolones (Gürdal et al. 1991; Marshall and Piddock 1994), polypeptides (Marshall and Piddock 1994) or various cephalosporins (Chow and Bartlett 1981). Therefore, this medium, which was used in two previous studies (Beach et al. 2012; Szabó et al. 2015), was excluded from the growth experiments.

After 20 h incubation at $35 \pm 2^\circ \text{C}$, the OD_{600} values of inoculated CAMHB were lower than those of CAMHB plus 2.5 % LHB and VFM although in all test media bacterial counts of 10^7 to 10^8 cfu ml⁻¹ were obtained. The differences between culture-based enumeration and OD_{600} measurements have already been observed in previous studies performing growth experiments with *B. bronchiseptica* or *Listeria monocytogenes* (Francois et al. 2005; Tyrovouzis et al. 2014; Prüller et al. 2015a). The differences are probably because of components in the media, such as erythrocytes in CAMHB + 2.5% LHB or yeast extract in VFM, which darken during incubation, thus leading to OD shifts. Therefore, the colony counts were used to evaluate the suitability of the media, and CAMHB was selected for further development of the method. The CAMHB provided clearly readable button formations after 20 h incubation of *B. avium*

at 35 °C ± 2 °C in microtiter plates and it is a convenient medium that does not require the addition of supplements, such as lysed horse blood, supplement C or yeast extract as is the case with the other test media. The other susceptibility test conditions were chosen exactly as recommended by CLSI for the broth microdilution of bacteria that grow aerobically (CLSI 2018b). Under these test conditions, the MIC values were easily readable for all 49 *B. avium* isolates tested; the results were also highly reproducible, as demonstrated in the present study, by analysing five independent replicates of the MIC testing with five epidemiological unrelated isolates. Thus, the current study showed an exact MIC agreement of 68–100%, here depending on the antimicrobial agent considered and an essential MIC agreement of 100% for 23 of the 24 antimicrobial agents. For tiamulin only, an essential MIC agreement of 92% was calculated. However, because the essential MIC agreement proposed by the CLSI should be ≥90%, the agreement for tiamulin is still in the acceptable range (CLSI 2018a).

Because there are currently no approved breakpoints for the interpretation of MIC values for *B. avium*, it was not possible to classify the isolates tested as resistant, intermediate or susceptible. Nevertheless, such a classification was made in one study, in which the authors defined high-level resistance as equal to or greater than the maximum dose (Beach et al. 2012). In another study, Blackall et al. (1995) suggested MIC breakpoints for *B. avium*, which were summarized from older studies; the latter authors classified *B. avium* isolates as resistant if they exhibited the following MICs: ampicillin ≥2 µg ml⁻¹, streptomycin ≥16 µg ml⁻¹, tetracycline ≥2 µg ml⁻¹ and trimethoprim/sulfamethoxazole ≥64/1216 µg ml⁻¹. Accordingly, one *B. avium* isolate tested in the present study with a MIC for ampicillin of 2 µg ml⁻¹ would be considered resistant to ampicillin. This isolate also showed higher MICs to third- and fourth-generation cephalosporins such as cefotaxime (8 µg ml⁻¹), cefquinome (8 µg ml⁻¹), ceftiofur (8 µg ml⁻¹) and cephalotin (4 µg ml⁻¹) when compared with the rest of the strain collection. Because there was no detection of ESBL in the ESBL confirmatory test, it can be assumed that the resistance was because of either an AmpC mechanism or a currently unknown mechanism in *B. avium*. A lower effectiveness of cephalosporins has already been observed in another *Bordetella* species -the pig pathogen *B. bronchiseptica*- which was attributed to a generally low membrane permeability for cephalosporins (Kadlec et al. 2007; Prüller et al. 2015b). Moreover, all except one isolate would be classified as resistant to streptomycin according to the breakpoints

proposed by Blackall et al. (1995) because the MICs ranged between 16 and 512 $\mu\text{g ml}^{-1}$. In addition, according to these breakpoints, five isolates with MICs of 64-128 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for tetracycline and a single isolate with a MIC of 32 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for trimethoprim/sulfamethoxazole would be considered resistant to the corresponding antimicrobial.

Comparing the MICs obtained in the present study with the MICs previously described, some differences are noticeable. For example, the current study found 21 isolates with higher MICs ($32\text{-}\geq 1024 \mu\text{g ml}^{-1}$) of streptomycin, which was not the case in the study by Blackall et al. (1995). We also found lower MIC values for tetracycline or trimethoprim/sulfamethoxazole than in the studies by Blackall et al. (1995), Mortensen et al. (1989), or Beach et al. (2012). However, some MIC values, such as for doxycycline, were higher than previously found (Szabó et al. 2015). The different MIC values obtained in the few available susceptibility studies including *B. avium* might be because of the variations in the testing methods (e.g., media, incubation times and conditions); changes in the antimicrobial resistance status of the pathogen in recent years (because some studies are more than 15 years old) (Mortensen et al. 1989; Blackall et al. 1995); or differences in the geographic origin of the isolates (Australian, US and European isolates). However, this underlines the need for harmonized methods for antimicrobial susceptibility testing of *B. avium*, which is also a prerequisite for the development of antimicrobial susceptibility testing breakpoints for the pathogen.

Most isolates did not carry any of the resistance genes tested, but this may be because very little is known about the genetic basis of antimicrobial resistance in *B. avium*. PCR assays only detect the target genes, so some genes may have remained undetected. To detect these genes, other methods, such as whole genome sequencing, must be used. Nevertheless, the presence of at least two resistance genes conferring resistance to different classes of antimicrobial agents was detected in five *B. avium* isolates. Three even harboured three different resistance genes (Fig. 1) and were classified as multidrug resistant based on their phenotypic resistance. Although *tet(A)*, *sul1* and *aadA1* have been previously described in two *B. avium* isolates (Erfan et al. 2018), the current study was, to the best of our knowledge, the first to demonstrate the occurrence of *floR*, *dfrB1/2/3* and *sul2* in *B. avium*. Therefore, it is of great importance to monitor the antimicrobial resistance of *B. avium* using harmonized antimicrobial susceptibility testing.

It was shown that cation-adjusted Mueller-Hinton broth is a suitable medium for broth microdilution susceptibility testing of *B. avium*. Using the test conditions and incubation times recommended for rapidly growing bacteria from animals in the CLSI documents, valid and reproducible results can be obtained (CLSI 2018b). Obtaining a harmonized method for testing this pathogen could contribute to monitoring the antimicrobial resistance status of *B. avium* and performing targeted antimicrobial therapy for bordetellosis.

Acknowledgments

The authors would like to thank Cornelia Dürschmidt, Karin Simon and Claudia Walter for excellent technical assistance. This study was financially supported by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) (grant number FKZ 2818HS015).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Author contribution statement

Conceptualization: A.M., Y.C. and C.K.; methodology: F.G., A.M., Y.C., A.J., A.S.B., M.Y. and C.K.; validation: F.G., A.M., Y.C., and C.K.; formal analysis: F.G., A.M., Y.C., and C.K.; investigation: F.G., Y.C., A.S.B.; resources: A.J. and C.K.; data curation: F.G., A.M., Y.C., and C.K.; writing—original draft preparation: F.G., A.M., and C.K.; writing—review and editing: F.G., A.M., Y.C., A.J., A.S.B., M.Y. and C.K.; supervision, A.M. and C.K.; project administration: C.K.. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Beach, N. M., Thompson, S., Mutnick, R., Brown, L., Kettig, G., Puffenberger, R., Stockwell, S. B., Miyamoto, D. and Temple, L. (2012) *Bordetella avium* antibiotic resistance, novel enrichment culture, and antigenic characterization. *Vet Microbiol* **160** (1-2), 189–196.
- Blackall, P. J., Eaves, L. E. and Fegan, M. (1995) Antimicrobial sensitivity testing of Australian isolates of *Bordetella avium* and the *Bordetella avium*-like organism. *Aust Vet J* **72** (3), 97–100.

Chow, A. W. and Bartlett, K. H. (1981) Comparative in-vitro activity of ceftazidime (GR 20263) and other beta-lactamase stable cephalosporins against pseudomonas. Effect of inoculum size and divalent cation supplementation. *J Antimicrob Chemother* **8** Suppl B, 345–348.

Clark, S. (2018) Turkey Industry Report – current health and industry issues facing the US turkey industry. Edited by National Turkey Federation, L. L.C. Devenish Nutrition.

CLSI (2017) Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET06. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2018a) Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. M23. 5th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2018b): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI standard M07, 11th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2020) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI (2021) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31st ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* **65** (3), 490–495.

Erfan, A., Badr, J. and Abd-Elhalim, M. (2018) First record of *Bordetella avium* in Egyptian turkey flocks. *Biosci Res* **15**, 2583–2590.

Ficken, M. D. (1983) Antibiotic aerosolization for treatment of *Alcaligenes rhinotracheitis*. *Avian diseases* **27** (2), 545–548.

Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A. R., Geeraerd, A. H., Cools, I., van Impe, J. F. and Debevere, J. (2005) Environmental factors influencing the relationship between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *J Appl Microbiol* **99** (6), 1503–1515.

Frech, G., Kehrenberg, C. and Schwarz, S. (2003) Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J Antimicrob Chemother* **51** (1), 180–182.

- Gürdal, H., Usanmaz, S. and Tulunay, F. C. (1991) The effects of ions on antibacterial activity of ofloxacin and ceftriaxone. *Chemotherapy* **37** (4), 251–255.
- Harrington, A. T., Castellanos, J.A., Ziedalski, T. M., Clarridge, J. E. and Cookson, B. T. (2009) Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella* Strain from patients with respiratory disease. *Emerg Infect Dis* **15** (1), 72–74.
- Kadlec, K., Wiegand, I., Kehrenberg, C. and Schwarz, S. (2007) Studies on the mechanisms of beta-lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother* **59** (3), 396–402.
- Kehrenberg, C., Friederichs, S., de Jong, A., Michael, G. B. and Schwarz, S. (2006) Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene qnrS in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* **58** (1), 18–22.
- Kelly, B. J., Ghazikhanian, G. Y. and Mayeda, B. (1986) Clinical outbreak of *Bordetella avium* infection in two turkey breeder flocks. *Avian diseases* **30** (1), 234–237.
- Knab, R., Petersen, H., Rautenschlein, S. and Jung, A. (2018) Establishment of a *Bordetella avium* challenge model in turkeys. *Avian Pathol* **47** (3), 227–237.
- Lavrenko, A., Digtar, N., Gerasymenko, N. and Kaidashev, I. (2020) A rare case of *Bordetella avium* pneumonia complicated by *Raoultella planticola*. *Clin Case Rep* **8** (6), 1039–1043.
- Malik, Y. S., Chander, Y., Gupta, S. C. and Goyal, S. M. (2005) A retrospective study on antimicrobial resistance in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Species, and *Bordetella avium* from chickens in Minnesota. *J Appl Poult Res* **14** (3), 506–511.
- Marshall, A. J. and Piddock, L. J. (1994) Interaction of divalent cations, quinolones and bacteria. *J Antimicrob Chemother* **34** (4), 465–483.
- Mortensen, J. E., Brumbach, A. and Shryock, T. R. (1989) Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **33** (5), 771–772.
- Müller, A., Jansen, W., Grabowski, N. T., Monecke, S., Ehricht, R. and Kehrenberg, C. (2018) ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J Food Microbiol* **283**, 52-58.
- Panigrahy, B., Grumbles, L. C., Terry, R. J., Millar, D. L. and Hall, C. F. (1981) Bacterial coryza in turkeys in Texas. *Poult Sci J* **60** (1), 107–113.

Prüller, S., Frömke, C., Kaspar, H., Klein, G., Kreienbrock, L. and Kehrenberg, C. (2015a) Recommendation for a standardised method of broth microdilution susceptibility testing for porcine *Bordetella bronchiseptica*. *PLoS One* **10** (4).

Prüller, S., Rensch, U., Meemken, D. Kaspar, H. Kopp, P. A., Klein, G. and Kehrenberg, C. (2015b) Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from swine and companion animals and detection of resistance genes. *PLoS One* **10** (8).

Prüller, S., Turni, C., Blackall, P. J., Beyerbach, M., Klein, G., Kreienbrock, L., Strutzberg-Minder, K., Kaspar, H., Meemken, D. and Kehrenberg, C. (2017) Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol* **55** (1), 264–273.

Randall, L. P., Cooles, S. W., Osborn, M. K., Piddock, L. J. V. and Woodward, M. J. (2004) Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* **53** (2), 208-216.

Register, K. B. and Jackwood, M. W. (Eds.) (2020) Bordetellosis (Turkey Coryza). In *Diseases of Poultry*. 14th edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 860-872.

Register, K. B. and Kunkle, R. A. (2009) Strain-specific virulence of *Bordetella hinzii* in poultry. *Avian diseases* **53** (1), 50–54.

Ribot, E. M., Fair, M. A., Gautom, R., Cameron, D. N., Hunter, S. B., Swaminathan, B. and Barrett, T. J. (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet, *Foodborne Pathog Dis* **3** (1), 59-67.

Saif, Y. M., Moorhead, P. D., Dearth, R. N. and Jackwood, D. J. (1980) Observations on *Alcaligenes faecalis* infection in turkeys. *Avian diseases* **24** (3), 665.

Spilker, T., Liwiński, A. A. and LiPuma, J. J. (2008) Identification of *Bordetella spp.* in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **14** (5), 504–506.

Szabó, R., Wehmann, E. and Magyar, T. (2015) Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary. *Acta Vet Hung* **63** (4), 413–424.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns

produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33** (9), 2233–2239.

Turkyilmaz, S., Kirdar, S., Ocak, F. and Hazimoğlu, Ş. (2009) Detection of *Bordetella avium* by polymerase chain reaction in the lungs and tracheas of turkeys with pneumonia. *Turkish J Vet Anim Sci.* **33** (2): 147-150.

Tyrovouzis, N. A., Angelidis, A. S. and Stoforos, N. G. (2014) Bi-phasic growth of *Listeria monocytogenes* in chemically defined medium at low temperatures. *Int J Food Microbiol* **186**, 110–119.

Vredenburg, J., Varela, A. R., Hasan, B., Bertilsson, S., Olsen, B., Narciso-da-Rocha, C., Bonnedahl, J., Stedt, J., Da Costa, P. M. and Manaia C. M. (2014) Quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from birds of prey in Portugal are genetically distinct from those isolated from water environments and gulls in Portugal, Spain and Sweden. *Environ Microbiol* **16** (4), 995–1004.

Figure legends

Fig 1. Genetic similarity, origin and antimicrobial genotypes of 49 *Bordetella avium* isolates tested in this study.

^a this isolate was used as a test isolate for the growth experiments.

^b this isolate was used as a test isolate for the method validation of broth-microdilution.

* ND, this isolate was included in resistance gene analysis, but no resistance genes were detected (for the listing of resistance genes, see Tab. 3).

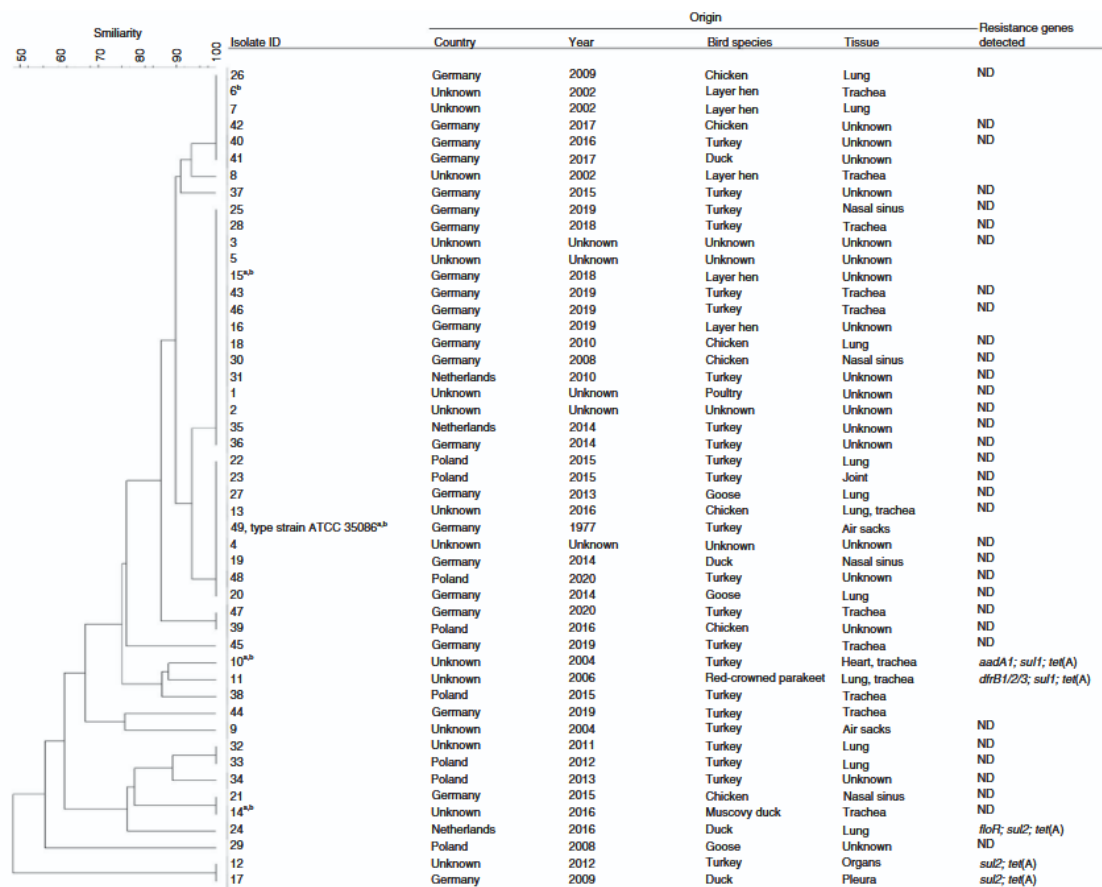


FIGURE 1 Genetic similarity, origin and antimicrobial genotypes of 49 *Bordetella avium* isolates tested in this study. (a) this isolate was used as a test isolate for the growth experiments. (b) this isolate was used as a test isolate for the method validation of broth-microdilution. *NI this isolate was included in resistance gene analysis, but no resistance genes were detected (for the listing of resistance genes, see Table 3)

Fig 2. Viable counts (\log_{10} cfu ml⁻¹) of *Bordetella avium* type strain ATCC 35086 grown in three different media.

CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood; VFM, Veterinary Fastidious Medium.

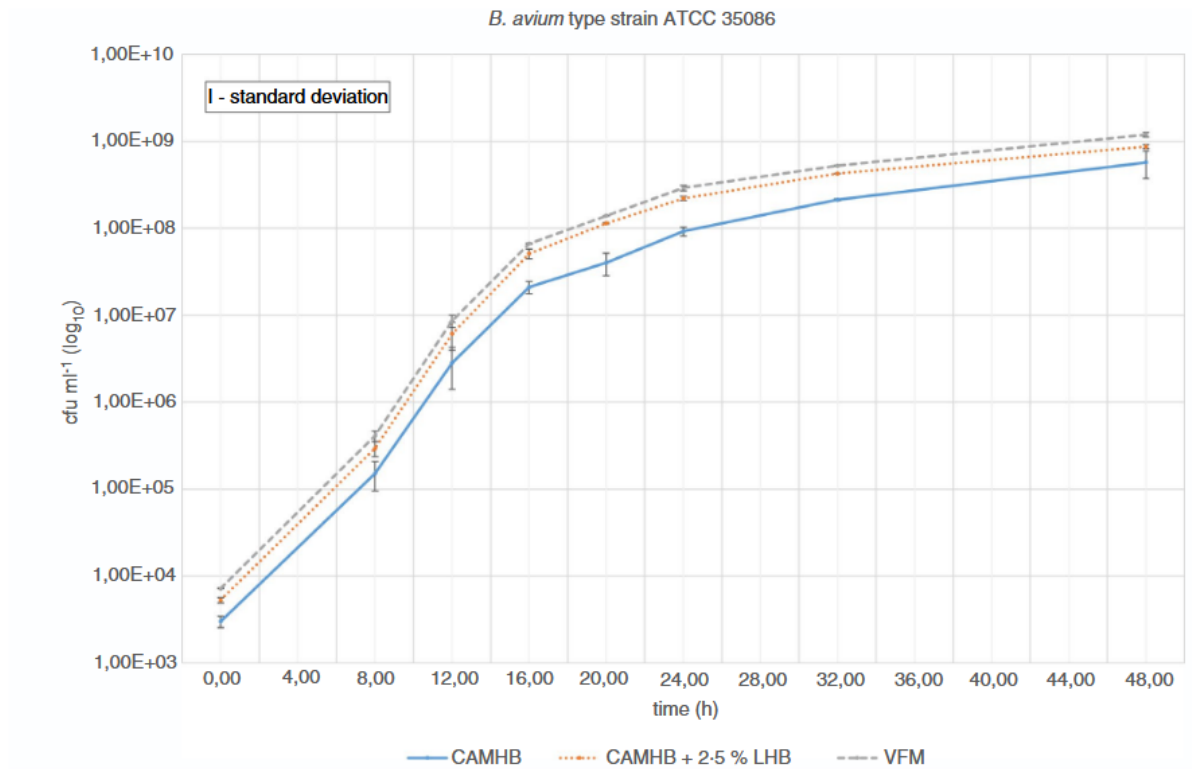


FIGURE 2 Viable counts (\log_{10} cfu ml⁻¹) of *Bordetella avium* type strain ATCC 35086 grown in three different media. CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood; VFM, Veterinary Fastidious Medium

Tables

Table 1: Homogeneity of MIC values of five *B. avium* isolates obtained from five independent test replicates in cation-adjusted Mueller-Hinton broth after incubation in ambient air at 35 ± 2 °C for 20 hours.

Anti-microbial agent ^a	Deviation from MIC mode ^{b,c}							Exact MIC agreement (%) ^d	Essential MIC agreement (%) ^e
	-3	-2	-1	0	1	2	3		
AMP			2	20	3			80.0	100.0
AMC			4	21				84.0	100.0
XNL				21	4			84.0	100.0
CFP			4*	21				84.0	100.0
CTX			2	20	3			80.0	100.0
CQN			5	19	1			76.0	100.0
CEF			1	22	2			88.0	100.0
CIP				24	1			96.0	100.0
CST			2	21	2			84.0	100.0
DOX			3	17*	5			68.0	100.0
ENRO			1	22	2			88.0	100.0
FFN				23	2			92.0	100.0
GEN				24	1			96.0	100.0
IPM				25				100.0	100.0
MAR			2	18	5			72.0	100.0
NAL			2	22	1			88.0	100.0
NEO			6	17	2			68.0	100.0
PEN			1	22	2			88.0	100.0
STR				20	5			80.0	100.0
TIA		1	2	19	2	1		76.0	92.0
TET				21*	4			84.0	100.0
TIL			4	17	4			68.0	100.0
SXT			2	18	5			72.0	100.0
TUL			1	22	2			88.0	100.0

^a AMP, ampicillin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; XNL, ceftiofur; CFP, cefoperazone; CTX, cefotaxime; CQN, cefquinome; CEF, cephalotin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MAR, marbofloxacin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TIA, tiamulin; TET, tetracycline; TIL, tilmicosin; TUL, tulathromycin

^b MIC, minimal inhibitory concentration;

^c Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are shaded in grey;

^d Exact MIC agreement, percentage of MIC values that exactly match the MIC mode;

^e Essential MIC agreement, percentage of MIC values within ± 1 dilution step from MIC mode

Table 2: Results from antimicrobial susceptibility testing of 49 *B. avium* isolates in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB).

Anti-microbial agent ^a	Number of <i>B. avium</i> isolates and their MIC ^b ($\mu\text{g ml}^{-1}$) after 20 h of incubation																	MIC ₅₀ ^c	MIC ₉₀ ^d	
	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
AMC ^e			g	9	22	7	10		1										0.12	0.50
AMP				20	11	9	5	3	1										0.12	0.50
CFP				2*	23	4	4	16											0.12	1.00
CTX					9	19	4	8	8		1								0.25	2.00
CQN							8	22	5	12	2								1.00	4.00
XNL					17	11	7	8	8	5	1								0.50	4.00
CEF							8	37	4										1.00	1.00
CIP							39	10	4										0.50	1.00
CST							11	26	10	2									1.00	2.00
DOX				8*	27	8	1			1	2	2							0.12	4.00
ENRO						17	27	5											0.50	1.00
FFN								5	39	4			1						2.00	4.00
GEN								15	32	2									2.00	2.00
IPM						1	16	32											1.00	1.00
MAR						12	34	3											0.50	0.50
NAL									1	19	28	1							8.00	8.00
NEO									25	22	2								2.00	4.00
PEN						1	25	8	6	7	1	1							0.50	4.00
STR											1	27	18	1	1			1*	16.00	32.00
TET					8*	31	4	1						2	3				0.25	64.00
TIA										5	9	13	4	1	17*				16.00	≥ 128.00
TIL											3	27	5	8	6				16.00	128.00
SXT ^f				1	30	10	2	3	1	1				1*					0.12	1.00
TUL										11	15	8	15						8.00	32.00

^a AMC, amoxicillin-clavulanic acid 1:2 ratio; AMP, ampicillin; CFP, cefoperazone; CTX, cefotaxime; CQN, cefquinome; XNL, ceftiofur; CEF, cephalotin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MAR, marbofloxacin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TIA, tiamulin; TIL, tilmicosin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole 1:19 ratio; TUL, tulathromycin

^b MIC, minimal inhibitory concentration

^c MIC₅₀ indicates the MIC that is required to inhibit 50 % of the isolates

^d MIC₉₀ indicates the MIC that is required to inhibit 90 % of the isolates

^e Data represent the concentration of amoxicillin; ^f Data represent the concentration of trimethoprim

^g The tested range of the antimicrobials is visualized in the white area

* Number of isolates with MIC values equal to or lower or higher than the concentrations of the test range

Table 3: *B. avium* isolates tested and detected resistance genes.

Antimicrobial agent	MIC (µg ml ⁻¹)	Number of isolates tested	Number of isolates with the following detected resistance genes												
			<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA2</i>	<i>aac(3)-I</i>	<i>aac(3)-IV</i>	<i>aac(6')-Ib</i>	<i>ant(2'')-I</i>					
Aminoglycosides															
Gentamicin	4	2	a				-	-	-	-					
Streptomycin	≥128	2	-	-	1	-									
β-lactam antibiotics			<i>bla_{BOR-1}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i>	<i>bla_{OXA-2}</i>	<i>bla_{ROB}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>bla_{SHV}</i>							
Ampicillin	2	1	-	-	-	-	-	-							
Cefotaxime	≥8	1	-	-	-	-	-	-							
Cefquinome	≥8	2	-	-	-	-	-	-							
Ceftiofur	≥8	1	-	-	-	-	-	-							
Folate pathway inhibitors			<i>dfrA1/15/16</i>	<i>dfrA5/14</i>	<i>dfrA7/17</i>	<i>dfrB1/2/3</i>	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>	<i>sul3</i>						
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	≥1/19	6	-	-	-	1	2	3	-						
Phenicols			<i>floR</i>												
Florfenicol	32	1	1												
Quinolones			<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrD</i>	<i>qnrS</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>							
Enrofloxacin	≥0.5	32	-	-	-	-	-	-							
Marbofloxacin	≥0.5	37	-	-	-	-	-	-							
Tetracyclines			<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(C)</i>	<i>tet(D)</i>	<i>tet(E)</i>	<i>tet(G)</i>	<i>tet(H)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>tet(O)</i>			
Tetracycline ^b	≥64	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

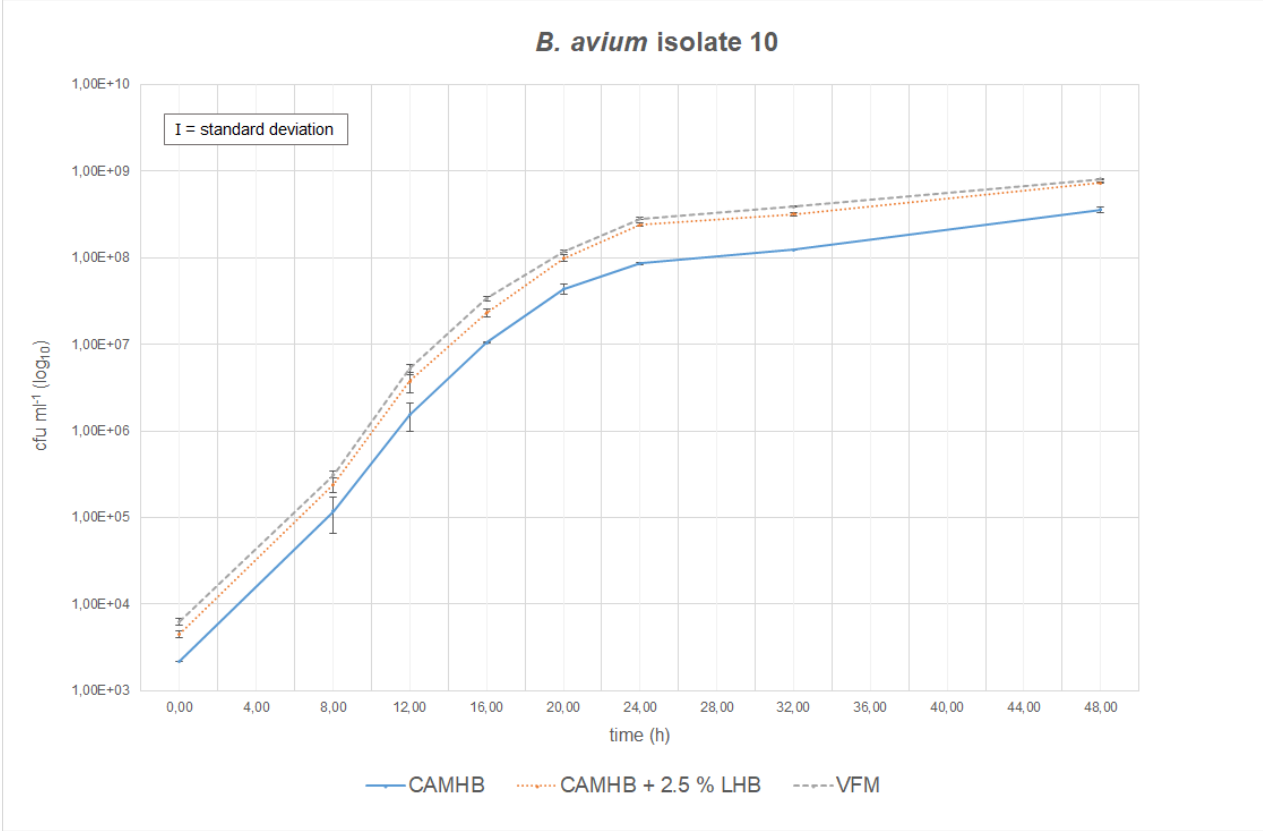
^a Gray shading indicates that the isolates have not been tested for the presence of these genes

^b Isolates with tetracycline MIC values of ≥64 µg ml⁻¹ also had MIC values for doxycycline of ≥4 µg ml⁻¹

Supporting information captions

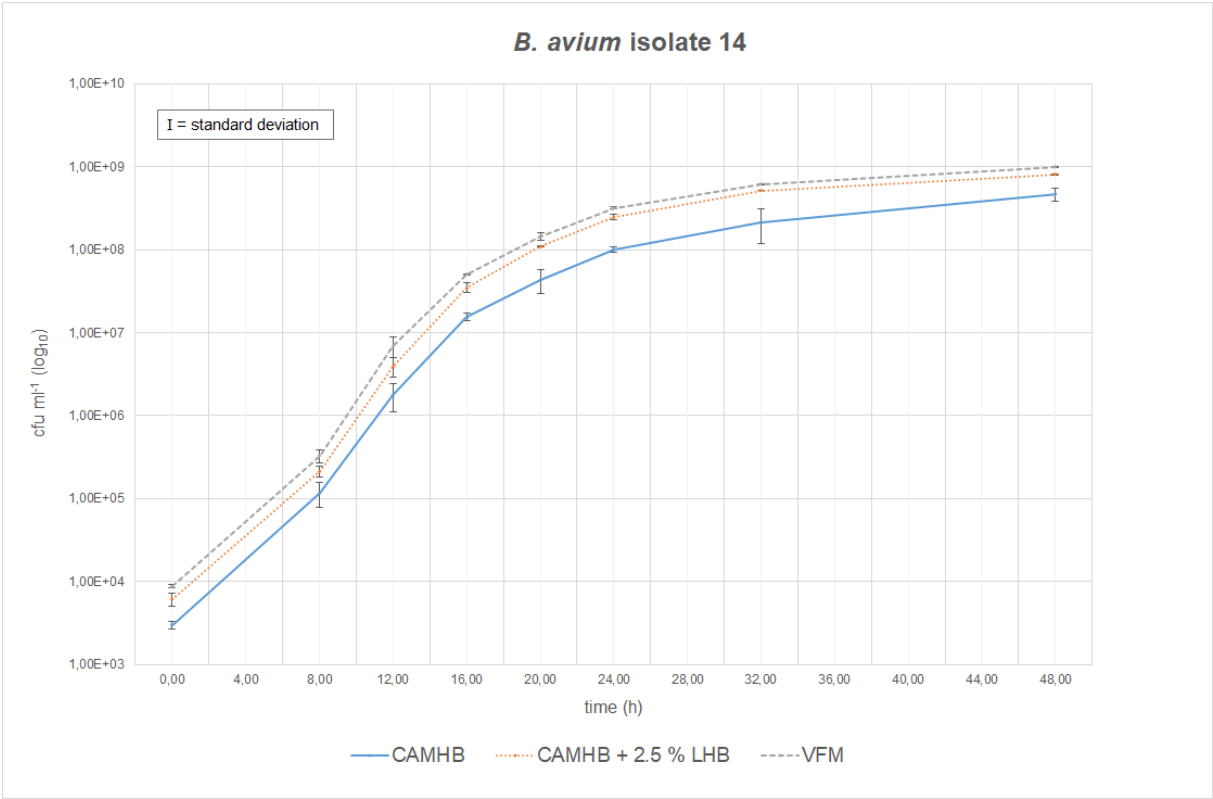
Figure S1: Viable counts (\log_{10} cfu ml⁻¹) of *Bordetella avium* isolate 10 grown in three different media.

Figure S1



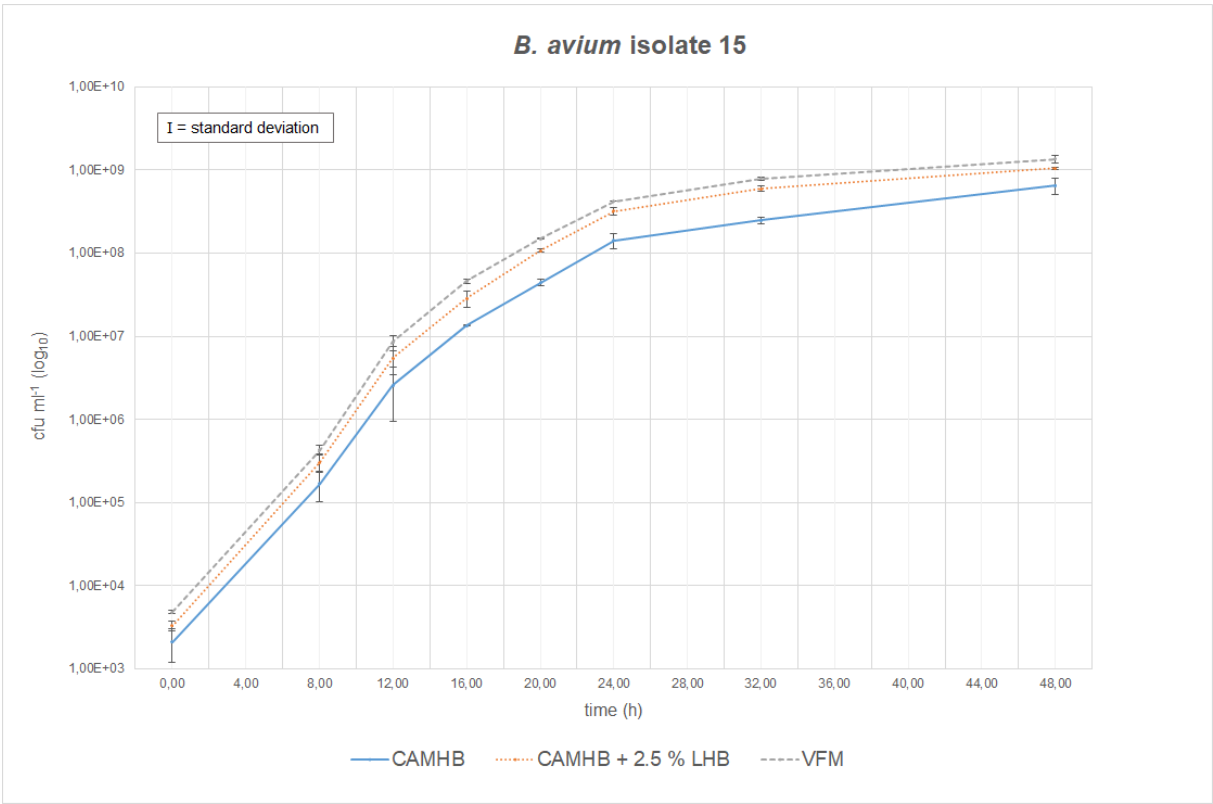
CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium.

Figure S2: Viable counts (\log_{10} cfu ml⁻¹) of *Bordetella avium* isolate 14 grown in three different media.



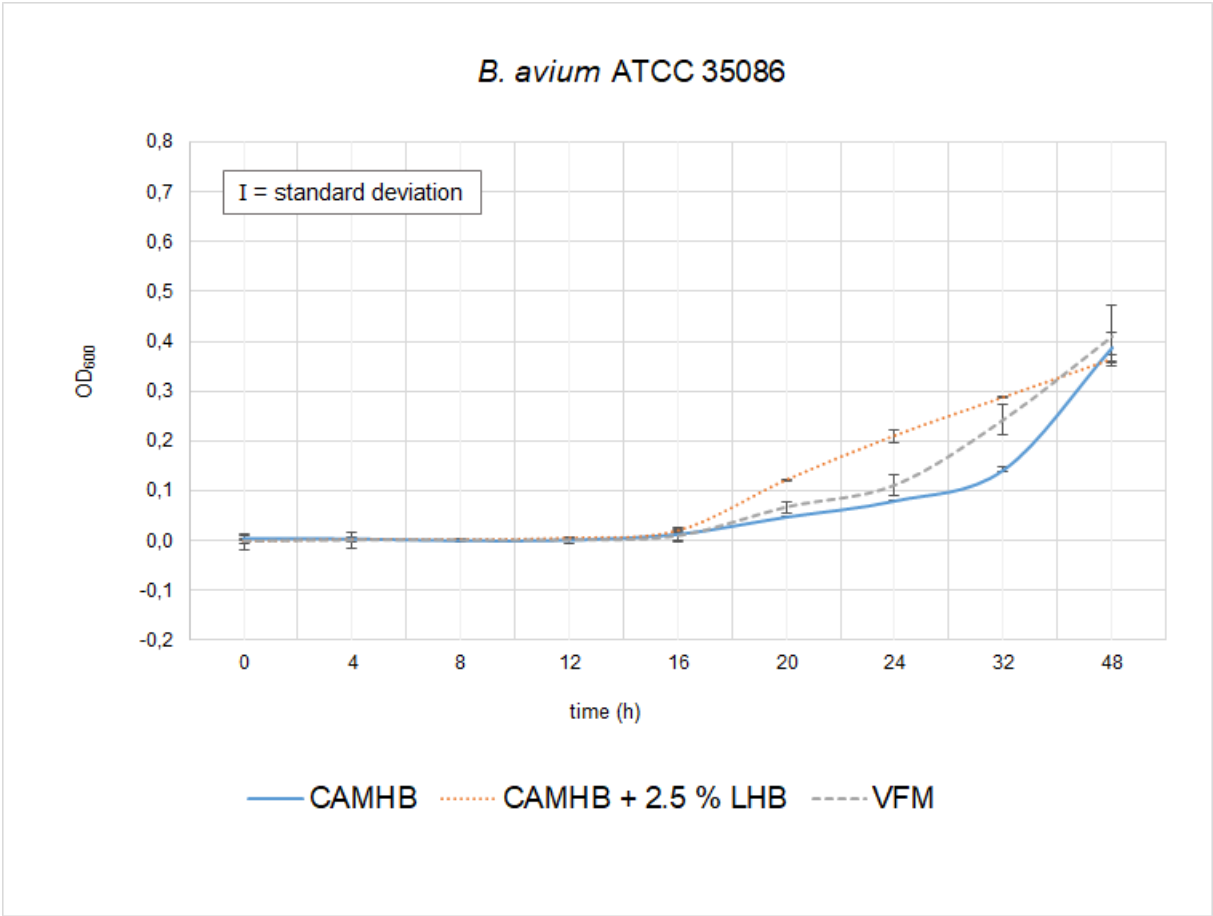
CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium

Figure S3: Viable counts (\log_{10} cfu ml⁻¹) of *Bordetella avium* isolate 15 grown in three different media.



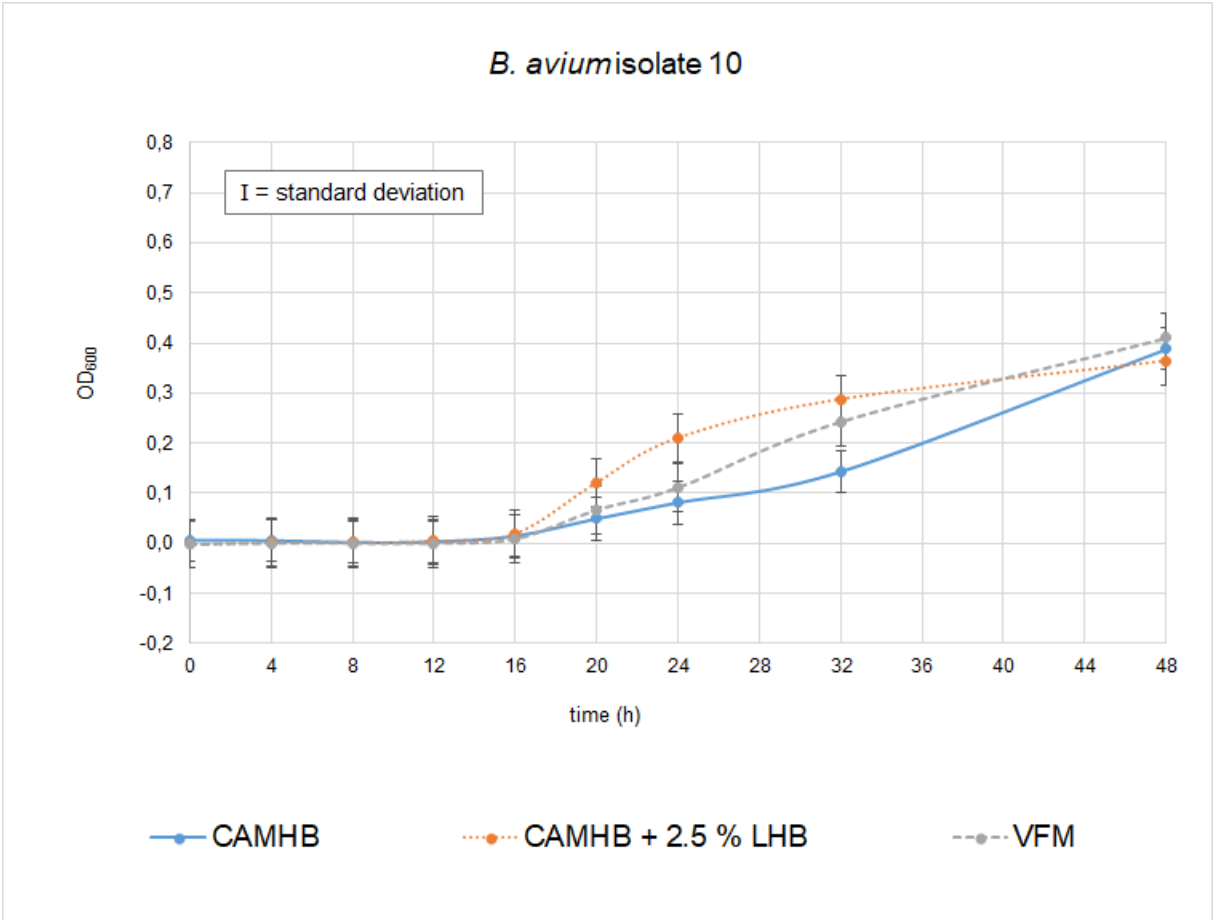
CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium

Figure S4: Optical density (600 nm) of *Bordetella avium* type strain ATCC 35086 grown in three different media.



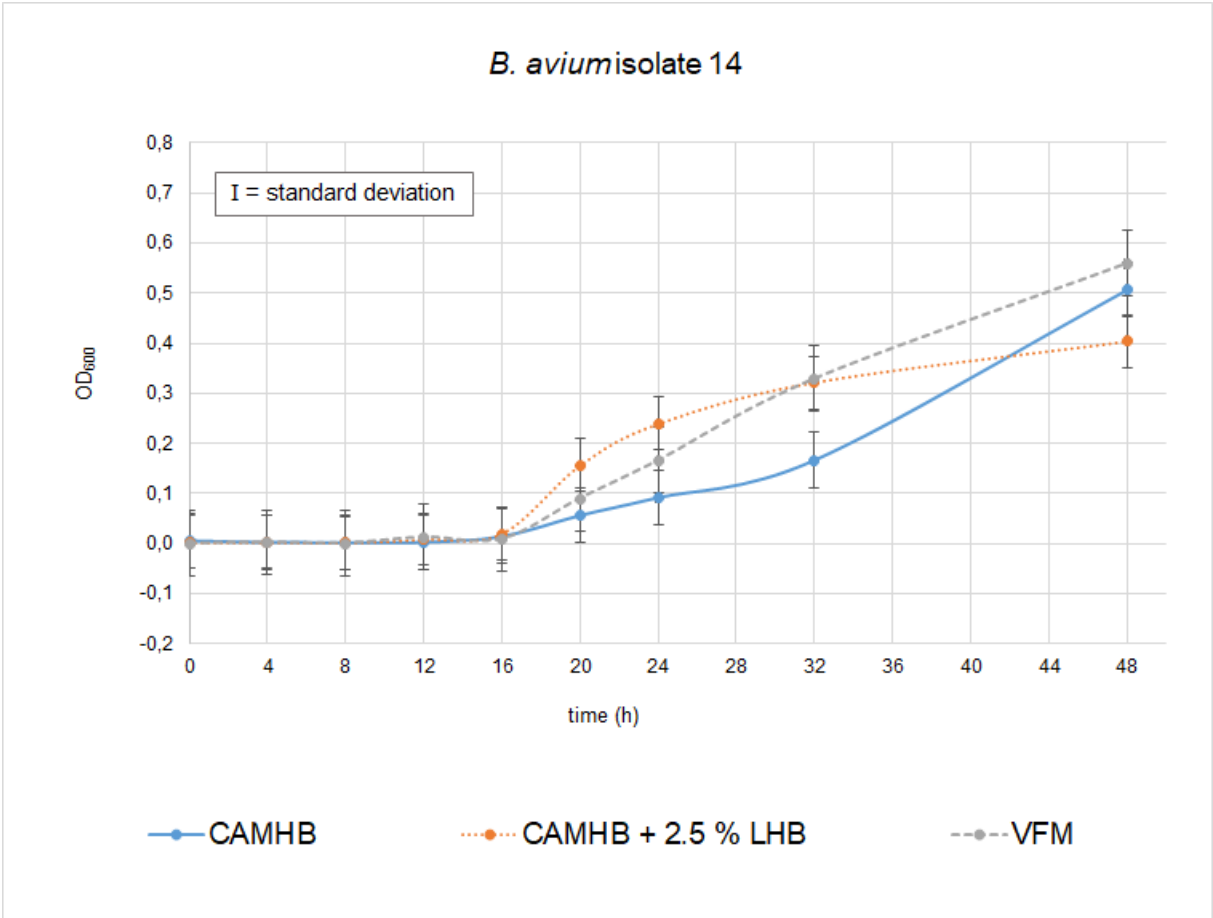
CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium

Figure S5: Optical density (600 nm) of *Bordetella avium* isolate 10 grown in three different media.



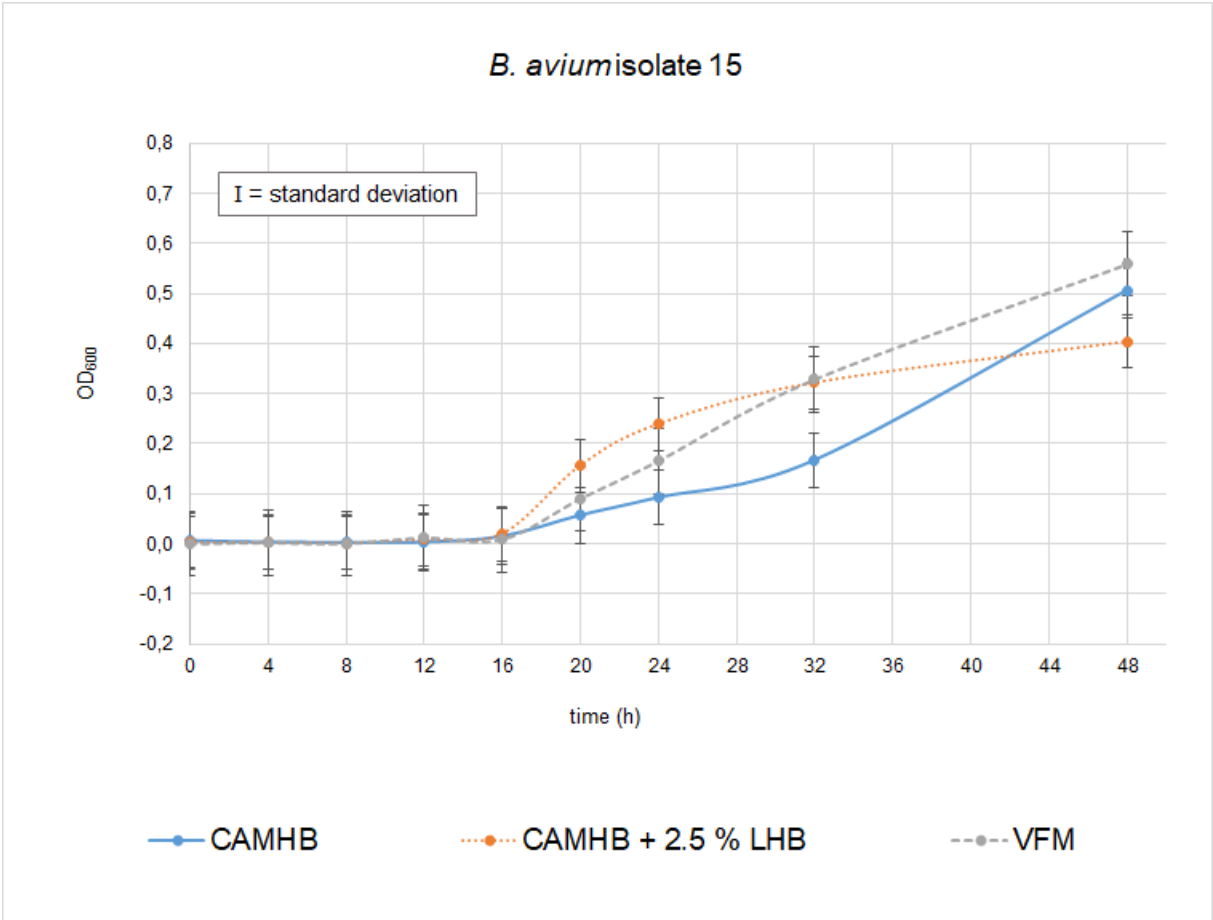
CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium

Figure S6: Optical density (600 nm) of *Bordetella avium* isolate 14 grown in three different media.



CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium

Figure S7: Optical density (600 nm) of *Bordetella avium* isolate 15 grown in three different media.



CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; LHB, lysed horse blood, VFM, Veterinary Fastidious Medium

Table S8: Homogeneity of MIC values of five *B. avium* isolates obtained from six independent test replicates in cation-adjusted Mueller-Hinton broth from two manufacturers after incubation in ambient air at 35 ± 2 °C for 20 hours

Antimicrobial agent	Deviation from MIC mode ^{a,b,c}							Exact MIC agreement (%) ^d	Essential MIC agreement (%) ^e
	-3	-2	-1	0	1	2	3		
Amoxicillin/Clavulanic acid 1:2			6	21	3			70.00	100.00
Ampicillin			7*	23				76.67	100.00
Cefoperazone			2*	24	4			80.00	100.00
Cefotaxime			4*	25	1			83.33	100.00
Cefquinome			4	23	3			76.67	100.00
Ceftiofur			5	24	1			80.00	100.00
Cephalotin			3	24	3			80.00	100.00
Ciprofloxacin			1	28	1			93.33	100.00
Colistin			3	24	3			80.00	100.00
Doxycycline			3	18*	9			60.00	100.00
Enrofloxacin			1	26	3			86.67	100.00
Florfenicol				26	4			86.67	100.00
Gentamicin		1	4	24	1			80.00	96.67
Imipenem			1	29				96.67	100.00
Marbofloxacin			2	23	5			76.67	100.00
Nalidixic Acid			2	24	4			80.00	100.00
Neomycin		2	9	17	2			56.67	93.33
Penicillin			1	27	2			90.00	100.00
Streptomycin			2	23	5			76.67	100.00
Tetracycline			1	22*	7			73.33	100.00
Tiamulin		2	3	21	3	1		70.00	90.00
Tilmicosin			6	20	4			66.67	100.00
Trimethoprim/Sulfamethoxazole 1:19		1	4	20	5			66.67	96.67
Tulathromycin		1	4	23	2			76.67	96.67

^a MIC, minimal inhibitory concentration;

^b Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are shaded in grey;

^c The values were obtained from six independent test replicates in CAMHB from two manufacturers (manufacturer 1: n=5; manufacturer 2: n=1);

^d Exact MIC agreement, percentage of MIC values that exactly match the MIC mode;

^e Essential MIC agreement, percentage of MIC values within ±1 dilution step from MIC mode

Publikation 2

Gütgemann F, Müller A, Churin Y, Jung A, Kumm F, Heuvelink A, Yue M, Kehrenberg C. Proposal of a method for harmonized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium gallinarum*. J Clin Microbiol. 2022 Aug 17;60(8):e0041922.
doi: 10.1128/jcm.00419-22

Copyright notice

Used with permission of American Society for Microbiology – Journals.

Permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Proposal of a method for harmonized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium gallinarum*

Franziska Gütgemann¹, Anja Müller¹, Yury Churin¹, Arne Jung²; Franziska Kumm¹; Annet Heuvelink³; Min Yue^{4,5,6}; Corinna Kehrenberg^{1*}

¹Institute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 92, 35392 Giessen, Germany

²Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany

³Royal GD, Deventer, The Netherlands

⁴Institute of Preventive Veterinary Science and Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou 310058, China

⁵Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou, China

⁶Hainan Institute of Zhejiang University, Sanya 572025, China

*Corresponding author

E-Mail: corinna.kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de

Keywords: *Avibacterium gallinarum*; CAMHB; CAMHB+CS+NADH; CLSI; MIC; broth microdilution; resistance genes; susceptibility testing

Avibacterium (Av.) gallinarum is an opportunistic pathogen in poultry, which, however, has also been associated with human disease. There is currently no approved method for antimicrobial susceptibility testing of this pathogen, so this study aimed at developing a harmonized broth microdilution method for *Av. gallinarum* that is suitable for diagnostic laboratories. For this, the *Av. gallinarum* CCUG 12391^T type strain and 42 field isolates were collected and their species was confirmed by using a species-specific PCR assay and biochemical reactions. To select epidemiologically unrelated isolates, Apal macrorestriction analysis was performed. Preliminary growth experiments were conducted with six culture media, and based on the results, four media were selected to compile growth curves with four isolates. Independent repetitions of MIC determinations were then performed to evaluate the reproducibility of the values. Cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) was initially selected as broth medium, but did not show sufficient homogeneity of MICs. Therefore, CAMHB plus 1% chicken serum and 0.0025% NADH was selected and showed a good homogeneity of MICs after 20 h and 24 h of incubation at 35 ± 2 °C. This was reflected in essential MIC agreements ranging between 96% and 100%. Testing of a larger *Av. gallinarum* collection (n=43) revealed that easily readable MICs could be obtained for the type strain and all isolates. Some *Av. gallinarum* showed elevated MICs of enrofloxacin (n=35), nalidixic acid (n=35), penicillin (n=2), tetracycline (n=19) and/or trimethoprim/sulfamethoxazole (n=1). By using PCR analyses, the following antimicrobial resistance genes were detected: *bla*_{TEM}, *dfrA14*, *sul2*, *tet*(B), *tet*(H). The study demonstrated that the proposed medium is suitable for a harmonized broth microdilution susceptibility testing of *Av. gallinarum* with a recommended incubation time of 20 to 24 h.

Introduction

Avibacterium gallinarum (*Av. gallinarum*, formerly *Pasteurella gallinarum*) is a Gram-negative opportunistic pathogen in poultry (1). It was first described by Hall and co-workers in 1955 (2), but has been assigned to the newly described genus *Avibacterium* since 2005 (3). Although *Av. gallinarum* does not cause major economic losses in the poultry industry, the pathogen can lead to increased mortality in chickens and turkeys in cases of coinfections with other pathogens such as *Mycoplasma* spp. (e.g., *Mycoplasma synoviae*) or *Enterobacteriaceae* (e.g., *Escherichia coli*) (1, 4–6). Pericardial, hepatic, peritoneal and synovial inflammation have been described in broilers and laying hens infected with *Av. gallinarum* (7, 8). Chickens also suffer from respiratory symptoms due to inflammation of the respiratory organs such as the air sacs or trachea (8, 9).

More recently, *Av. gallinarum* has been isolated from several other avian species, such as African guinea fowl (9), geese (10) and a healthy duck (11). After *Av. gallinarum* was detected in humans with acute gastroenteritis or endocarditis, it was discussed whether *Av. gallinarum* is indeed pathogenic to humans (1, 12–15). However, the difficulty so far in distinguishing *Av. gallinarum* from the closely related species *Av. avium*, *Av. paragallinarum*, and *Av. volantium*, which share nucleotide sequence identities of at least 96.8%, may also have led to misclassifications between these species (1, 3).

However, when *Av. gallinarum* causes clinical disease in poultry or humans, targeted antimicrobial treatment is required. Since antimicrobial resistance has already been found in many other pathogenic bacteria isolated from poultry, such as *E. coli*, it must be assumed that *Av. gallinarum* may also become clinically resistant to antimicrobials and could serve as a reservoir for antimicrobial resistance genes (16, 17). To find the most appropriate antimicrobial agent for treating *Av. gallinarum* infections, a reliable and standardized method for antimicrobial susceptibility testing is required. Although the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) provides standards for antimicrobial susceptibility testing of bacteria isolated from animals, no harmonized test method has yet been approved for *Av. gallinarum*. Since the genus *Avibacterium* belongs to the more fastidious family of *Pasteurellaceae* (3), a method for fast-growing pathogens cannot simply be used without verifying its suitability. In addition, in the only four studies known to date in which the antimicrobial susceptibility

of *Av. gallinarum* was investigated, a non-standardized agar disk diffusion method was used for qualitative susceptibility testing (10, 12, 13, 15).

To finally enable routine laboratories to report comparable minimal inhibitory concentration (MIC) values for *Av. gallinarum*, and thus to record quantitative results, the aim of this study was to develop a harmonized method for broth microdilution antimicrobial susceptibility testing for this pathogen. For further validation of the method, antimicrobial susceptibility testing of a larger isolate collection was performed and antimicrobial resistance gene analyses of isolates were used to compare the phenotypic and genotypic resistance of isolates.

Material and methods

***Avibacterium gallinarum* type strain and field isolate collection and culturing**

A total of 42 *Av. gallinarum* field isolates originating from three European countries (Germany, n = 34; Poland, n = 7; Denmark, n = 1) were used in this study. These field isolates were originally isolated between 1986 and 2020 from domestic poultry including chickens (category not known; n = 22), laying hens (n = 5), turkeys (n = 12), ducks (n = 1), and poultry of unknown species (n = 2). In addition, the *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T (Culture Collection University of Gothenburg, CCUG, Göteborg, Sweden) (synonym ATCC 13361^T or NCTC 11188^T) was used. *Av. gallinarum* isolates were cultured on Columbia sheep blood agar plates containing 5% blood (Oxoid, Wesel, Germany) and in Brain-heart infusion broth (BHI) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 24 h ± 1 h at 37 °C in a microaerobic (5% CO₂) atmosphere.

Species confirmation of *Avibacterium* spp. field isolates by biochemical tests

To confirm their species, all isolates were subjected to the following biochemical tests, which were based on literature data (3): fermentation of D(-)-mannitol, D(+)-maltose and D-sorbitol, the presence of β-galactosidase, activity of catalase, symbiotic growth with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, hemolytic activity on Columbia sheep blood agar and growth on MacConkey agar (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., Mumbai, India). To detect the presence of β-galactosidase, ONPG disks (Merck KGaA) were used according to the manufacturer's instructions. Catalase activity was determined from an overnight culture on TSA using 3% hydrogen peroxide (VWR International GmbH,

Darmstadt, Germany). To verify symbiotic growth, the growth of the isolates in the hemolysis zone of *S. aureus* ATCC 25923 was assessed.

Species confirmation of *Avibacterium* spp. isolates by PCR

Differentiation of bacterial species within the genus *Avibacterium* by sequence analysis of parts of the 16S rRNA gene only appeared to be not reliable (3). Therefore, a PCR assay for the identification of *Av. gallinarum* was developed in the course of the current study.

This assay was based on a previously developed HPG-2 PCR assay (18, 19) and sequence analyses of the target region of this assay performed as part of this study. Sequence analysis using BLAST software revealed that the target region overlapped the 3' end of the *pyrG* gene (encoding a CTP synthetase), an intergenic region, and the 3' end of the *yihA* gene (encoding a ribosome biogenesis GTP-binding protein) in *Av. paragallinarum* (accession no. NZ_CP050316.1). However, comparison of this region with corresponding HPG2 regions from *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T (UGSQ01000003.1) demonstrated differences in the nucleotide sequences of the 3' end of *pyrG* between *Av. gallinarum* and *paragallinarum* (76% sequence identity). Therefore, this region was used for the selection of species-specific reverse primers. For PCR analyses, the DNA of all 42 field isolates and control strains (*Av. avium* CCUG 12833^T, *Av. gallinarum* CCUG 12391^T, *Av. paragallinarum* CCUG 12835^T (acquired from the Culture Collection University of Gothenburg (CCUG), Göteborg, Sweden), *Av. volantium* DSM 22841^T (acquired from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) Braunschweig, Germany) and three *Av. paragallinarum* field isolates from the collection of the institute) was isolated from fresh overnight cultures by a boiling method (15 min; 99 °C). As forward and reverse primers, the nucleotide sequences fw-5' AGAAGGTAGCCGTGCGCGTGAAC 3' and rv-5' GAGCAGGCTTGATCAGAAGGGTC 3' were used. Using a thermal cycler (Biometra GmbH, Göttingen, Germany), the following cycling conditions were applied: 95 °C for 5 min, 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 30 s, and a final extension at 72 °C for 5 min.

Macrorestriction analysis

The clonal relationship of the *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T and the 42 field isolates was investigated by Apal-macrorestriction analysis followed by pulsed-field gel

electrophoresis (PFGE) based on a previously described protocol (20) in order to select unrelated isolates for further validation steps. The DNA fragments were separated by PFGE using a CHEF DR II system (BioRad, Munich, Germany). The pulse time increased over 20 h from 1 s to 18 s at 6 volts. XbaI-digested DNA of *Salmonella* Typhimurium LT2 served as size marker. Using BioNumerics software (version 7.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), fragment patterns were analyzed. The cluster analysis (UPGMA) was performed using the Dice coefficient, an optimization of 0.5% and a position tolerance of 1%.

Testing of *Av. gallinarum* growth behavior in six broth media

To find a suitable broth medium for *Av. gallinarum*, the visible growth of 13 isolates (*Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T and field isolates no. 2 – 13) was determined in six broth media: Cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany), CAMHB plus 1% heat inactivated chicken serum (v/v) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (CAMHB+CS), CAMHB plus 0.0025% NADH (v/v) (Roche Diagnostics GmbH) (CAMHB+NADH), CAMHB plus 1% heat inactivated chicken serum (v/v) and 0.0025% NADH (v/v) (CAMHB+CS+NADH), CAMHB + 2.5% lysed horse blood (v/v) (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) (CAMHB+LHB) and Veterinary Fastidious Medium (VFM). These media were selected because unsupplemented CAMHB, CAMHB+LHB and VFM are CLSI-approved media for antimicrobial susceptibility testing of commonly isolated, rapidly growing, aerobic or facultative anaerobic organisms (CAMHB), or of fastidious organisms (CAMHB+LHB, VFM), respectively (21). Although *Av. gallinarum* is not haemophilic, it is located in a genus in which haemophilic bacteria are predominant (1). Thus, the CAMHB+CS+NADH recently proposed for harmonized antimicrobial susceptibility testing of the haemophilic species *Glaesserella (G.) parasuis* was also selected (1, 22). To test if a medium for *Av. gallinarum* needs to be supplemented with X- and V-factors, NADH and chicken serum were also added separately to the CAMHB medium.

The initial inoculum density of approximately 5×10^5 cfu/ml was set according to CLSI guidelines for broth microdilution susceptibility testing (21). Then, a 1:200 dilution was prepared and 50 μ l of this solution was added to each well of sterile 96-well microtiter plates. After incubation periods of 18 h, 20 h and 24 h, respectively, under aerobic conditions at 35 ± 2 °C, the wells were checked for visible growth.

Based on the results, four broth media were selected to compile growth curves with four epidemiologically unrelated *Av. gallinarum* isolates (*Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T, field isolates no. 3, 4 and 11). Isolate no. 4 was included due to its unsharp button formation when grown in microtiter plates during the preliminary tests. In brief, the inoculum was adjusted to an initial concentration of approximately 10³ cfu/ml test medium. After 0, 18 and 24 h of incubation at 35 ± 2 °C in ambient air, bacterial counts (cfu/ml) were determined by culture enumeration. Dilution levels with colony counts between 5 and 200 colonies were included in the quantification and the weighted mean cfu/ml was calculated. In addition, the optical density (600 nm) of the inoculated test media was measured using a UV spectrophotometer (Spectrophotometer UV5, Mettler Toledo) at nine time points (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 h) for comparative purposes.

Determination of MIC values

For MIC determination, 50 µl/well microtiter plates coated with vacuum-dried antibiotics (including 22 antimicrobials currently licensed for food-producing animals) in 2-fold dilution series were used (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK). Inoculum density and preparation, incubation conditions, and determination of MIC endpoints followed the specifications given in CLSI documents (21, 23). The direct colony suspension method was used for inoculum preparation to yield an initial inoculum density of approximately 5 x 10⁵ cfu/ml, as briefly described before. Verification of inoculum densities was done according to CLSI standard M07-A10. The *E. coli* ATCC 25922 served as quality control. Microtiter plates were sealed with self-adhesive films and incubated for 18 h, 20 h and 24 h in ambient air at 35 ± 2 °C. MIC values were read visually by the same person.

To assess the reproducibility of MICs, the values of four unrelated *Av. gallinarum* field isolates no. 3, 4, 11 and 13 and type strain *Av. gallinarum* CCUG 12391^T, were analyzed in five independent experiments in our laboratory. Subsequently, the exact MIC agreements (percentage of homogeneous MIC values) and the essential MIC agreements (accepting a deviation of ±1 dilution step) were calculated. The remaining 38 field isolates were then tested using the proposed method.

Detection of resistance genes

The DNA of *Av. gallinarum* isolates with elevated MICs of at least one antimicrobial was analyzed for the presence of resistance genes using previously described PCR assays (24) (see Table S1 in the supplemental material). The PCR amplicons of *bla*_{TEM} and *dfrA5/14* were sent to Eurofins Genomics (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany) for sequencing. Assembly of the sequences was done by using DNAMAN software version 8 (Lynnon Biosoft, San Ramon, CA, USA) and BLASTN algorithms (25) contributed to the identification of the respective resistance gene determinant.

Results

Species confirmation of *Av. gallinarum* isolates

All 42 *Av. gallinarum* field isolates as well as the *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T showed the species-specific band in the *Av. gallinarum* PCR assay. In contrast, no band was visible for the negative control strains *Av. avium* type strain CCUG 12833^T, *Av. paragallinarum* type strain CCUG 12835^T and *Av. volantium* DSM 22841^T. Furthermore, the results of the biochemical reactions for all 42 *Av. gallinarum* field isolates were consistent with the previously published species specifications (3). While all isolates did not ferment D(-)-mannitol and D-sorbitol, all isolates showed positive results for D(+)-maltose fermentation, did not grow on MacConkey agar, and did not demonstrate symbiotic growth or hemolytic activity on blood agar plates. All isolates showed a positive result in the catalase test, and 24 of the 42 field isolates showed a positive result in the ONPG reaction. Table S2 visualizes the test results of the biochemical assays for the whole isolate collection.

Clonality of isolates determined by macrorestriction analysis

To select five epidemiologically unrelated *Av. gallinarum* isolates for the development of the antimicrobial susceptibility testing method, macrorestriction analysis was performed. Figure 1 shows that most isolates were distinguishable by their fragment patterns, but that there were three groups of isolates (each consisting of five to nine isolates) that could not be distinguished based on their macrorestriction patterns. Despite the close relationship of some isolates of the same group, these isolates originated from different bird species and years. Based on the PFGE results, type strain *Av. gallinarum* CCUG 12391^T and four isolates were selected (isolates nos. 3, 4, 11,

and 13) that differed by >7 fragments and were thus considered unrelated according to Tenover et al. (1995) (26). They were isolated between 1982 and 2020 from different tissues from chickens in Germany (n = 4) or the USA (*Av. gallinarum* CCUG 12391^T; n = 1) (Fig. 1).

Growth behavior in six different media and growth curves

In the preliminary growth experiments, the visible growth of the 13 tested isolates did not differ between an incubation period of 20 h and 24 h, whereas after 18 h, growth was not yet visually apparent by button formation in two of the isolates in all six media tested. In the four media CAMHB, CAMHB+NADH, CAMHB+CS and CAMHB+CS+NADH, all isolates showed easily readable and well visible growth in the form of a button formation at the bottom of the wells after 20 h and 24 h of incubation (Table 1). In contrast, in the blood-containing media CAMHB+LHB and VFM, three isolates showed poor growth after 20h and 24 h incubation, making microtiter plate reading difficult. Therefore, and due to the short shelf life of the blood component, the blood-containing media were excluded from further growth experiments.

The remaining four broth media were used for growth curves with type strain *Av. gallinarum* CCUG 12391^T and three *Av. gallinarum* field isolates (Figures S1 – S5). All isolates showed adequate growth after 18 h to 24 h incubation at 35 ± 2 °C with colony counts ranging from 10^7 to 10^9 cfu/ml. However, it was found that the values in CAMHB were about 1 log level lower than in the other media. Optical density (OD₆₀₀) measurement showed that a late-exponential increase was still detectable after 18 h of incubation, and the OD₆₀₀ maximum was reached after approximately 20 h of incubation (Figures S6 – S9). While the OD₆₀₀ values in CAMHB+CS+NADH and CAMHB+CS were maximal at approximately 0.5 to 0.6, the CAMHB without supplementation and CAMHB+NADH only reached maximum OD₆₀₀ values of about 0.2 to 0.4.

Broth medium for antimicrobial susceptibility testing of *Av. gallinarum*

Initially, commercially available CAMHB without supplements was selected as medium for antimicrobial susceptibility testing, as it is the CLSI recommended broth medium for most rapidly replicating bacteria. In addition, the four isolates showed sufficient growth ($>10^7$ cfu/ml) after 20 h of incubation when the growth curves were compiled. To assess the homogeneity of MIC values using this medium, antimicrobial

susceptibility testing of five unrelated isolates including the type strain and three isolates selected for the growth experiments, was repeated independently. However, after three replications of MIC testing with CAMHB, the MIC values differed by up to seven dilution steps after 20 h of incubation (Table S3). Because the essential MIC agreement was only between 80% and 100% after these three replications (whereas the CLSI requires an essential agreement of $\geq 90\%$) (27), method validation with CAMHB medium was stopped and another broth medium was selected. The CAMHB+CS+NADH was selected for this purpose, as this medium was already accepted for inclusion in the forthcoming CLSI document VET06. Using CAMHB+CS+NADH, all tested isolates showed clearly visible button formations (buttons approximately 2 – 3 mm in size) after incubation periods of 20 h and 24 h, respectively, at 35 ± 2 °C. After 18 h, however, growth of some isolates (two out of five) was not clearly visible, so this incubation period was not used further. As shown in Tables 2 and S4, the MIC values obtained with CAMHB+CS+NADH were homogeneous, both after 20 h and 24 h of incubation. At both time points, an exact MIC agreement between 60 – 96% and an essential MIC agreement between 96 – 100% was calculated for all 24 antimicrobials tested. However, when comparing the two incubation times, 20 h and 24 h, it was seen that the mean exact MIC agreement was slightly higher for CAMHB+CS+NADH after 20 h (80.08%), than after 24 h (77.17%). In contrast, the mean essential MIC agreement was almost the same, with 99.33% after 20 h and 99.17% after 24 h of incubation. *E. coli* ATCC 25922, included as a quality control, was within published quality control ranges after 20 h and 24 h incubation in CAMHB+CS+NADH.

Antimicrobial susceptibility of *Av. gallinarum* field isolates in CAMHB supplemented with 1% heat inactivated chicken serum and 0.0025% NADH

To determine the suitability of CAMHB+CS+NADH for broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Av. gallinarum* field isolates, the complete isolate and strain collection was tested. For all isolates, MIC values could be read without any problems and the results are presented in Table 3. The MIC values showed either unimodal distributions (e.g., amoxicillin/clavulanic acid, colistin, and florfenicol), bimodal (e.g., enrofloxacin, marbofloxacin, tetracycline) or broad distributions spanning >6 dilution levels (e.g., cefoperazone, cefquinome, ceftiofur, or trimethoprim/sulfamethoxazole). Since there are no breakpoints for *Av. gallinarum*, it was not possible to classify the

isolates as susceptible, intermediate, or resistant to the antimicrobials. Nevertheless, as shown in Table 3, low MIC_{50/90} values were seen for amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cephalosporins and florfenicol. However, there were a couple of isolates exhibiting MIC values of ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin (n = 2), 32 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline (n = 2), ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ neomycin (n = 3), ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ penicillin (n = 2), ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline (n = 19), 32/608 $\mu\text{g/ml}$ trimethoprim/sulfamethoxazole (n = 1) or ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ tulathromycin (n = 1), and which thus had considerably higher values than the rest of the isolates (Table 3). Some isolates (n = 12) showed elevated MIC values for ≥ 3 classes of antimicrobial agents. Of these, isolate no. 21 even exhibited elevated MIC values for five classes of antimicrobials, including β -lactams (ampicillin 64 $\mu\text{g/ml}$; penicillin ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), tetracyclines (doxycycline 32 $\mu\text{g/ml}$; tetracycline 128 $\mu\text{g/ml}$), chinolones (nalidixic acid 128 $\mu\text{g/ml}$), macrolides (tilmicosin 128 $\mu\text{g/ml}$; tulathromycin ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$) and folate synthesis inhibitors (trimethoprim/sulfamethoxazole 32/608 $\mu\text{g/ml}$).

Detection of antimicrobial resistance genes

PCR assays to detect antimicrobial resistance genes in isolates with elevated MICs yielded positive results for the following resistance genes: *bla*_{TEM} (n = 2), *dfrA5/14* (n = 1), *sul2* (n = 1), *tet(B)* (n = 15) and *tet(H)* (n = 5) (Table 4).

In total, at least one antimicrobial resistance gene was detected in 18 of the 42 field isolates. Of these, 13 isolates carried the tetracycline resistance gene *tet(B)* (MICs of ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$), three carried the *tet(H)* gene (MICs of ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), and two isolates with tetracycline MICs of ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ carried both resistance genes, *tet(B)* and *tet(H)*. Testing of the isolate with a MIC of 4 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline revealed that none of the *tet* genes included in the PCR assays were present. Isolate no. 21, which was noticed for elevated MIC values against five classes of antimicrobial agents, showed positive results in PCR assays targeting *bla*_{TEM}, *dfrA5/14*, *sul2*, *tet(B)* and *tet(H)*. Subsequent sequence analysis of PCR amplicons comprising more than one resistance determinant (*bla*_{TEM}, *dfrA5/14*) showed that the genes involved were *bla*_{TEM-1} and *dfrA14*.

Discussion

In order to monitor the antimicrobial resistance situation and to carry out targeted therapy if necessary, monitoring the antimicrobial resistance status of *Av. gallinarum*

is essential. However, monitoring antimicrobial resistance requires approved and harmonized methods for susceptibility testing, otherwise no comparable and valid data can be obtained. Unfortunately, no approved method for quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Av. gallinarum* is available so far. To address this problem, a broth microdilution susceptibility testing method for *Av. gallinarum* was developed in the course of the current study.

The growth behavior of *Av. gallinarum* in six different broth media was investigated. It was noticed that after 18 h of incubation, which is within the recommended range of 16 – 20 h for testing fast growing bacteria (21) according to CLSI supplement VET01S, the OD₆₀₀ values were lower than after 20 h and 24 h of incubation. In addition, the preliminary experiments showed that not all isolates formed readable buttons in microtiter plates after 18 h. Therefore, slightly longer incubation periods of 20 h and 24 h were chosen. Since unsupplemented CAMHB is the CLSI approved standard medium for antimicrobial susceptibility testing of non-fastidious bacteria (21), this medium was initially selected for method validation. After three independent replications of MIC testing to determine exact and essential MIC agreements, it was seen that the MIC values differed considerably and could not be consistently replicated. Therefore, unsupplemented CAMHB does not meet the CLSI criterion of at least 90% essential MIC agreement in repeated experiments as test medium for *Av. gallinarum* (27). Since the type strain and all tested field isolates showed better growth in CAMHB+CS+NADH and this medium was recently accepted by the CLSI for testing *G. parasuis* (the method was accepted to appear in the new CLSI document VET06), this medium was selected. Using this medium, homogenous MICs were obtained after 20 h and 24 h of incubation in the course of five independent replications and the essential MIC agreement reached $\geq 96\%$ for all antibiotics tested. Since it has already been shown in a previous study (22), and in the current study for *E. coli* ATCC 25922, the QC strains recommended by CLSI can be used for the CAMHB+CS+NADH medium and no new QC strains or QC ranges need to be defined. A control of different batches and manufacturers was also performed previously, allowing direct use of the medium (22).

The suitability of the broth microdilution method with CAMHB+CS+NADH was verified by testing the complete *Av. gallinarum* collection and easily readable MIC values were obtained for the type strain and all field isolates. However, since there are no accepted breakpoints for *Av. gallinarum* yet, a classification of isolates into

susceptible, intermediate, or resistant was not possible. The MIC₉₀ values for some antimicrobials, e.g., ciprofloxacin, doxycycline, enrofloxacin, marbofloxacin, or tetracycline, were nevertheless significantly (≥ 3 dilution levels) above the MIC₅₀ values and were thus indicative for the development of resistance in some isolates. This was also reflected by bimodal distributions of MIC values for some antimicrobials, e.g., fluoroquinolones, nalidixic acid and tetracyclines, indicating acquired or mutational resistance mechanisms in the non-wild type *Av. gallinarum* isolates (28). Notable was the high number of 19 isolates with MIC values of ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$. Of particular concern was isolate no. 21, which exhibited elevated MIC values of β -lactams, macrolides, tetracyclines, a chinolone and a folate synthesis inhibitor combination, indicating multidrug resistance (29). Nevertheless, no conclusions can be drawn at present about the in vivo efficacy of the antibiotics. This would require establishing clinical breakpoints that also take into account other data, such as the tissue distribution of the antibiotics in poultry.

To our knowledge, this study was the first to collect quantitative MIC data for *Av. gallinarum*. Therefore, a comparison with MIC values from other studies or isolates from other geographic origins was not possible. Only four previous studies, published between 1977 and 2002, examined the susceptibility of *Av. gallinarum* isolates, formerly known as *Pasteurella gallinarum*. Mushin et al. (1977) performed antimicrobial susceptibility testing of avian *Av. gallinarum* using the agar diffusion method with Drug Sensitivity Test (DST) and Mueller Hinton agar (10). In another study, agar diffusion was performed without providing more details of the methodology (15). Two other studies, however, did not provide any information about the method and media used (12, 13). Although approved breakpoints are not available for *Av. (P.) gallinarum*, most of the isolates were reported as susceptible to the antimicrobial agents tested.

In the study by Mushin et al. (1977) (10), there were fewer tetracycline wild type isolates compared to our study. This may, of course, be due to the different methods of testing, regional differences (isolates from Israel versus isolates from Germany, Poland and Denmark), or the lack of accepted breakpoints, but it might also be due to spread of antimicrobial resistance genes in *Av. gallinarum* over time. Trends towards AMR were also reported for other poultry pathogens and has been attributed to the frequent use of tetracyclines in poultry production and the spread of resistance genes through horizontal gene transfer (30–32). Antimicrobial resistance genes conferring

resistance to tetracyclines, but also to aminoglycoside or β -lactam antibiotics, were also detected in the closely related species *Av. paragallinarum* (33, 34).

As there were many isolates with elevated MIC values (compared to the other isolates of the isolate collection) PCR assays were performed to detect antimicrobial resistance genes commonly found in Gram-negative bacteria. It was seen that many isolates carried resistance genes, particularly those conferring tetracycline resistance. In 18 out of 19 isolates with an elevated tetracycline MIC of ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$, resistance genes could be determined, demonstrating a very good correlation between resistance phenotype and genotype. In two isolates even two genes, *tet(B)*, and *tet(H)* were detected, and these isolates also showed higher MICs of tetracycline (≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) than the remaining isolates. In contrast, the isolate with a MIC of 4 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline did not carry any of the *tet* genes tested. For the other classes of antibiotics included in resistance gene analyses, it was not expected that resistance-mediating genes would always be detected. This might be due to the large number of different aminoglycoside resistance-mediating genes, of which only a subset was included in our analyses. Or, in the case of reduced fluoroquinolone susceptibility, it could be caused by chromosomal mutations, e.g., mutations in topoisomerase genes or regulatory genes that confer resistance to fluoroquinolones (35, 36). Thus, it remains to be elucidated which mechanisms mediate resistance to these antimicrobials in *Av. gallinarum*. Nevertheless, to the best of our knowledge, this study is the first to describe the presence of *bla*_{TEM-1}, *dfrA14*, *sul2*, *tet(B)* and *tet(H)* in *Av. gallinarum*.

Conclusion

In this study, we demonstrated that unsupplemented CAMHB is not suitable for antimicrobial susceptibility testing of *Av. gallinarum* due to poorly readable and non-reproducible MIC values. In contrast, CAMHB+CS+NADH resulted in reproducible and easily readable MIC values for 42 field isolates from three countries. The performance of the proposed method is in accordance with CLSI recommendations, however, an incubation time of 20 – 24 h which is within the specifications for fastidious organisms, is recommended. CLSI quality control strains can be used for broth microdilution with CAMHB+CS+NADH, as shown in a previous study (22) and confirmed in the course of the present study. The recommended broth microdilution method provides an easy-to-

perform quantitative antimicrobial susceptibility testing of *Av. gallinarum* that is suitable for diagnostic laboratories.

Funding

This research was funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) (grant number FKZ 2818HS015).

Acknowledgments

The authors would like to thank Cornelia Dürschmidt, Karin Simon and Claudia Walter for their excellent technical support.

Institutional Review Board Statement

Not applicable.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Publication bibliography

1. Blackall PJ, Soriano-Vargas E. 2020. Infectious coryza and related bacterial infections. *In* Diseases of poultry, 14th ed., Swayne DE (ed), vol 1: 890–906. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
2. Hall WJ, Heddleston KL, Legenhausen DH, Hughes RW. 1995. Studies on pasteurellosis. I. A new species of *Pasteurella* encountered in chronic fowl cholera. *Am J Vet Res* 16 (61 Part 1):598–604.
3. Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55 (Pt 1):353–362.
4. Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Channing SE. 1990. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. *Avian Dis* 34 (4):1009.
5. Droual R, Shivaprasad HL, Meteyer CU, Shapiro DP, Walker RL. 1992. Severe mortality in broiler chickens associated with *Mycoplasma synoviae* and *Pasteurella gallinarum*. *Avian Dis* 36 (3):803–807.

6. Bisgaard M, Christensen H, Behr K-P, Gerhard C, Jens P. 2005. Investigations on the clonality of isolates of *Pasteurella gallinarum* obtained from turkeys in Germany. *Avian Pathol* 34 (2):106–110.
7. Tjahjowati G, Orr JP, Chirino-Trejo M, Mills JH. 1995. Experimental reproduction of endocarditis with *Pasteurella gallinarum* in mature leghorn chickens. *Avian Dis* 39 (3):489–498.
8. Shivaprasad HL, Droual R. 2002. Pathology of an atypical strain of *Pasteurella gallinarum* infection in chickens. *Avian Pathol* 31 (4):399–406.
9. Mohan K, Dziva F, Chitauru D. 2000. *Pasteurella gallinarum*: Zimbabwean experience of a versatile pathogen. *The Onderstepoort j vet res* 67 (4):301–305.
10. Mushin R, Bock R, Abrams M. 1977. Studies on *Pasteurella gallinarum*. *Avian Pathol* 6 (4):415–423.
11. Muhairwa AP, Mtambo MM, Christensen JP, Bisgaard M. 2001. Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania. *Vet Microbiol* 78 (2):139–153.
12. al Fadel Saleh M, al-Madan MS, Erwa HH, Defonseka I, Sohel SZ, Sanyal SK. 1995. First case of human infection caused by *Pasteurella gallinarum* causing infective endocarditis in an adolescent 10 years after surgical correction for truncus arteriosus. *Pediatrics* 95 (6):944–948.
13. Arashima Y, Kato K, Kakuta R, Fukui T, Kumasaka K, Tsuchiya T, Kawano K. 1999. First case of *Pasteurella gallinarum* isolation from blood of a patient with symptoms of acute gastroenteritis in Japan. *Clin Infect Dis* 29 (3):698–699.
14. Frederiksen W, Tønning B. 2001. Possible misidentification of *Haemophilus aphrophilus* as *Pasteurella gallinarum*. *Clin Infect Dis* 32 (6):987–989.
15. Ahmed K, Sein PP, Shahnawaz M, Hoosen AA. 2002. *Pasteurella gallinarum* neonatal meningitis. *Clin Microbiol Infect* 8 (1):55–57.
16. European Food Safety Authority (EFSA). 2018. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA journal* 16 (2).
17. Chuppava B, Keller B, Abd El-Wahab A, Sürrie C, Visscher C. 2019. Resistance reservoirs and multi-drug resistance of commensal *Escherichia coli* from excreta and manure isolated in broiler houses with different flooring designs. *Front Microbiol* 10:2633.

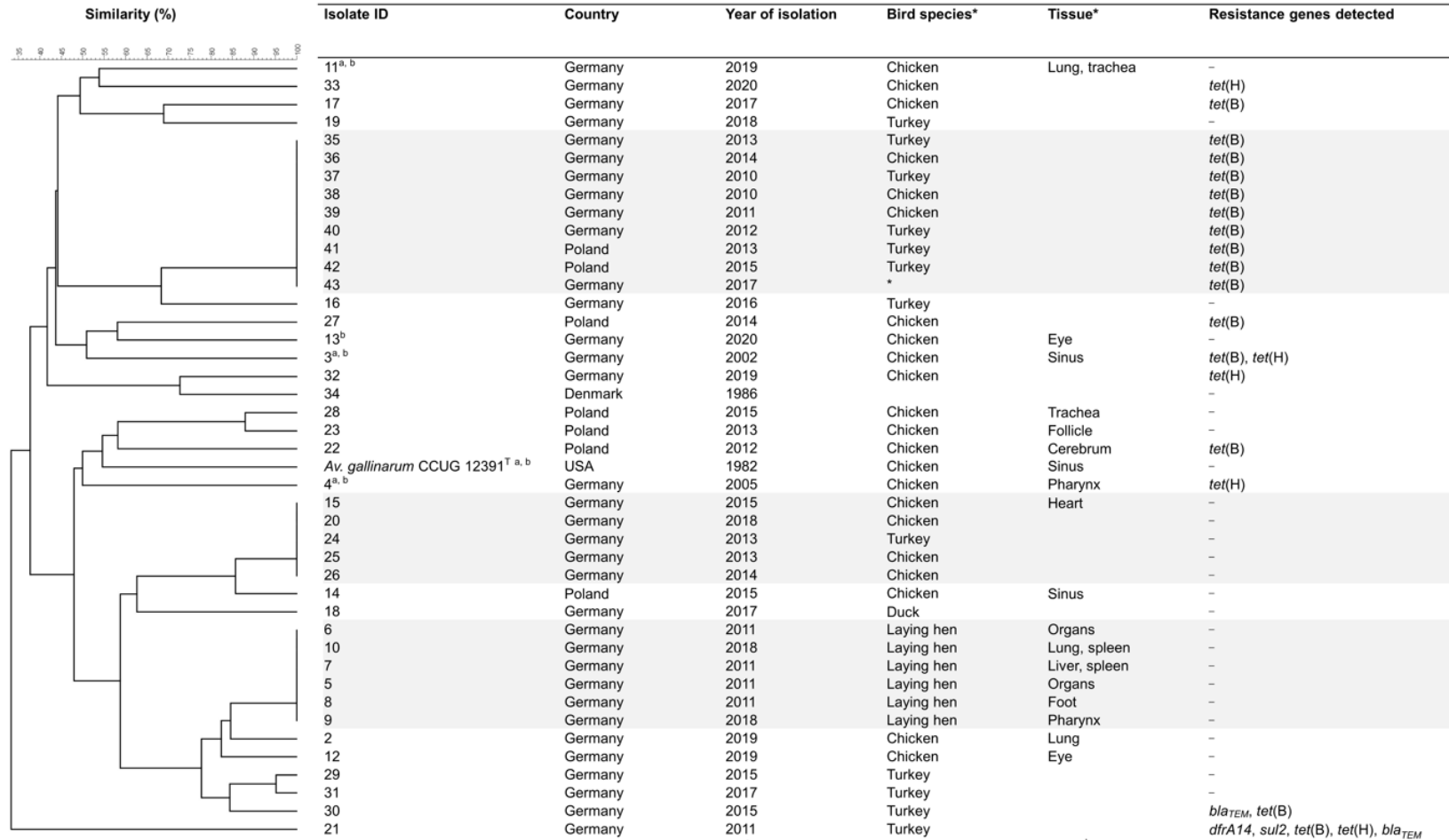
18. Chen X, Miflin JK, Zhang P, Blackall PJ. 1996. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 40 (2):398–407.
19. Luna-Castrejón LP, Buter R, Pantoja-Nuñez GI, Acuña-Yanes M, Ceballos-Valenzuela K, Talavera-Rojas M, Salgado-Miranda C, Heuvelink A, de Wit S, Soriano-Vargas E, Feberwee A. 2021. Identification, HPG2 sequence analysis, and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial layers in Sonora State, Mexico. *Avian Dis* 65 (1):95-101.
20. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3 (1):59–67.
21. CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
22. Prüller S, Turni C, Blackall PJ, Beyerbach M, Klein G, Kreienbrock L, Strutzberg-Minder K, Kaspar H, Meemken D, Kehrenberg C. 2017. Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol* 55 (1):264–273.
23. CLSI. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard – tenth Edition. CLSI document M07-A10. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
24. Gütgemann F, Müller A, Churin Y, Jung A, Braun AS, Yue M, Kehrenberg C. 2022. Development of a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella avium* using broth microdilution and detection of resistance genes. *J Appl Microbiol* 132 (3):1775–1787.
25. Nucleotide BLAST, National Center for Biotechnology Information. Available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed 2018 by U.S. National Library of Medicine).
26. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33 (9):2233–2239.

27. CLSI. 2018. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. M23. 5th ed. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Wayne, PA.
28. Diarra MS, Malouin F. 2014. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Front Microbiol* 5:282.
29. Müller A, Jansen W, Grabowski NT, Monecke S, Ehricht R, Kehrenberg C. 2018. ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J Food Microbiol* 283:52–58.
30. Mancabelli L, Ferrario C, Milani C, Mangifesta M, Turrone F, Duranti S, Lugli GA, Viappiani A, Ossiprandi MC, van Sinderen D, Ventura M. 2016. Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environ Microbiol* 12:4727–4738.
31. Sreejith S, Shajahana S, Prathiush PR, Anjana VM, Viswanathan A, Chandran V, Kumar GSA, Jayachandran R, Mathew J, Radhakrishnan EK. 2020. Healthy broilers disseminate antibiotic resistance in response to tetracycline input in feed concentrates. *Microb Pathog* 149.
32. Juricova H, Matiasovicova J, Kubasova T, Cejkova D, Rychlik I. 2021. The distribution of antibiotic resistance genes in chicken gut microbiota commensals. *Nature* 11 (1).
33. Heuvelink A, Wiegel J, Kehrenberg C, Dijkman R, Soriano-Vargas E, Feberwee A. 2018. Antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates from outbreaks of infectious coryza in Dutch commercial poultry flocks, 2008-2017. *Vet Microbiol* 217:135–143.
34. Byarugaba DK, Minga UM, Gwakisa PS, Katunguka-Rwakishaya E, Bisgaard M, Christensen H, Olsen JE. 2011. Demonstration of antibiotic resistance genes *strA*, *bla_{TEM}*, *tetA*, *tetC* and *sul2* in *Avibacterium paragallinarum*. *Afr J Microbiol Res* 5 (22):3624–3627.
35. Kehrenberg C, Jong AD, Friederichs S, Cloeckert A, Schwarz S. 2007. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *J Antimicrob Chemother* 59 (5):886–92.
36. Kehrenberg C, Cloeckert A, Klein G, Schwarz S. 2009. Decreased fluoroquinolone susceptibility in mutants of *Salmonella* serovars other than Typhimurium: detection of novel mutations involved in modulated expression of *ramA* and *soxS*. *J Antimicrob Chemother* 6:1175–1180.

Figure legend

Figure 1: Clonal relationship of 42 *Av. gallinarum* field isolates and *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T used in this study, their origins and detected resistance genes

* Blank fields indicate that the species or tissue is not known; ^a This isolate was used to compile growth curves; ^b This isolate was used in five independent repetitions of susceptibility testing; – No resistance genes was detected in this isolate; gray shading indicates the groups of isolates not distinguishable in macrorestriction analysis.



* Blank fields indicate that the species or tissue is not known; ^a This isolate was used to compile growth curves; ^b This isolate was used in five independent repetitions of susceptibility testing; – No resistance genes was detected in this isolate; Gray shading indicates the groups of isolates not distinguishable in macrorestriction analysis

Tables

Table 1: Visible growth of 13 *Av. gallinarum* isolates (including the *Av. gallinarum* CCUG 12391^T) in six test media after 20 h and 24 h of incubation.

Isolate ID	CAMHB ^a	CAMHB + 1% chicken serum	CAMHB + 1% chicken serum + 0.0025% NADH	CAMHB + 0.0025% NADH	CAMHB + 2.5% lysed horse blood	VFM ^b
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
4	++	++	++	++	++	++
5	+++	+++	+++	+++	+	+
6	+++	+++	+++	+++	+	+
7	+++	+++	+++	+++	+	+
8	++	++	++	++	++	++
9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++	+++	+++
11	+++	+++	+++	+++	+++	+++
12	+++	+++	+++	+++	+++	+++
13	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Visible growth of *Av. gallinarum* was graded using the following scheme: +, poor growth (unclear button formation); ++, fair growth (blurred button formation); +++, excellent growth (clear button formation); ^a CAMHB, cation-adjusted Mueller-Hinton broth; ^b VFM, Veterinary Fastidious Medium

Table 2: Homogeneity of *Av. gallinarum* MIC values ($\mu\text{g/ml}$) obtained in CAMHB plus 1% chicken serum and 0.0025% NADH after 20 h of incubation.

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^{b,d}						Exact MIC agreement (%)	Essential MIC agreement ^c (%) ^c	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
AMC		1*	2	19	3			76	96
AMP		1	3*	17	4			68	96
XNL			3	22*				88	100
CFP			1*	21*	3			84	100
CTX				24*	1			96	100
CQN		1	4*	18*	2			72	96
CEF			6*	18	1			72	100
CIP				24*	1			96	100
CST			6	19				76	100
DOX			1	22	2			88	100
ENRO			2*	20*	3			80	100
FFN			2	21*	2			84	100
GEN			7*	15	3			60	100
IPM			3	19	3			76	100
MAR			3*	20	2			80	100
NAL			1	21	3			84	100
NEO			4	21				84	100
PEN		1	2	19	3			76	96
STR				24	1			86	100
TET			2	22	1			88	100
TIA			5	19	1			76	100
TIL			4	19	2			76	100
SXT			2*	22*	1			88	100
TUL			5	17	3			68	100

^a AMC, amoxicillin-clavulanic acid ratio 2:1; AMP, ampicillin; XNL, ceftiofur; CFP, cefoperazone; CTX, cefotaxime; CQN, cefquinome; CEF, cephalotin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MAR, marbofloxacin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TIA, tiamulin; TIL, tilmicosin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole ratio 1:19; TUL, tulathromycin

^b Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are in the gray area.

^c Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution steps of reference MICs.

^d Data are from testing five isolates in five independent replications.

* Number of recorded MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table 3: Antimicrobial susceptibility (MIC values) of the *Av. gallinarum* CCUG 12391^T and 42 field isolates tested in CAMHB plus 1% chicken serum and 0.0025% NADH and MIC_{50/90} values.

Antimicrobial agent	Quantity of isolates and their MIC values (µg/ml) after 20 h of incubation																MIC ₅₀	MIC ₉₀	
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256			512
Amoxicillin/clavulanic acid ^a					3	14	23	2	1									0.50	0.50
Ampicillin				2	10	17	9	3		1				1				0.25	1.00
Cefoperazone				21*	4	5	8	3	2									0.12	1.00
Cefotaxime		29*	5	6	3													0.015	0.06
Cefquinome		6*	13	7	6	3	3	5										0.06	1.00
Ceftiofur			11*	12	6	9	4	1										0.06	0.50
Cephalotin				1*	3	7	6	16	9		1							1.00	2.00
Ciprofloxacin	8*						8	9	2	2	4	9	1*					1.00	16.00
Colistin						2	37	4										0.50	0.50
Doxycycline						1	15	6	6	4	9		2					1.00	8.00
Enrofloxacin	2*	5	1				2	9	5	1	4	3	11*					2.00	≥32.00
Florfenicol					2*	8	32	1										0.50	0.50
Gentamicin						2	4	22	14	1								1.00	2.00
Imipenem				7	29	7												0.12	0.25
Marbofloxacin	1*	6	1				2	15	1	2	15							1.00	8.00
Nalidixic Acid							4	3	1					2	25	8*		128.00	≥256.00
Neomycin								8	17	15		1			2*			2.00	4.00
Penicillin						5	5	7	7	5	12		1	1*				2.00	8.00
Streptomycin									1	14	13	13		2				8.00	16.00
Tetracycline							15	8		1	1	5	11	1	1			1.00	32.00
Tiamulin								1	1	8	13	8	11	1				8.00	32.00
Tilmicosin									3	3	14	11	10	1	1			16.00	32.00
Trimethoprim/Sulfamethoxazole ^b		11*	13	5	2	1	1		9				1					0.03	2.00
Tulathromycin									2	6	17	16	1		1*			4.00	8.00

^a Data refer to the concentration of amoxicillin; ^b Data refer to the concentration of trimethoprim; * Isolates with MIC values equal to or above/below the tested concentration range.

Table 4: Number of isolates screened for resistance genes and quantity of resistance genes detected.

Antimicrobial agent	MIC (µg/ml)	Quantity of isolates tested	Resistance genes tested	Resistance genes detected (number of isolates)
Aminoglycosides				
Gentamicin	≥2	15	<i>aac(3)-I, aac(3)-IV, aac(6')-Ib, ant(2'')-I</i>	
Streptomycin	64	2	<i>strA, strB, aadA1, aadA2</i>	
β-lactams				
Penicillin	≥32	2	<i>bla_{BOR-1}, bla_{OXA-1}, bla_{OXA-2}, bla_{ROB}, bla_{TEM}, bla_{SHV}</i>	<i>bla_{TEM}</i> (2)
Folate pathway inhibitors				
Trimethoprim*	32	1	<i>dfrA1/15/16, dfrA5/14, dfrA7/17, dfrB1/2/3</i>	<i>dfrA5/14</i> (1)
Sulfamethoxazole*	608	1	<i>sul1, sul2, sul3</i>	<i>sul2</i> (1)
Quinolones and derivates				
Ciprofloxacin	≥0.5	35	<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	
Enrofloxacin	≥0.5	35	<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	
Marbofloxacin	≥0.5	35	<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	
Nalidixic Acid	≥64	35	<i>qnrA, qnrB, qnrC, qnrD, qnrS, aac(6')-Ib-cr</i>	
Tetracyclines				
Doxycycline	≥2	21	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(L), tet(M), tet(O)</i>	<i>tet(B)</i> (15), <i>tet(H)</i> (5)
Tetracycline	≥8	19	<i>tet(A), tet(B), tet(C), tet(D), tet(E), tet(G), tet(H), tet(L), tet(M), tet(O)</i>	<i>tet(B)</i> (15), <i>tet(H)</i> (5)

* refers to the MIC of the combination drug trimethoprim/sulfamethoxazole

Supplemental Material

Table S1: PCR primers used in this study for the detection of antimicrobial resistance genes

Gene	Primers	Fragment size	Reference
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	fw: 5' - ttg cga tgc tct atg agt ggc ta - 3' rv: 5' - ctc gaa tgc ctg gcg tgt tt - 3'	482 bp	(1)
<i>bla_{BOR-1}</i>	fw: 5' - acg aac gct ttc cga tgt g - 3' rv: 5' - ttc tgc cag cac agc att c - 3'	650 bp	(2)
<i>bla_{OXA-1-like}</i>	fw: 5'-ggcacc aga ttc aac ttt caa g-3' rv: 5'-gac ccc aag ttt cct gta agt g-3'	564 bp	(3)
<i>bla_{OXA-2}</i>	fw: 5' - aag aaa cgc tac tcg cct gc - 3' rv: 5' - cca ctc aac cca tcc tac cc - 3'	478 bp	(4)
<i>bla_{ROB}</i>	fw: 5' - tgt tgc aat cgc tgc c - 3' rv: 5' - tta tcg tac act ttc ca - 3'	400 bp	(5)
<i>bla_{SHV}</i>	fw: 5'-agc cgc ttg agc aaa tta aac-3' rv: 5'-atc ccg cag ata aat cac cac-3'	713 bp	(3)
<i>bla_{TEM}</i>	fw: 5'-cat ttc cgt gtc gcc ctt att c-3' rv: 5'-cgt tca tcc ata gtt gcc tga c-3'	800 bp	(3)
<i>dfrA1/15/16</i>	fw: 5' - gat att cca tgg agt gcc a - 3' rv: 5' - acc ctt ttg cca gat ttg - 3'	414 bp	(6)
<i>dfrA5/14</i>	fw: 5' - gat tgg ttg cgg tcc a - 3' rv: 5' - ctc aaa aac aac ttc gaa gg - 3'	383 bp	(6)
<i>dfrA7/17</i>	fw: 5' - cag aaa atg gcg taa tcg - 3' rv: 5' - tca cct tca acc tca acg - 3'	345 bp	(6)
<i>dfrB1/2/3</i>	fw: 5' - caa agt agc gat gaa gcc a - 3' rv: 5' - cag gat aaa ttt gca ctg agc - 3'	205 bp	(6)
<i>florR</i>	fw: 5' - agg gtt gat tcg tca tga cca - 3' rv: 5' - cgg tta gac gac tgg cga ct - 3'	752 bp	(7)
<i>qnrA</i>	fw: 5' - tca gca aga gga ttt ctc a - 3' rv: 5' - ggc agc act atg act ccc a - 3'	627 bp	(7)
<i>qnrB</i>	fw: 5' - tcg gct gtc agt tct atg atc g - 3' rv: 5' - tcc atg agc aac gat gcc t - 3'	496 bp	(8)
<i>qnrC</i>	fw: 5' - ggg ttg tac att tat tga atc - 3' rv: 5' - tcc act tta cga ggt tct - 3'	447 bp	(9)
<i>qnrD</i>	fw: 5' - cga gat caa ttt acg ggg aat a - 3' rv: 5' - aac aag ctg aag cgc ctg - 3'	582 bp	(10)
<i>qnrS</i>	fw: 5' - tga tct cac ctt cac cgc ttg - 3' rv: 5' - gaa tca gtt ctt gct gcc agg - 3'	566 bp	(8)
<i>strA</i>	fw: 5' - tga ctg gtt gcc tgt cag agg c - 3' rv: 5' - cca gtt gtc ttc ggc gtt agc a - 3'	646 bp	(11)
<i>strB</i>	fw: 5' - atc gtc aag gga ttg aaa cc - 3' rv: 5' - gga tcg tag aac ata ttg gc - 3'	509 bp	(12)
<i>sul1</i>	fw: 5' - cta ggc atg atc taa ccc tcg gtc t - 3' rv: 5' - atg gtg acg gtg ttc ggc att ctg a - 3'	840 bp	(13)
<i>sul2</i>	fw: 5' - aca gtt tct ccg atg gag gcc g - 3' rv: 5' - ctc gtg tgt gcg gat gaa gtc a - 3'	704 bp	(14)
<i>sul3</i>	fw: 5' - gag caa gat ttt tgg aat cg - 3' rv: 5' - cat ctg cag cta acc tag ggc ttt gga - 3'	789 bp	(15)
<i>tet(A)</i>	fw: 5' - gct aca tcc tgc ttg cct tc - 3' rv: 5' - cat aga tcg ccg tga aga gg - 3'	210 bp	(16, 17)
<i>tet(B)</i>	fw: 5' - gta atg ggc caa taa cac cg - 3' rv: 5' - ttg gtt agg ggc aag ttt tg - 3'	659 bp	(16, 18)
<i>tet(C)</i>	fw: 5' - ctt gag agc ctt caa ccc ag - 3' rv: 5' - atg gtc gtc atc tac ctg cc - 3'	418 bp	(16, 18)
<i>tet(D)</i>	fw: 5' - aaa cca tta cgg cat tct gc - 3' rv: 5' - gac cgg ata cac cat cca tc - 3'	787 bp	(16, 18)
<i>tet(E)</i>	fw: 5' - aaa cca cat cct cca tac gc - 3' rv: 5' - aaa tag gcc aca acc gtc ag - 3'	278 bp	(16, 19)
<i>tet(G)</i>	fw: 5' - cag ctt tcg gat tct tac gg - 3'	844 bp	(16, 20)

	rv: 5' - gat tgg tga ggc tcg tta gc - 3'		
<i>tet</i> (H)	fw: 5' - cct gaa aac caa act gcc tc 3'	526 bp	(16, 21)
	rv: 5' - aca gac cat ccc aat aag cg - 3'		
<i>tet</i> (L)	fw: 5' - gtt gcg cgc tat att cca aa - 3'	788 bp	(22)
	rv: 5' - tta agc aaa ctc att cca gc - 3'		
<i>tet</i> (M)	fw: 5' - gtt aaa tag tgt tct tgg ag - 3'	657 bp	(22)
	rv: 5' - cta aga tat ggc tct aac aa - 3'		
<i>tet</i> (O)	fw: 5' - gat ggc ata cag gca cag ac - 3'	634 bp	(22)
	rv: 5' - caa tat cac cag agc agg ct - 3'		

References

- Mabilat C, Lourençao-Vital J, Goussard S, Courvalin P. 1992. A new example of physical linkage between Tn1 and Tn21: the antibiotic multiple-resistance region of plasmid pCFF04 encoding extended-spectrum beta-lactamase TEM-3. *Mol Gen Genet* 235 (1):113–21.
- Prüller S, Rensch U, Meemken D, Kaspar H, Kopp PA, Klein G, Kehrenberg C. 2015. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from swine and companion animals and detection of resistance genes. *PLoS One* 10 (8).
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 65 (3):490–495.
- Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. 2002. Identification of PSE and OXA beta-lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 50 (1):11–8.
- San Millan A, Escudero JA, Catalan A, Nieto S, Farelo F, Gibert M, Moreno MA, Dominguez L, Gonzalez-Zorn B. 2007. Beta-lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing bla_{ROB}-1. *Antimicrob Agents Chemother* 51 (6):2260–4.
- Frech G, Kehrenberg C, Schwarz S. 2003. Resistance phenotypes and genotypes of multiresistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium var. Copenhagen isolates from animal sources. *J Antimicrob Chemother* 51 (1):180–2.
- Kadlec K, Kehrenberg C, Schwarz S. 2007. Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. *J Antimicrob Chemother* 59 (2):191–6.
- Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Michael GB, Schwarz S. 2006. Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J Antimicrob Chemother* 58 (1):18–22.
- Wang M, Guo Q, Xu X, Wang X, Ye X, Wu S, Hooper DC, Wang M. 2009. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (5):1892–7.
- Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. 2009. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and

- Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother* 53 (2):603–8.
11. Kehrenberg C, Schwarz S. 2001. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol* 205 (2):283–290.
 12. Scholz P, Haring V, Wittmann-Liebold B, Ashman K, Bagdasarian M, Scherzinger E. 1989. Complete nucleotide sequence and gene organization of the broad-host-range plasmid RSF1010. *Gene* 75 (2):271–88.
 13. Walker RA, Lindsay E, Woodward MJ, Ward LR, Threlfall EJ. 2001. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. *Microb Drug Resist* 7 (1):13–21.
 14. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. 2004. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. *J Antimicrob Chemother* 53 (2):208–16.
 15. Perreten V, Boerlin P. 2003. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (3):1169–72.
 16. Fonseca EL, Mykytczuk OL, Asensi MD, Reis EM, Ferraz LR, Paula FL, Ng LK, Rodrigues DP. 2006. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 44 (8):2767–72.
 17. Mendez B, Tachibana C, Levy SB. 1980. Heterogeneity of tetracycline resistance determinants. *Plasmid* 3 (2):99–108.
 18. Marshall B, Tachibana C, Levy SB. 1983. Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose-fermenting coliforms. *Antimicrob Agents Chemother* 24 (6):835–40.
 19. Marshall B, Morrissey S, Flynn P, Levy SB. 1986. A new tetracycline-resistance determinant, class E, isolated from *Enterobacteriaceae*. *Gene* 50 (1-3):111–7.
 20. Zhao J, Aoki T. 1992. Nucleotide sequence analysis of the class G tetracycline resistance determinant from *Vibrio anguillarum*. *Microbiol Immunol* 36 (10):1051–60.
 21. Hansen LM, McMurry LM, Levy SB, Hirsh DC. 1993. A new tetracycline resistance determinant, Tet H, from *Pasteurella multocida* specifying active efflux of tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother* 37 (12):2699–705.
 22. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* 37 (2):127–37.

Table S2: Biochemical test results of 43 *Av. gallinarum* isolates.

Isolate ID	Acid from:				Catalase	Growth on MacConkey agar	Hemolysis	Symbiotic growth
	D(-)-Mannitol	D(+)-Maltose	ONPG	D-Sorbitol				
<i>Av. gallinarum</i> (23)	-	+	v	not specified	+	not specified	not specified	-
<i>Av. gallinarum</i> (24)	-	+	v	-	+	-	-	-
<i>Av. gallinarum</i> CCUG 12391 ^T	-	+	-	-	+	-	-	-
2	-	+	+	-	+	-	-	-
3	-	+	+	-	+	-	-	-
4	-	+	-	-	+	-	-	-
5	-	+	+	-	+	-	-	-
6	-	+	+	-	+	-	-	-
7	-	+	+	-	+	-	-	-
8	-	+	+	-	+	-	-	-
9	-	+	+	-	+	-	-	-
10	-	+	+	-	+	-	-	-
11	-	+	+	-	+	-	-	-
12	-	+	+	-	+	-	-	-
13	-	+	-	-	+	-	-	-
14	-	+	+	-	+	-	-	-
15	-	+	+	-	+	-	-	-
16	-	+	-	-	+	-	-	-
17	-	+	-	-	+	-	-	-
18	-	+	+	-	+	-	-	-
19	-	+	-	-	+	-	-	-
20	-	+	+	-	+	-	-	-
21	-	+	+	-	+	-	-	-
22	-	+	+	-	+	-	-	-
23	-	+	+	-	+	-	-	-
24	-	+	+	-	+	-	-	-
25	-	+	+	-	+	-	-	-
26	-	+	+	-	+	-	-	-
27	-	+	-	-	+	-	-	-
28	-	+	+	-	+	-	-	-
29	-	+	+	-	+	-	-	-
30	-	+	+	-	+	-	-	-
31	-	+	+	-	+	-	-	-
32	-	+	-	-	+	-	-	-
33	-	+	-	-	+	-	-	-
34	-	+	-	-	+	-	-	-
35	-	+	-	-	+	-	-	-
36	-	+	-	-	+	-	-	-
37	-	+	-	-	+	-	-	-
38	-	+	-	-	+	-	-	-
39	-	+	-	-	+	-	-	-
40	-	+	-	-	+	-	-	-
41	-	+	-	-	+	-	-	-
42	-	+	-	-	+	-	-	-
43	-	+	-	-	+	-	-	-

References:

23. Hall WJ, Heddleston KL, Legenhausen DH, Hughes RW. 1995. Studies on pasteurellosis. I. A new species of *Pasteurella* encountered in chronic fowl cholera. *Am J Vet Res* 16 (61 Part 1):598–604.
24. Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55 (Pt 1):353–362.

Table S3: Homogeneity of MICs ($\mu\text{g/ml}$) obtained in Cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB) after 20 h of incubation at $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Antimicrobial agent ^a	Incubation time 20 h									Exact MIC agreement (%) ^c	Essential MIC agreement (%) ^d
	Deviation from MIC mode ^b										
	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4		
AMC				2	11	2				73.33	100.0
AMP				3	11	1				73.33	100.0
XNL					15*					100.00	100.0
CFP					14*	1				93.33	100.0
CTX				1*	13*	1				86.67	100.0
CQN					15*					100.0	100.0
CEF			1*	1*	11	2				73.33	93.33
CIP				3	11	1				73.33	100.0
CST				3	12					80.00	100.0
DOX					13	2				86.67	100.0
ENRO				1	12	2				80.00	100.0
FFN					15					100.0	100.0
GEN		1*		2	10*		2			66.67	80.00
IPM				3	9	3				60.00	100.0
MAR				1	11	3				73.33	100.0
NAL			1		14*					93.33	93.33
NEO	1*	1*		1	11	1				73.33	86.67
PEN			1	1	9	4				60.00	93.33
STR	1*			1	9	3		1		60.00	86.67
TET			1*	1	12	1				80.00	93.33
TIA				3	11	1				73.33	100.0
TIL				1	13	1				86.67	100.0
SXT				3*	11	1				73.33	100.0
TUL			1	1	11	2				73.33	93.33

^a AMC, amoxicillin-clavulanic acid; AMP, ampicillin; XNL, ceftiofur; CFP, cefoperazone; CTX, cefotaxime; CQN, cefquinome; CEF, cephalotin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MAR, marbofloxacin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TIA, tiamulin; TIL, tilmicosin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TUL, tulathromycin.

^b Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are in the gray area.

^c Exact MIC agreement includes MICs that corresponded to the MIC mode.

^d Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of reference MICs.

* Number of isolates with MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table S4: Homogeneity of *Av. gallinarum* MIC values ($\mu\text{g/ml}$) obtained in CAMHB plus 1% chicken serum and 0.0025% NADH after 24 h of incubation.

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^b						Exact MIC agreement (%)	Essential MIC agreement (%) ^c	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
AMC		1*	2	18	4			72	96
AMP		1	5*	15	4			60	96
XNL			2	23*				92	100
CFP			1*	20*	4			80	100
CTX				24*	1			96	100
CQN		1	3*	18*	3			72	96
CEF			5*	16	4			64	100
CIP				23*	2			92	100
CST			6	17	2			68	100
DOX			1	20	4			80	100
ENRO			1*	19*	5			76	100
FFN			2	21*	2			84	100
GEN			4*	17	4			68	100
IPM			5	18	2			72	100
MAR		1*	2*	20	2			80	96
NAL			4	19*	2			76	100
NEO			4	21				84	100
PEN		1	4	18	2			72	96
STR				22	3			88	100
TET			4	21				84	100
TIA			5	17	3			68	100
TIL			3	18	4			72	100
SXT				22*	3			88	100
TUL			5	16	4			64	100

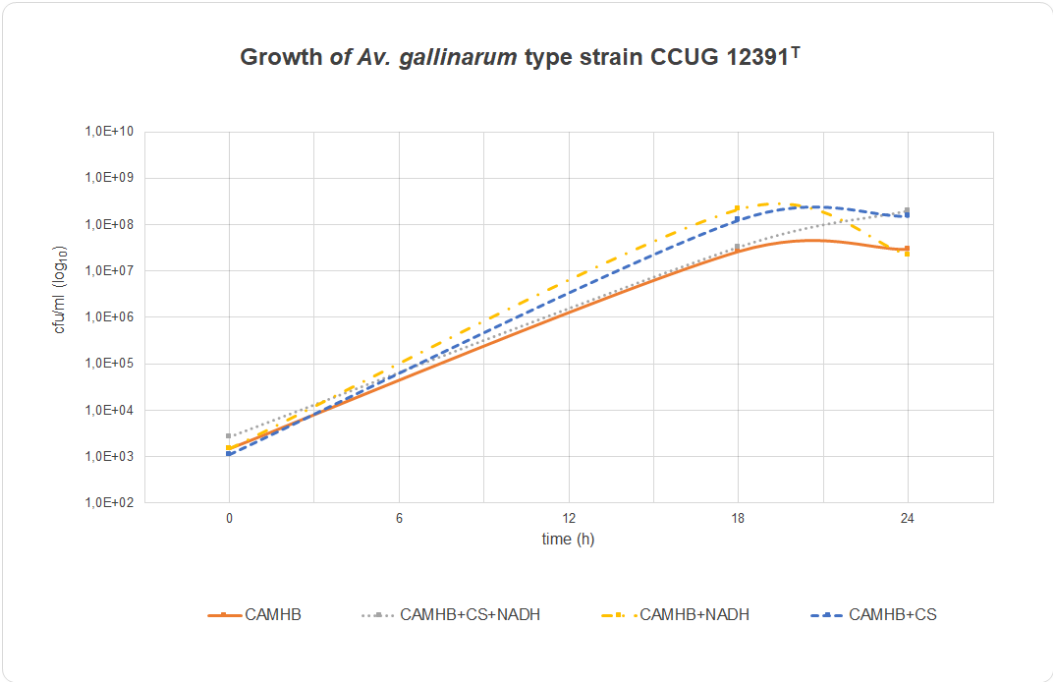
^a AMC, amoxicillin-clavulanic acid ratio 2:1; AMP, ampicillin; XNL, ceftiofur; CFP, cefoperazone; CTX, cefotaxime; CQN, cefquinome; CEF, cephalotin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MAR, marbofloxacin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TIA, tiamulin; TIL, tilmicosin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole ratio 1:19; TUL, tulathromycin

^b Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are in the gray area.

^c Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution steps of reference MICs.

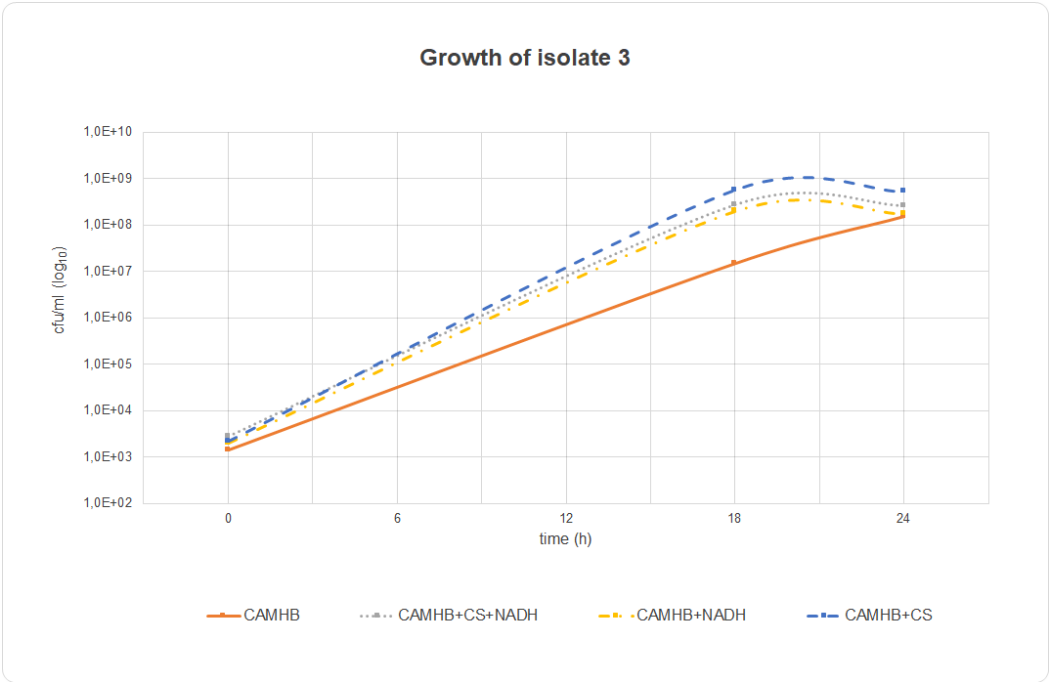
* Number of recorded MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Figure S1



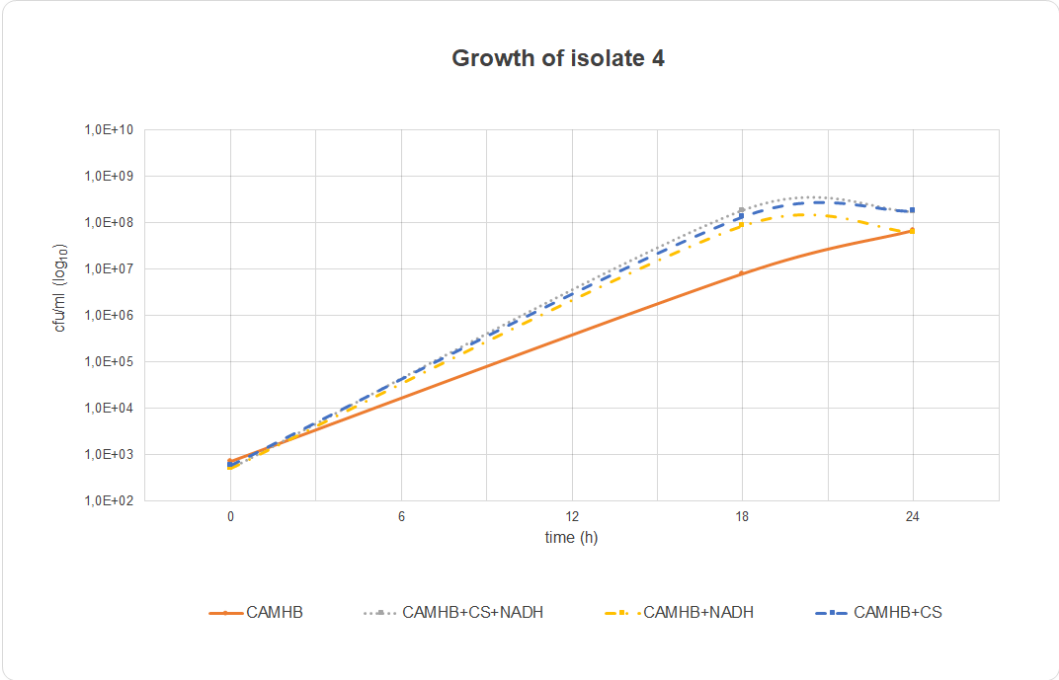
Viable counts (log₁₀ cfu/ml) of *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T grown in four different media.

Figure S2



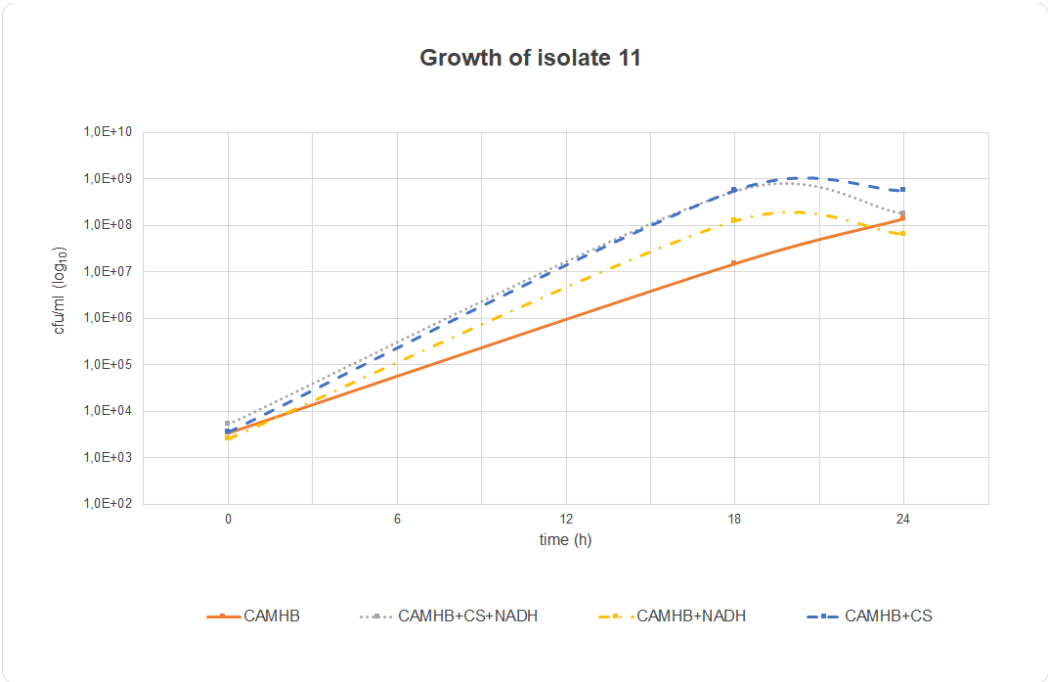
Viable counts (log₁₀ cfu/ml) of *Av. gallinarum* field isolate no. 3 grown in four different media.

Figure S3



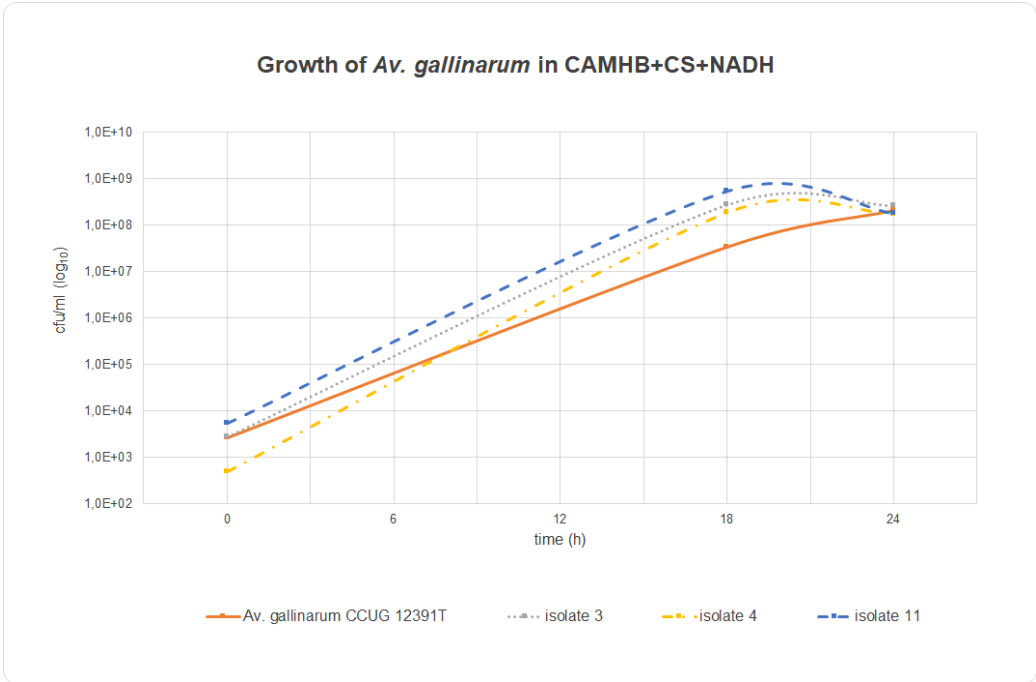
Viable counts (log₁₀ cfu/ml) of *Av. gallinarum* field isolate no. 4 grown in four different media.

Figure S4



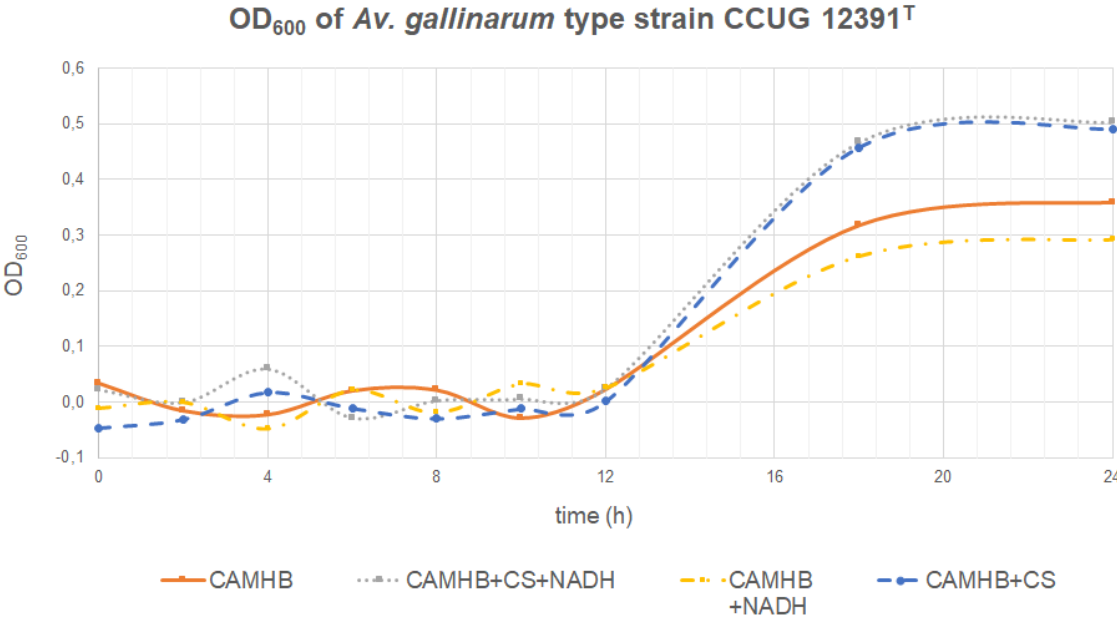
Viable counts (log₁₀ cfu/ml) of *Av. gallinarum* field isolate no. 11 grown in four different media.

Figure S5



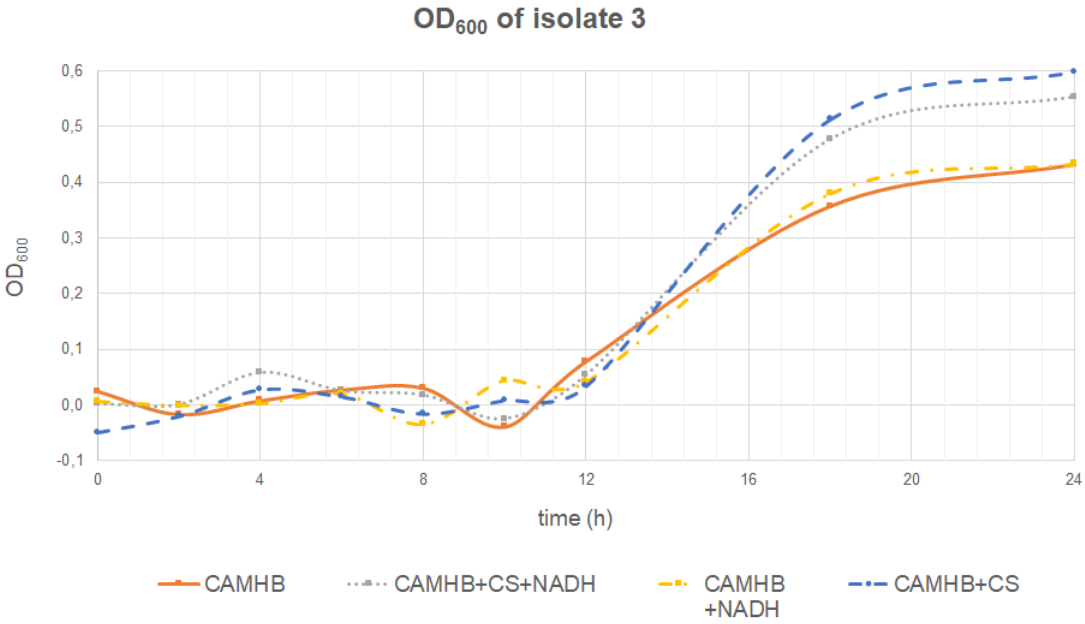
Viable counts (log₁₀ cfu/ml) of four *Av. gallinarum* isolates grown in CAMHB plus 1% heat inactivated chicken serum and 0.0025% NADH (CAMHB+CS+NADH).

Figure S6



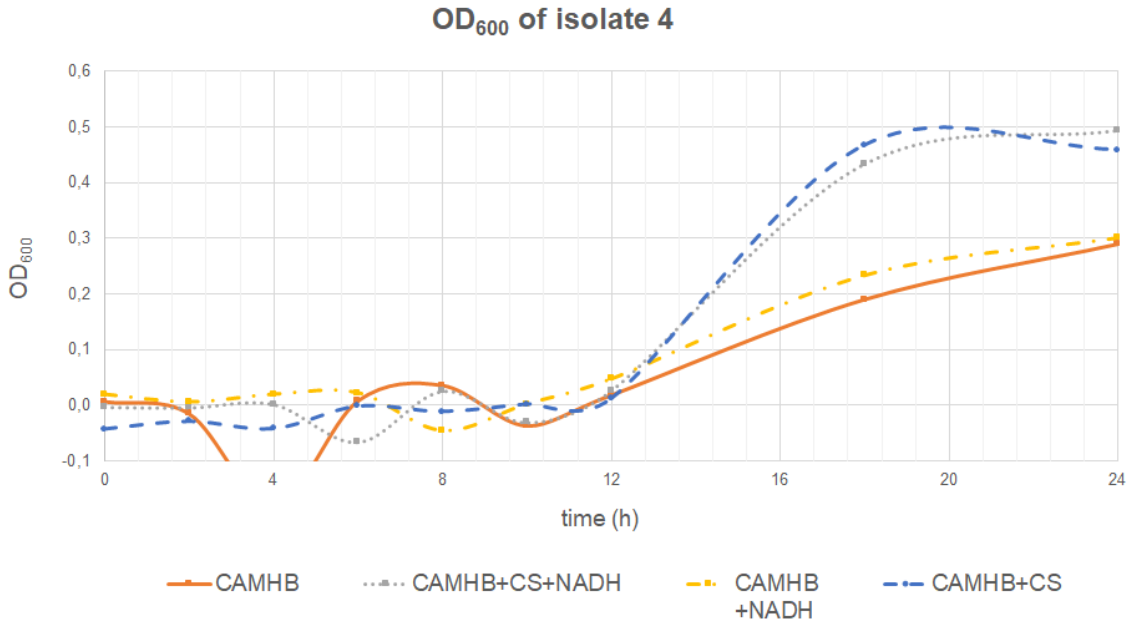
Optical density (600 nm) of *Av. gallinarum* type strain CCUG 12391^T grown in four test media.

Figure S7



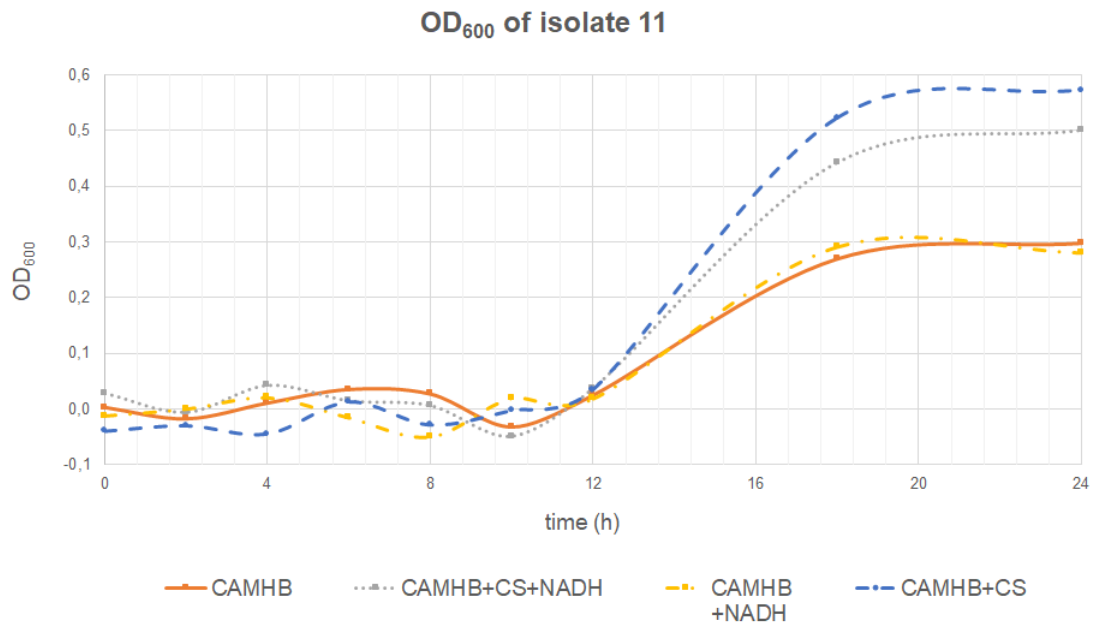
Optical density (600 nm) of *Av. gallinarum* isolate no. 3 grown in four test media.

Figure S8



Optical density (600 nm) of *Av. gallinarum* isolate no. 4 grown in four test media.

Figure S9



Optical density (600 nm) of *Av. gallinarum* isolate no. 11 grown in four test media.

Author contributions

Conceptualization	CK
Funding acquisition	CK
Project administration	CK
Data curation	FG , CK
Resources	AJ, AH, CK
Formal analysis	FG , AM, YC
Investigation	FG , AM, YC
Methodology	FG , AM, YC, AJ, FK, AH, MY, CK
Validation	FG , AM, YC
Supervision	CK
Writing – original draft	FG , YC, CK
Writing – review and editing	FG , AM, YC, AJ, FK, AH, MY, CK

Publikation 3

Gütgemann F, Müller A, Churin Y, Kumm F, Braun AS, Yue M, Eisenberg T, Entorf M, Peters T, Kehrenberg C. Toward a method for harmonized susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* by broth microdilution. J Clin Microbiol. 2023 Aug 23;61(8):e0190522.

doi: 10.1128/jcm.01905-22

Copyright notice

Used with permission of American Society for Microbiology – Journals.

Permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Toward a method for harmonized susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* by broth microdilution

Franziska Gütgemann¹, Anja Müller¹, Yury Churin¹, Franziska Kumm¹; Ann S Braun¹; Min Yue^{2,3}; Tobias Eisenberg⁴; Monika Entorf⁵; Thomas Peters⁵; Corinna Kehrenberg^{1*}

¹Institute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 92, 35392 Giessen, Germany

²Institute of Preventive Veterinary Science and Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou 310058, China

³Hainan Institute of Zhejiang University, Sanya 572025, China

⁴Hessian State Laboratory, Department of Veterinary Medicine, Giessen, Germany

⁵Dairy Herd Consulting and Research Company (MBFG), Wunstorf, Germany

*Corresponding author

E-Mail: corinna.kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de

Keywords: CLSI; MIC values; *Mycoplasma bovis*; SP4 broth; antimicrobial susceptibility testing; broth microdilution; quality control; standardization

Mycoplasma (M.) bovis is a fastidious pathogen of cattle causing massive economic losses in the calf and dairy industries worldwide. Since there is no approved standard method for antimicrobial susceptibility testing (AST) of *M. bovis*, the Clinical and Laboratory Standards Institute has requested the development of a suitable method. Therefore, this study aimed at developing a method for harmonized broth microdilution AST of *M. bovis*. For this, 131 *M. bovis* field isolates and *M. bovis* DSM 22781^T were collected and macrorestriction analysis was performed to select 15 epidemiologically unrelated *M. bovis* for method validation steps. To select a suitable broth for AST of *M. bovis*, growth determinations were performed using five media and growth curves were compiled. Then, susceptibility testing was performed considering the exact (precondition of five identical MICs) and essential (MIC mode accepting a deviation of ± 1 dilution step) MIC agreements to evaluate the reproducibility of MIC values and using a panel of 16 antimicrobial agents. Subsequently, the remaining field isolates were tested and the suitability of QC strains was assessed. Growth experiments showed that the SP4 broth was the only of the five media that yielded sufficient growth of *M. bovis*. Therefore, it was selected as the test medium for AST and homogeneous MIC values were obtained (exact and essential agreements of 36 – 100% and 92 – 100%, respectively). For all other isolates tested, easy-to-read MIC endpoints were determined with this medium. High overall MIC₅₀ and/or MIC₉₀ values were observed for aminoglycosides and macrolides and some isolates showed elevated MICs of fluoroquinolones, gentamicin and/or tiamulin. Since the MICs of four commonly used QC strains were partially not within their ranges, a twenty-fold MIC testing of *M. bovis* DSM 22781^T was performed and met the criteria for a new QC strain. For harmonized AST of *M. bovis*, the SP4 broth seems to be suitable with an incubation time of 72 \pm 2 h and further validation of *M. bovis* DSM 22781^T as a future QC strain is recommended.

Introduction

As a highly contagious member of the *Mollicutes* class, *Mycoplasma (M.) bovis* (also referred to as *Mycoplasma bovis*) plays a major role in threatening the health of cattle herds of all ages and types (1, 2). The spread of the pathogen in the cattle industry is mainly promoted by the purchase of latently infected cattle, which are then transported either internationally or domestically (1, 2). Infected cattle may develop mastitis, joint inflammation, keratoconjunctivitis, endocarditis, salpingitis and endometritis (2, 3). Moreover, *M. bovis*, in combination with other bacterial (e.g., *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*) or viral (e.g., BRSV, PI3V, BVDV) infections, is also associated with the bovine respiratory disease (BRD) complex in calves (4, 5). As a result, *M. bovis* leads to substantial financial losses in the dairy and meat industries and poses a serious animal welfare concern (2, 6).

Due to the unique characteristics of mycoplasmas (e.g., lack of a cell wall), *M. bovis* is intrinsically resistant to various antimicrobial agents such as β -lactams or glycopeptides targeting the cell wall or to sulfonamides, trimethoprim, polymyxins, first-generation quinolones, and rifampicin (7 – 11). Therefore, only a few classes of antimicrobials (e.g., fluoroquinolones, macrolides, tetracyclines) can be considered for antimicrobial treatment of cattle suffering from bovine mycoplasmosis (1, 9, 11). In addition, increasing reports of antimicrobial resistance (AMR) (e.g., to enrofloxacin or tilmicosin) over the past two decades also raise concerns about limited antimicrobial therapy options for *M. bovis* infections (2, 7, 12). Selection of an appropriate antimicrobial agent for therapy is further complicated by the fact that the pathogen has challenging growth requirements, making isolation and antimicrobial susceptibility testing (AST) difficult. For example, the usual inoculum settings (e.g., direct colony suspension method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) supplement VET01S) are unsuitable for *M. bovis*, because the detection of growth based on turbidity in broth is problematic (7). In addition, there are currently no clinical breakpoints for the pathogen that allow interpretation of susceptibility testing. Although Hannan (2000) provided general guidelines for AST of veterinary mycoplasmas using color indicator systems (13), the AST methods used so far for testing *M. bovis* vary enormously (8, 12). More precisely, previous studies have used a wide variety of test parameters (e.g., different media, indicator systems, incubation conditions) that can have a significant impact on the results and, thus, on the minimal inhibitory

concentrations (MIC) determined (14 – 17). This casts doubts on the comparability of data from different studies. Although the CLSI already provides methods for AST of human mycoplasmas (18), there is a lack of methods for harmonized AST for mycoplasmas from animals. Thus, the CLSI has requested the development of methods for AST of veterinary important mycoplasma species (19).

Hence, the objective of this study was to respond to this request and to develop a suitable method for harmonized broth microdilution susceptibility testing for the fastidious bovine pathogen *M. bovis*. This method should preferably be based on media and conditions available in CLSI documents and development steps should include testing of QC strains and of a larger number of epidemiologically unrelated *M. bovis* isolates.

Material and methods

***M. bovis* type strain and field isolate collection, culturing and species confirmation**

A total of 131 *M. bovis* field isolates isolated between 2015 and 2021 from dairy cows (n=119) or calves (n=12) was examined in this study (Table 1). The farms were located in ten different federal states in Germany and the isolates were collected on the basis of one isolate per year and farm. In addition, the *M. bovis* type strain DSM 22781^T (synonym ATCC 25523 and Donetta PG45) was acquired from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). Culturing of *M. bovis* in a liquid medium was done in SP4 broth, while SP4 agar plates were used as solid culturing medium. Media were prepared according to CLSI instructions (18) using a 1% solution of the pH indicator phenol red (v/v) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). A color change from red to yellow indicated growth of *M. bovis*. Isolates grown on SP4 agar plates using single colonies were macroscopically visible as delicate colonies after incubation for 48 – 94 h at 37 °C in an atmosphere with 5% CO₂, but were additionally examined under a light microscope (40x) (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) for a better assessment of the colony morphology. A previously described PCR assay with slightly modified primers (forward 5'-ggattggatcaactgctggatat -3'; reverse 5'- agatgctccacttatcttagttcaat -3') was used for species confirmation of all *M. bovis* isolates (20).

Determination of the clonality of isolates by macrorestriction analysis

To select 15 epidemiologically unrelated *M. bovis* isolates for further steps in method validation, the epidemiological relatedness of 58 *M. bovis* field isolates and *M. bovis* DSM 22781^T was examined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). As there is no harmonized PFGE protocol for *M. bovis*, the procedure was based on a previously described protocol for *Escherichia coli*, *Salmonella* serotypes and *Shigella* spp. (21). For this, DNA from *M. bovis* isolates was digested with the restriction enzyme SmaI (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) and separated in a CHEF DR II system (BioRad, Munich, Germany) at 6 volts for 20 h with a starting time of 5 s and final time of 25 s. As a size marker, XbaI-digested DNA of *Salmonella* Typhimurium LT2 was used. Band patterns were analyzed using BioNumerics software (version 7.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). For UPGMA cluster analysis, the Dice coefficient was set at an optimization of 0.5% and a position tolerance of 1%.

Colony count determination and inoculum setting of *M. bovis*

The determination of *M. bovis* colony counts (cfu/ml) for inoculation of microtiter plates was performed according to CLSI document M43-A, Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing for Human Mycoplasmas, which contains a detailed description of the inoculum preparation (18). In brief, two loops (approximately 20 µl) of a *M. bovis* glycerol stock were inoculated into 4 ml of SP4 broth. The bacterial suspension was then incubated for 72 h at 37 °C in an incubator with air plus 5% CO₂. A volume of 100 µl of the suspension was then used to make a tenfold dilution series, while the rest of the suspension was frozen at -80 °C until the day of testing. However, the serial dilutions were prepared by pipetting 100 µl of the suspensions into 900 µl SP4 broth or (for growth experiments) into sterile 0.9% saline solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Then, 20 µl of each dilution level was spread onto pre-dried (1 h at 37 °C) SP4 agar plates. For this purpose, the agar plates were previously divided into six segments on their underside with a permanent marker and each dilution level was spread onto one segment of the plate. Care was taken that the pipette tips did not touch the agar surface during application and that the entire pipetting volume remained on the agar surface. Agar plates were then incubated inverted at 37 °C for 72 h in an incubator (air plus 5% CO₂). After inoculation, the colonies from agar plate segments containing 30 – 300 colonies were counted in a meandering pattern under a light microscope. The number of cfu/ml of the bacterial suspensions frozen at -80 °C was

then calculated using the following formula: number of colonies counted x 50 x dilution level (18).

Growth experiments with five broth media

To find a suitable broth medium for harmonized AST of *M. bovis*, preliminary growth experiments were conducted in three independent repetitions. For this, the visible growth of 15 epidemiologically unrelated *M. bovis* (*M. bovis* DSM 22781^T and 14 field isolates) was determined in the following five broth media already used for MIC determination of *M. bovis*: Eaton broth (22 – 24), Friis broth (25), modified Standard Mycoplasma broth (26, 27), modified PPLO medium (28) and SP4 broth (29) (Table S1). Among these media, the SP4 broth is already approved by the CLSI for testing *Mycoplasma (M.) pneumoniae* and is also suggested by the DSMZ as a suitable growth medium for *M. bovis* (18, 30). For these experiments, the frozen bacterial suspensions with known cfu/ml were preincubated in an incubator in ambient air (37 °C, 2 h) and adjusted to a colony count of approximately 10⁴ cfu/ml by dilution in sterile 0.9% saline. A volume of 100 µl of these solutions was then suspended in 900 µl of the respective medium to obtain a final inoculum concentration of approximately 10³ cfu/ml. A volume of 50 µl of these suspensions was then added into the wells of the sterile microtiter plates in duplicate (two wells). For quality control (negative control), six wells were filled with 50 µl of the culture medium not inoculated with bacteria. The microtiter plates were sealed with a self-adhesive film and incubated at 37 °C in ambient air. After 0, 24 (±2 h), 48 (±2 h), and 72 h (±2 h) of incubation, the wells were visually checked by the same person for a color change of the medium.

To determine colony counts of *M. bovis* in the five previously mentioned media, growth experiments with five isolates (*M. bovis* DSM 22781^T and field isolates no. 10, 33, 52 and 100) were conducted in three independent repetitions and growth curves were compiled. Briefly, bacterial suspensions were prepared as described above to achieve an initial inoculum density of approximately 10³ cfu/ml in 20 ml of the respective broth medium. The samples were then incubated at 37 °C in ambient air without shaking, and after 0, 24, 48, and 72 h of incubation, the colony counts were determined as described in the chapter colony count determination. Subsequently, multi-day growth curves were compiled using the three repetitions of the growth experiments. For this, the average cfu/ml and standard deviations for each measurement point were calculated using Microsoft Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Determination of MIC values and their homogeneity

Based on the growth data (testing for visible growth in microtiter plates and growth curves), the SP4 broth already approved by the CLSI for testing human mycoplasmas was selected as test medium for AST of *M. bovis*. In order to determine the reproducibility of MICs when using this broth, susceptibility testing with five unrelated test isolates (including the type strain and four field isolates selected for the growth experiments) in five independent repetitions was performed. Inoculum preparation, incubation conditions, and reading of endpoints followed the specifications of CLSI document M43-A (18). Two different microtiter plate layouts (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK) containing a total of 16 antimicrobial agents were used for this purpose. These antimicrobial agents included some with proven efficacy against mycoplasmas, but antimicrobial agents with known intrinsic resistance of *M. bovis* were also present on the microtiter plates (Tables 2 and 3).

For susceptibility testing, frozen *M. bovis* cultures with known cfu/ml were pre-incubated for 2 h at 37 °C in ambient air in an incubator according to CLSI document M43-A (18). The inoculum was then diluted in 900 µl SP4 broth to obtain a concentration of approximately 10^7 cfu/ml. From this dilution, 100 µl was pipetted into a volume of 19.9 ml SP4 broth to achieve a final inoculum of approximately $10^4 - 10^5$ cfu/ml, which was confirmed by colony count enumeration in duplicate. Using a multichannel pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 50 µl of these bacterial suspensions were then pipetted into each well of the microtiter plates. The inoculated microtiter plates were sealed with self-adhesive films (Sensititre) and incubated at 37 °C in ambient air. The plates were examined for a visible color change in both growth control wells after 24, 48 and 72 h of incubation (± 2 h) by the same person. Subsequently, the essential (MIC mode accepting a deviation of ± 1 dilution step) and exact MIC agreements (precondition of five identical MICs) were calculated.

To evaluate the suitability of the method for a larger set of epidemiologically unrelated *M. bovis*, the remaining field isolates were tested and MIC₅₀ and MIC₉₀ values of the *M. bovis* collection (n=132) were calculated. The MIC₅₀ value defines the lowest concentration of an antimicrobial agent at which 50% of the *M. bovis* isolates are inhibited. In contrast, the MIC₉₀ value defines the lowest concentration of an antimicrobial agent at which 90% of the *M. bovis* isolates are inhibited. Furthermore, inoculum controls and purity controls of the medium were performed for each test series.

Testing media components from different producers

In the repeated tests to determine the homogeneity of the MIC values and the testing of the *M. bovis* collection, media components from the following producers were used: fetal bovine serum (FBS; USA origin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), Bacto TC Yeastolate (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) and tryptone (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). To also test the suitability of media components from other producers, additional three independent repetitions of MIC testing were performed. Here, the media components were obtained from the following producers: FBS (EU origin, Biowest SAS, Nuaille, France), bacto TC yeastolate (Life Technologies Limited, Paisley, UK), and tryptone (Oxoid Limited, Basingstoke, UK). The MIC values obtained with media components from different producers were then compared.

Testing the suitability of approved quality control (QC) strains

The *M. pneumoniae* ATCC 29342 serves as QC strain for testing the human pathogenic mycoplasma species *M. pneumoniae* using SP4 broth and an incubation time of 96 – 144 h at 37 °C (18). However, as this human pathogenic mycoplasma species is extremely challenging for veterinary diagnostic laboratories (e.g., a stereomicroscope is required for detection of very small colonies, usually <100 µm) (31), it was tested whether less fastidious CLSI-approved QC strains or *M. bovis* DSM 22781^T could be used under these AST conditions.

Therefore, the QC strains *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (QC ranges have been established with cation-adapted Mueller-Hinton broth, CAMHB) and the more fastidious QC strain *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090, which is recommended for testing with Veterinary Fastidious Medium (VFM) or Mueller-Hinton Fastidious Broth Medium with Yeast Extract (MHF-Y) (32, 33), were used for MIC determinations under the conditions applied to *M. bovis*. These QC strains were tested five times independently, performing the direct colony suspension method for inoculum setting according to CLSI supplement VET01S (33). The MICs were read after the CLSI-recommended incubation time for the strains (20 and 24 h, respectively) as well as after 48 (±2 h) and 72 h (±2 h). It was then compared whether the achieved MIC values were still within the specified QC ranges (33). In addition, the *M. bovis* type strain DSM 22781^T was tested 20-times using the developed method to determine the homogeneity of MIC

values, which serves as a prerequisite for inclusion as a future QC strain according to CLSI guideline M23 (34).

Results

Clonality of *M. bovis* and selection of unrelated test isolates

A dendrogram based on the banding patterns of the *M. bovis* type strain DSM 22781^T and the 58 field isolates included in macrorestriction analysis is shown in Figure 1, illustrating their epidemiological relationship. Overall, banding patterns were very heterogeneous. Nevertheless, some isolates, partly from different isolation years and federal states, had indistinguishable banding patterns. Following Tenover et al. (1995) (35), a criterion of ≥ 7 band differences was used to define epidemiologically unrelated *M. bovis*, and based on the differences in band patterns as well as epidemiological data, 15 unrelated isolates were selected for further validation steps (Figure 1). Among them were type strain DSM 22781^T and four field isolates from different isolation years (2015, n=1; 2016, n=2; and 2019, n=1) and federal states (Bremen, Lower Saxony, Saxony-Anhalt and Schleswig-Holstein), which were used to compile growth curves and determine the homogeneity of MICs.

Growth behavior of *M. bovis* in five broth media

The results of the preliminary growth experiments demonstrated that visible growth of *M. bovis* is media- and time-dependent (Table S2). While only some of the 15 tested *M. bovis* showed growth (as indicated by a color change of the medium due to the addition of the pH indicator) in Friis broth (n=9), modified Standard Mycoplasma broth (n=9), modified PPLO medium (n=8), and Eaton broth (n=4) even after 72 h (± 2 h) of incubation, visible growth was observed for all tested *M. bovis* in SP4 broth. In SP4 broth, an incubation period of 72 h (± 2 h) was required before growth of all *M. bovis* could be detected, whereas only some of the isolates (n=7) showed growth after 48 h and none after 24 h. The readability of the color changes also varied with the media. When modified PPLO broth was used, a clear color change from red to yellow was detected for *M. bovis* growing in this medium. However, the difference between the negative controls and wells with color change was less pronounced when Friis and SP4 broth were used due to the naturally lighter color of the media. Nevertheless, with the exception of Eaton broth where color changes were hardly visible, positive results

for growth could be distinguished from negative ones using all media. Examples of the growth results using different media are shown in the Supplemental Material, Figure S1.

Growth curves with five unrelated *M. bovis* were then compiled in all aforementioned media, and growth was determined by colony counts in cfu/ml. As a result, the highest numbers of cfu/ml (approximately 10^7 to 10^9 cfu/ml) for all tested *M. bovis* were detected in SP4 broth after 72 h of incubation at 37 °C (Figures S2 – S6). At this time, growth of the five unrelated test isolates in the other four culture media was variable and 10^7 cfu/ml could not always be obtained, especially for the type strain *M. bovis* DSM 22781^T or when using the Eaton broth (Figures S2 – S6).

Broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *M. bovis*

Since the growth experiments gave promising results for the SP4 broth after an incubation time of 72 h at 37 °C and this medium is already recommended by the CLSI for testing human mycoplasmas (18), this medium was selected for further validation steps. Testing of homogeneity of MIC values in SP4 broth was then performed in five independent AST experiments using the full panel of 16 antimicrobial agents. Since the growth controls of some test isolates were negative (no visible color change) after 24 ± 2 h or 48 ± 2 h of incubation, the MICs were determined after 72 ± 2 h. At this time point, a color change was visible in all growth control wells. In addition, after 72 ± 2 h, there was also good readability of MIC endpoints, indicated by a color change from red to yellow in the case of *M. bovis* growth, which could be easily distinguished from wells without growth (red) (Figure S7). Four test isolates (*M. bovis* DSM 22781^T and nos. 10, 33, and 100) even formed distinct buttons at the bottom of microtiter plate wells, and these buttons were confirmed as *M. bovis* cells after culturing.

High essential MIC agreements between 92% and 100% (mean of 97%) and exact MIC agreements between 56% and 80% (mean of 66.33%) were obtained for almost all antimicrobials, as shown in Table 2. Only for streptomycin and tulathromycin, the exact MIC agreements were lower with 44% and 36%, respectively. As expected, the MICs of the antimicrobials colistin, imipenem, nalidixic acid, and trimethoprim/sulfamethoxazole, to which *M. bovis* is intrinsically resistant, were often above the tested drug concentration and thus were not included in the calculations.

Influence of medium additives from different producers

The suitability of media additives from different producers on MIC test results of *M. bovis* was investigated. The test results were in the same range as in the previous test series with a maximum deviation of one dilution step (Table S3). Thus, even with the inclusion of these data, high exact MIC agreements of 50 – 100% (mean of 71.41%) and essential MIC agreements of 90 – 100% (mean of 96.86%) were obtained.

Antimicrobial susceptibility of the *M. bovis* collection

The remaining 127 *M. bovis* field isolates of the isolate collection were tested. Under the test conditions, good readable MIC values could be obtained for all isolate and antimicrobial agent combinations. Most *M. bovis* (n=89) formed buttons at the bottom of the microtiter plates, allowing easy visual reading of MICs (Figure S8). Table 3 shows the MIC values of all 132 *M. bovis*, including calculated MIC₅₀ and MIC₉₀ values. However, as there are no approved clinical breakpoints for *M. bovis* yet, the isolates could not be classified as resistant, intermediate or susceptible to the 16 antimicrobial agents tested. An unimodal MIC distribution was found for florfenicol, whereas bimodal or multimodal distributions were observed for some antimicrobials and combinations tested, e.g., streptomycin, gentamicin or fluoroquinolones. However, because some isolates had MIC values outside the tested concentration ranges, it was not possible to characterize the MIC distributions for these antimicrobials as uni-, bi-, or multimodal. Of note were the MIC differences among the isolates for the antimicrobial agent tilmicosin, with two *M. bovis*, field isolate no. 91 and type strain DSM 22781^T, respectively, having MICs of ≤ 0.06 and $0.25 \mu\text{g/ml}$, while all other *M. bovis* exhibited MICs of $\geq 16 \mu\text{g/ml}$. In addition, a single isolate, no. 85, showed higher MIC values against all fluoroquinolones tested (ciprofloxacin $16 \mu\text{g/ml}$, enrofloxacin $16 \mu\text{g/ml}$ and marbofloxacin $\geq 32 \mu\text{g/ml}$). For the antimicrobial agents for which intrinsic resistance of *M. bovis* is known, very high MIC values were found, as expected (Table 3).

Quality control (QC) strains for MIC testing of *M. bovis*

To investigate whether established QC strains can also be used in SP4 broth, MIC values were determined under test conditions applied for *M. bovis*. Interpretation of results was based on the color change in the wells and additionally on a button formation and was evaluated visually by the same person. However, only a few of the MICs were within the specified MIC ranges after 16 – 20 h, 48 ± 2 h, or 72 ± 2 h (Tables

S4 – S7). So were *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090 within the MIC ranges for six antimicrobial agents (enrofloxacin, florfenicol, marbofloxacin, tetracycline, tiamulin, tilmicosin) and *S. aureus* ATCC 29213 for four (florfenicol, gentamicin, tiamulin, tilmicosin). In contrast, *E. coli* ATCC 25922 and *E. faecalis* ATCC 29212 were within the MIC ranges for only two antimicrobials (florfenicol, marbofloxacin and florfenicol, tulathromycin, respectively). Therefore, the suitability of *M. bovis* DSM 22781^T as a future QC strain for quality control purposes was tested according to CLSI guideline M23. For this, MICs were determined in 20 independent repetitions and results are presented in Table 4. All MICs showed maximum deviations between 2- and 4-dilution levels, meaning that this type strain meets the requirement for a QC strain according to the CLSI document (34). However, some MICs were outside the tested concentration range. This was the case for doxycycline, neomycin, streptomycin, and tetracycline, and also for antimicrobial agents, for which intrinsic resistance is known (colistin, imipenem, nalidixic acid, and trimethoprim/sulfamethoxazole), so that no MIC ranges can be established for these antimicrobial agents.

Discussion

Due to the high growth requirements of *M. bovis*, culturing and AST represent a practical as well as financial challenge for laboratories as special media must be used. However, since *M. bovis* is an important pathogen in cattle farms (2, 36), there are many reports of susceptibility testing of this highly fastidious pathogen, including by using agar dilution or broth microdilution (8). Some examples can be found in Rosenbusch et al. 2005, Gerchman et al. 2009, Hendrick et al. 2013, Ayling et al. 2014, Sulyok et al. 2014, Heuvelink et al. 2016, Klein et al. 2017 and 2019, Jelinski et al. 2020, Bokma et al. 2020, and Kinnear et al. 2020 (24, 27, 28, 37 – 44). But in the absence of harmonized methods for broth microdilution susceptibility testing of *M. bovis*, very different test conditions have been used. In addition to differences in initial inoculum concentrations and incubation conditions, more than ten different culture media with varying supplements (e.g., heat-inactivated or non-heat-inactivated animal sera, pH indicators and substrates for metabolism) were applied. A strong influence on the test results, especially when using a pH indicator to indicate growth, could also be caused by the differences in the originally set pH values of the media, which ranged from 7.2 to 7.8 (14 – 17, 45, 46). Therefore, harmonized test methods are needed in order to achieve comparable results. In addition, elevated MIC values of *M. bovis* to

mycoplasma-relevant antimicrobials such as aminoglycosides, fluoroquinolones, or macrolides have been reported (8, 44, 47 – 50), which makes the determination of the susceptibility of the pathogen to antimicrobial agents highly recommended prior to therapy of infections (12, 51).

Molecular typing of *M. bovis* in this study by macrorestriction analyses (although modern, sequence-based methods also exist), revealed a low evidence of clonality. This has previously been shown for *M. bovis* isolates from the United Kingdom as well (52). Growth experiments showed that although all tested media have been used previously for AST of *M. bovis*, sufficient growth ($\geq 10^7$ cfu/ml) of the unrelated test isolates was only detected in SP4 broth after 48 – 72 h of incubation at 37 °C. Thus, only this medium fulfilled the requirements according to the CLSI guideline M23 (34). SP4 broth was recently used by Josi et al. (2018) for AST of *M. bovis* and (29), in addition, Bürgi et al. 2018 were able to detect sufficient colony counts in SP4 broth after 24 – 36 h incubation of two swiss *M. bovis* strains (53). However, it was necessary to choose an extended incubation time to achieve visible growth of all *M. bovis*, as demonstrated in the growth experiments in the course of the present study. As the SP4 broth is already approved by the CLSI (18), this medium was selected for broth microdilution susceptibility testing of *M. bovis*. Thus, for diagnostic laboratories, it also has the great advantage that the same medium can be used for testing other mycoplasmas. Testing was performed according to the specifications (10^4 - 10^5 cfu/ml inoculum concentration, 37 °C incubation temperature) given in the CLSI document M43-A for testing human mycoplasmas (18) with SP4 broth and an incubation time of 72 ± 2 h. The calculated exact and essential MIC agreements of 36 – 80% and 92 – 100%, respectively, met the CLSI criterion of a target intermethod correlation of $\geq 90\%$ essential agreement (34). Therefore, MIC values appeared to be reproducible and the method suitable for further validation. Nevertheless, it is recommended that future validation steps of the proposed method include an inter-laboratory comparison study to test the reproducibility of MICs between laboratories. In addition, testing on a large number of isolates from different countries and continents should further demonstrate the suitability of the method.

Subsequently, it was tested whether SP4 medium components (FBS, tryptone, or yeastolate) from different producers may have an influence on MIC values. MIC values barely deviated from MIC ranges previously determined. Therefore, a very low influence of medium components from different producers on the MIC values was

assumed. These results are consistent with the findings of a multilaboratory study that found no differences in MICs of *M. pneumoniae* QC strains when comparing commercial and non-commercial SP4 broth (18).

For quality control purposes using the SP4 broth, the CLSI recommends the QC strain *M. pneumoniae* ATCC 29342 (18). However, because this highly fastidious strain requires a longer incubation time of 96 – 144 h compared to *M. bovis* (72 ± 2 h) and a stereomicroscope for colony counting (18), less demanding QC strains were tested to facilitate handling by veterinary laboratories. Since *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 29212, and *S. aureus* ATCC 29213 are routinely tested in other broth media (e.g. Mueller-Hinton broth) and not in SP4 broth (33), their MIC values were outside the approved MIC ranges for many antimicrobial agents, so that they did not appear to be suitable QC strains under the test conditions used for *M. bovis*. Similar observations were made in a study investigating the suitability of *E. faecalis* ATCC 29212 and *S. aureus* ATCC 29213 as QC strains for susceptibility testing of the porcine pathogen *M. hyorhinis* (54). Thus, the use of the common QC strains for mycoplasmas is not recommended. Therefore, it seems to be important to establish a new QC strain for susceptibility testing of *M. bovis* in the future, which is suitable for monitoring the entire procedure, including the challenging inoculum setting. For this purpose, the suitability of *M. bovis* DSM 22781^T was investigated. The MICs of all 16 agents met the minimum requirement of $\geq 95\%$ of the values within a range of up to four consecutive dilutions steps, according to CLSI guideline M23. Although the values cannot be assessed for all antimicrobials because they were outside the test range (particularly antimicrobials where there is known intrinsic resistance of the pathogen), MIC ranges could nevertheless be assessed for eight antimicrobials, including fluoroquinolones and macrolides, which are relevant for the treatment of *M. bovis* infections (2, 8, 50). In addition, there is no need to test additional concentration steps, as the QC-ranges were within the range of field isolates. MIC values for *M. bovis* DSM 22781^T obtained from other studies also confirmed the results (11, 27, 39, 40, 55). Further validation of this type strain as a new QC strain in future research is therefore highly recommended.

During susceptibility testing of the remaining *M. bovis* field isolates, MIC endpoints could be read easily from the color change of the medium and, for many isolates, by a button formation at the bottom of the microplate wells. Without approved breakpoints for *M. bovis*, it was not possible to classify these isolates as susceptible,

intermediate, or resistant. However, the breakpoints for *Pasteurellaceae* reported in CLSI supplement VET01S have been used previously to interpret the MICs of *M. bovis* (12, 33, 56, 57). However, because such a classification based on breakpoints for different bacterial species must be interpreted cautiously, the development of *M. bovis*-specific clinical breakpoints is an urgent need. Nevertheless, bimodal or broad MIC distributions as well as high MICs were observed for some agents (e.g., aminoglycosides, fluoroquinolones, and macrolides), indicating non-wild-type subpopulations with acquired AMR. Since these include antimicrobials frequently used to treat *M. bovis* infections in cattle (8), *M. bovis* with elevated MICs to these agents are of particular concern. A decrease in the susceptibility of *M. bovis* to these classes of antimicrobials is mostly based on mutations in the target genes (2, 7, 10, 12, 50).

When comparing the MIC values from this study with those from other studies, it is noticeable that there were significant differences, although the *M. bovis* were collected during similar time periods. For example, *M. bovis* collected between 2014 and 2020 from dairy, beef, mixed and veal farms showed lower MICs of the aminoglycoside antibiotics neomycin (MIC₅₀ = 0.5 µg/ml; MIC₉₀ = 2 µg/ml) and streptomycin (MIC₅₀ = 0.5 µg/ml; MIC₉₀ = 1 µg/ml) (28), whereas the *M. bovis* tested in this study exhibited much higher values (Table 3). Bokma et al. (2020) even pointed out that some MICs of *M. bovis* type strain PG45 differed from reported MICs for the same strain, although reference strains should be genetically stable over the long term (58). Therefore, in order to exclude influences of the susceptibility test method between studies and to carry out targeted therapy of infections, a harmonized AST method should be used for this important pathogen.

Conclusions

The SP4 broth is recommended as medium for broth microdilution susceptibility testing of *M. bovis*. Following the specifications given in CLSI document M43-A, reproducible and easily readable MICs of *M. bovis* were determined after 72 ±2 h incubation at 37 °C. However, it is recommended that a QC strain will be validated for testing, and based on the results of this study, *M. bovis* DSM 22781^T may be well suited for this purpose.

Acknowledgments

This study was financially supported by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) (grant number FKZ 2818HS015). The authors would like to thank Cornelia Dürrschmidt, Jan Paulus, Karin Simon, Katharina Engel and Claudia Walter for excellent technical assistance.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Nicholas RAJ, Fox LK, Lysnyansky I. 2016. *Mycoplasma* mastitis in cattle: To cull or not to cull. *Vet J* 216:142–147.
2. Dudek K, Nicholas RAJ, Szacawa E, Bednarek D. 2020. *Mycoplasma bovis* infections — occurrence, diagnosis and control. *Pathogens* 9(8):640.
3. Kanda T, Tanaka S, Suwanruengsri M, Sukmawinata E, Uemura R, Yamaguchi R, Sueyoshi M. 2019. Bovine endocarditis associated with *Mycoplasma bovis*. *J Comp Pathol* 171:53–58.
4. Arcangioli M-A, Duet A, Meyer G, Dernburg G, Bézille P, Poumarat F, Le Grand D. 2008. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Vet J* 177:89–93.
5. Pardon B, Callens J, Maris J, Allais L, Van Praet W, Deprez P, Ribbens S. 2020. Pathogen-specific risk factors in acute outbreaks of respiratory disease in calves. *J Dairy Sci* 103(3):2556–2566.
6. Gogoi-Tiwari J, Tiwari HK, Wawegama NK, Premachandra C, Robertson ID, Fisher AD, Waichigio FK, Irons P, Aleri JW. 2022. Prevalence of *Mycoplasma bovis* infection in calves and dairy cows in Western Australia. *Vet Sci* 11(7):351.
7. Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Le Grand D, Paoli A, Gay E, Poumarat F. 2014. Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France. *PLoS One* 9(2):e87672.
8. Lysnyansky I, Ayling RD. 2016. *Mycoplasma bovis*: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility. *Front Microbiol* 7:595.
9. Chernov VM, Chernova OA, Mouzykantov AA, Medvedeva ES, Baranova NB, Malygina TY, Aminov RI, Trushinet MV. 2018. Antimicrobial resistance in mollicutes: known and newly emerging mechanisms. *FEMS Microbiol Lett* 365(18).

10. Gautier-Bouchardon AV. 2018. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr* 6(4).
11. García-Galán A, Nouvel LX, Baranowski E, Gómez-Martín Á, Sánchez A, Citti C, de La Fe C. 2020. *Mycoplasma bovis* in spanish cattle herds: two groups of multiresistant isolates predominate, with one remaining susceptible to fluoroquinolones. *Pathogens* 9(7):545.
12. Jaÿ M, Poumarat F, Colin A, Tricot A, Tardy F. 2021. Addressing the antimicrobial resistance of ruminant mycoplasmas using a clinical surveillance network. *Front Vet Sci* 8:667175.
13. Hannan PC. 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International research programme on comparative mycoplasmology. *Vet Res* 31(4):373–395.
14. Whithear KG, Bowtell DD, Ghiocas E, Hughes KL. 1983. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis* 27(4):937–949.
15. Wheat PF. 2001. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. *J Antimicrob Chemother* 48:1–4.
16. Li J, Xie S, Ahmed S, Wang F, Gu Y, Zhang C, Chai X, Wu Y, Cai J, Cheng G. 2017. Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. *Front Pharmacol* 8:364.
17. Loose M, Namer KG, Coates A, Wagenlehner FME, Hu Y. 2020. Effect of different media on the bactericidal activity of colistin and on the synergistic combination with azidothymidine against mcr-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 11:54.
18. CLSI. 2011. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; approved guideline. CLSI document M43-A. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
19. CLSI. 2017. Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria isolated from animals, 1st edition. CLSI supplement VET06. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
20. Sayin Z, Sakmanoğlu A, Uçan US, Uslu A, Hadimli HH, Aras Z, Özdemir Ö, Erganiş O. 2016. Mycoplasma infections in dairy cattle farms in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci* 40:569–574.

21. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3(1):59–67.
22. Nicholas R, Baker S. 1998. Recovery of mycoplasmas from animals. *Methods Mol Biol* 104:37–43.
23. Ayling RD, Baker SE, Peek ML, Simon AJ, Nicholas RA. 2000. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*. *Vet Rec* 146(26):745–747.
24. Ayling RD, Rosales RS, Barden G, Gosney FL. 2014. Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain. *Vet Rec* 175(19):486.
25. Friis NF. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27(6):337–339.
26. Rosengarten R, Behrens A, Stetefeld A, Heller M, Ahrens M, Sachse K, Yogev D, Kirchhoff H. 1994. Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins. *Infect Immun* 62(11):5066–5074.
27. Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Lysnyansky I. 2009. In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle. *Vet Microbiol* 137(3-4):268–275.
28. Bokma J, Gille L, Bleecker K de, Callens J, Haesebrouck F, Pardon B, Boyen F. 2020. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal, dairy and beef herds. *Antibiotics* 9(12):882.
29. Josi C, Bürki S, Stojiljkovic A, Wellnitz O, Stoffel MH, Pilo P. 2018. Bovine epithelial in vitro infection models for *Mycoplasma bovis*. *Front Cell Infect Microbiol* 18(8):329.
30. DSMZ. Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH. Online available at <https://www.dsmz.de/>.
31. Waites KB, Talkington DF. 2014. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 17(4):697–728.
32. CLSI. 2018a. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 4th edition. CLSI VET08-ED4. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.

33. CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
34. CLSI. 2018b. Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. 5th ed. CLSI guideline M23. *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
35. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathanet B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9):2233–2239.
36. Zhao G, Zhu X, Zhang H, Chen Y, Schieck E, Hu C, Chen H, Guo A. 2021. Novel secreted protein of *Mycoplasma bovis* MbovP280 induces macrophage apoptosis through CRYAB. *Front Immunol* 12:619–362.
37. Rosenbusch RF, Kinyon JM, Apley M, Funk ND, Smith S, Hoffman LJ. 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *J Vet Diagn Invest* 17(5):436–441.
38. Hendrick SH, Bateman KG, Rosengren LB. 2013. The effect of antimicrobial treatment and preventive strategies on bovine respiratory disease and genetic relatedness and antimicrobial resistance of *Mycoplasma bovis* isolates in a western Canadian feedlot. *Can Vet J* 54(12):1146–1156.
39. Sulyok KM, Kreizinger Z, Fekete L, Hrivnák V, Magyar T, Jánosi S, Schweitzer N, Turcsányi I, Makrai L, Erdélyi K, Gyuranecz M. 2014. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe. *BMC Vet Res* 10:256.
40. Heuvelink A, Reugebrink C, Mars J. 2016. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands. *Vet Microbiol* 189:1–7.
41. Klein U, Jong A de, Moyaert H, El Garch F, Leon R, Richard-Mazet A, Rose M, Maes D, Pridmore A, Thomson JR, Ayling RD. 2017. Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. *Vet Microbiol* 204:188–193.

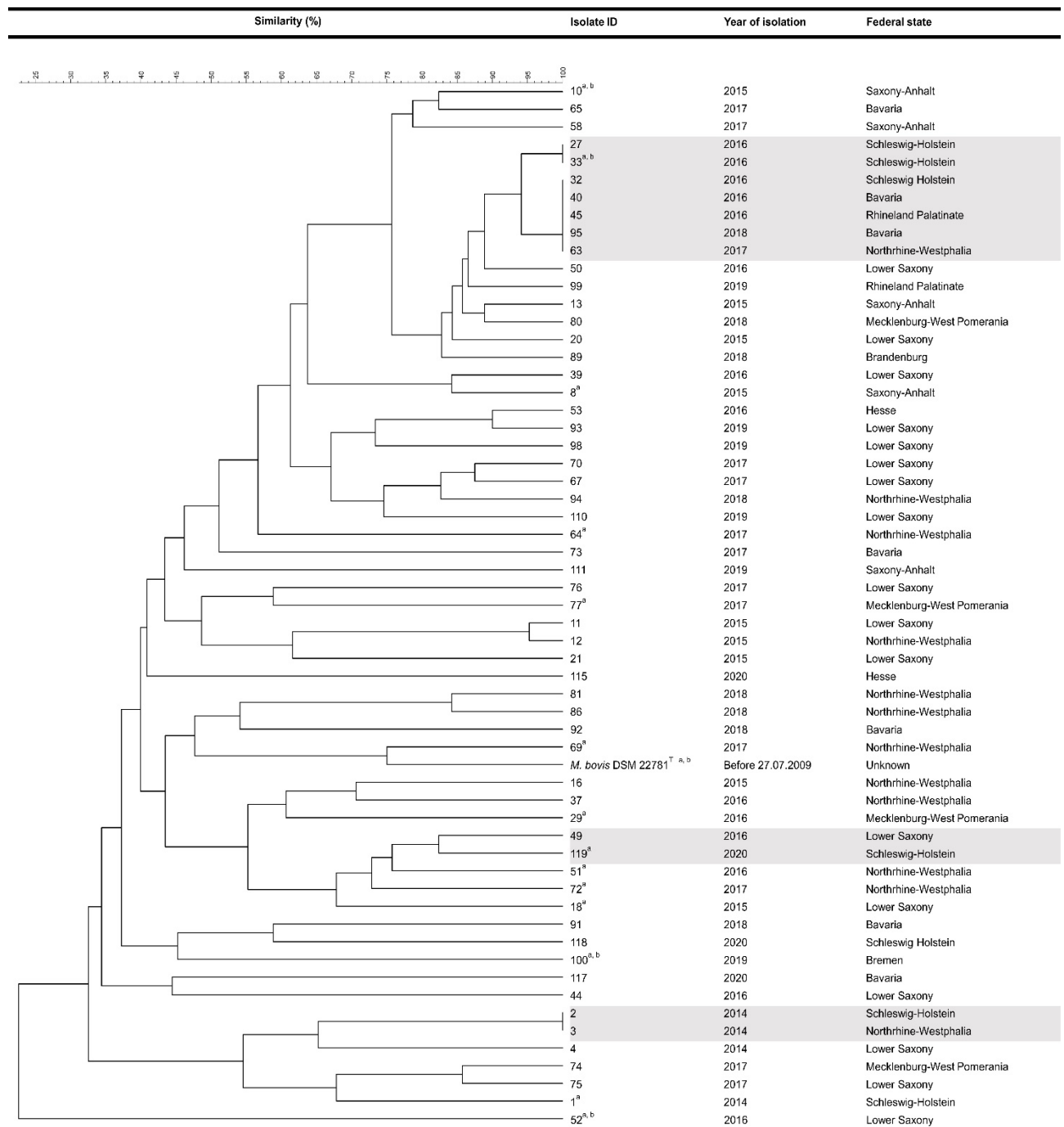
42. Klein U, Jong A de, Youala M, El Garch F, Stevenin C, Moyaert H, Rose M, Catania S, Gyuranecz M, Pridmorek A, Ayling RD. 2019. New antimicrobial susceptibility data from monitoring of *Mycoplasma bovis* isolated in Europe. *Vet Microbiol* 238:108432.
43. Jelinski M, Kinnear A, Gesy K, Andrés-Lasheras S, Zaheer R, Weese S, McAllister TA. 2020. Antimicrobial sensitivity testing of *Mycoplasma bovis* isolates derived from western canadian feedlot cattle. *Microorganisms* 8(1):124.
44. Kinnear A, McAllister TA, Zaheer R, Waldner M, Ruzzini AC, Andrés-Lasheras S, Parker S, Hill JE, Jelinski MD. 2020. Investigation of macrolide resistance genotypes in *Mycoplasma bovis* isolates from canadian feedlot cattle. *Pathogens* 9(8):622.
45. Godinho KS. 2008. Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates. *Vet Microbiol* 129(3-4):426–432.
46. Ammar AM, Abd El-Hamid MI, Mohamed YH, Mohamed HM, Al-Khalifah DHM, Hozzein WN, Selim S, El-Neshwy WM, El-Malt RMS. 2022. Prevalence and antimicrobial susceptibility of bovine mycoplasma species in Egypt. *Biology* 11(7):1083.
47. Kong LC, Gao D, Jia BY, Wang Z, Gao YH, Pei ZH, Liu SM, Xin JQ, Ma HX. 2016. Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China. *J Vet Med Sci* 78(2):293–296.
48. Hata E, Harada T, Itoh M. 2019. Relationship between antimicrobial susceptibility and multilocus sequence type of *Mycoplasma bovis* isolates and development of a method for rapid detection of point mutations involved in decreased susceptibility to macrolides, lincosamides, tetracyclines, and spectinomycin. *Appl Environ Microbiol* 85(13):e00575-19.
49. Bokma J, Vereecke N, Nauwynck H, Haesebrouck F, Theuns S, Pardon B, Boyen F. 2021. Genome-wide association study reveals genetic markers for antimicrobial resistance in *Mycoplasma bovis*. *J Antimicrob Chemother* 9(2):e0026221.
50. Niu J, Yan M, Xu J, Xu Y, Chang Z, Sizhu S. 2022. The resistance mechanism of *Mycoplasma bovis* from yaks in Tibet to fluoroquinolones and aminoglycosides. *Front Vet Sci* 2(9):840981.
51. WHO. 2021. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report. *World Health Organization*.

52. McAuliffe L, Kokotovic B, Ayling RD, Nicholas RA. 2004. Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters. *J Clin Microbiol* 42(10):4556-65.
53. Bürgi N, Josi C, Bürki S, Schweizer M, Pilo P. 2018. *Mycoplasma bovis* co-infection with bovine viral diarrhoea virus in bovine macrophages. *Vet Res* 49(1):2.
54. Käbisch L, Schink AK, Kehrenberg C, Schwarz S. 2021. Provisional use of CLSI-approved quality control strains for antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma* ('*Mesomycoplasma*') *hyorhinis*. *Microorganisms* 9(9):1829.
55. Hannan PC, O'Hanlon PJ, Rogers NH. 1989. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res Vet Sci* 46(2):202–11.
56. Becker CAM, Ambroset C, Huleux A, Vialatte A, Colin A, Tricot A, Arcangioli MA, Tardy F. 2020. Monitoring *Mycoplasma bovis* diversity and antimicrobial susceptibility in calf feedlots undergoing a respiratory disease outbreak. *Pathogens* 9(7):593.
57. Oucheriah Y, Heleili N, Colin A, Mottet C, Tardy F, Becker CAM. 2022. Prevalence of *Mycoplasma bovis* in Algeria and characterisation of the isolated clones. *Front Vet Sci* 20(9):910799.
58. King A, Brown DFJ. 2001. Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother* 48:71–76.

Figure legends

Figure 1: Dendrogram based on macrorestriction patterns of 58 *M. bovis* field isolates and *M. bovis* DSM 22781^T.

^a This isolate was used for preliminary growth experiments; ^b This isolate was used for determining the homogeneity of MIC values; Gray shading indicates groups of isolates that were indistinguishable in macrorestriction analysis.



Tables

Table 1: Origin and years of isolation of 131 *M. bovis* field isolates and *M. bovis* type strain DSM 22781^T used in this study.

Federal state	Year of isolation	Number of isolates from	
		Dairy cow	Calf
Bavaria	2016	1	-
	2017	2	-
	2018	3	-
	2020	1	-
Brandenburg	2018	2	-
Bremen	2019	1	-
Hesse	2015	-	3
	2016	1	2
	2017	-	6
	2018	1	-
	2020	1	-
Lower Saxony	2021	-	1
	2014	2	-
	2015	10	-
	2016	16	-
	2017	7	-
	2018	3	-
Mecklenburg Western Pomerania	2019	10	-
	2020	1	-
	2015	1	-
	2016	1	-
	2017	2	-
	2018	1	-
	2019	1	-
Northrhine- Westphalia	2014	1	-
	2015	3	-
	2016	4	-
	2017	7	-
	2018	6	-
	2019	1	-
	2020	1	-
Rheinland-Pfalz	2016	1	-
	2019	1	-
Saxony-Anhalt	2015	3	-
	2017	1	-
	2019	1	-
Schleswig-Holstein	2014	2	-
	2015	2	-
	2016	8	-
	2017	2	-
	2018	1	-
	2019	3	-
	2020	2	-
Unknown	Before 07/2009	1 ^a	-
	2017	1	-

^a This is *M. bovis* type strain DSM 22781^T; - No isolate available.

Table 2: Homogeneity of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) obtained with SP4 broth after 72 ± 2 h of incubation at 37°C

Antimicrobial agent ^a	Deviation from the MIC mode						Exact MIC agreement of isolates (%) ^b	Essential MIC agreement of isolates (%) ^{c, d}	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
Ciprofloxacin			6	17	2			68	100
Doxycycline			1	21	2	1		84	96
Enrofloxacin			2	19	4			76	100
Florfenicol			3	20	2			80	100
Gentamicin			2	14	9			56	100
Marbofloxacin			2	20	3			80	100
Neomycin ^f		1	2	20	2			80	96
Streptomycin ^f		1	7	11	5	1		44	92
Tetracycline ^f		1	4	15	5			60	96
Tiamulin		1	5	14	5			56	96
Tilmicosin ^f		1	1	19	4			76	96
Tulathromycin ^f		1	7	9	7	1		36	92
Colistin ^f				25				100	100
Imipenem ^f			1	24				96	100
Nalidixic acid ^f				20	5			80	100
Trimethoprim/ sulfamethoxazole ^{e, f}				25				100	100

^a The antimicrobial agents below the blank line represent antimicrobials with known intrinsic resistance of *M. bovis*; ^b Exact MIC agreement indicates the percentage of MICs that match the MIC mode (precondition of five identical MICs); ^c Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are in the gray area; ^d Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of MIC modes; ^e Ratio 1:19; ^f The MIC value of at least one isolate was equal to, lower or higher than the concentrations of the tested range.

Table 3: MIC distribution of 131 *M. bovis* field isolates and type strain *M. bovis* DSM 22781^T after 72 ± 2 h of incubation in SP4 broth

Antimicrobial agent ^a	MIC ^b (µg/ml)																	MIC ₅₀	MIC ₉₀	
	0.008	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512			1024
Ciprofloxacin				1	2	20	90	14	1	3		1							0.5	1
Doxycycline				3*	1	13	73	38	3	1									0.5	1
Enrofloxacin					14	106	7	3	1			1							0.25	0.25
Florfenicol							4	30	74	20	4								2	4
Gentamicin							1	3	24	84	17	1			2				4	8
Marbofloxacin					1	2	77	45	5	1			1 [#]						0.5	1
Neomycin											2	13	63	44	10 [#]				32	64
Streptomycin									3	14	44	17	12	17	16	7	2		16	128
Tetracycline					3*		5	45	68	9	2								2	2
Tiamulin			30*	57	34	9	1		1										0.06	0.12
Tilmicosin				1*		1						2	2	6	17	103 [#]			≥256	≥256
Tulathromycin							4	20	41	36	10	3	1	17 [#]					4	≥64
Colistin															132 [#]				≥128	≥128
Imipenem													1	131 [#]					≥64	≥64
Nalidixic acid													1	10	99	22 [#]			128	≥256
Trimethoprim/sulfamethoxazole ^b													2	130 [#]					≥64	≥64

The tested range of the antimicrobial agents is represented in the white area; ^a The antimicrobial agents below the blank line represent antimicrobials with known intrinsic resistance of *M. bovis*; ^b Data represent the concentration of trimethoprim, Ratio 1:19; * MICs equal to or lower than the concentrations of the test range; # MICs equal to or higher than the concentrations of the test range.

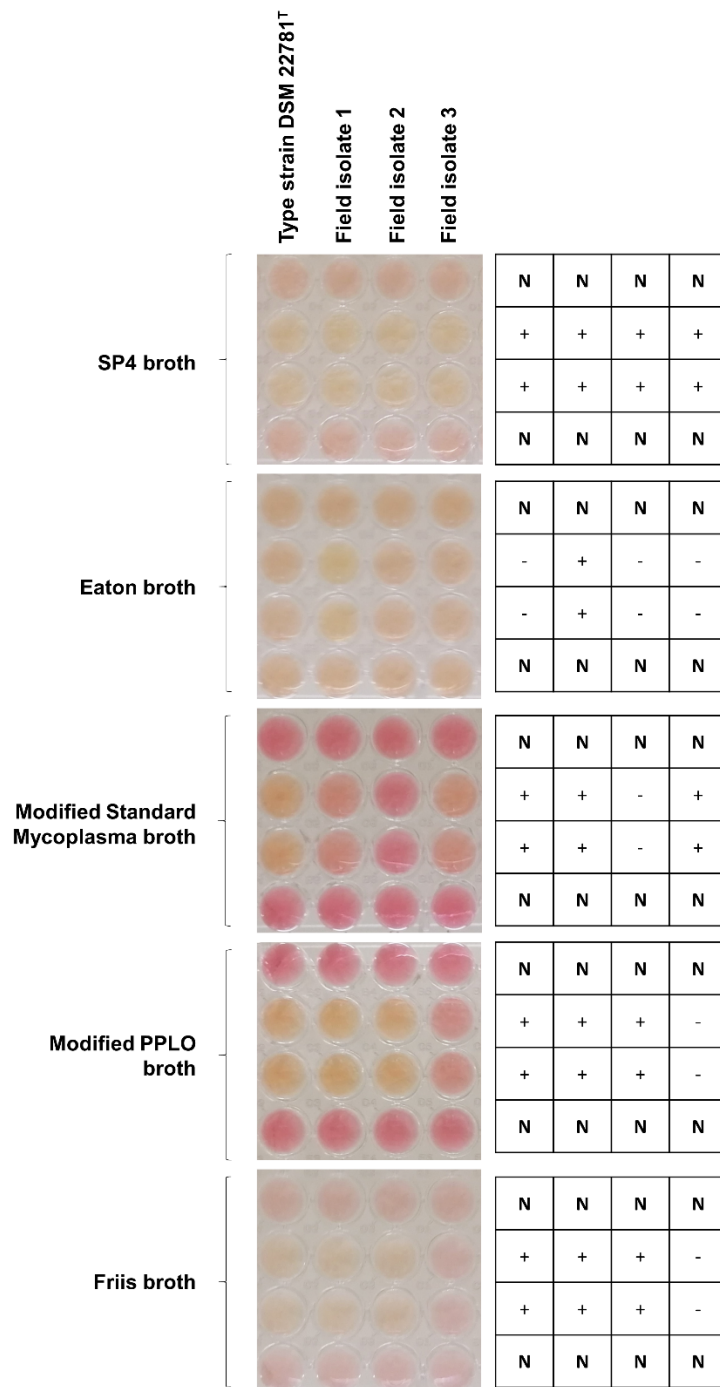
Table 4: Distribution of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of *M. bovis* type strain DSM 22781^T obtained after 20 independent replications of broth microdilution susceptibility testing in SP4 broth

Antimicrobial agent ^a	MIC values (in $\mu\text{g/ml}$)																Determined MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	Percentage of MICs within the CLSI recommended range ^b		
	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
Ciprofloxacin							4	16											0.5 - 1	100
Doxycycline			19*	1															$\leq 0.06 - 0.12$	100
Enrofloxacin					1	5	14												0.12 - 0.5	100
Florfenicol							2	14	2	2									0.5 - 4	100
Gentamicin									2	14	2	2							2 - 16	100
Marbofloxacin							4	16											0.5 - 1	100
Neomycin											1	15		4 [#]					16 - ≥ 128	100
Streptomycin															2	14	4 [#]		256 - ≥ 1024	100
Tetracycline					15*	4	1												$\leq 0.12 - 0.5$	100
Tiamulin			6	10	4														0.06 - 0.25	100
Tilmicosin					3	11	3	2	1										0.12 - 1	95.00
Tulathromycin								5	9	3	3								1 - 8	100
Colistin															20 [#]				≥ 128	100
Imipenem													20 [#]						≥ 64	100
Nalidixic acid													2	11	7 [#]				64 - ≥ 256	100
Trimethoprim/sulfamethoxazole ^c												4	16 [#]						32 - ≥ 64	100

The tested range of the antimicrobial agents is represented in the white area; ^a The antimicrobial agents below the blank line represent antibiotics with known intrinsic resistance of *M. bovis*; ^b A limit of $\geq 95\%$ is set according to CLSI guideline M23; ^c Data represent the concentration of trimethoprim, Ratio 1:19; * MICs equal to or lower than the concentrations of the test range; # MICs equal to or higher than the concentrations of the test range.

Supplemental Material

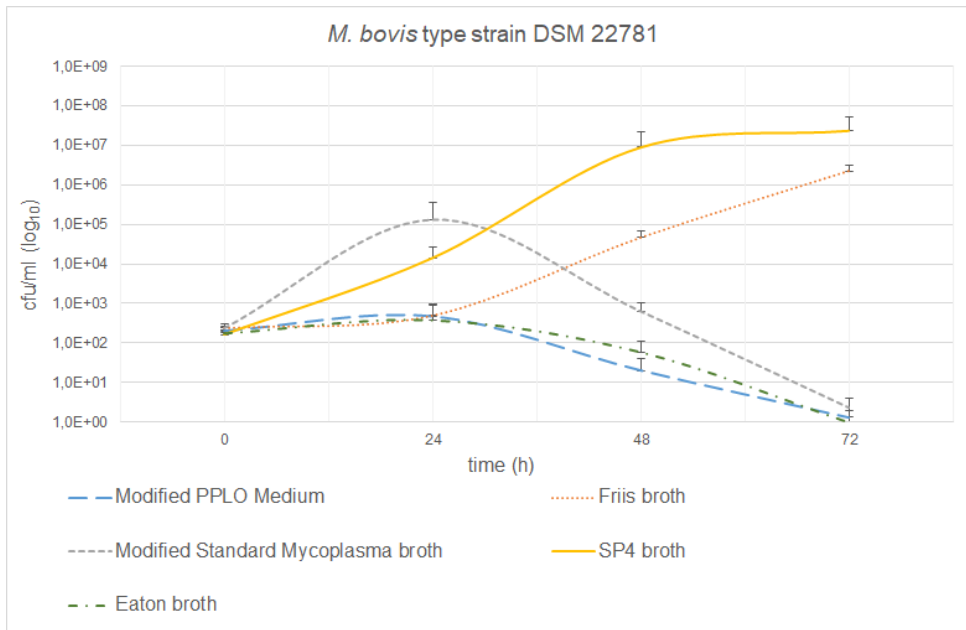
Figure S1



Visible growth of four epidemiologically unrelated *M. bovis* field isolates (in duplicate) in five different broth media after 72 h incubation at 37 °C.

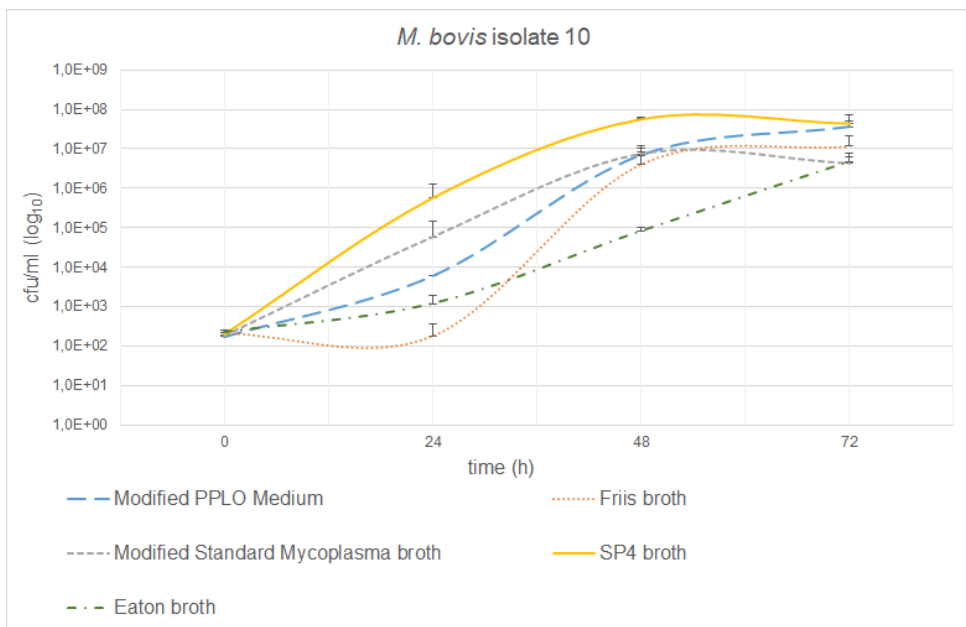
The following scheme was used to grade visible growth: + visible growth detectable; - no visible growth detectable; N non-inoculated medium control.

Figure S2



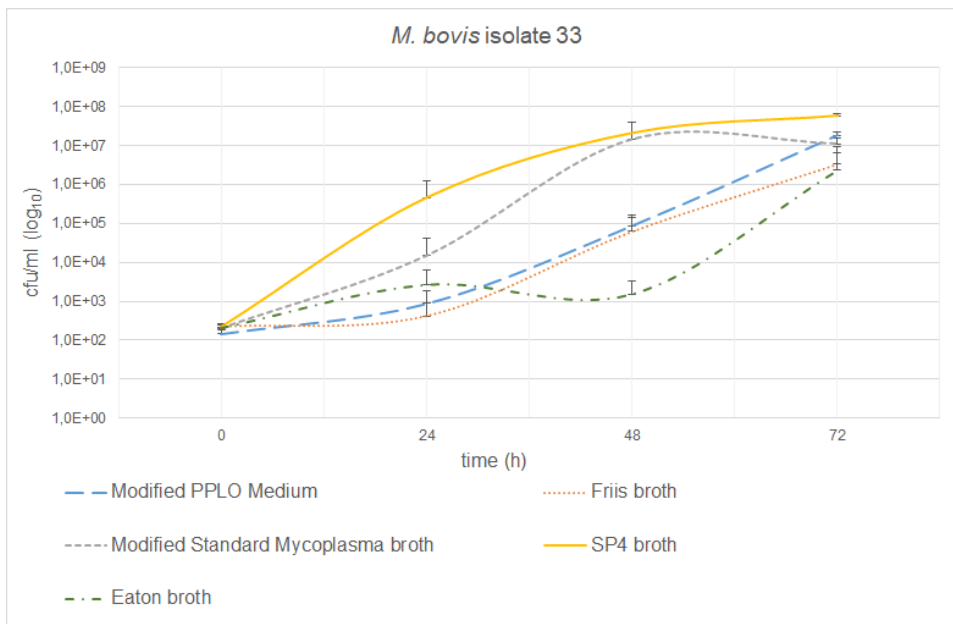
Colony counts (cfu/ml) of the *M. bovis* type strain DSM 22781^T in five different test media.

Figure S3



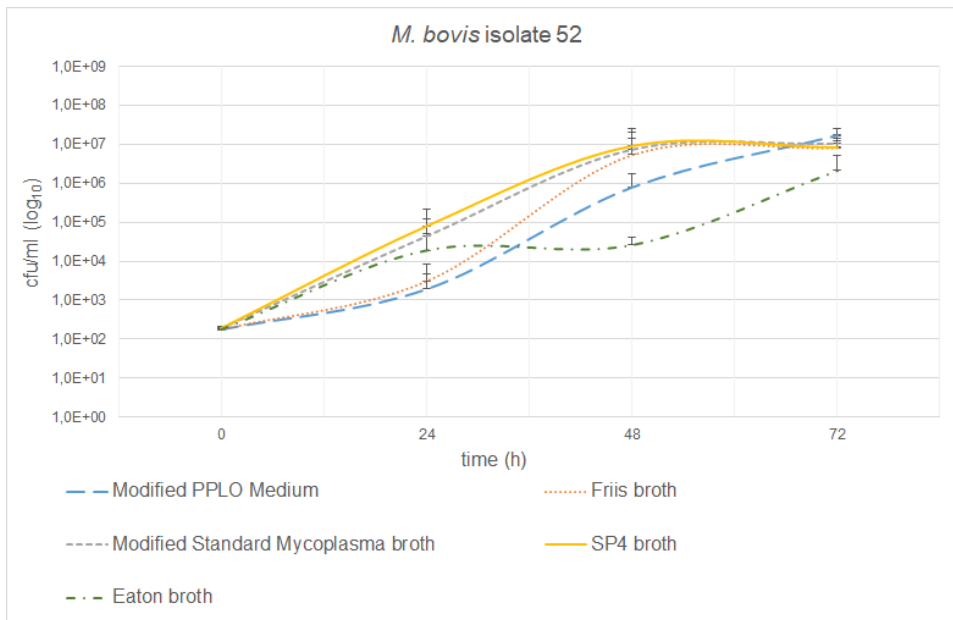
Colony counts (cfu/ml) of *M. bovis* field isolate no. 10 in five different test media.

Figure S4



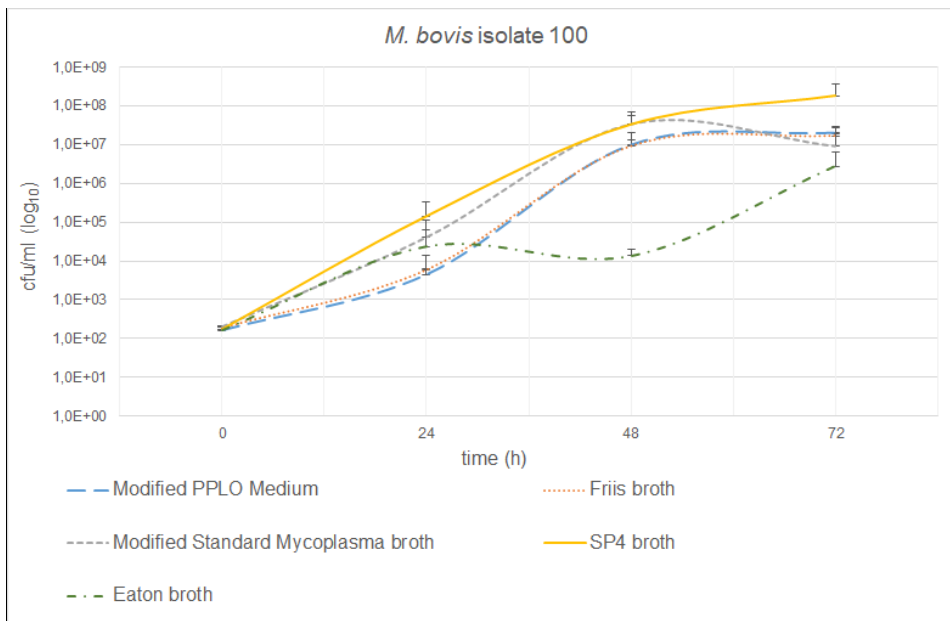
Colony counts (cfu/ml) of *M. bovis* field isolate no. 33 in five different test media.

Figure S5



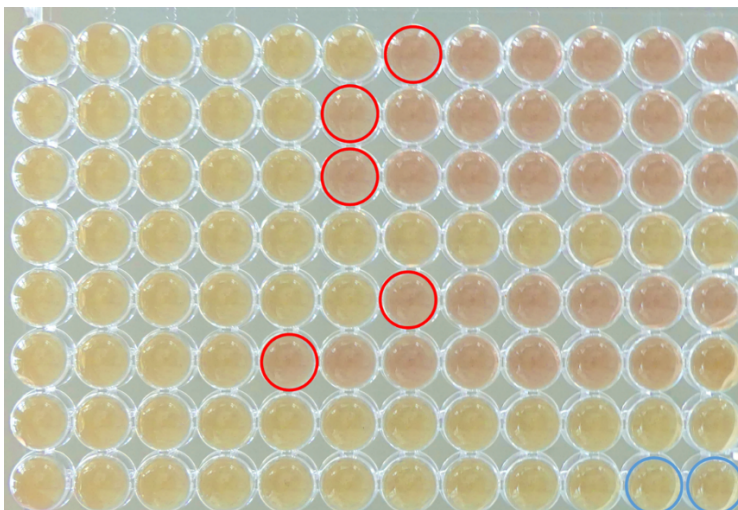
Colony counts (cfu/ml) of *M. bovis* field isolate no. 52 in five different test media.

Figure S6



Colony counts (cfu/ml) of *M. bovis* field isolate no. 100 in five different test media.

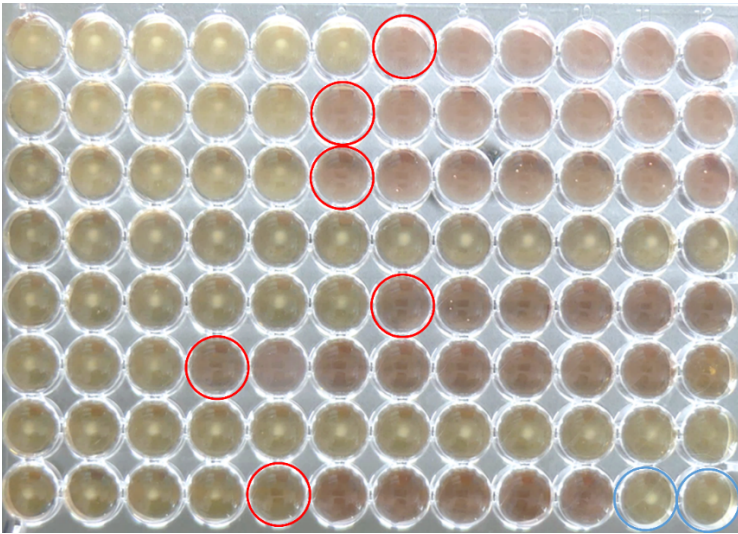
Figure S7



Inoculated microtiter plate with *M. bovis* type strain DSM 22781^T after 72 ± 2 h of incubation in SP4 broth.

Red-circled wells represent MIC values; Blue-circled wells represent positive growth controls.

Figure S8



Inoculated microtiter plate of *M. bovis* field isolate no. 144 forming buttons at the bottom of wells after 72 \pm 2 h incubation in SP4 broth.

Red-circled wells represent MIC values; Blue-circled wells represent positive growth controls.

Table S1: Determination of visible growth of 15 *M. bovis* isolates after 24 (\pm 2 h), 48 h (\pm 2 h), and 72 h (\pm 2 h) incubation in different broth media.

Medium	Number of isolates for which visible growth was indicated by a color change of the indicator after		
	24 h \pm 2 h	48 h \pm 2 h	72 h \pm 2 h
Eaton broth	0	0	4
Friis broth	0	2	9
Modified Standard Mycoplasma broth	0	1	9
Modified PPLO Medium	0	0	8
SP4 broth	0	7	15

Table S2: Homogeneity of *M. bovis* MIC values determined with SP4 broth after 72 ±2 h incubation at 37 °C using media components (fetal bovine serum, Bacto TC Yeastolate, tryptone) from different producers.

Antimicrobial agent ^a	Deviation from the MIC mode						Exact MIC agreement of isolates (%) ^b	Essential MIC agreement of isolates (%) ^{c,d}	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
Ciprofloxacin			6	32	2			80.00	100
Doxycycline			5	24*	11	1		60.00	97.50
Enrofloxacin			5	30	5			75.00	100
Florfenicol			7	29	4			72.50	100
Gentamicin			7	24	7	2		60.00	95.00
Marbofloxacin			9	26	5			65.00	100
Neomycin		3	9	26*	2*			65.00	92.50
Streptomycin		2	12	21*	3	2		52.50	90.00
Tetracycline		1	8*	23	8			57.50	97.50
Tiamulin		2	9*	20	8	1		50.00	92.50
Tilmicosin		1	7	30*		2		75.00	92.50
Tulathromycin			8	22*	7	3		55.00	92.50
Colistin				40*				100	100
Imipenem				40*				100	100
Nalidixic acid			3	30	7*			75.00	100
Trimethoprim/sulfamethoxazole ^e				40*				100	100

^a The antimicrobial agents below the blank line represent antibiotics with known intrinsic resistance of *M. bovis*; ^b Exact MIC agreement indicates the percentage of MICs that match the MIC mode (a precondition of five identical MICs); ^c Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are in the gray area; ^d Essential MIC agreement defines MICs within ±1 dilution of MIC modes; ^e Ratio 1:19; * Isolates with MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the tested range.

Table S3: MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of *Escherichia coli* ATCC 25922 obtained in SP4 broth using three different incubation times and comparison to established QC ranges.

Antimicrobial agent ^a	Incubation time (h)	Number of repetitions resulting in a MIC ($\mu\text{g/ml}$) of																	
		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
Ciprofloxacin	20	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxycycline	20	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	20	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Florfenicol	20	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Marbofloxacin	20	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomycin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-
Streptomycin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-
Tetracycline	20	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiamulin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2*	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2*	-	-	-	-
Tilmicosin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2*	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3*	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3*	-	-	-
Tulathromycin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3*	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4*	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4*	-	-	-	-	-
Colistin	20	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	4	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imipenem	20	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nalidixic acid	72 ±2	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-
Trimethoprim/ sulfamethoxazole 1:19	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3	1	-	-	-	-	-	-

Blue shading outlined with vertical bars visualize the CLSI-defined QC ranges of *E. coli* ATCC 25922 after incubation for 16 - 20 h in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) (CLSI 2020); The white areas visualize the tested range of concentrations; * MICs equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table S4: MIC values (µg/ml) of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 obtained in SP4 broth using three different incubation times and comparison to established QC ranges.

Antimicrobial agent ^a	Incubation time (h)	Number of repetitions resulting in a MIC (µg/ml) of																		
		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	
Ciprofloxacin	20	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
Doxycycline	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	
Enrofloxacin	20	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Florfenicol	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	
Gentamicin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	
Marbofloxacin	20	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Neomycin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	2	2	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3*	5*	
Streptomycin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-
Tetracycline	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
Tiamulin	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*	-	
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*	-	
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*	-	

Tilmicosin	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tulathromycin	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Colistin	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Imipenem	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Nalidixic acid	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Trimethoprim/ sulfamethoxazole 1:19	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Blue shading outlined with vertical bars visualize the CLSI-defined QC ranges of *Ec. faecalis* ATCC 29212 after testing in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) and incubation for 16 – 20 h (CLSI 2020); The white areas visualize the tested range of concentrations; * MICs equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table S5: MIC values (µg/ml) of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 obtained in SP4 broth using three different incubation times and comparison to established QC ranges.

Antimicrobial agent ^a	Incubation time (h)	Number of repetitions resulting in a MIC (µg/ml) of																	
		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
Ciprofloxacin	20	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxycycline	20				-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2				-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2				-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	20				-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2				-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2				-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Florfenicol	20				-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2				-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2				-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicin	20				-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2				-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2				-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marbofloxacin	20	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Neomycin	20		-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	
	48 ±2		-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
	72 ±2		-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	
Streptomycin	20		-	-	-	-	-	-	4	-	1	-	-	
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	3	1	-	1	-	
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	2	2	-	-	1	
Tetracycline	20		-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2		-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2		-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	
Tiamulin	20		-	-	-	-	5	3	-	-	-	-	-	
	48 ±2		-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	
	72 ±2		-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	
Tilmicosin	20		-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2		-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	
	72 ±2		-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	-	
Tulathromycin	20		-	-	-	-	-	-	-	4	-	1	-	
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	2	2	1	-	
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	1	3	1	-	
Colistin	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*
Imipenem	20		-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 ±2		-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 ±2		-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
Nalidixic acid	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3
Trimethoprim/ sulfamethoxazole 1:19	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*	-
	48 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*	-
	72 ±2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*	-

Blue shading outlined with vertical bars visualize the CLSI-defined QC ranges of *S. aureus* ATCC 29213 after testing in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) and incubation for 16 - 20 h (CLSI 2020); The white areas visualize the tested range of concentrations; * MICs equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table S6: MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090 obtained in SP4 broth using three different incubation times and comparison to established QC ranges.

Antimicrobial agent ^a	Incubation time (h)	Number of repetitions resulting in a MIC ($\mu\text{g/ml}$) of																	
		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
Ciprofloxacin	24	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Doxycycline	24	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enrofloxacin	24	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Florfenicol	24	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentamicin	24	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marbofloxacin	24	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neomycin	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-
Streptomycin	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-
Tetracycline	24	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tiamulin	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-
Tilmicosin	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-
Tulathromycin	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	-
Colistin	24	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48 \pm 2	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	72 \pm 2	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Imipenem	24	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	48 ±2		-	-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	
	72 ±2		-	-	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	
	24						-	-	-	-	5	-	-	-	
Nalidixic acid	48 ±2						-	-	-	-	5	-	-	-	
	72 ±2						-	-	-	-	5	-	-	-	
Trimethoprim/ sulfamethoxazole	24						1	4	-	-	-	-	-	-	
	48 ±2						-	5	-	-	-	-	-	-	
1:19	72 ±2						-	5	-	-	-	-	-	-	

Blue shading outlined with vertical bars visualize the CLSI-defined QC ranges of *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090 after testing in Veterinary Fastidious Medium and incubation for 20 - 24 h (CLSI 2018); The white areas visualize the tested range of concentrations; * MICs equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

References

CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 4th edition. CLSI VET08-ED4.

Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI supplement VET01S.

Clinical and Laboratory Standards Institute.

Author contributions

Conceptualization	CK
Funding acquisition	CK
Project administration	CK
Data curation	FG , CK
Resources	TE, ME, TP, CK
Formal analysis	FG , AM, YC
Investigation	FG , AM, YC
Methodology	FG , AM, YC, FK, ASB, MY, TE, ME, TP, CK
Validation	FG , AM, YC
Supervision	CK
Writing – original draft	FG , CK
Writing – review and editing	FG , AM, YC, FK, ASB, MY, TE, ME, TE, CK

Publikation 4

Gütgemann F, Heuvelink A, Müller A, Churin Y, Buter R, Jung A, Feberwee A, Wiegel J, Kumm F, Braun AS, Yue M, Soriano-Vargas E, Swanepoel S, Botteldoorn N, Kirchner M, Kehrenberg C. Recommendation of a standardized broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium paragallinarum* and resistance monitoring. J Clin Microbiol. 2024 Mar 13;62(3):e0101123.

doi: 10.1128/jcm.01011-23

Copyright notice

Used with permission of American Society for Microbiology – Journals.

Permission conveyed through Copyright Clearance Center, Inc.

Recommendation of a standardized broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium paragallinarum* and resistance monitoring

Franziska Gütgemann^{1#}, Annet Heuvelink^{2#}, Anja Müller¹, Yury Churin¹, Rianne Buter²; Arne Jung³; Anneke Feberwee²; Jeanine Wiegel²; Franziska Kumm¹; Ann S Braun¹; Min Yue^{4,5}; Edgardo Soriano-Vargas⁶; Stefan Swanepoel⁷; Nadine Botteldoorn⁸; Miranda Kirchner⁹; Corinna Kehrenberg^{1*}

#Geteilte Erstautorenschaft

¹Institute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, Giessen, Germany

²Royal GD, Deventer, the Netherlands

³Clinic for Poultry, University of Veterinary Medicine Hannover, Foundation, Hannover, Germany

⁴Hainan Institute of Zhejiang University, Sanya, China

⁵Department of Veterinary Medicine, Institute of Preventive Veterinary Science, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou, China

⁶Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Mexico

⁷Deltamune, Centurion, South Africa

⁸DGZ Vlaanderen, Torhout, Belgium

⁹Animal and Plant Health Agency, Addlestone, Surrey, United Kingdom

*Corresponding author

E-Mail: corinna.kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*; CAMHB + CS + NADH; MIC values; VFM; antimicrobial resistance genes; antimicrobial susceptibility testing; broth microdilution; whole-genome sequencing

Abstract

This study aimed to develop a method for standardized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing (AST) of *Avibacterium (Av.) paragallinarum*, the causative agent of infectious coryza in chickens. For this, a total of 83 *Av. paragallinarum* isolates and strains were collected from 15 countries. To select unrelated isolates for method validation steps, macrorestriction analyses were performed with 15 *Av. paragallinarum*. The visible growth of these *Av. paragallinarum* was examined in six broth media and growth curves were compiled. In Veterinary Fastidious Medium and cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) + 1% chicken serum + 0.0025% NADH (CAMHB+CS+NADH), visible growth of all isolates was detected and both media allowed adequate bacterial growth. Due to better readability of *Av. paragallinarum* growth in microtiter plates, CAMHB+CS+NADH was chosen for AST. Repetitions of MIC testing with five epidemiologically unrelated isolates using a panel of 24 antimicrobial agents resulted in high essential MIC agreements of 96 – 100% after 48 h incubation at 35 ± 2 °C. Hence, the remaining 78

Av. paragallinarum were tested and demonstrated easily readable MICs with the proposed method. Differences in MICs were detected between isolates from different continents, with isolates from Africa showing lower MICs compared to isolates from America and Europe, which more often showed elevated MICs of aminoglycosides, quinolones, tetracyclines and/or trimethoprim/sulfamethoxazole. PCR analyses of isolates used for method development revealed that isolates with elevated MICs of tetracyclines harbored the tetracycline resistance gene *tet(B)*, but none of the other tested resistance genes were detected. Therefore, whole-genome sequencing data from 62 *Av. paragallinarum* were analyzed and revealed the presence of sequences showing nucleotide sequence identity to the genes *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *bla_{TEM-1B}*, *catA2*, *sul2*, *tet(B)*, *tet(H)*, and *mcr*-like. Overall, the proposed method using CAMHB+CS+NADH for susceptibility testing with 48 h incubation time at 35 ± 2 °C in ambient air was shown to be suitable for *Av. paragallinarum*. Due to a variety of resistance genes detected, the development of clinical breakpoints is highly recommended.

Introduction

Avibacterium (Av.) paragallinarum (formerly *Haemophilus paragallinarum*) is the causative agent of infectious coryza (IC) in chickens (1 – 3). The fastidious pathogen causes an acute respiratory disease associated with airsacculitis, conjunctivitis,

swollen head, mucopurulent or serous nasal discharge, and rhinitis (3). Disease caused by *Av. paragallinarum* results in a mortality of up to 10% as well as a significant reduction in fattening performance due to lower feed conversion and a decrease in laying performance of 10% to 80% (3, 4). This phenomenon is further enhanced by secondary infections with other pathogens (e.g., *Mycoplasma* spp.) or poor housing conditions (3, 5, 6). As a result, IC consistently leads to marked economic losses in the chicken and egg industries worldwide (3).

Antimicrobials such as macrolides, sulfonamides and tetracyclines have been used to treat IC in poultry for years (3, 7). However, as there is no agreed method for standardized antimicrobial susceptibility testing (AST) for *Av. paragallinarum*, which is included in standards so far, different methods were used to determine minimal inhibitory concentration (MIC) values for *Av. paragallinarum*. Nevertheless, it is known that test parameters (e.g., inoculum size, medium, incubation conditions) can influence the results of MIC testing (8 – 10), which may affect the evaluation of the results and thus the selection of the most appropriate antibiotic in case of treatment of disease. Additionally, as *Av. paragallinarum* is highly fastidious and requires complex media containing sodium chloride (1.0 – 1.5%) and for most isolates NAD (V-factor) (3, 11), common methods for AST of fast-growing bacteria of animal origin (such as *Escherichia coli*) according to CLSI supplement VET01S are not suitable for *Av. paragallinarum*.

In two recent studies a broth medium, cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) plus 0.0025% NADH (β -NAD, reduced form, disodium salt) plus 1% heat-inactivated chicken serum (CAMHB \pm CS+NADH), was used to determine the susceptibility status of *Av. paragallinarum* (12, 13). This medium was accepted by the CLSI for AST of *Glaesserella parasuis* and for inclusion in the next CLSI guidance document VET06 (personal communication). Furthermore, this medium has recently been recommended for harmonized AST of the closely related pathogen *Av. gallinarum* (23). However, since the suitability of this and other broth media for standardized MIC testing of *Av. paragallinarum* has not been previously demonstrated, this study aimed to investigate the suitability of this and other broth media and test parameters for standardized broth microdilution susceptibility testing of *Av. paragallinarum*. The method was subsequently used to examine its suitability for field isolates from different geographic areas (America, Europe, southern Africa) and to determine MIC values of the isolates. In addition, whole genome sequencing (WGS)

analysis was performed to investigate the presence of antimicrobial resistance genes (ARGs) in *Av. paragallinarum*.

Material and methods

Collection of *Av. paragallinarum* field isolates and reference strains, culturing and species confirmation

A total of 83 *Av. paragallinarum* were collected for this study, including 76 field isolates isolated between 1994 and 2022 (Table 1). The collection included 15 *Av. paragallinarum*, which were used for method development as their epidemiological relatedness was investigated by macrorestriction analysis as described below (Figure 1). Of these, 14 field isolates (no. 1 – 14) originated from chickens and were isolated in 2009 (n=6), 2016 (n=2), 2018 (n=1), 2019 (n=2), 2020 (n=2), and 2022 (n=1) from poultry flocks in Germany (n=8) and the Netherlands (n=6). In addition, the *Av. paragallinarum* type strain CCUG 12835^T (synonym IPDH 2403), which was isolated in Germany in 1973 (14) and obtained from the Culture Collection University of Gothenburg (CCUG, Gothenburg, Sweden), was used for comparative purposes. The additional 68 *Av. paragallinarum* from Royal GD (Deventer, the Netherlands) were used to test the suitability of the developed method. These included 62 field isolates collected between 1994 and 2021 from poultry flocks in various countries in Europe (Belgium, England, Germany, the Netherlands, Spain; n=31), southern Africa (South Africa, Zimbabwe; n=16), and North and South America (Guadeloupe, Ecuador, Mexico, Peru; n=15). The collection also included six *Av. paragallinarum* reference strains (HP14, E-3C, 2671, 221, SA-3, 0222) originating from five different continents.

For culturing the *Av. paragallinarum* isolates, Tryptic Soy agar plates (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) supplemented with 10% (v/v) chicken serum (heat-inactivated at 56 °C for 30 min) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) and 0.025% (v/v) NADH (β -NAD, reduced form, disodium salt) (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) (TSA+) was used. However, chocolate agar plates containing 10% (v/v) defibrinated horse blood (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) were used for colony count determinations in the growth experiments, as most *Av. paragallinarum* showed more easily countable colonies on this agar. After 24 – 48 h at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂, transparent colonies were visible on the agar plates. In addition, Haemophilus medium (HM), according to the specifications of the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany), was

used for culturing isolates in broth for macrorestriction analyses. Species confirmation of the *Av. paragallinarum* for method development was performed by a previously described species-specific PCR assay (15), modified by Muhammad and Sreedevi (2015) (16). For this, DNA was isolated from colonies selected from a 24 – 48 h old culture on TSA+ agar plates by boiling (99 °C; 15 min). In addition, the species assignment of all isolates from Royal GD *Av. paragallinarum* collection was done by using a real-time PCR assay as described previously by Feberwee et al. (2019) (17).

Macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis analyses

For selecting unrelated isolates for method validation steps, macrorestriction digests followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) were used to determine the clonal relationship of the 15 *Av. paragallinarum* isolates collected first (although more modern methods e.g. whole genome sequencing with SNP analysis or cgMLST are available today). The method was based on a previously described PulseNet protocol for *E. coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* with minor modifications regarding the run time and restriction enzyme used (18). In short, DNA was digested by using the restriction enzyme KpnI (Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania). For *Salmonella* Typhimurium LT2, which served as a size marker in the analyses, the restriction enzyme XbaI (Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania) was used. DNA fragments were separated in gels at 6 V using the CHEF DR II system (BioRad, Munich, Germany), with a pulse time increasing over 20 h from an initial time of 2 sec to a final extension time of 18 sec. For fragment pattern analysis (UPGMA), the BioNumerics software (version 7.6; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) was used. The Dice coefficient was set with a position tolerance of 1% and an optimization of 0.5%.

Visible growth of *Av. paragallinarum* in six broth media

To select a suitable medium for susceptibility testing, preliminary growth experiments were performed with 15 *Av. paragallinarum* in different media to investigate whether the isolates show visible growth in microtiter plates. For this, the following six broth media were included: CAMHB (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA), CAMHB plus 2.5% lysed horse blood (v/v) (Oxoid Limited) (CAMHB+LHB), CAMHB plus 0.0025% NADH (v/v) (Roche Diagnostics GmbH) plus 1% heat-inactivated chicken serum (v/v) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (CAMHB+CS+NADH), as well as

the Haemophilus Test Medium (HTM), Mueller-Hinton fastidious broth medium with yeast extract (MHF-Y), and Veterinary Fastidious Medium (VFM) produced according to CLSI guidelines (19 – 21). In the case of the VFM medium, however, the availability of one of the ingredients is discontinuous, so it is not always possible to produce it. While CAMHB without supplements is the medium included in the CLSI standard for testing rapidly growing bacteria like *Enterobacterales* (21), CAMHB+LHB, HTM, MHF-Y and VFM are approved media for testing fastidious organisms (e.g., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Histophilus somni*, or *Haemophilus influenzae*) (19 – 21). The CAMHB+CS+NADH was previously used for MIC testing of *Av. paragallinarum* (12, 13) and was recently recommended for standardized testing of the fastidious pathogen *Glaesserella parasuis* (22). This medium, soon included in CLSI guidance document VET06 for broth microdilution testing of *G. parasuis*, was also recently recommended for standardized AST of the closely related pathogen *Av. gallinarum* (23).

For the tests, *Av. paragallinarum* colonies from a 24 h-old culture on TSA+ plates were suspended into a sterile 0.9% saline solution (Merck KGaA) to achieve a suspension with a density corresponding to that of a McFarland standard of 0.5 (approximately 10^8 cfu/ml) using the McFarland densitometer DEN-1B (Biosan SIA, Riga, Latvia). The dilution steps to obtain an initial inoculum of approximately 5×10^5 cfu/ml, the microtiter plates and their inoculation as well as the controls were performed as described in a previous publication (23). After incubation in ambient air at 35 ± 2 °C, the wells were checked for visible growth at five time points (18, 20, 22, 24, and 48 h, respectively).

Compiling multi-day growth curves

Based on the data obtained from the preliminary growth test, two media (CAMHB+CS+NADH and VFM) were selected for compiling growth curves. For this purpose, two independent repetitions of growth experiments were performed on different days, determining the number of cfu/ml of four epidemiologically unrelated *Av. paragallinarum* (*Av. paragallinarum* CCUG 12835^T and field isolates nos. 3, 7, and 13) in the media. Preparation of the inoculum for the growth curves was performed as in a study on *Av. gallinarum* (23). During a 48-hour period, a volume of 100 µl was taken from the broth medium at each of the time points mentioned (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 32, and 48 h) and 10-fold serial dilutions were prepared with sterile 0.9% saline. Subsequently, the dilutions (50 µl from each dilution step) were spread in duplicate on

pre-dried chocolate agar plates. After incubation of the agar plates at 37 °C for 24 – 48 h in a microaerobic atmosphere (5% CO₂), colonies were counted and statistical average values and standard deviations calculated as previously described (23).

Antimicrobial susceptibility testing of *Av. paragallinarum*

For broth microdilution susceptibility testing, three different customized microtiter plate layouts (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK; virgin polystyrene plates) were used per isolate. This resulted in the testing of 24 antimicrobial agents or antimicrobial combinations, which are listed in detail in the Results section. Microtiter plates coated with vacuum-dried antibiotics were inoculated with 50 µl of bacteria-supplemented CAMHB+CS+NADH, the broth medium selected based on the previous experiments. To assess the suitability of the broth medium and incubation conditions for susceptibility testing, five epidemiologically unrelated isolates (*Av. paragallinarum* CCUG 12835^T, field isolates nos. 3, 4, 7, and 11) were tested in five independent experiments. The selection of isolates was based on differences in their growth behavior, with isolates 4 and 11 being characterized by difficult culturing and particularly small colonies. The performance of broth microdilution (inoculum preparation, incubation temperature and conditions) was done according to CLSI guidelines for testing bacteria isolated from animals (21), and the procedure was also briefly described for *Av. gallinarum* in a previous study by Gütgemann et al. (2022a) (23). The inoculum density of approximately 5 x 10⁵ cfu/ml was verified by performing two inoculum controls as described in CLSI standard M07 and supplement VET01S (21, 24). The quality control (QC) strain *E. coli* ATCC 25922 was used for quality control purposes. Reading of MICs was done visually after 18, 20, 22, 24, and 48 h (±10 min) of incubation, respectively. Subsequently, the exact MIC agreements (percentage of MICs with a precondition of five identical MICs) and the essential MIC agreements (percentage of MICs that allow a deviation of the MIC mode of ±1 log₂ dilution steps) were calculated to determine the homogeneity of MICs.

After evaluating the results, the remaining *Av. paragallinarum* field isolates and reference strains were tested on site at Royal GD and MIC₅₀ and MIC₉₀ values (indicating the MICs required to inhibit 50% and 90% of the isolates, respectively) were calculated.

Control of medium and supplements from different producers

To investigate whether susceptibility testing with medium and supplements from different producers resulted in comparable MICs of *Av. paragallinarum* isolates, additional testing of the five isolates used for method validation was performed using CAMHB (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) and the supplements chicken serum (BioWest SAS, Nuaille, France) and NADH (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) instead of CAMHB (Becton Dickinson and Company), chicken serum (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), and NADH (Roche Diagnostics GmbH). The resulting MICs were then compared with the previously determined MICs collected in the 5-fold tests and the exact and essential MIC agreements were calculated.

Analyses of antimicrobial resistance genes

Isolates with elevated MIC values compared to the other isolates of the *Av. paragallinarum* collection were tested for the presence of ARGs to assess the concordance of resistance phenotypes and genotypes. For this purpose, formed on 14 of the 15 *Av. paragallinarum* collected first, which showed higher MICs for at least one antimicrobial agent compared to the other isolates tested. The PCR assays were carried out as described previously (23, 25). Details on the tested resistance genes and references for the PCR assays are given in Table S1 in the Supplementary data.

For 62 out of 68 *Av. paragallinarum* from the Royal GD collection, whole genome sequencing (WGS) data were available from another ongoing study focussing on typing of a large collection of *Av. paragallinarum* isolates. The available WGS data were used in the current study to support the phenotypical AST findings. DNA library preparation and *de novo* assembly were performed as previously described by Buter et al. (2023) (26). *De novo* contigs were used for screening for the presence of ARGs by using the Find Resistance with Nucleotide DB script version 1.2 and the ResFinder Database (version 2021-02-28; minimum identity % = 60, minimum length % = 60, filter overlaps = Yes) within the CLC Genomic Workbench v. 22.0.2 (Qiagen Aarhus A/S, Aarhus, Denmark). Then, consensus sequences having a ResFinder database hit were extracted from the contigs and a BLAST search in the NCBI non-redundant database was used for confirmation of the presence of sequences with a high sequence identity with AMR-associated genes. For WGS analysis, all isolates were included that showed elevated MIC values compared to other isolates against at least one antimicrobial agent, as well as 23 isolates with low MIC values for comparison

purposes. Raw sequence data were submitted to the sequence read archive (SRA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) under BioProject number PRJNA1044294 and accession numbers SAMN38380366 to SAMN38380422. In addition, WGS data of the field isolates used for compilation of growth curves and/or method validation can be found under the following accession numbers: GCF_002921155.1 (CCUG 12835^T), SAMN38658941 (isolate 4), SAMN38658940 (isolate 7), SAMN38380376 (isolate 11), and SAMN38380375 (isolate 13).

Results

Clonality of 15 *Av. paragallinarum* used for method validation

Macrorestriction analysis and subsequent cluster analysis revealed that some of the 15 *Av. paragallinarum* isolates used for method validation were very diverse, but some had identical band patterns (Figure 1). Two major clusters were detected (A and B), with nine isolates belonging to group A and six isolates belonging to group B. However, within clusters A and B, the banding patterns of some isolates showed >80% similarity, allowing the isolates to be classified as epidemiologically related according to the interpretative criteria of Tenover et al. (1995) (27). The fragment patterns of the *Av. paragallinarum* type strain CCUG 12835^T and four field isolates (no. 3, 4, 7 and 11) differed by at least seven bands. Since these isolates are classified as epidemiologically unrelated, they were selected for method validation. These five unrelated test isolates were isolated in Germany (n=4) or the Netherlands (n=1) in 2020 (n=2), 2018 (n=1), 2009 (n=1), or 1982 (n=1).

Visible growth of *Av. paragallinarum* in different broths

Results of the preliminary growth experiments in which the visible growth of 14 *Av. paragallinarum* field isolates and the *Av. paragallinarum* type strain CCUG 12835^T was determined in six different broth media are summarized in Table 2. In general, the number of *Av. paragallinarum* showing visible growth increased with longer incubation times. After 48 h of incubation, all tested *Av. paragallinarum* showed button formations in CAMHB+CS+NADH and VFM medium. At this time point, fewer isolates showed visually readable growth in MHF-Y (n=11), HTM (n=8), and CAMHB+LHB (n=6) broth. None of the isolates grew in un-supplemented CAMHB up to hour 48. The data also demonstrated significantly better readability of button formations in clear media than in the brownish-colored media (CAMHB+LHB, MHF-Y, and VFM; see Figure S1 in the

Supplemental material). With the exception of isolate no. 3 (which showed a diffuse rather turbid growth), isolates grown in CAMHB+CS+NADH and HTM formed distinct buttons in the wells. In contrast, the buttons formed in CAMHB+LHB, MHF-Y, and VFM were less prominent and more difficult to read.

Growth curves of *Av. paragallinarum* with two broth media

Based on the preliminary growth tests, CAMHB+CS+NADH and VFM were used to compile growth curves with the *Av. paragallinarum* type strain CCUG 12835^T and three epidemiologically unrelated *Av. paragallinarum* field isolates (no. 3, 7 and 13). The field isolates no. 3 and 13 were selected because they were extremely difficult to culture and formed tiny dewdrop-shaped colonies (approximately 0.3 mm in size).

The growth curves of the three field isolates and the type strain, including the calculated standard deviations, are visualized in Figures S2 to S5 in the Supplemental material. Both media allowed sufficient growth of the isolates (about $5 \times 10^6 - 10^9$ cfu/ml) after 24 – 48 h incubation at 35 ± 2 °C. Surprisingly, a short-term decrease in numbers of cfu/ml was observed for three isolates at the measurement time points after 24 or 32 h. However, numbers of cfu/ml then increased again, and, except for isolate no. 3, the other three *Av. paragallinarum* reached their highest colony counts (cfu/ml) after 40 h.

Homogeneity of *Av. paragallinarum* MIC values

Based on the growth data and the lack of availability of VFM (20), CAMHB+CS+NADH was selected as the test medium for AST of *Av. paragallinarum*. The homogeneity of MIC values obtained with CAMHB+CS+NADH was assessed by performing five independent experiments of MIC determinations with the five unrelated test isolates against a panel of 24 antimicrobials or antimicrobial combinations.

Since no *Av. paragallinarum* showed visible growth in either growth control after 18, 20, and 22 h, the MIC endpoints of the isolates were determined after 24 and 48 h of incubation. Although readable MICs were obtained for all test isolates at these two time points, the readability (button size) of visible growth in the wells improved after 48 h. However, to evaluate the most appropriate time point for reading MICs of *Av. paragallinarum*, the homogeneity of MICs obtained after 24 and 48 h was compared (Tables 3 and 4). In summary, the MICs obtained after 24 h were less homogeneous than those after 48 h. After 24 hours, the MIC values were within the essential MIC

agreement range for 12 antimicrobials, whereas for the other antimicrobials, deviations in MICs of up to ≥ 7 dilution levels from the MIC modes were observed (Table 3). Considerably better homogeneity of MICs was observed after 48 h of incubation, with deviations of ± 1 or ± 2 dilution steps from the MIC mode for 17 and 6 antimicrobials, respectively (Table 4). Only a single MIC of streptomycin showed a deviation of +3 dilution steps from the MIC mode, while the MICs of ceftiofur, cefotaxime, and cefquinome were 100% homogeneous. As a result, clearly better essential MIC agreements (accepting ± 1 dilution step deviation) were seen after an incubation time of 48 h (96% – 100%, mean value 98.83%) than after 24 h (84% – 100%, mean value 96.33%). In addition, exact MIC agreements ranging between 64% to 100% were observed for both time points, with a slightly higher mean value after 48 h than after 24 h (86% vs. 84%, respectively).

Since it was previously shown that the medium CAMHB+CS+NADH had no effect on MICs of quality control (QC) strains (22), it was tested here whether the extended incubation time of 48 h might influence the MICs of the QC strain *E. coli* ATCC 25922. However, the MICs were within the specified ranges given by CLSI guideline M23 (28) with the only exception of cephalothin, for which they were one dilution step above the QC range in three out of five independent replications.

Comparison of MIC values with medium and supplements from different manufacturers

When comparing the MIC values of the five *Av. paragallinarum* test isolates using CAMHB and supplements from different manufacturers, it was found that most MICs either did not deviate or deviated by a maximum of ± 1 or ± 2 dilution steps from the MIC modes (Table S2 and Table 4). Only the MICs of enrofloxacin and tetracycline of isolate no. 7 deviated by a maximum of ± 3 dilution steps, after additional testing with media components of other producers. Overall, the exact MIC ranged from 56.67% to 100% and the essential MIC agreement ranged from 93.33% to 100%, which is within the accepted range according to CLSI guideline M23 (28).

Testing of a *Av. paragallinarum* collection from different continents

The suitability of the method was tested with the remaining *Av. paragallinarum* that were available for the study. Testing the remaining *Av. paragallinarum* was carried out using the broth medium and incubation conditions as previously worked out. Although eight *Av. paragallinarum* formed speckled buttons in the wells of the microtiter plates, easy-to-read MICs were achieved for all isolates with CAMHB+CS+NADH. Two randomly chosen controls for testing the inoculum density revealed inoculum sizes between 3.8×10^5 to 7.3×10^5 cfu/ml, which is within the specifications according to standard M07 (24).

The MIC distributions and calculated MIC₅₀ and MIC₉₀ values of the entire *Av. paragallinarum* collection (n=83) tested in this study are summarized in Table 5. As no approved breakpoints for *Av. paragallinarum* are available, the isolates could not be classified as resistant, intermediate, or susceptible to the tested antimicrobials. Nevertheless, for many antimicrobials (e.g., ampicillin, cefoperazone, cefotaxime, ceftiofur, cequinome, cephalothin, florfenicol, gentamicin, tilmicosin, tulathromycin) unimodal MIC distributions or distributions comprising a maximum of six dilution steps were seen. In contrast, bimodal or multimodal MIC distributions were obtained for tetracyclines (doxycycline, tetracycline), fluoroquinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin), nalidixic acid, penicillin, streptomycin, and for the antimicrobial combination trimethoprim/sulfamethoxazole (Table 5).

A total of 36 isolates were particularly noticeable, demonstrating higher MICs (compared to the other isolates) to three to five classes of antimicrobials: aminoglycosides (≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin), β -lactams (1 – 2 $\mu\text{g/ml}$ penicillin), tetracyclines (16 – 32 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline, 32 – 128 $\mu\text{g/ml}$ tetracycline), (fluoro)quinolones (32 – 128 $\mu\text{g/ml}$ nalidixic acid, 1 – 2 $\mu\text{g/ml}$ ciprofloxacin, 2 – 8 $\mu\text{g/ml}$ enrofloxacin, 1 – 4 $\mu\text{g/ml}$ marbofloxacin), and/or folate synthesis inhibitors (0.25/4.75 – 8/152 $\mu\text{g/ml}$ trimethoprim/sulfamethoxazole). A large proportion of these *Av. paragallinarum* came from Europe or America (Table S3).

Detection of antimicrobial resistance genes

During method development, PCR analyses for the presence of resistance genes were performed with 14 of the 15 isolates that were included in macrorestriction analysis, as these isolates showed higher MICs compared to the others. This was done to determine whether the resistance phenotypes corresponded to the genotypes. The

PCR analyses demonstrated that all seven isolates with higher MICs of doxycycline (16 – 32 µg/ml) and tetracycline (64 – 128 µg/ml) harbored the tetracycline resistance gene *tet(B)* (Table 6). With the PCR primers used in this study, no other ARGs (A list of the tested resistance genes can be found in Table S1 in the Supplementary data) were detected in the isolates used for method development.

For another 62 *Av. paragallinarum*, WGS data were available, which were analyzed for the presence of ARGs in the course of the present study. About one third of these *Av. paragallinarum* (33.87%, n=21) harbored at least one of the following ARGs: *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *bla_{TEM-1B}*, *catA2*, *sul2*, *tet(B)*, *tet(H)*, and/or *mcr*-like (Table 6). All *Av. paragallinarum* that had MICs of 4 – 32 µg/ml doxycycline and 32 – 128 µg/ml tetracycline harbored *tet(B)* or *tet(H)*. In addition, a partial sequence of an *mcr*-like gene of 1547 base pairs, showing 97% sequence identity the phosphoethanolamine transferase gene of *Moraxella osloensis* strain NP7 (GenBank CP024443.2), was detected in an English field isolate, which showed a colistin MIC of 4 µg/ml, which was within the range of other *Av. paragallinarum* tested. Four American field isolates carried not only *tet(B)*, but also the chloramphenicol resistance gene *catA2*. However, as the microtiter plate layouts used in this study did not contain chloramphenicol, the MIC values for these *catA2*-carrying *Av. paragallinarum* are unknown. Two European isolates with a MIC of 1 µg/ml penicillin and ≥1024 µg/ml streptomycin carried the β-lactamase resistance genes *bla_{TEM-1B}* as well as the aminoglycoside resistance genes *aph(6)-Id* and *aph(3'')-Ib*. Another European field isolate carried only one aminoglycoside resistance gene (*aph(6)-Id*) and showed a comparatively lower MIC of 32 µg/ml streptomycin. Furthermore, there were two European field isolates that harbored the sulfonamide resistance gene *sul2* and had MICs of 0.5/9.5 µg/ml and 2/38 µg/ml trimethoprim/sulfamethoxazole, respectively.

It was found that the majority of the ARG-carrying *Av. paragallinarum* from this study originated from Europe, and fewer from America (Figure S6). Thus, 24 out of 43 European *Av. paragallinarum* tested for the presence of resistance genes had either one (n=21), three (n=1), four (n=1), or six (n=1) ARGs. In addition, four out of 17 American *Av. paragallinarum* tested carried two ARGs, *catA2* and *tet(B)*. African isolates tested showed no ARGs. Due to the low number of available *Av. paragallinarum* from Asia (n=1) or Oceania (n=1), their MIC values were not included in the comparison.

Discussion

Antimicrobial resistance (AMR) in bacterial pathogens is currently an important public health problem (29, 30). Therefore, AST of bacterial pathogens is of prime importance, especially to be able to perform targeted antimicrobial treatment (30, 31). This requires accepted methods for AST, preferably with precise testing specifications published in accepted standards. This is still lacking for some fastidious pathogens, such as *Av. paragallinarum*. Therefore, this study aimed to develop a method for standardized broth microdilution testing of this fastidious and economically important pathogen. In addition, the current susceptibility status of field isolates was assessed using the proposed AST method.

For method development, the growth of 15 *Av. paragallinarum* was compared in six different broth media. As many *Av. paragallinarum* depend on the V-factor (3), it was not surprising that none of the isolates demonstrated growth in CAMHB without the supplementation of this growth factor. Nevertheless, this medium was included because it is the standard medium for testing fast-growing bacteria and is routinely being used in many diagnostic laboratories (21). The two media CAMHB+CS+NADH and VFM allowed the reading of the growth of all tested *Av. paragallinarum* in microtiter plates. But of course it cannot be excluded that other media not tested here (e.g. MH-F broth) would also be suitable. As expected, both media also led to sufficient colony counts (approx. $5 \times 10^6 - 10^9$ cfu/ml) after 24 – 48 h as demonstrated in the growth curves. However, since the availability of VFM is not guaranteed due to the discontinued production of supplement CTM (20), CAMHB+CS+NADH was chosen as the broth medium for further validation steps. This decision was also supported by the fact that this medium was already used for AST of *Av. paragallinarum* in two previous studies (12, 13) and has recently been proposed for standardized AST of the closely related species *Av. gallinarum* (23), as well as for another fastidious pathogen, *G. parasuis* (22). The medium CAMHB+CS+NADH will also be included in the forthcoming CLSI guidance document VET06 as a test medium for *G. parasuis* (personal communication). Using the same medium for different bacterial species is an advantage for veterinary diagnostic laboratories and it is even possible that CAMHB+CS+NADH is also a suitable medium for standardized AST of further fastidious pathogens for which there are no approved AST methods yet. However, in a previous study on *Av. paragallinarum* (12), the reproducibility of the obtained MICs did not yet comply with the requirements of the CLSI. Since *Av. paragallinarum* is

relatively slow growing, different incubation times needed to be evaluated. Although some previous studies examining MICs of *Av. paragallinarum* used incubation times of 20, 22, or 24 h (7, 12, 13, 32 – 36), the MICs could be read at the earliest after 24 h in the course of this study. In addition, low essential MIC agreements were observed by Heuvelink et al. (2018) (12) using a 22-hour incubation period and, in this study, after 24 h (77.8% – 95.6% and 84% – 100%, respectively), which for many antimicrobials did not meet the necessary requirement of $\geq 90\%$ for a new method according to CLSI guideline M23 (28). For this reason, an extension of the incubation period seemed necessary and indeed resulted in higher essential MIC agreements ranging between 96% – 100%, thus exceeding the criterion required by the CLSI (28). This extended incubation time is still within the times suggested in CLSI standards (24 – 48 h) for fastidious bacteria, such as *Campylobacter jejuni* (21). Since the MICs of the QC strain *E. coli* ATCC 25922 were within the required MIC ranges after 24 h (12, 22) and after 48 h for all tested strain-antimicrobial agent combinations except for cephalothin (this study), a complex validation of new QC strains seems not necessary. In addition, testing can be performed with media and supplements from different producers and still leads to comparable MICs, as shown by high essential MIC agreements. Hence, for suitability testing, the remaining *Av. paragallinarum* available for method development were subsequently tested. Although eight isolates formed scattered instead of distinct buttons in the wells of microtiter plates, which were similar to those formed by *Av. gallinarum* (23), easily readable MICs were obtained for all isolates. However, as mentioned above, it was not possible to classify *Av. paragallinarum* as resistant, intermediate, or sensitive because there are currently no accepted breakpoints for this pathogen, despite the interpretive criteria recommended by Blackall (1988) (32). Nevertheless, the bimodal and/or broad MIC distributions observed for some agents (e.g., quinolones, streptomycin, tetracyclines, trimethoprim/sulfamethoxazole) indicated the existence of non-wild type subpopulations with acquired resistance (37). Of particular note was the detection of 36 isolates with higher MICs (MIC values that were at the right edge of the distribution) against ≥ 3 classes of antimicrobials (aminoglycosides, β -lactams, folate synthesis inhibitors, quinolones, tetracyclines), indicating phenotypical multidrug resistance (38). *Av. paragallinarum* with elevated MICs against these antimicrobials have been reported previously (7, 12, 34, 35, 39). Of these, sulfonamides and tetracyclines are

among the antimicrobials commonly used to control *Av. paragallinarum* infections in poultry (3, 7), so isolates with elevated MICs are problematic for therapy.

Although only a limited number of isolates was available for this study without random selection, so that no clear conclusions can be drawn, the observed data seem to indicate that AMR depends on the geographical origin of *Av. paragallinarum* isolates. For example, African *Av. paragallinarum* showed lower MICs of fluoroquinolones and tetracycline, while a large proportion of American and European *Av. paragallinarum* showed comparatively higher MICs. Although this comparison must be considered with caution due to the different numbers of isolates included, these differences might be due to variations in the use of antimicrobials in the individual countries. However, it must also be taken into account that the use of antibiotics varies between different types of poultry production (40, 41).

To assess the correlation between resistance phenotypes and genotypes during method development, *Av. paragallinarum* with elevated MICs used for method development were subjected to PCR analysis for the presence of ARGs. In all seven isolates exhibiting elevated MICs of doxycycline (16 – 32 µg/ml) and tetracycline (64 – 128 µg/ml), the tetracycline resistance gene *tet(B)* was detected, demonstrating a good correlation between genotype and phenotype. In contrast, no ARGs were detected in *Av. paragallinarum* with elevated MICs of penicillin, quinolones, streptomycin, and/or trimethoprim/sulfamethoxazole with the PCR primers used. This might be due to the large number of ARGs conferring resistance to penicillin (42), streptomycin (43) or trimethoprim (44), of which only a smaller spectrum was tested here. In addition, chromosomal mutations may also be responsible for reduced susceptibility to quinolones, streptomycin, sulfonamides, and trimethoprim (45 – 49).

In order to investigate the presence of non-PCR identified ARGs, WGS data were analyzed for 62 *Av. paragallinarum*. Combining the PCR and WGS data, it was demonstrated that many American (4 out of 17) and European (24 out of 43) *Av. paragallinarum* tested in this study harbored one to four ARGs. Some of these ARGs have already been detected in *Av. paragallinarum* or related bacterial species (e.g., *Av. gallinarum*, *G. parasuis*) and confer resistance to aminoglycosides (*aph(6)-Id*), β-lactams (*bla_{TEM}*), sulfonamides (*sul2*), or tetracyclines (*tet(B)*) (23, 36, 50, 51). Nevertheless, to our knowledge, this study is the first that describes the presence of nucleotide sequences showing high sequence identity to *aph(3'')-Ib*, *catA2*, *tet(H)*, and an *mcr*-like gene in *Av. paragallinarum*, genes that are known to mediate

aminoglycoside, β -lactam, chloramphenicol, tetracycline or colistin resistance. Of note, the isolate carrying a *mcr*-like gene had a colistin MIC that corresponded to the MIC₅₀ value of the isolate collection (4 μ g/ml) and, thus, was not higher than the values of many isolates without a *mcr*-like gene. Similar observations were made with *mcr-2.1*-bearing *E. coli* and *Salmonella* spp. exhibiting comparable MICs ranging between 4 and 8 μ g/ml (52 – 55). Yet, a previous study showed that the naturally occurring *mcr*-like genes from *Moraxella* spp., to which the gene detected in our isolate showed a very high similarity, conferred colistin resistance after being experimentally introduced into an *E. coli* host (56). However, whether our isolate should be considered as colistin resistant (as would be the case for *Enterobacteriales*) cannot be determined without clinical breakpoints. Further studies are required to clarify the functionality of the gene in *Av. paragallinarum*. Furthermore, since high-level resistance to colistin is often not only due to the presence of *mcr* genes, but rather to mutations (57), similar mechanisms can be assumed for *Av. paragallinarum*, representing an interesting area of future research.

Conclusion

Reproducible MICs were obtained using CAMHB+CS+NADH as medium for susceptibility testing of *Av. paragallinarum* by broth microdilution with an incubation time of 48 h at 35 \pm 2 $^{\circ}$ C in ambient air. For quality control purposes, *E. coli* ATCC 25922 and the QC ranges included in the CLSI standards can be used (with the exception of cephalothin). Based on the results of this study, it can be concluded that the method is suitable to be used as a standardized method for susceptibility testing of *Av. paragallinarum* and can be included in standards of susceptibility testing. Many of the *Av. paragallinarum* tested had elevated MICs for aminoglycosides, quinolones, tetracyclines and trimethoprim/sulfamethoxazole, most of them originating from America or Europe. Using PCR and WGS, 28 out of 76 *Av. paragallinarum* tested were found to carry at least one nucleotide sequence showing high sequence identity to a resistance gene, *aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *bla*_{TEM-1B}, *catA2*, *sul2*, *tet(B)*, *tet(H)*, and/or *mcr-2.1*. Therefore, future development of clinical breakpoints for this pathogen is strongly recommended.

Funding

This research was funded by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) (grant number FKZ 2818HS015).

Acknowledgments

Special thanks to Cornelia Dürrschmidt, Jan Paulus, Karin Simon and Claudia Walter for their excellent technical support.

Conflicts of Interest

No conflict of interest.

Author contribution statement

Conceptualization: CK, AH; methodology: FG, AH, AM, RB, YC, AJ, AF, JW, FK, ASB, MY, MK, CK; validation: FG, AH, AM, CK formal analysis: FG, AH, RB, AM, AF, CK; investigation: FG, RB, AM, AF, YC, AJ, JW, FK, ASB, ESV, SS, MK, NB; resources: CK, AH, AJ, ESV, SS, MK, NB; data curation: FG, AH, RB, CK; writing—original draft: FG, AH, CK; writing—review and editing: FG, AH, AM, YC, RB, AJ, AF, JW, FK, ASB, MY, ESV, SS, MK, NB, CK; supervision: AH, CK; project administration: CK. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

1. Blackall PJ. 1999. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 12(4):627–632.
2. Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. 2005. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(Pt 1):353–362.
3. Blackall PJ, Soriano-Vargas E. 2020. Infectious coryza and related bacterial infections, p 890–906. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (ed), *Diseases of Poultry*, 14th ed, vol 2. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
4. Guo M, Liu D, Chen X, Wu Y, Zhang X. 2022a. Pathogenicity and innate response to *Avibacterium paragallinarum* in chickens. *Poult Sci* 101(1):101523.

5. Han MS, Kim JN, Jeon EO, Lee HR, Koo BS, Min KC, Lee SB, Bae YJ, Mo JS, Cho SH, Jang HS, Mo IP. 2016. The current epidemiological status of infectious coryza and efficacy of PoulShot Coryza in specific pathogen-free chickens. *J Vet Sci* 17(3):323–330.
6. Gallardo RA, Da Silva AP, Egaña-Labrin S, Stoute S, Kern C, Zhou H, Cutler G, Corsiglia C. 2020. Infectious coryza: Persistence, genotyping, and vaccine testing. *Avian Dis* 64(2):157–165.
7. Guo M, Chen X, Zhang H, Liu D, Wu Y, Zhang X. 2022b. Isolation, serovar identification, and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* from chickens in China from 2019 to 2020. *Vet Sci* 9(1):27.
8. Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. 1998. Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. *J Clin Microbiol* 36(7):1907–1911.
9. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens* 10(2):165.
10. Traczewski MM, Ambler JE, Schuch R. 2021. Determination of MIC quality control parameters for exebacase, a novel lysin with antistaphylococcal activity. *J Clin Microbiol* 59(7):e0311720.
11. Clothier KA, Torain A, Reinl S. 2019. Surveillance for *Avibacterium paragallinarum* in autopsy cases of birds from small chicken flocks using a real-time PCR assay. *J Vet Diagn Invest* 31(3):364–367.
12. Heuvelink A, Wiegel J, Kehrenberg C, Dijkman R, Soriano-Vargas E, Feberwee A. 2018. Antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates from outbreaks of infectious coryza in Dutch commercial poultry flocks, 2008–2017. *Vet Microbiol* 217:135–143.
13. Luna-Castrejón LP, Buter R, Pantoja-Nuñez GI, Acuña-Yanes M, Ceballos-Valenzuela K, Talavera-Rojas M, Salgado-Miranda C, Heuvelink A, De Wit S, Soriano-Vargas E, Feberwee A. 2021. Identification, HPG2 sequence analysis, and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial layers in Sonora State, Mexico. *Avian Dis* 65(1):95–101.

14. Hinz KH. 1973. Beitrag zur differenzierung von *Haemophilus*-stämmen aus hühnern II, mitteilung: serologische untersuchungen im objektträger-agglutinations-test. *Avian Pathol* 2:269–278.
15. Chen X, Chen Q, Zhang P, Feng W, Blackall PJ (1998): Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. *Avian Path* 27(3):296–300.
16. Muhammad TMN, Sreedevi B. 2015. Detection of *Avibacterium paragallinarum* by polymerase chain reaction from outbreaks of infectious coryza of poultry in Andhra Pradesh. *Vet World* 8(1):103–108.
17. Feberwee A, Dijkman R, Buter R, Soriano-Vargas E, Morales-Erasto V, Heuvelink A, Fabri T, Bouwstra R, de Wit S. 2019. Identification and characterization of Dutch *Avibacterium paragallinarum* isolates and the implications for diagnostics. *Avian Path* 48(6):549–556.
18. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett Timothy J. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3(1):59–67.
19. CLSI (2016): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. In: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
20. CLSI (2019): Replacement broth medium for Veterinary Fastidious Medium and new *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC® 27090 and *Histophilus somni* ATCC® 700025 minimal inhibitory concentration quality control ranges.
21. CLSI (2020): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET01S, 5th edition. In: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
22. Prüller S, Turni C, Blackall PJ, Beyerbach M, Klein G, Kreienbrock L, Strutzberg-Minder K, Kaspar H, Meemken D, Kehrenberg C. 2017. Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol* 55(1):264–273.
23. Gütgemann F, Müller A, Churin Y, Jung A, Kumm F, Heuvelink A, Yue M, Kehrenberg C. 2022a. Proposal of a method for harmonized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium gallinarum*. *J Clin Microbiol* 60(8):e0041922.

24. CLSI (2018b): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. In: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
25. Gütgemann, F, Müller A, Churin Y, Jung A, Braun A-S, Yue M, Kehrenberg C. 2022b. Development of a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella avium* using broth microdilution and detection of resistance genes. *J Appl Microbiol* 132(3):1775–1787.
26. Buter R, Feberwee A, de Wit S, Heuvelink A, da Silva A, Gallardo R, Soriano Vargas E, Swanepoel S, Jung A, Tödte M, Dijkman R. 2023. [Molecular characterization of the HMTp210 gene of Avibacterium paragallinarum and the proposition of a new genotyping method as alternative for classical serotyping.](#) *Avian Pathol* 52(5):362-376.
27. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 33(9):2233–2239.
28. CLSI (2018a): Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. CLSI guideline M23. In: *Clinical and Laboratory Standards Institute*.
29. Antimicrobial Resistance Collaborators. 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399(10325):629–655.
30. Gajic I, Kabic J, Kekic D, Jovicevic M, Milenkovic M, Mitic Culafic D, Trudic A, Ranin L, Opavski N. 2022. Antimicrobial susceptibility testing: A comprehensive review of currently used methods. *Antibiotics* 11(4):427.
31. Fuhrmeister AS, Jones RN. 2019. The importance of antimicrobial resistance monitoring worldwide and the origins of SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open Forum Infect Dis* 6(Suppl 1):1–4.
32. Blackall PJ. 1988. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 32(4):742–747.
33. Blackall PJ, Yamamoto R. 1989. 'Haemophilus gallinarum'—a re-examination. *J Gen Microbiol* 135(Pt 2):469–474.
34. Hsu YM, Shieh HK, Chen WH, Sun TY, Shiang JH. 2007. Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains. *Vet Microbiol* 124(3-4):209–218.

35. Noonkhokhetkong T, Chukiatsiri K, Sasipreeyajan J, Chansiripornchai N. 2013. Determination of antimicrobial susceptibility, antimicrobial resistance genes and in vivo testing of antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum*. *Thai J Vet Med* 43(4):525–531.
36. Xu J, Mei C, Zhi Y, Liang Z-X, Zhang X, Wang H-J. 2022. Outer membrane vesicle mediated multidrug resistance gene transfer in *Avibacterium paragallinarum*. *bioRxiv* 488265.
37. Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, Martinez JL. 2014. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS one* 9(1):e86669.
38. Müller A, Jansen W, Grabowski NT, Monecke S, Ehricht R, Kehrenberg C. 2018. ESBL- and AmpC-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J Food Microbiol* 283:52–58.
39. Zhu J, Chen Y, Wu Y, Wang Y, Zhu K. 2022. Commensal bacteria contribute to the growth of multidrug-resistant *Avibacterium paragallinarum* in chickens. *Front Microbiol* 13:1010584.
40. Barroga TRM, Morales RG, Benigno CC, Castro SJM, Caniban MM, Cabullo MFB, Agunos A, de Balogh K, Dorado-Garcia A. 2020. Antimicrobials used in backyard and commercial poultry and swine farms in the Philippines: A qualitative pilot study. *Front Vet Sci* 7:329.
41. Jibril AH, Okeke IN, Dalsgaard A, Olsen JE. 2021. Association between antimicrobial usage and resistance in *Salmonella* from poultry farms in Nigeria. *BMC Vet Res* 17(1):234.
42. Van Hoek AHAM, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Paul Roberts A, Aarts HJM. 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol* 2:203.
43. Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57(1):138–163.
44. Grape M, Motakefi A, Pavuluri S, Kahlmeter G. 2007. Standard and real-time multiplex PCR methods for detection of trimethoprim resistance *dhfr* genes in large collections of bacteria. *Clin Microbiol Infect* 13(11):1112–1118.

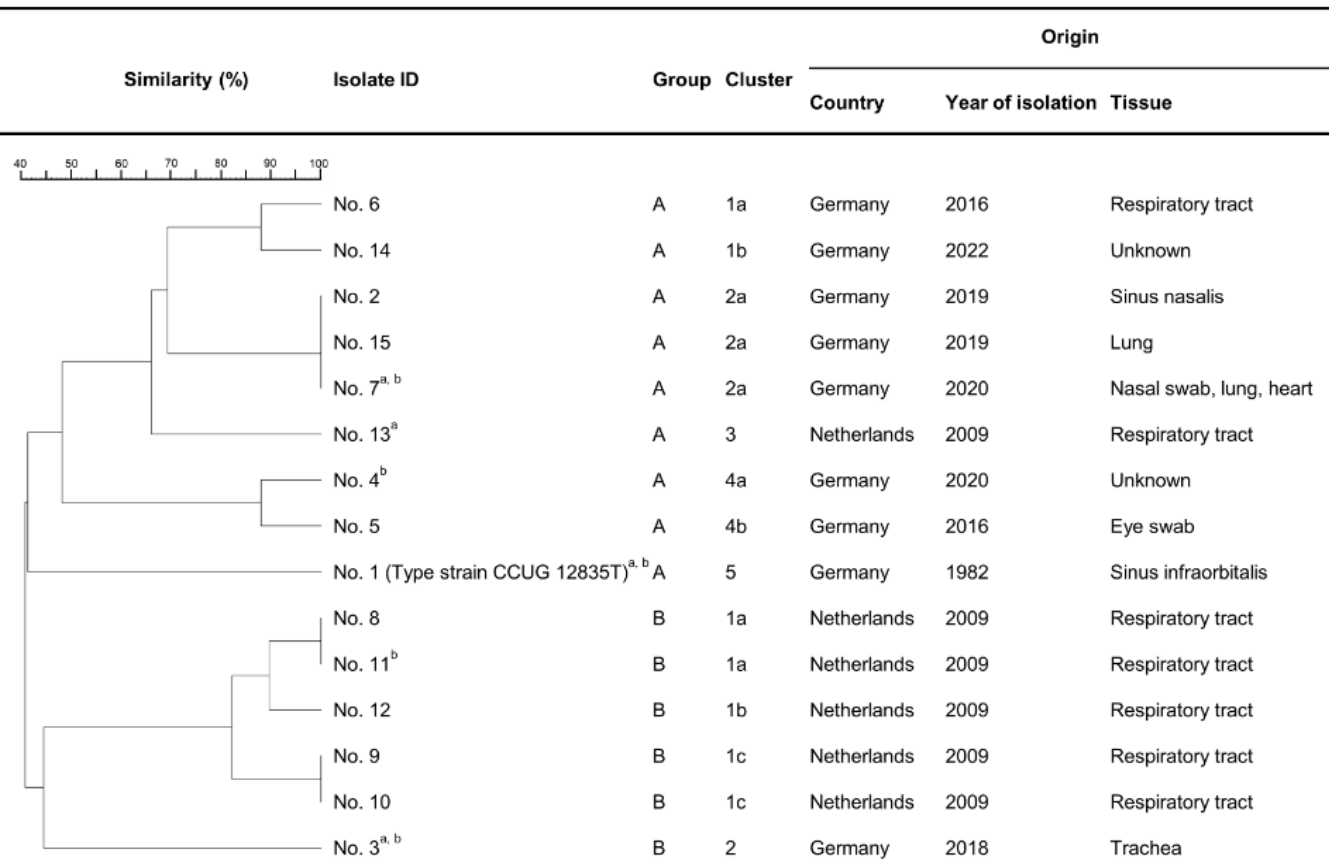
45. Sköld O. 2000. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat* 3(3):155–160.
46. Springer B, Kidan YG, Prammananan T, Ellrott K, Böttger EC, Sander P. 2001. Mechanisms of streptomycin resistance: Selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45(10):2877–2884.
47. Fiebelkorn KR, Crawford SA, Jorgensen JH. 2005. Mutations in *folP* associated with elevated sulfonamide MICs for *Neisseria meningitidis* clinical isolates from five continents. *Antimicrob Agents Chemother* 49(2):536–540.
48. Kehrenberg C, Friederichs S, de Jong A, Schwarz S. 2007. Novel variant of the *qnrB* gene, *qnrB12*, in *Citrobacter werkmanii*. *Antimicrob Agents Chemother* 52(3):1206–1207.
49. Watson M, Liu J-W, Ollis D. 2007. Directed evolution of trimethoprim resistance in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 274(10):2661–2671.
50. Byarugaba DK, Minga UM, Gwakisa PS, Katunguka-Rwakishaya E, Bisgaard M, Christensen H, Olsen JE. 2011. Demonstration of antibiotic resistance genes *strA*, *bla_{TEM}*, *tetA*, *tetC* and *sul2* in *Avibacterium paragallinarum*. *Afr J Microbiol Res* (5):3624–3627.
51. Wan X, Li X, Osmundson T, Li C, Yan H. 2020. Whole-genome sequence analyses of *Glaesserella parasuis* isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *PeerJ* 8:e9293.
52. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, Malhotra-Kumar S. 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill* 21(27).
53. Garcia-Graells C, De Keersmaecker SCJ, Vanneste K, Pochet B, Vermeersch K, Roosens N, Dierick K, Botteldoorn N. 2018. Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from good at retail in Belgium from 2012 to 2015. *Foodborne Pathog Dis* 15(2):114–117.
54. Poirel L, Larpin Y, Dobias J, Stephan R, Decousser JW, Madec JY, Nordmann P. 2018. Rapid polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the *mcr-1/mcr-2* genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 90(1):7–10.
55. Gaballa A, Wiedmann M, Carroll LM. 2022. More than *mcr*: canonical plasmid- and transposon-encoded mobilized colistin resistance (*mcr*) genes represent a subset of phosphoethanolamine transferases. *bioRxiv*.

56. Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. 2017. *Moraxella* species as potential sources of MCR-Like polymyxin resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2017, 61(6):e00129-17.
57. Bertelloni F, Cagnoli G, Turchi B, Ebani VV. 2022. Low level of colistin resistance and *mcr* genes presence in *Salmonella* spp.: evaluation of isolates collected between 2000 and 2020 from animals and environment. *Antibiotics* 11(2):272.
58. Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. 1983. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol* 17:958–964.
59. Rimler RB. 1979. Studies of the pathogenic avian haemophili. *Avian Dis* 23:1006–1018.
60. Page LA. 1962. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res* 23:85–95.
61. Kato K, Tsubahara H. 1962. Infectious coryza of chickens. II. Identification of isolates. *Bull Nat Inst Animal Health* 45:21–26.
62. Hinz K-H. 1980. Heat-stable antigenic determinants of *Haemophilus paragallinarum*. *Zbl Vet Med B* 27:668–676.
63. Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. 1989. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *J Clin Microbiol* 27:1510–1513.

Figure legend

Figure 1: Genetic similarity and origin of 15 *Avibacterium paragallinarum* used for method development.

^aThis isolate was used to compile growth curves; ^bThis isolate was selected for method validation steps.



Tables

Table 1: Origin and number of *Av. paragallinarum* field isolates (n=76) and reference or type strains (n=7) used in this study.

Origin			Quantity of <i>Av. paragallinarum</i>		
Continent	Country	Year of isolation	Field isolates	Strains# (strain designation)	
Africa	South Africa	1994	1		
		1998	2		
		2002	1		
		2008	1		
		2011	1		
		2012	4		
		2014	2		
		2015	3		
		Unknown		1 (SA-3 ^{*,a})	
	Zimbabwe	2006	1		
America	Brazil	Unknown		1 (E-3C ^{*,b})	
		2002	1		
	Ecuador	2005	1		
		Unknown	1		
	Guadeloupe	2007	3		
		2008	2		
	Mexico	2011	1		
		2015	2		
		2017	1		
		2019	1		
		Unknown	1		
		Peru	2012	1	
		USA	Unknown		1 (0222 ^{*,c})
Asia	Japan	Unknown		1 (221 ^{*,d})	
Europe	Belgium	2020	1		
		England	2008	1	
			2010	4	
			2011	1	
			2012	6	
	Germany	1973		1 (CCUG 12835 ^T)	
		2015	1		
		2016	6		
		2018	5		
		2019	3		
		2020	2		
		2022	1		
		Unknown		1 (2671 ^{*,e})	
		Netherlands	2009	6	
			2010	1	
	2017		1		
	2018		2		
2020	2				
Spain	2021	1			
	2017	1			
Oceania	Australia	Unknown		1 (HP14 ^{*,f})	

* Reference strain; ^T Type strain; ^a Strain SA-3, South Africa, 1982 provided by Rick Rimler (58); ^b Strain E-3C, Sao Paulo, Brazil, 1979 (59); ^c Strain 0222, California, USA, 1960 (60); ^d Strain 221, Japan, 1961 (61); ^e Strain 2671, Germany, 1979 (62); ^f Strain HP14, Australia, 1988 (63).

Strain is defined here as a very well characterized and studied organism that is publicly available (typically from a strain collection)

Table 2: Visible growth of 15 *Avibacterium paragallinarum* used for method development in six broth media.

Reading of plates after an incubation time of (h)	Number of isolates showing visible growth in the broth medium					
	CAMHB ^a	CAMHB + LHB ^b	CAMHB + CS + NADH ^c	HTM ^d	MHF-Y ^e	VFM ^f
18	0	0	11	6	6	8
20	0	1	11	6	7	10
22	0	1	11	7	7	10
24	0	1	11	7	7	11
48	0	6	15	8	11	15

^a Cation-adjusted Mueller-Hinton broth; ^b CAMHB + 2.5% lysed horse blood; ^c CAMHB + 1% chicken serum + 0.0025% NADH; ^d Haemophilus Test Medium; ^e Mueller-Hinton fastidious broth medium with yeast extract; ^f VFM, Veterinary Fastidious Medium.

Table 3: Homogeneity of *Avibacterium paragallinarum* MIC values obtained from broth microdilution susceptibility testing in CAMHB+CS+NADH after 24 h of incubation at 35 ± 2 °C.

Antimicrobial agent	Deviation from MIC mode ^{a,b}										Exact MIC agreement (%) ^c	Essential MIC agreement (%) ^d			
	>-7	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	0	1			2	3	4
Amoxicillin/clavulanic acid 2:1								4*	21*					84	100
Ampicillin								1	22*	2				88	100
Cefoperazone									25*					100	100
Cefotaxime									25*					100	100
Ceftiofur									25*					100	100
Cefquinome									25*					100	100
Cephalothin								1*	22*	2				88	100
Ciprofloxacin									24*	1				96	100
Colistin				2*				2	16	5				64	92
Doxycycline						1*		1	20	3				80	96
Enrofloxacin									21*	4				84	100
Florfenicol								3*	22					88	100
Gentamicin								3*	19	1	2			76	92
Imipenem								3	22*					88	100
Marbofloxacin									22*	3				88	100
Nalidixic acid				1*	1*			3	19	1				76	92
Neomycin						1*		5	17	2				68	96
Penicillin								2	22*			1		88	96
Streptomycin	2*							1	21*		1			84	88
Tetracycline								3	21*		1			84	96
Tiamulin				2*	1			3	17	1	1			68	84
Tilmicosin		1*	1*					4	18	1				72	92
Trimethoprim/sulfamethoxazole 1:19								2	20*	3				80	100
Tulathromycin				1*	1*			2	18	2	1			72	88

Data that fulfill the criteria of the essential MIC agreement are highlighted in gray.

^a The MIC mode indicates the most frequently measured MIC related to an isolate and agent; ^b Data are from testing five isolates in five independent replications; ^c Percentage of MIC values corresponding to the MIC mode of the isolates; ^d The essential MIC agreement allows a deviation of ±1 dilution step from the MIC mode; * The MIC value of at least one isolate was equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table 4: Homogeneity of *Avibacterium paragallinarum* MIC values obtained from broth microdilution susceptibility testing in CAMHB+CS+NADH after 48 h incubation at 35 ± 2 °C.

Antimicrobial agent	Deviations from MIC mode ^{a,b}						Exact MIC agreement (%) ^c	Essential MIC agreement (%) ^d	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
Amoxicillin/clavulanic acid 2:1			3*	21*	1			84	100
Ampicillin			1*	22*	2			88	100
Cefoperazone				24*	1			96	100
Cefotaxime				25*				100	100
Ceftiofur				25*				100	100
Cefquinome				25*				100	100
Cephalothin			3*	22*				88	100
Ciprofloxacin				23*	22			92	100
Colistin			3	18	3	1		72	96
Doxycycline			3	17	5			68	100
Enrofloxacin				22*	3			88	100
Florfenicol				23	2			92	100
Gentamicin			1	20	4			80	100
Imipenem			1	23*	1			92	100
Marbofloxacin				21*	4			84	100
Nalidixic acid		1	2	20	2			80	96
Neomycin			3	22				88	100
Penicillin			4*	16	4		1	64	96
Streptomycin				24*		1		96	96
Tetracycline			3	22				88	100
Tiamulin		1	2	20	2			80	96
Tilmicosin		1	2	21	1			84	96
Trimethoprim/sulfamethoxazole 1:19			2	21*	2			84	100
Tulathromycin			2	19	3	1		76	96

Data that fulfill the criteria of the essential MIC agreement are highlighted in gray.

^a The MIC mode indicates the most frequently measured MIC related to an isolate and agent; ^b Data are from testing five isolates in five independent replications; ^c Percentage of MIC values corresponding to the MIC mode of the isolates; ^d The essential MIC agreement allows a deviation of ±1 dilution step from the MIC mode; * The MIC value of at least one isolate was equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table 5: MIC values of 83 *Av. paragallinarum* isolates (74 field isolates and ten reference or type strains) obtained after 48 h incubation at 35 ± 2 °C in CAMHB+CS+NADH.

Antimicrobial agent ^a	Number of <i>Av. paragallinarum</i> and their MIC ^b (µg/ml)																MIC ₅₀ ^c (µg/ml)	MIC ₉₀ ^d (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
AMC ^e			9*	4	51	18	1												0.12	0.25
AMP			10*	21	26	20	6												0.12	0.25
CFP				72*	8	2	1												≤0.06	0.12
CTX		81*	1	1															≤0.015	≤0.015
CQN		54*	20	5		2	2												≤0.015	0.06
XNL			72*	7	2	1	1												≤0.03	0.06
CEF				46*	18	17	1	1											≤0.06	0.25
CIP	31*	9	9	2	1	3	6	21	1										0.03	1
CST						1	4	5	31	28	6	2	4	1	1 [#]				4	8
DOX					1	2	20	17	13	3	5	15	7						2	16
ENRO	11*	11	12	11	7	2		2	8	16	3								0.06	4
FFN					6*	35	33	7		2									0.5	1
GEN					5*	4	18	34	17	5									1	2
IPM		23*	13	40	7														0.06	0.06
MAR	10*	15	16	8	2	1	3	14	13	1									0.06	2
NAL				1*	6	4	13	14	3	5	4	18	14	1					8	64
NEO					2*	4	13	26	25	12				1					2	8
PEN		6*	14	4	8	19	10	13	9										0.25	2
STR							1	3	12	23	2	1	3	1	2	1	2	32 [#]	16	≥1024
TET					1*	1	9	22	21				5	16	8				2	64
TIA				3			2	3	13	22	25	15							4	16
TIL						3		10	17	31	22								4	8
SXT ^f		29*	12	13	3	3	11	5	5	1	1								0.06	1
TUL						4	8	39	25	5	2								1	2

^a AMC, amoxicillin-clavulanic acid 1:2 ratio; AMP, ampicillin; CFP, cefoperazone; CTX, cefotaxime; CQN, cefquinome; XNL, ceftiofur; CEF, cephalothin; CIP, ciprofloxacin; CST, colistin; DOX, doxycycline; ENRO, enrofloxacin; FFN, florfenicol; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; MAR, marbofloxacin; NAL, nalidixic acid; NEO, neomycin; PEN, penicillin; STR, streptomycin; TET, tetracycline; TIA, tiamulin; TIL, tilmicosin; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole 1:19 ratio; TUL, tulathromycin; ^b MIC, minimal inhibitory concentration; ^c MIC₅₀ indicates the MIC that is required to inhibit 50% of the isolates; ^d MIC₉₀ indicates the MIC that is required to inhibit 90% of the isolates; ^e Data represent the concentration of amoxicillin; ^f Data represent the concentration of trimethoprim; ^g The tested range of the antimicrobials is visualized in the white area; * MIC values equal to or lower than the lowest concentrations tested; # MIC values equal to or higher than the highest concentrations tested.

Table 6: Antimicrobial resistance genes of 76 *Av. paragallinarum* detected by whole genome sequencing or PCR analysis.

Antimicrobial resistance genes	Number of isolates with resistance gene			percentage (%) among tested isolates	MIC values of isolates carrying the resistance gene
	detected by		total		
	WGS (n=62)	PCR (n=14)			
Aminoglycosides					
<i>aph(6)-Id</i>	3	ND	3	4.84	STR: ≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$
<i>aph(3'')-Ib</i>	2	ND	2	3.23	STR: ≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$
β-lactams					
<i>bla_{TEM-1B}</i>	2	ND	2	3.23	PEN: 1 $\mu\text{g/ml}$
Chloramphenicol					
<i>catA2</i>	4	ND	4	6.45	ND ^a
Polymyxins					
<i>mcr-2.1</i>	1	ND	1	1.61	COL: 4 $\mu\text{g/ml}$
Sulfonamides					
<i>sul2</i>	2	0	2	2.63	SXT: 0.5/9.5 – 2/38 $\mu\text{g/ml}$
Tetracyclines					
<i>tet(B)</i>	19	7	26	34.21	DOX: 4 – 32 $\mu\text{g/ml}$ TET: 32 – 128 $\mu\text{g/ml}$
<i>tet(H)</i>	1	0	1	1.31	DOX: 4 – 32 $\mu\text{g/ml}$ TET: 32 – 128 $\mu\text{g/ml}$

WGS, whole genome sequencing; ND, not determined; COL, colistin; DOX, doxycycline; PEN, penicillin; STR, streptomycin; SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole; TET, tetracycline.

^a Chloramphenicol was not tested as it was not part of the microtiter plate layouts.

Manuskript 1

Recommendation of a method for harmonized antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasmoides* ('*Mycoplasma*') *gallisepticum* using broth microdilution

Franziska Gütgemann¹, Anja Müller¹, Yury Churin¹, Franziska Kumm¹; Min Yue^{2,3}, Franca Möller Palau-Ribes⁴, Michael Lierz⁴, Corinna Kehrenberg^{1*}

¹Institute for Veterinary Food Science, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig University Giessen, Frankfurter Str. 92, 35392 Giessen, Germany

²Institute of Preventive Veterinary Science and Department of Veterinary Medicine, Zhejiang University College of Animal Sciences, Hangzhou 310058, China

³Hainan Institute of Zhejiang University, Sanya 572025, China

⁴Clinic for Birds, Reptiles, Amphibians and Fish, Justus-Liebig University Giessen, Hollerweg 18, 35392 Giessen, Germany

*Corresponding author

E-Mail: corinna.kehrenberg@vetmed.uni-giessen.de

Keywords: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasmoides gallisepticum*, broth microdilution, antimicrobial susceptibility testing, MIC values, SP4 broth, CLSI, standardization

Causing chronic respiratory disease (CRD) in chickens and infectious sinusitis in turkeys, *Mycoplasmoides (M.) gallisepticum* (formerly *Mycoplasma gallisepticum*) is a big concern in the poultry industry. However, as there are no approved standard methods for antimicrobial susceptibility testing (AST) of this fastidious pathogen, the aim of this study was to develop a method for harmonized broth microdilution susceptibility testing for *M. gallisepticum*. For this, sixteen *M. gallisepticum* of different origins were included in the study. A suitable broth medium for AST of *M. gallisepticum* was selected by performing growth experiments with four media containing a pH indicator. SP4 was the only broth that provided sufficient growth of *M. gallisepticum* isolates. Thus, this medium was selected for AST and all five *M. gallisepticum* isolates selected for validation showed easy-to-read MICs after 72 - 168 ± 2 h at 37 °C, indicated by a color change from red to yellow. To assess the homogeneity of minimal inhibitory concentrations (MIC values), five replicates of broth microdilution susceptibility testing were performed with five *M. gallisepticum* and a panel of 24 antimicrobials according to CLSI guideline M43-A. Homogeneous MICs were detected after incubation for 72, 96 and 168 ± 2 h, with the best values at 72 ± 2 h (mean essential MIC agreement of 99.76 %; mean exact MIC agreement of 91.06 %). The remaining *M. gallisepticum* were tested using the same test parameters and the suitability of common QC strains and *Mycoplasma bovis* DSM 22781^T was evaluated. As a result, easy-to-read MICs were detected for all isolates tested. Some *M. gallisepticum* showed elevated MICs of fluoroquinolones, macrolides, and/or streptomycin. After 20 tests with the *M. gallisepticum* DSM 19817^T, new MIC ranges for five agents could be defined that meet the requirements for a new QC strain according to CLSI guideline M23. The data indicate that the method recently recommended for *My. bovis* is suitable for harmonized AST of *M. gallisepticum*. As previously reported, *My. bovis* DSM 22781^T appears to be suitable as a new QC strain for which MIC ranges were proposed in this study.

Introduction

The worldwide occurring avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* (formerly *Mycoplasma gallisepticum*) causes airsacculitis alone or in combination with other avian pathogens in poultry (Gupta et al. 2018; OIE 2021). The great importance of this avian pathogen is reflected in the fact that *M. gallisepticum* is on the list of notifiable terrestrial and aquatic animal diseases of the World Organisation for Animal Health (WOAH, founded as OIE). Being a causative agent of chronic respiratory disease (CRD) in chickens and infectious sinusitis in turkeys, affected poultry show nasal discharge, sneezing and coughing (Armour 2020; Zhang et al. 2020). Since *M. gallisepticum* can generally infect any age group through horizontal or vertical transmission, it can lead to massive deterioration in egg and poultry production (Armour 2020). Moreover, the avian pathogen is also one of the main reasons for significant costs due to expensive prevention and control measures in poultry farms (Armour 2020). Besides poultry, *M. gallisepticum* infections have also been detected in a variety of other gallinaceous or wild bird species, including coturnix quail, duck, geese, grey partridge, peafowl or pheasant (do Nascimento and do Nascimento 1986; Cookson and Shivaprasad 1994; Benčina et al. 2003; Vitula et al. 2011; Armour 2020). Antimicrobial therapies are routinely used in poultry to reduce the morbidity and mortality of *M. gallisepticum* infections and their economic consequences. However, since *M. gallisepticum* belongs to the cell wall-less mollicutes and is intrinsically resistant to cell wall-attacking (e.g. β -lactams) and other agents (e.g. trimethoprim), antimicrobial treatment of *M. gallisepticum* infections is limited from the outset (Gautier-Bouchardon 2018; Armour 2020). In addition, over the last two decades, several studies have reported an increased incidence of *M. gallisepticum* isolates with AMR and cross-resistance to fluoroquinolones, macrolides, pleuromutilins and tetracyclines (Gerchman et al. 2011; Khatoon 2018; Armour 2020; Taiyari et al. 2021), although antimicrobial therapy with these agents was shown to be effective before 2000 (Cummings et al. 1986; Glisson et al. 1989; Tanner et al. 1993; Bradbury et al. 1994; Jordan et al. 1999). For this reason and to adjust use of antimicrobials, it is important to monitor the antimicrobial susceptibility of clinical isolates using appropriate methods. However, the AST of *M. gallisepticum* represents a major challenge for many laboratories, since this fastidious pathogen has high growth requirements and common methods (e.g. for *Enterobacterales*) are therefore not suitable.

Although Hannan (2000) has published guidelines for testing the minimum inhibitory concentrations (MIC values) of veterinary mycoplasmas, a variety of methods and different test parameters (e.g. medium, pH indicator, incubation conditions) have been used for AST of *M. gallisepticum* over the past decades (Taiyari et al. 2021). However, the performance of non-standard methods can significantly influence MIC values and thus the choice of the most appropriate antimicrobial agent (Whithear et al. 1983; Schuurmans et al. 2009), may give rise to resistance selection. Therefore, to prevent potential misuse of antimicrobials and associated antimicrobial resistance selection in *M. gallisepticum*, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) has called for the development of a suitable method for veterinarian mycoplasmas like *M. gallisepticum* (CLSI 2017).

The aim of this study was therefore to develop a suitable method for broth microdilution susceptibility testing of *M. gallisepticum* by evaluating the reproducibility of MIC values at different time points according to CLSI guidelines. In addition, the suitability of the *Mycoplasma bovis* DSM 22781^T as a future QC strain was investigated after it had been recommended as a new QC strain for testing the bovine pathogen *Mycoplasma bovis* (Gütgemann et al. 2023).

Material and methods

***M. gallisepticum* collection, selection of test isolates, and culturing**

A total of 16 *M. gallisepticum* were collected for this study, including 13 field isolates and three type or reference strains (Table 1). The field isolates were isolated from turkeys (n=5), Humboldt penguins (n=2), unspecified poultry (n=2), chicken (n=1), or unknown species (n=3) between 2010 and 2021 (unknown year of isolation, n=8). For method development and quality purposes, the *M. gallisepticum* DSM 19817^T (synonym strain PG 31) was acquired from the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ, Braunschweig, Germany). The *M. gallisepticum* live vaccine F-strain and *M. gallisepticum* reference strain 75969 were acquired from the Mollicutes Collection, supervised by the International Organization for Mycoplasma (IOM). For method validation steps, five *M. gallisepticum* (type strain DSM 19817^T and field isolates no. 1 – 4) were selected (referred to as test isolates), originating from different years and bird species (Table 1).

For culturing of *M. gallisepticum*, the SP4 broth and SP4 agar were used. Media were prepared according to CLSI document M43-A (CLSI 2011), using a 1 % solution of the

pH indicator phenol red (v/v) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany). Incubation of liquid cultures (48 h) and agar plates (72 – 144 h) took place at 37 °C + 5 % CO₂. Changing color from red to yellow indicated the growth of *M. gallisepticum* and colonies grown on SP4 agar were examined under a light microscope (40x) (Carl Zeiss AG; Oberkochen, Germany). Species confirmation of *M. gallisepticum* was confirmed using a previously described PCR assay (Lierz et al. 2008). For this, the DNA of fresh *M. gallisepticum* colonies has been isolated by boiling (15 min; 99 °C) and centrifugation (30 min; 15000 g).

Determination of colony counts and inoculum setting of *M. gallisepticum*

Determination of colony counts (cfu/ml) was performed according to the inoculum preparation specified by CLSI guideline M43-A for testing human mycoplasmas (CLSI 2011). For this, approximately 20 µl (two loops) of a *M. gallisepticum* glycerol stock were inoculated in 4 ml of the respective broth (SP4 broth for susceptibility testing). The bacterial suspension was then incubated for 48 h at 37 °C + 5 % CO₂ without shaking. Then, 100 µl of the bacterial suspension were transferred into 900 µl of the respective dilution medium (0.9 % saline solution (Merck KgaA, Darmstadt, Germany) for growth experiments or SP4 broth for broth microdilution) to prepare 10-fold serial dilutions and the remainder of the suspension was frozen at -80 °C until the testing day. Afterwards, 20µl of each dilution were spread on pre-dried (1 h at 37 °C) SP4 agar plates, the undersides of which had previously been divided into six segments with a permanent marker. To ensure that the entire volume remains on the agar surface, care was taken not to break the surface with the pipette tip. Then, the agar plates were incubated at 37 °C + 5 % CO₂ for 72 – 144 h until easily readable colonies were countable in a meandering pattern under the light microscope. To calculate back the number of cfu/ml of the frozen bacterial suspensions, the following formula was used: Number of colonies counted x 50 x dilution level (CLSI 2011).

Preliminary growth test and growth curve generation with four broth media

To find a suitable broth for harmonized AST of *M. gallisepticum*, three independent preliminary growth experiments were performed to investigate the visible growth (color change) of the entire *M. gallisepticum* collection using four broth media containing a pH indicator. The Mycoplasma broth and SP4 broth are CLSI approved media for harmonized MIC determination of human mycoplasmas (CLSI 2011). The modified

Frey broth (Li et al. 2010) and Friis broth (Friis 1975; de Jong et al. 2021) have been used in past studies for AST of avian mycoplasmas like *M. gallisepticum*.

In brief, frozen bacterial suspensions with known cfu/ml were pre incubated in ambient air for 2 h at 37 °C. To generate a starting inoculum of approximately 10^3 , a volume of 100 µl of a 10^4 cfu/ml suspension was suspended into 900 µl of the test medium. For this dilution series, saline solution was used instead of SP4 broth to avoid foreign media components getting into the samples. Then, 50 µl of this bacterial suspension were pipetted into three wells of sterile microtiter plates (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Germany). For negative controls (quality controls), six additional wells were filled with 50 µl medium without inoculated with bacteria. Subsequently, the plates were sealed with a self-adhesive film and incubated at 37 °C in ambient air. The wells were visually checked for a color change after incubating for 24, 48, 72, 96, and 168 h, always done by the same person.

For growth curve generation, three independent growth experiments were performed with five *M. gallisepticum* test isolates (*M. gallisepticum* DSM 19817^T and field isolates no. 1 – 4) using the four media previously used in the growth preliminary tests. Briefly, a starting inoculum of 10^3 cfu/ml was set in 20 ml test medium as previously described. The samples were then incubated at 37 °C in ambient air without shaking and the cfu/ml were determined after 24, 48, 72, 96, and 168 h as described above. After calculating the mean cfu/ml and standard deviations from the three repetitions, growth curves were generated using Microsoft Excel software (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Antimicrobial susceptibility testing and homogeneity of MIC values

Continuing the growth experiments, the SP4 broth, which is already approved by the CLSI for testing *M. pneumoniae* (CLSI 2011), was chosen as the test medium for susceptibility testing of *M. gallisepticum*. The same medium is also recommended by the DSMZ for culturing *M. gallisepticum* and only recently for broth microdilution susceptibility testing of the bovine pathogen *My. bovis* (Gütgemann et al. 2023). To assess the homogeneity of MICs using the SP4 broth, the five *M. gallisepticum* test isolates were independently tested five times in our laboratory. For this, the specifications of CLSI document M43-A were followed for inoculum preparation, incubation conditions, and evaluation of MIC values (CLSI 2011). Testing included three different microtitre plate layouts (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East

Grinstead, UK) containing a total of 24 antimicrobials or antimicrobial combinations (Tables 3 – 5). Of these, 17 agents have proven efficacy against mycoplasmas, but the plate layouts also included seven agents with known intrinsic resistance of mycoplasmas.

For broth microdilution susceptibility testing, the SP4 broth was freshly prepared and adjusted to a pH value of 7.4 – 7.6 specified by the CLSI using 8 N NaOH (Firma) (CLSI 2011). Frozen *M. gallisepticum* suspensions of known cfu/ml were pre-incubated in ambient air at 37 °C for 2 h, and the inoculum was then diluted in 900 µl of SP4 broth to yield approximately 10⁷ cfu/ml (CLSI 2011). To achieve a starting concentration of 10⁴ – 10⁵ cfu/ml, 100 µl of this solution were pipetted into 19.9 ml SP4 broth (CLSI 2011). The inoculum of two isolates was confirmed in two tests by colony count enumeration. A volume of 50 µl was pipetted into the wells the microtiter plates using a multichannel pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Then, the inoculated plates were sealed with a self-adhesive film (Sensititre) and incubated at 37 °C in ambient air, as these incubation conditions are accepted by the CLSI for testing *M. pneumoniae* (CLSI 2011). After 24, 48, 72, 96 and 168 h (± 2 h) of incubation, the control wells were visually inspected for color change by the same person who had already performed the growth experiments and examination of visible growth. To determine the homogeneity of MIC values, the exact MIC agreements (MIC values corresponding to the most frequently measured MIC value of the respective test isolate and agent) and essential MIC agreements (MIC values allowing a dilution step deviation of ± 1, measured with respect to the MIC mode of a test isolate and an agent) were calculated. After these validation steps, the remaining eleven *M. gallisepticum* were tested.

Influence of media components from different manufacturers

In the quintuplicate testing of the five *M. gallisepticum* test isolates, fetal bovine serum (FBS; USA origin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany), Bacto TC yeastolate (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) and tryptone (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany) were used to prepare the SP4 broth according to CLSI guideline M43-A (CLSI 2011). To subsequently test the influence of media components from other manufacturers on the MICs of *M. gallisepticum*, five test isolates previously used for method development were each tested a sixth time with FBS (EU origin, Biowest SAS, Nuaille, France), Bacto TC yeastolate (Life

Technologies Limited, Paisley, UK), or tryptone (Oxoid Limited, Basingstoke, UK). Subsequently, the MIC values were compared with the previously determined MIC values.

Quality control (QC) strains for broth microdilution testing

Only recently, Gütgemann et al. (2023) tested the suitability of four common QC strains (*Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC 27090, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) for QC of AST of *My. bovis* using the same test conditions as recommended for *M. gallisepticum* (this study). In addition, the latter authors initiated the validation of the *My. bovis* strain DSM 22781^T as a new QC strain according to CLSI guideline M23. For this reason, these strains were also used in this study for quality control purposes.

However, as eight agents (clindamycin, erythromycin, pirlimycin, quinupristin/dalfopristin, tylosin, linezolid, oxacillin + 2 % NaCl, vancomycin) were tested in this study and not by Gütgemann et al. (2023), the four common QC-strains were included in a further five independent replications using the direct colony suspension method according to CLSI document VET01S. To further investigate the suitability of *My. bovis* DSM 22781^T as a future QC strain for AST of *My. bovis* and *M. gallisepticum*, 20-fold testing was performed using the eight agents not tested by Gütgemann et al. (2023).

Results

Growth behavior of *M. gallisepticum* in four broth media

Table 2 gives an overview of the results of the growth experiments for determining visible growth of the entire *M. gallisepticum* with four broth media using a pH indicator. Growth was scored if an isolate showed a visible color change in all inoculated wells in all three independent preliminary growth test.

In general, the occurrence of visible growth varied depending on the incubation time, isolate, and broth medium. Thus, the SP4 broth (after 72 ± 2 h) and Friis broth (after 168 ± 2 h) were the only tested media showing a visible color change of all *M. gallisepticum* tested in this study. In contrast, no or less *M. gallisepticum* showed a visible color change in the Frey broth (none until 168 ± 2 h) and Mycoplasma broth (maximum of five after 168 ± 2 h).

Three independent growth experiments contributed to the generation of growth curves of five test isolates with the four prementioned test media (Figure S1 – S5 in the supplementary material). The data obtained indicate that the test medium and the incubation time have a significant influence on the growth of *M. gallisepticum*. Only in the SP4 broth (about 9×10^8 and 3×10^{10} cfu/ml after 24 – 72 h) and Friis broth (about 10^7 – 9×10^8 cfu/ml after 48 – 168 h), all five *M. gallisepticum* test isolates showed high numbers of cfu/ml. In contrast, only four (about 10^7 – 10^{10} cfu/ml after 48 – 168 h) test isolates grew in the Mycoplasma broth and only three (about 9×10^4 – 8×10^8 cfu/ml after 72 – 168 h) in the Frey broth.

Determination of homogeneity of MIC values

To determine the homogeneity of the MIC values, the five *M. gallisepticum* test isolates were tested independently five times by broth microdilution according to the CLSI guidelines for human mycoplasmas (CLSI 2011) using a panel of 24 antimicrobials. Since the SP4 broth revealed the best growth of this *M. gallisepticum* at the earliest stage after $24 - 74 \pm 2$ h of incubation, this medium already approved by the CLSI for AST of *M. pneumoniae* (CLSI 2011) and recommended by the DSMZ for culturing *M. gallisepticum* was chosen as broth medium.

Since the growth controls of some test isolates did not reveal any visible color change after 24 or 48 ± 2 h of incubation, the MICs were determined after 72, 94, and 168 ± 2 h. At these time points, easily readable MIC values could be read for all isolates, visualized by a visible color change of the medium from red to yellow (Figure 1). In addition, with the exception of field isolate no. 4, the test isolates also showed the formation of buttons (1 – 3 mm in size) at the bottom of the yellowish wells, which simplified the readability of MIC endpoints (Figure S6). These buttons were confirmed as *M. gallisepticum* after culturing on SP4 agar and Columbia blood agar (Oxoid Limited, Basingstoke, UK) for 168 h at 37 °C plus 5 % CO₂.

Good homogeneity of MIC values was observed after all three time points, as evidenced by high essential MIC agreements ranging between 96 and 100 % (after 72 and 96 ± 2 h) and 92 and 100 % (after 168 ± 2 h) (Table 3 and S1 in the supplementary material), meeting the CLSI specifications of ≥ 90 % for a new method (CLSI 2018a). This resulted in mean essential MIC agreements of 99.76 % after 72 and 96 ± 2 h (Table 3), and 98.82 % after 168 ± 2 h. The mean exact MIC agreement showed slightly larger differences of 91.06 % after 72 ± 2 h, 86.59 % after 96 ± 2 h, and 84.24 % after

168 ± 2 h. Since *M. gallisepticum* is intrinsically resistant to seven agents or agent combinations tested (colistin, imipenem, linezolid, nalidixic acid, oxacillin + 2 % NaCl, trimethoprim/sulfamethoxazole, vancomycin) and the MIC values were therefore often above the tested drug concentrations, their data were not included in these analyses.

Impact of media components from different manufacturers

After the five test isolates were tested a sixth time each with FBS, tryptone or yeastolate purchased from other manufacturers, it was found that most of the MICs did not differ from the previously determined MIC values by more than one dilution step. An exception were the MIC values for the lincosamide antibiotics clindamycin and pirlimycin, which were up to three dilution levels lower than the previously measured MICs when using tryptone and yeastolate from other manufacturers.

Nevertheless, good homogeneity of MICs was achieved when performing AST with media components of different origin, resulting in high essential MIC agreements of 96.67 – 100 % FBS (mean of 99.61 %), 93.33 – 100 % tryptone (mean of 98.04 %), and 90 – 100 % yeastolate (mean of 98.63 %) (Table S2 – S4). In addition, exact MIC agreements ranged between 70 and 100 % FBS (mean of 89.80 %), 70 and 100 % yeastolate (mean of 88.63 %), and 66.67 and 100 % tryptone (mean of 83.92 %). As before, the MIC values for the seven agents to which *M. gallisepticum* is intrinsically resistant were not considered here.

Broth microdilution susceptibility testing of the *M. gallisepticum* collection

The remaining eleven *M. gallisepticum* were tested and showed easily readable MIC values under the test conditions, indicated by a color change and for eight isolates additionally by a button formation. The MIC distribution of the 16 *M. gallisepticum* tested is visualized in Table 4. Due to the low number of *M. gallisepticum* available for this study, no MIC_{50/90} (minimum concentrations at which 50/90 % of the isolates were inhibited) values were determined. Moreover, as there are no approved breakpoints for *M. gallisepticum* yet, a classification of the reference strains and field isolates tested in resistant, intermediate, or susceptible was not possible.

Unimodal MIC distributions were found for florfenicol, gentamicin, tetracyclines (doxycycline, tetracycline) and quinupristin/dalfopristin. In contrast, clear-cut bimodal MIC distributions were observed for fluoroquinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin), macrolides (erythromycin, tilmicosin, tulathromycin) and streptomycin.

Particularly striking were field isolates no. 7 and 12, which showed elevated MIC values against three or four different antimicrobial drug classes including aminoglycosides (streptomycin), fluoroquinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin), lincosamides (clindamycin, pirlimycin), and macrolides (erythromycin, tilmicosin, tulathromycin). Of note were neomycin, as all *M. gallisepticum* tested showed MIC values exceeding the tested concentration range of ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$.

As expected, high MICs were seen for most antimicrobials (carbapenems, glycopeptides, linezolid, nalidixic acid, polypeptides, trimethoprim/sulfamethoxazole) that are unable to damage mycoplasmas due to their mechanism of action. With only one exception (oxacillin + 2 % NaCl), high MIC values were found for all agents or agent combinations to which mycoplasmas are intrinsically resistant.

Quality control (QC) strains for MIC determination of *M. gallisepticum*

Even after 72 ± 2 h of incubation in SP4 broth, the MIC values of the CLSI-approved QC strains were within their ranges as reported by Gütgemann et al. (2023) (CLSI 2018b, 2020, 2023), as follows: *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090 (for enrofloxacin, florfenicol, marbofloxacin, tetracycline, tiamulin, and tilmicosin), *E. coli* ATCC 25922 (for florfenicol, marbofloxacin), *E. faecalis* ATCC 29212 (for tulathromycin), *S. aureus* ATCC 29213 (for gentamicin). In addition, the MIC values of the *My. bovis* DSM 22781^T were within the MIC ranges given for 16 agents as reported by Gütgemann et al. (2023). However, since eight more agents were included in the broth microdilution tests in the present study than in Gütgemann et al. (2023), the CLSI-approved QC strains were tested 5-fold using these eight agents to assess their suitability for QC for this new method. As no CLSI-accepted MIC ranges for these agents are available for *A. pleuropneumoniae* ATCC 27090 and *E. coli* ATCC 25922 yet (CLSI 2020, 2023), a comparison for these QC strains was not possible. However, the MIC values of *E. faecalis* ATCC 29212 (for erythromycin, tylosin, oxacillin + 2 % NaCl) and *S. aureus* ATCC 29213 (for erythromycin, tylosin, vancomycin) were within their approved MIC ranges for three agents each (Table S5 – S6).

After 20 independent replications, the MIC ranges of the *My. bovis* type strain differed between two or three dilution levels (Table 5), meeting the requirements for a new QC strain according to CLSI guideline M23 (CLSI 2018a). Nevertheless, it should be noted that some MICs (for erythromycin, oxacillin +2 % NaCl, vancomycin) were outside the tested drug concentrations, so that no MIC ranges are to be defined for these agents.

Discussion

Antimicrobial treatment is an important means of controlling *M. gallisepticum* infections in birds (Huang et al. 2021; Bottinelli et al. 2022). However, standardized susceptibility testing of *M. gallisepticum*, which is necessary for targeted antibiotic therapy, is a major challenge due to its demanding growth and lack of official breakpoints and QC strains (Gautier-Bouchardon 2018; Taiyari et al. 2021). On the one hand, the pathogen is intrinsically resistant to many agents (e.g. beta-lactams, sulfonamides) commonly used in veterinary medicine (Bottinelli et al. 2022). As a result, only a few agents have in-vitro efficacy against *M. gallisepticum*, such as florfenicol, fluoroquinolones (e.g., enrofloxacin), macrolides (e.g., erythromycin, tylosin), pleuromutilins (e.g., tiamulin) and tetracyclines (Huang et al. 2021; Bottinelli et al. 2022). On the other hand, AST methods approved for testing frequently isolated pathogens (e.g. *Enterobacterales*) are not suitable for *M. gallisepticum*, as most mycoplasmas do not show visible turbidity in liquid cultures as known for other bacteria and their high growth requirements (e.g., need of longer processing times and expensive media with various additives) (Nikfarjam and Farzaneh 2012; Käbisch et al. 2023).

For this reason, Hannan (2000) presented suitable methods for testing veterinary mycoplasmas, visualizing growth by a color change in the medium after a pH indicator has been added. But since a suitable standard method for AST of *M. gallisepticum* has not yet been provided, the methods published by more than 25 studies vary widely (Taiyari et al. 2021). For example, different test media (e.g. Frey broth, Friis broth, modified Chanock medium, modified PPLO broth, Mycoplasma Experience[®]) were used, with or without indication of the pH indicator and initial pH values (Tanner and Wu 1992; Bradbury et al. 1994; Hannan et al. 1997; Wu et al. 2005; Li et al. 2010; Gerchman et al. 2011; Lysnyansky et al. 2012; Chen et al. 2015; Ammar et al. 2016; Zhang et al. 2016; Zhang et al. 2017; Beylefeld et al. 2018; Khatoon 2018; Huang et al. 2019; de Jong et al. 2021; Bottinelli et al. 2022). However, in addition to different incubation conditions (time and temperature), various methods (e.g. ccu/ml, colony changing units; cfu/ml, colony forming units) were used to determine the initial inoculum for AST of *M. gallisepticum*. Given that these test parameters can influence the MIC values (Whithear et al. 1983; Butaye et al. 1998; Loose et al. 2020), it can be assumed that the MICs of *M. gallisepticum* are not comparable between laboratories. As a result, the choice of the most appropriate antimicrobial agent in the event of an outbreak of *M. gallisepticum* mycoplasmosis is compromised, which in turn can lead to

rise of AMR. Therefore, both the researchers and the CLSI call for the provision of a suitable method for standardized in vitro AST of veterinary mycoplasmas and in particular *M. gallisepticum* (CLSI 2017; Taiyari et al. 2021; Bottinelli et al. 2022).

To find a suitable test medium for harmonized AST of *M. gallisepticum*, the growth of this fastidious pathogen was investigated with four different broth media. Although the Eaton broth, Frey broth and Friis broth (or modified forms of these media) had already been used for AST of *M. gallisepticum* (Li et al. 2010; Gerchman et al. 2011; Lysnyansky et al. 2012; Beylefeld et al. 2018; Khatoon 2018; Morrow et al. 2020; de Jong et al. 2021), the *M. gallisepticum* examined in this study did not show sufficient growth in these media. In contrast, the SP4 broth already approved by the CLSI for testing *M. pneumoniae* and by the DSMZ for culturing *M. gallisepticum* achieved sufficient growth for all tested *M. gallisepticum* after 72 h of incubation (CLSI 2011). This might be due to the fact that the SP4 broth contains additives (e.g. CMRL-1066 10X) that are not part of the other three media tested. Nevertheless, it is also advantageous that the SP4 broth has only recently been proposed for harmonized AST of the bovine pathogen *My. bovis* (Gütgemann et al. 2023), so this medium was chosen for AST of *M. gallisepticum*.

To assess the homogeneity of MICs using SP4 broth, five independent replicates were performed with five test isolates according to CLSI document M43-A using 24 antimicrobials or antimicrobial combinations. For this, an incubation temperature of 37 °C in ambient air was chosen, as this parameter is already accepted by the CLSI for testing human mycoplasmas and recommended for AST of *My. bovis* (CLSI 2011; Gütgemann et al. 2023). Although some authors have set incubation times ranging between 18 and 48 h for MIC tests of *M. gallisepticum* (Tanner and Wu 1992; Migaki et al. 1993; Bradbury et al. 1994; Bottinelli et al. 2022), the unrelated test isolates examined in this study showed easy-to-read MICs only after at least 72 ± 2 h of incubation. Thus, homogeneity and readability of MICs were assessed after 72, 96, and 168 h (± 2 h), as some studies performing MIC tests with *M. gallisepticum* applied longer incubation times ranging between 72 and 168 h (Li et al. 2010; Ammar et al. 2016; de Jong et al. 2021). The CLSI requirement of ≥ 90 % essential MIC agreement for a new method was met at all three time points (CLSI 2018a). However, lower mean essential MIC agreement were obtained after 168 ± 2 h (mean of 98.82 %) than after 72 and 96 ± 2 h (mean of 99.76 %). Therefore, and because MICs tend to shift after a longer incubation period (Waites et al. 2012), an incubation period of 168 h seems less

appropriate. Although very similar reproducibility was found after 72 and 96 h (± 2 h), we recommend an incubation period of 72 ± 2 h for reasons of urgency in case of a severe disease outbreak. In addition, an incubation period of 72 ± 2 h seems to be the most appropriate, as it is already recommended under the same test conditions for AST of *My. bovis* (Gütgemann et al. 2023). This would allow diagnostic laboratories to use the same method for both veterinary pathogens, simplifying the complex process. Gütgemann et al. (2023) demonstrated that conventional QC strains (*A. pleuropneumoniae* ATCC 27090, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213) are not suitable for quality control purposes for the new method, as their MIC values were outside their approved MIC ranges for many agents. Similar results were obtained by Käbisch et al. (2021) and this study, which is why the validation of a mycoplasma strain as a new QC strain seems necessary for future quality control purposes. After reviewing the suitability of *My. bovis* DSM 22781^T as a future QC strain for the new method, Gütgemann et al. (2023) concluded that it met the requirements for a new QC strain according to CLSI guideline M23 (CLSI 2018a). However, since the latter authors did not include eight agents that were tested here, 20 additional tests were conducted in the present study with these eight agents and the same type strain. With the exception of erythromycin, oxacillin + 2 % NaCl, and vancomycin, it was possible to define MIC ranges for all other five agents that fulfilled the CLSI requirements (≥ 95 % of MIC values meet 2-4 dilution ranges) for a new QC strain (CLSI 2018a). These include tylosin, a macrolide antibiotic often used to treat respiratory infections in birds (e.g. *M. gallisepticum*) (Cornejo et al. 2018; Garmyn et al. 2019; Huang et al. 2021). After testing the remaining *M. gallisepticum*, all of them showed easy-to-read MICs. As expected, agents that do not intrinsically have antimicrobial activity against mycoplasmas showed high MIC values. Oxacillin + 2 % NaCl was, however, an exception, but this could be due to growth inhibition caused by the high sodium chloride content, as previously reported for *E. coli* (Li et al. 2021). Although a valid classification of the susceptibility (resistant, intermediate, and susceptible) of *M. gallisepticum* is not possible due to the lack of approved breakpoints for this important pathogen, a provisional comparison can be made with the breakpoints used for classification of avian mycoplasmas by Hannan et al. (1997). The latter authors applied breakpoints to classify *M. gallisepticum* MICs based on guidelines to test bacteria affecting humans or domestic animals (Welsh 1987; NCCLS 1994). Besides flumequine and oxytetracycline, which were not tested here, these were: enrofloxacin (≤ 0.5 $\mu\text{g/ml}$

sensitive, 1 µg/ml intermediate, ≥2 µg/ml resistant), tylosin (≤1 µg/ml sensitive, 2 µg/ml intermediate, ≥4 µg/ml resistant), and tiamulin (≤8 µg/ml sensitive, ≥16 µg/ml resistant) (Hannan et al. 1997). According to this classification, some *M. gallisepticum* tested in this study are considered resistant to enrofloxacin (n=2) and/or tylosin (n=3), which is consistent with the bimodal distributions observed for these agents. However, since a large proportion of the MIC values were equal to or below the tested tiamulin drug concentration, an evaluation of the MIC distribution and thus no delimitation as wild-type and non-wild-type subpopulation was possible here. Nevertheless, since the breakpoints used are not adapted to mycoplasmas and their specific characteristics, this classification should be used with caution and pathogen-specific breakpoints should be developed in the future. For this purpose, the studies conducted by Zhang et al. (2022) on pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of tilmicosin in lung tissue against *M. gallisepticum* are particularly valuable. The authors indicate that a dose of 9.12 mg/kg may be effective in pulmonary infections caused by *M. gallisepticum*, which could help to establish specific breakpoints for *M. gallisepticum*. However, as bimodal MIC distributions were found for agents commonly used against *M. gallisepticum* infections in poultry (e.g. fluoroquinolones, macrolides), suggesting resistant non-wildtype subpopulations, these isolates are of concern. Particularly alarming were field isolates nos. 7 and 12, which showed elevated MICs for ≥3 different antimicrobial classes (fluoroquinolones, lincosamides, macrolides, pleuromutilins), signalling phenotypical multidrug resistance (Müller et al. 2018).

M. gallisepticum with elevated MICs or acquired AMR to fluoroquinolones and macrolides has already been reported in other studies (Gerchman et al. 2011; de Jong et al. 2021; Morrow et al. 2020), a possible consequence of extensive use of antibiotics in the poultry industry (Gerchman et al. 2008; Huang et al. 2021; Abreu et al. 2023). Point mutations in the quinolone resistance determining regions (QRDRs) of target genes (DNA gyrase, topoisomerase IV) have been linked to fluoroquinolone resistance in *M. gallisepticum* (Reinhardt et al. 2002; De la Cruz et al. 2022), while macrolide resistance has been associated with mutations in the central loop domain of the 23S rRNA gene (Ammar et al. 2016; Chernov et al. 2018). According to a review, resistance of *M. gallisepticum* seems to depend mainly on the geographical origin of the isolates (Taiyari et al. 2021). For example, according to the authors, most Brazilian isolates (66.67 %) were classified as resistant to tylosin, while many European *M. gallisepticum* were classified as resistant to enrofloxacin (Germany 53 %; Italy 75 %; Netherlands

38 %). Bottinelli et al. (2022) also found that 79.1 % of Italian *M. gallisepticum* tested had an elevated MIC of ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ enrofloxacin. Nevertheless, the same authors reported a general improvement in the antimicrobial susceptibility of *M. gallisepticum* to macrolides (erythromycin, spiramycin, tilmicosin, tylosin), lincomycin and tiamulin. Interlaboratory differences in MIC values may be the result of regional differences in antibiotic use. However, MIC differences can also be attributed to the use of different methods and test parameters for AST (Whithear et al. 1983). The latter is illustrated by the fact that MIC values of the *M. gallisepticum* type strain DSM 19817^T differed between laboratories, although reference strains should have stable antimicrobial susceptibility (King and Brown 2001). This type strain showed MIC values ranging between 0.0063 and 0.01 $\mu\text{g/ml}$ tylosin (Hannan et al. 1997; Li et al. 2010; Gerchman et al. 2011), while lower MICs ranging from 0.12 to 0.16 $\mu\text{g/ml}$ tylosin were found by Beylefeld et al. (2018) and this study. Comparing the MIC values for other *M. gallisepticum*, further differences between the laboratories are noticeable. For example, the MIC_{50/90} values reported by Bottinelli et al. (2022) for doxycycline, enrofloxacin and oxytetracycline were 2 to ≥ 4 dilution levels higher than those reported by de Jong et al. (2021). It should be noted, however, that both studies examined *M. gallisepticum* field isolates from the same geographical area (Europe), from the same bird species (chicken and turkey) and from similar isolation years (between 2010 and 2020) using broth microdilution. Since both studies used different test parameters for the AST of *M. gallisepticum*, methodological influences can be assumed for the deviations. For example, Bottinelli et al. (2022) used a starting inoculum of 10^4 ccu/ml and Avian Mycoplasma Liquid Medium (Mycoplasma Experience[®], Reigate, UK) with incubation at 37 ± 1 °C for 24 - 48 h. In contrast, de Jong et al. (2021) applied a starting inoculum of 5×10^5 cfu/ml and Friis broth with incubation at 35 ± 1 °C for up to 120 h. Based on these findings, future application of a suitable method for standardized broth microdilution tests of *M. gallisepticum* is urgently needed.

Conclusion

For harmonized broth microdilution susceptibility testing of *M. gallisepticum*, SP4 broth with an incubation period of 72 ± 2 h proved to be suitable, as only recently recommended for *My. bovis*. Some *M. gallisepticum* showed elevated MICs for fluoroquinolones, macrolides, and/or streptomycin. In agreement with the data of

Gütgemann et al. (2023), *My. bovis* type strain DSM 22781^T seems to be suitable as a new QC strain and further validation is recommended.

Acknowledgments

The authors would like to thank Cornelia Dürrschmidt, Jan Paulus and Claudia Walter for excellent technical assistance. This study was financially supported by the German Federal Ministry of Food and Agriculture (BMEL) (grant number FKZ 2818HS015).

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

- Abreu R, Semedo-Lemsaddek T, Cunha E, Tavares L, Oliveira M. 2023. Antimicrobial drug resistance in poultry production: current status and innovative strategies for bacterial control. *Microorganisms* 11(4):953.
- Ammar AM, Abd El-Aziz NK, Gharib AA, Ahmed HK, Lameay AE. 2016. Mutations of domain V in 23S ribosomal RNA of macrolide-resistant *Mycoplasma gallisepticum* isolates in Egypt. *J Infect Dev Ctries* 10(8):807–813.
- Armour NK. 2020. *Mycoplasma gallisepticum* infection, p 911–924. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V, Suarez DL (ed), *Diseases of Poultry*, 14th ed, vol 2. Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ.
- Benčina D, Mrzel I, Zorman Rojs O, Bidovec A, Dovč A. 2003. Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. *Vet Rec* 152(8):230–234.
- Beylefeld A, Wambulawaye P, Bwala DG, Gouws JJ, Lukhele OM, Wandrag DBR, Abolnik C. 2018. Evidence for multidrug resistance in nonpathogenic *Mycoplasma* species isolated from South African poultry. *Appl Environ Microbiol* 84(21).
- Bottinelli M, Gastaldelli M, Picchi M, Dall’Ora A, Cristovao Borges L, Ramirez AS, Matucci A, Catania S. 2022. The monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* minimum inhibitory concentrations during the last decade (2010–2020) seems to reveal a comeback of susceptibility to macrolides, tiamulin, and lincomycin. *Antibiotics* 11(8):1021.
- Bradbury JM, Yavari CA, Giles CJ. 1994. In vitro evaluation of various antimicrobials against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the micro-broth

method, and comparison with a commercially-prepared test system. *Avian Pathol* 23(1):105–115.

Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F. 1998. Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci. *J Clin Microbiol* 36(7):1907–1911.

Chen L, Yang D, Pan Z, Lai L, Liu J, Fang B, Shi S. 2015. Synthesis and antimicrobial activity of the hybrid molecules between sulfonamides and active antimicrobial pleuromutilin derivative. *Chem Biol Drug Des* 86(2):239–245.

Chernov VM, Chernova OA, Mouzykantov AA, Medvedeva ES, Baranova NB, Malygina TY, Aminov RI, Trushin MV. 2018. Antimicrobial resistance in mollicutes: known and newly emerging mechanisms. *FEMS Microbiol Lett.* 365(18).

CLSI. 2011. Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; approved guideline. CLSI document M43-A. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. 2017. Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET06. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. 2018a. M23: Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters, 5th edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. 2018b. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 4th edition. CLSI VET08-ED4. *Clinical and Laboratory Standards Institute.*

CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET01S, 5th edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. 2023. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 6th edition. CLSI VET01S ED6:2023. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

Cookson KC, Shivaprasad HL. 1994. *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants, and peafowl. *Avian Dis* 38(4):914.

do Nascimento Mda G, do Nascimento ER. 1986. Infectious sinusitis in coturnix quails in Brazil. *Avian Dis* 30(1):228.

Cornejo J, Pokrant E, Carvallo C, Maddaleno A, San Martín B. 2018. Depletion of tylosin residues in feathers, muscle and liver from broiler chickens after completion of antimicrobial therapy. *Food Addit Contam.* 35(3):448–457.

Cummings TS, Kleven SH, Brown J. 1986. Effect of medicated feed on tracheal infection and population of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Dis* 30(3):580–4.

De la Cruz L, Díaz-Sánchez AA, Hernández-Fillor RE, Naranjo-Feliciano D, Lobo-Rivero E, Espinosa-Castaño I. 2022. Detection of mutations involved in fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum* positive field samples from broiler chicken flocks in Ecuador. *Rev Salud Anim* 44: 2224–470.

Friis NF. 1975. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nord Vet Med* 27(6):337–339.

Garmyn A, Vereecken M, De Gussem K, Depondt W, Haesebrouck F, Martel A. 2019. Efficacy of tylosin and tilmicosin against experimental *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Dis.* 63(2):359–365.

Gautier-Bouchardon AV. 2018. Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp. *Microbiol Spectr* 6(4).

Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Manso-Silvan L, Lysnyansky I. 2011. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. *Vet Res* 42:90.

Glisson JR, Cheng IH, Brown J, Stewart RG. 1989. The effect of oxytetracycline on the severity of airsacculitis in chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* 33(4):750-2.

Gupta RS, Sawnani S, Adeolu M, Alnajjar S, Oren A. 2018. Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order *Mycoplasmoidales* ord. nov., containing two new families *Mycoplasmoidaceae* fam. nov. and *Metamycoplasmataceae* fam. nov. harbouring *Eperythrozoon*, *Ureaplasma* and five novel genera. *Antonie Van Leeuwenhoek* 111(9):1583-1630.

Gutgemann F, Muller A, Churin Y, Kumm F, Braun AS, Yue M, Eisenberg T, Entorf M, Peters T, Kehrenberg C. 2024. Toward a method for harmonized susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* by broth microdilution. *J Clin Microbiol* 61(8):e0190522.

Hannan PC, Windsor GD, de Jong A, Schmeer N, Stegemann M. 1997. Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* 41(9):2037–2040.

Hannan PCT. 2000. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. *Vet Res* 31(4):373–395.

Huang Z, Wu Y, Zhou Z, Xia X, Gu X, Cai Q, Shen X, Yang H, Ding H. 2019. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and resistance analysis of tilmicosin against *Mycoplasma gallisepticum* in an in vitro dynamic model. *Front Pharmacol* 10:670.

Huang A, Wang S, Guo J, Gu Y, Li J, Huang L, Wang X, Tao Y, Liu Z, Yuan Z, Hao H. 2021. Prudent use of tylosin for treatment of *Mycoplasma gallisepticum* based on its clinical breakpoint and lung microbiota shift. *Front Microbiol* 12:712473.

de Jong A, Youala M, Klein U, El Garch F, Simjee S, Moyaert Hilde, Rose M, Gautier-Bouchardon AV, Catania S, Ganapathy K, Gyuranecz M, Möller Palau-Ribes F, Pridmore A, Ayling RD. 2021. Minimum inhibitory concentration of seven antimicrobials to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from six European countries. *Avian Path* 50(2):161–173.

Jordan FT, Forrester CA, Hodge A, Reeve-Johnson LG. 1999. The comparison of an aqueous preparation of tilmicosin with tylosin in the treatment of *Mycoplasma gallisepticum* infection of turkey poults. *Avian Dis* 43(3):521–5.

Käbisch L, Schink AK, Kehrenberg C, Schwarz S. 2021. Provisional use of CLSI-approved quality control strains for antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma* ('*Mesomycoplasma*') *hyorhinae*. *Microorganisms*. 9(9):1829.

Käbisch L, Schink AK, Hölting D, Spargser J, Kehrenberg C, Schwarz S. 2023. Towards a standardized antimicrobial susceptibility testing method for *Mycoplasma hyorhinae*. *Microorganisms* 11(4):994.

Khatoon H. 2018. Prevalence of mycoplasmosis and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* in commercial chicken flocks of Rawalpindi Division, Pakistan. *Pak Vet J* 38(04):446–448.

King A, Brown DF. 2001. Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother* 48(Suppl 1):71–76.

- Li B-B, Shen J-Z, Cao X-Y, Wang Y, Dai L, Huang S-Y, Wu C-M. 2010. Mutations in 23S rRNA gene associated with decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin in *Mycoplasma gallisepticum*. *FEMS Microbiol Lett* 308(2):144–149.
- Li F, Xiong X-S, Yang Y-Y, Wang J-J, Wang M-M, Tang J-W, Liu Q-H, Wang L, Gu B. 2021. Effects of NaCl concentrations on growth patterns, phenotypes associated with virulence, and energy metabolism in *Escherichia coli* BW25113. *Front Microbiol* 12:705326.
- Lierz M, Hagen N, Lueschow D, Hafez HM. 2008. Use of polymerase chain reactions to detect *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma imitans*, *Mycoplasma iowae*, *Mycoplasma meleagridis* and *Mycoplasma synoviae* in birds of prey. *Avian Path* 37(5):471–476.
- Loose M, Naber KG, Coates A, Wagenlehner FME, Hu Y. 2020. Effect of different media on the bactericidal activity of colistin and on the synergistic combination with azidothymidine against *mcr-1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 11:54.
- Lysnyansky I, Gerchman I, Levisohn S, Mikula I., Feberwee A, Ferguson NM, Noormohammadi AH, Spargser J, Windsor HM. 2012. Discrepancy between minimum inhibitory concentration to enrofloxacin and mutations present in the quinolone-resistance determining regions of *Mycoplasma gallisepticum* field strains. *Vet Microbiol* 160(1-2):222–226.
- Migaki TT, Avakian AP, Barnes HJ, Ley DH, Tanner AC, Magonigle RA. 1993. Efficacy of danofloxacin and tylosin in the control of mycoplasmosis in chicks infected with tylosin-susceptible or tylosin-resistant field isolates of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 37(2), 508.
- Müller A, Jansen W, Grabowski NT, Monecke S, Ehricht R, Kehrenberg C. 2018. ESBL- and *AmpC*-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries. *Int J Food Microbiol* 283:52–58.
- Morrow CJ, Kreizinger Z, Achari RR, Bekő K, Yvon C, Gyuranecz M. 2020. Antimicrobial susceptibility of pathogenic mycoplasmas in chickens in Asia. *Vet Microbiol.* 250:108840.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1994. Proposed standard, M31-P. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for

bacteria isolated from animals. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Nikfarjam L, Farzaneh P. 2012. Prevention and detection of *Mycoplasma* contamination in cell culture. *Cell J* 13(4):203–12.

OIE. 2021. OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2021. In: World Organisation for Animal Health. Online available at: <https://www.oie.int/en/home/>.

Reinhardt AK, Kempf I, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. 2002. Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. *J Antimicrob Chemother.* 50(4):589–92.

Schuermans JM, Nuri Hayali AS, Koenders BB, ter Kuile BH. 2009. Variations in MIC value caused by differences in experimental protocol. *J Microbiol Methods* 79(1):44–7.

Taiyari H, Faiz NM, Abu J, Zakaria Z. 2021. Antimicrobial minimum inhibitory concentration of *Mycoplasma gallisepticum*: a systematic review. *J Appl Poult Res* 30(2):100160.

Tanner AC, Wu C-C. 1992. Adaptation of the Sensititre [Registered trademark] broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis* 36(3):714.

Tanner AC, Avakian AP, Barnes HJ, Ley DH, Migaki TT, Magonigle RA. 1993. A comparison of danofloxacin and tylosin in the control of induced *Mycoplasma gallisepticum* infection in broiler chicks. *Avian Dis* 37(2):515–22.

Vitula F, Peckova L, Bandouchova H, Pohanka M, Novotny L, Jira D, Kral J, Ondracek K, Osickova J, Zendulkova D, Rosenbergova K, Tremel F, Pikula J. 2011. *Mycoplasma gallisepticum* infection in the grey partridge *perdix perdix*: outbreak description, histopathology, biochemistry and antioxidant parameters. *BMC Vet Res* 7(1).

Waites KB, Duffy LB, Bébéar CM, Matlow A, Talkington DF, Kenny GE, Patricia A Totten, Bade DJ, Zheng X, Davidson MK, Shortridge VD, Watts JL, Brown ST. 2012. Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*. *J Clin Microbiol* 50(11):3542–3547.

Welsh RD. 1987. MIC antimicrobial testing and combination antibiotics. *Southwest. Vet.* 38:17–32.

Whithear KG, Bowtell DD, Ghiocas E, Hughes KL. 1983. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis* 27(4):937.

Wu C-M, Wu H, Ning Y, Wang J, Du X, Shen J. 2005. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett* 247(2):199–205.

Zhang N, Gu X, Ye X, Wu X, Zhang B, Zhang L, Shen X, Jiang H, Ding H. 2016. The PK/PD Interactions of doxycycline against *Mycoplasma gallisepticum*. *Front Microbiol* 7:653.

Zhang N, Ye X, Wu Y, Huang Z, Gu X, Cai Q, Shen X, Jiang H, Ding H. 2017. Determination of the mutant selection window and evaluation of the killing of *Mycoplasma gallisepticum* by danofloxacin, doxycycline, tilmicosin, tylvalosin and valnemulin. *PLoS One* 12(1):e0169134.

Zhang W, Liu Y, Zhang Q, Waqas Ali Shah S, Wu Z, Wang J, Ishfaq M, Li J. 2020. *Mycoplasma gallisepticum* infection impaired the structural integrity and immune function of bursa of fabricius in chicken: Implication of oxidative stress and apoptosis. *Front Vet Sci* 7:225.

Zhang N, Zhou M, Yan X, Liu J, Yuan S, Yang H, DING H, ZHANG D, BAI Y. 2022. Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration of tilmicosin against *Mycoplasma gallisepticum* in the target infection site in chickens. *Front Vet Sci* 9, 952599.

Figure legends

Figure 1: Sensititre plate of *Mycoplasma gallisepticum* field isolate no. 7 after 72 ± 2 h of incubation at 37 °C.

The yellow bordered wells represent two positive growth controls. The red bordered wells represent MIC endpoints.

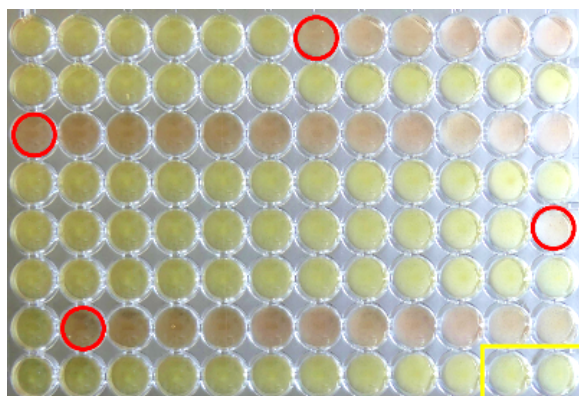


Table legends

Table 1: Origin of 13 *Mycoplasma gallisepticum* field isolates and three reference strains tested in this study (n=16).

Isolate ID	Year of isolation	Country	Bird species	Tissue
<i>M. gallisepticum</i> DSM 19817 ^{T*}	Before 10/2007	Great Britain	Chicken	Respiratory tract
<i>M. gallisepticum</i> live vaccine F-strain	-	-	Chicken	-
<i>M. gallisepticum</i> reference strain 75969	-	-	Chicken	-
Field isolate no. 1*	2010	Germany	Poultry	-
Field isolate no. 2*	2012	Germany	Poultry	-
Field isolate no. 3*	2019	Germany	Chicken	Trachea
Field isolate no. 4*	2021	Germany	Humboldt penguin	-
Field isolate no. 5	2021	Germany	Humboldt penguin	-
Field isolate no. 6	-	-	-	-
Field isolate no. 7	-	-	Turkey	-
Field isolate no. 8	-	-	Turkey	-
Field isolate no. 9	-	Great Britain	-	-
Field isolate no. 10	-	-	-	-
Field isolate no. 11	-	-	Turkey	-
Field isolate no. 12	-	-	Turkey	-
Field isolate no. 13	-	-	Turkey	-

* This *M. gallisepticum* was used as a test isolate for method development and growth curve generation; - Data not available.

Table 2: Visible growth of 16 *Mycoplasma gallisepticum* after five time points of incubation in four broth media.

Time (± 2 h)	Quantity of isolates that showed a visible color change after culturing in			
	SP4 broth	Friis broth	Frey broth	Mycoplasma broth
24	0	0	0	0
48	6	5	0	0
72	16	13	0	1
96	16	13	0	1
168	16	16	0	5

Table 3: Homogeneity of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of five *Mycoplasma* *gallisepticum* tested five times with SP4 broth and an incubation time of 72 h and 96 h (± 2 h).

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^b after 72 \pm 2 h							Exact MIC agreement of isolates (%) ^c	Essential MIC agreement of isolates (%) ^{d, e}	Deviation from MIC mode after 96 \pm 2 h							Exact MIC agreement of isolates (%)	Essential MIC agreement of isolates (%)
	-3	-2	-1	0	1	2	3			-3	-2	-1	0	1	2	3		
Ciprofloxacin				24	1			96	100			1	21	2	1	84	96	
Clindamycin			5	20				80	100			2	23			92	100	
Doxycycline ^f			2	23				92	100			1	22	2		88	100	
Enrofloxacin				25				100	100				21	4		84	100	
Erythromycin		1		20	3			80	96			7	17	1		68	100	
Florfenicol			1	22	2			88	100			2	22	1		88	100	
Gentamicin			1	24				96	100			1	23	1		92	100	
Marbofloxacin				25				100	100				21	4		84	100	
Neomycin ^f				25				100	100				25			100	100	
Pirlimycin			1	23	1			92	100			3	22			88	100	
SYN ^g			2	23				92	100			1	22	2		88	100	
Streptomycin ^f			1	23	1			92	100			2	23			92	100	
Tetracycline ^f			2	22	1			88	100				21	1		84	100	
Tiamulin ^f				25				100	100				24	1		96	100	
Tilmicosin ^f				21	4			84	100				19	6		76	100	
Tulathromycin			1	20	4			80	100			4	20	1		80	100	
Tylosin ^f			2	22	1			88	100				22	3		88	100	
Colistin ^f				25				100	100				25			100	100	
Imipenem ^f				25				100	100				25			100	100	
Linezolid ^f			2	23				92	100			2	23			92	100	
Nalidixic acid				23	2			92	100			1	22	2		88	100	
Oxacillin + 2 %				25				100	100				25			100	100	
NaCl ^f																		
SXT ^{f, h}				25				100	100				25			100	100	
Vancomycin ^f				25				100	100				25			100	100	

^a The lower half of the table contains antimicrobials with known intrinsic resistance of mycoplasmas; ^b The MIC mode indicates the most frequently measured MIC value related to a test isolate in the context of the five replicates; ^c Data fulfilling the criteria of the exact MIC agreement have a precondition of five identical MICs; ^d Data fulfilling the criteria of the essential MIC agreement are in the gray area; ^e Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of MIC mode; ^f The MIC of at least one *M. gallisepticum* was equal to, lower or higher than the concentrations of the test range; ^g SYN, quinupristin/dalfopristin; ^h SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole ratio 1:19

Table 4: Distribution of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of the entire *Mycoplasma gallisepticum* collection (n=16).

Antimicrobial agent ^a	MIC ^b values ($\mu\text{g/ml}$) after 72 \pm 2 h of incubation																	
	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
Ciprofloxacin		1		6	6	1					1		1 [#]					
Clindamycin							2	5	4	2	1	1	1					
Doxycycline				2 [*]	11	2	1											
Enrofloxacin			1	3	10						1	1						
Erythromycin			2	7	4									3 [#]				
Florfenicol								1	12	3								
Gentamicin												2	4	8	2			
Marbofloxacin			1	1	11	1					1	1						
Neomycin															16 [#]			
Pirlimycin								2	5	4	3	1	1					
Quinupristin/dalfopristin ^c			3	10	3													
Streptomycin										1	2	2	3	1				7 [#]
Tetracycline					2 [*]	8	4	1	1									
Tiamulin			13 [*]		2	1												
Tilmicosin				13 [*]											2		1 [#]	
Tulathromycin					1	5	7						1	2 [#]				
Tylosin				10 [*]	2	1					2	1						
Colistin																	16 [#]	
Imipenem														16 [#]				
Linezolid													1	2	13 [#]			
Nalidixic acid												1	1	8	6			
Oxacillin + 2 % NaCl		14 [*]									1	1 [#]						
Trimethoprim/sulfamethoxazole ^d												1	1	14 [#]				
Vancomycin														16 [#]				

The white area illustrates the test area of the antimicrobial agents; ^a The lower half of the table contains antimicrobials with known intrinsic resistance of mycoplasmas; ^b MIC, minimum inhibitory concentration; ^c Data represent the concentration of quinupristin; ^d Data represent the concentration of trimethoprim, ratio 1:19; * The MIC values of at least one isolate was equal to or lower than the concentration of the test range; # The MIC values of at least one isolate was equal to or higher than the concentration of the test range.

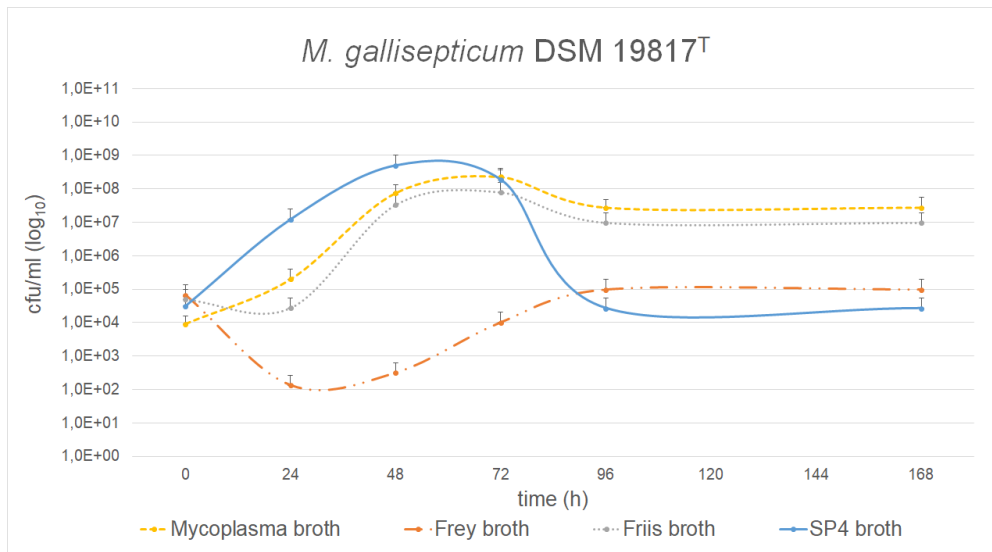
Table 5: MIC values and MIC ranges of *Mycoplasma bovis* DSM 22781^T for eight antimicrobials after 20-fold testing in SP4 broth for 72 ± 2 h.

Antimicrobial agent ^a	Quantity of replicates and their MIC ^b values (µg/ml)																Determined MIC range	MICs within the CLSI recommended range ^c (%)		
	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
Clindamycin	■				2	8	10								■				0.12 - 0.5	100
Erythromycin	■											2	1	17 [#]	■				16 - ≥64	100
Pirlimycin	■					4	13	3							■				0.25 - 1	100
Quinupristin/dalfopristin	■								6	9	5			■				02. Aug	100	
Tylosin	■							2	11	7				■				0.5 - 2	100	
Linezolid	■							3	13	4			■					0.5 - 2	100	
Oxacillin + 2 % NaCl	■			20 [*]								■						≤0.015	100	
Vancomycin	■											2	18 [#]	■				32 - ≥64	100	

The light gray areas visualize the concentration ranges that were outside the tested agent concentrations; ^a The lower half of the table contains antimicrobials with known intrinsic resistance of mycoplasmas; ^b MIC, minimum inhibitory concentration; ^c A limit of ≥95 % was set according to CLSI guideline M23; * The MIC values of at least one isolate was equal to or lower than the concentration of the test range; # The MIC values of at least one isolate was equal to or higher than the concentration of the test range.

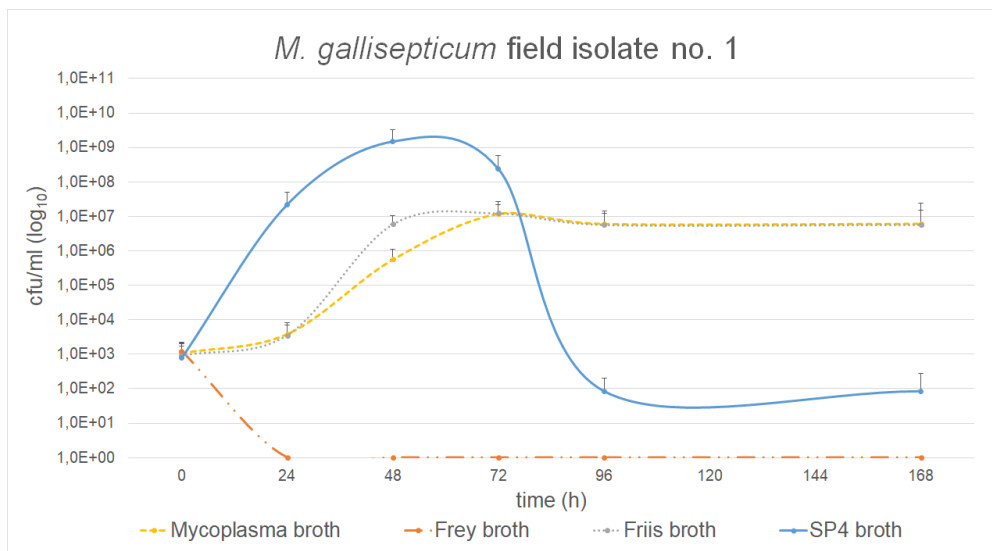
Supplemental Material

Figure S1:



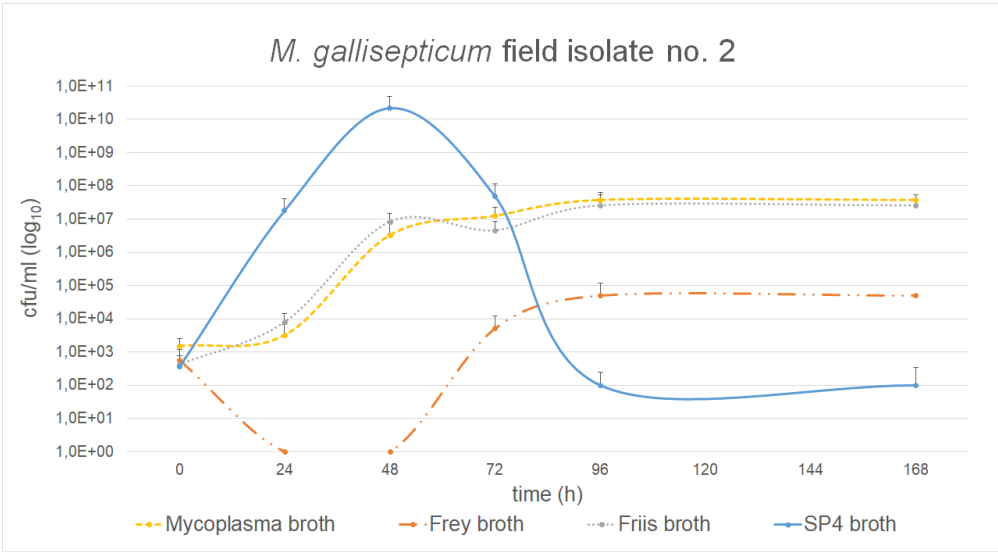
Growth curves of *M. gallisepticum* DSM 19817^T in four different test media.
I = standard deviations.

Figure S2:



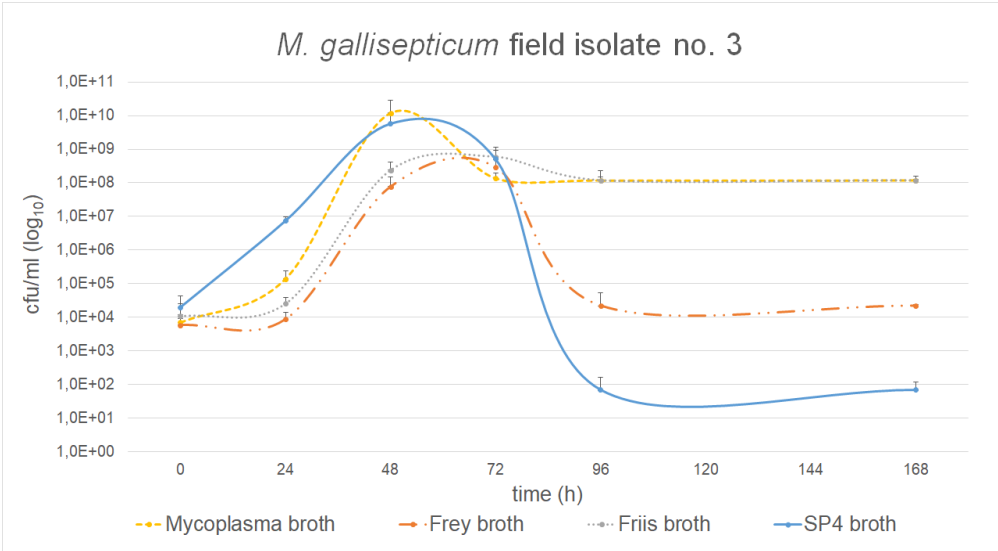
Growth curves of *M. gallisepticum* field isolate no. 1 in four different test media.
I = standard deviations.

Figure S3:



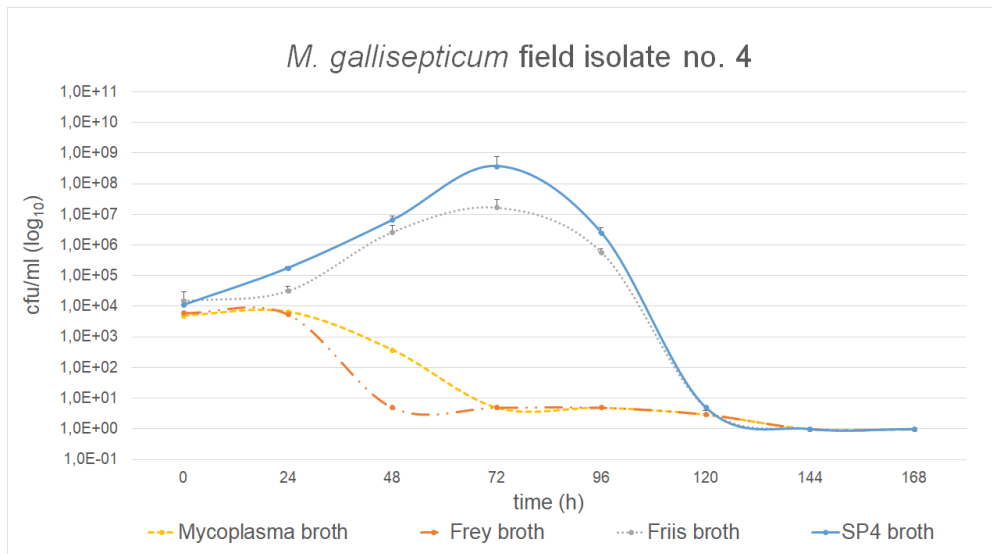
Growth curves of *M. gallisepticum* field isolate no. 2 in four different test media. I = standard deviations.

Figure S4:



Growth curves of *M. gallisepticum* field isolate no. 3 in four different test media. I = standard deviations.

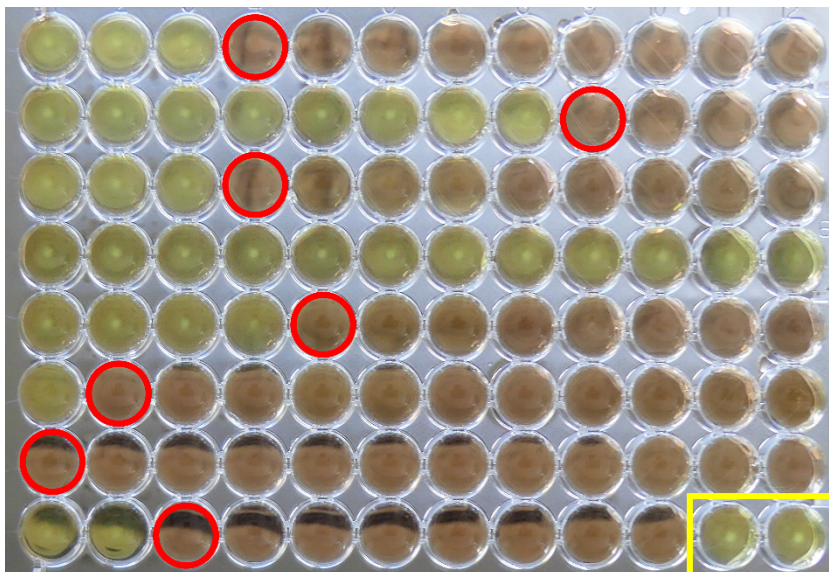
Figure S5:



Growth curves of *M. gallisepticum* field isolate no. 4 in four different test media.

I = standard deviations.

Figure S6:



Sensititre plate of *Mycoplasma gallisepticum* field isolate no. 2 after 72 h of incubation.

The yellow bordered wells represent two positive growth controls. The red bordered wells represent MIC endpoints.

Table S1: Homogeneity of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) of five *Mycoplasma gallisepticum* test isolates tested five times independently after 168 ± 2 h of incubation at 37°C .

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^b after 168 72 ± 2 h of incubation						Exact MIC agreement (%) ^c	Essential MIC agreement (%) ^d	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
Ciprofloxacin			2	19	4			76	100
Clindamycin			3	18	4			72	100
Doxycycline ^e				25				100	100
Enrofloxacin ^e	1	1	3	17	3			68	92
Erythromycin ^e			1	19	4	1		76	96
Florfenicol				25				100	100
Gentamicin ^e			1	24				96	100
Marbofloxacin ^e		1	3	19	2			76	96
Neomycin				25*				100	100
Pirlimycin			2	22	1			88	100
SYN ^f			4	18	3			72	100
Streptomycin			1	22*	2			88	100
Tetracycline ^e			1	24				96	100
Tiamulin ^e			1*	21*	2	1		84	96
Tilmicosin ^e			2	18*	5			72	100
Tulathromycin ^e			4	21				84	100
Tylosin ^e			2*	21*	2			84	100
Colistin ^e				25*				100	100
Imipenem				25*				100	100
Linezolid			2	23*				92	100
Nalidixic Acid			3	22				88	100
Oxacillin + 2 % NaCl				25*				100	100
SXT ^{e, g}				25*				100	100
Vancomycin				25*				100	100

^a The lower half of the table contains antimicrobials to which mycoplasmas are intrinsically resistant; ^b The MIC mode indicates the most frequently measured MIC value related to a test isolate in the context of the five replicates; ^c Data fulfilling the criteria of the exact MIC agreement are in the gray area; ^d Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of MIC mode; ^e Currently approved for food-producing animals in the EU; ^f SYN, quinupristin/dalfopristin; ^g SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole ratio 1:19; * Quantity of isolates with MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Table S2: Homogeneity of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) obtained after 72 ± 2 h of five *M. gallisepticum* test isolates tested six times independently with fetal bovine serum (FBS) from two different manufacturers.

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^b after 72 ± 2 h of incubation						Exact MIC agreement of isolates (%) ^c	Essential MIC agreement of isolates (%) ^d	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
Ciprofloxacin				29	1			96.67	100
Clindamycin		1	2	24	3			80.00	96.67
Doxycycline ^e			3*	21				70.00	100
Enrofloxacin ^e				30				100	100
Erythromycin ^e		1	3	23	3			76.67	96.67
Florfenicol			1	27	2			90.00	100
Gentamicin ^e			1	30				100	100
Marbofloxacin ^e				30				100	100
Neomycin				30*				100	100
Pirlimycin			1	28	1			93.33	100
SYN ^f				27	3			90.00	100
Streptomycin			1	28*	1			93.33	100
Tetracycline ^e			1	25*	4			83.33	100
Tiamulin ^e				30*				100	100
Tilmicosin ^e				26*	4			86.67	100
Tulathromycin ^e			1	24	5			80.00	100
Tylosin ^e				26*	4			86.67	100
Colistin ^e				30*				100	100
Imipenem				30*				100	100
Linezolid			2	28*				93.33	100
Nalidixic Acid				28	2			93.33	100
Oxacillin + 2 % NaCl			1	29*				96.67	100
SXT ^{e, g}				30*				100	100
Vancomycin				30*				100	100

^a The lower half of the table contains antimicrobials to which mycoplasmas are intrinsically resistant; ^b The MIC mode indicates the most frequently measured MIC value related to a test isolate in the context of six replicates; ^c Data fulfilling the criteria of the exact MIC agreement are in the gray area; ^d Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of MIC mode; ^e Currently approved for food-producing animals in the EU; ^f SYN, quinupristin/dalfopristin; ^g SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole ratio 1:19; * Quantity of isolates with MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the test range. Five replications were performed using FBS from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) and one replication was performed using FBS from Biowest SAS (Nuaillé, France)

Table S3: Homogeneity of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) obtained after 72 ± 2 h of five *M. gallisepticum* test isolates tested six times independently with yeastolate from two different manufacturers.

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^b after 72 ± 2 h of incubation						Exact MIC agreement of isolates (%) ^c	Essential MIC agreement of isolates (%) ^d	
	-3	-2	-1	0	1	2			3
Ciprofloxacin				29	1			96.67	100
Clindamycin	1	1		21				70.00	93.33
Doxycycline ^e			2*	28				93.33	100
Enrofloxacin ^e				29		1		96.67	96.67
Erythromycin ^e		1	4	22	3			73.33	96.67
Florfenicol			2	26	2			86.67	100
Gentamicin ^e			2	28				93.33	100
Marbofloxacin ^e				30				100	100
Neomycin				30*				100	100
Pirlimycin	1	1	4	23	1			76.67	93.33
SYN ^f			2	28				93.33	100
Streptomycin			1	28*	1			93.33	100
Tetracycline ^e			2	27*	1			90.00	100
Tiamulin ^e				30*				100	100
Tilmicosin ^e				26*	4			86.67	100
Tulathromycin ^e		1	4	21	4			70.00	96.67
Tylosin ^e				26*	4			86.67	100
Colistin ^e				30*				100	100
Imipenem				30*				100	100
Linezolid			2	28*				93.33	100
Nalidixic Acid				27	3			90.00	100
Oxacillin + 2 % NaCl				30*				100	100
SXT ^{e, g}				30*				100	100
Vancomycin				30*				100	100

^a The lower half of the table contains antimicrobials to which mycoplasmas are intrinsically resistant; ^b The MIC mode indicates the most frequently measured MIC value related to a test isolate in the context of six replicates; ^c Data fulfilling the criteria of the exact MIC agreement are in the gray area; ^d Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of MIC modes; ^e Currently approved for food-producing animals in the EU; ^f SYN, quinupristin/dalfopristin; ^g SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole ratio 1:19; * Quantity of isolates with MIC values equal to, lower or higher than the concentrations of the test range. Five replications were performed using yeastolate from Becton Dickinson and Company (Sparks, USA) and one replication was performed using yeastolate from Life Technologies Limited (Paisley, UK)

Table S4: Homogeneity of MIC values ($\mu\text{g/ml}$) obtained after 72 ± 2 h of five *M. gallisepticum* test isolates tested six times independently with tryptone from two different manufacturers.

Antimicrobial agent ^a	Deviation from MIC mode ^b after 72 ± 2 h of incubation							Exact MIC agreement of isolates (%) ^c	Essential MIC agreement of isolates (%) ^d
	-3	-2	-1	0	1	2	3		
Ciprofloxacin ^g			3	26	1			86.67	100
Clindamycin	1	2	7	20				66.67	90.00
Doxycycline ^g			4	26				86.67	100
Enrofloxacin			2	28				93.33	100
Erythromycin		1	5	21	3			70.00	96.67
Florfenicol		1	4	23	2			76.67	96.67
Gentamicin			4	26				86.67	100
Marbofloxacin			2	28				93.33	100
Neomycin ^g			2	28				93.33	100
Pirlimycin	2	1	3	23	1			76.67	90.00
SYN ^e			1	26	3			86.67	100
Streptomycin ^g			4	25	1			83.33	100
Tetracycline ^g			3	26	1			86.67	100
Tiamulin ^g				30				100	100
Tilmicosin ^g				26	4			86.67	100
Tulathromycin		2	4	20	4			66.67	93.33
Tylosin ^g				26	4			86.67	100
Colistin ^g				30				100	100
Imipenem ^g				30				100	100
Linezolid ^g			5	25				83.33	100
Nalidixic acid			2	26	2			86.67	100
Oxacillin + 2 % NaCl ^g				30				100	100
SXT ^{f, g}			1	29				96.67	100
Vancomycin ^g				30				100	100

^a The lower half of the table contains antimicrobials to which mycoplasmas are intrinsically resistant; ^b The MIC mode indicates the most frequently measured MIC value related to a test isolate in the context of six replicates; ^c Data fulfilling the criteria of the exact MIC agreement are in the gray area; ^d Essential MIC agreement defines MICs within ± 1 dilution of MIC mode; ^e SYN, quinupristin/dalfopristin; ^f SXT, trimethoprim/sulfamethoxazole ratio 1:19; ^g The MIC of at least one *M. gallisepticum* was equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

Five replications were performed using tryptone from Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Germany) and one replication was performed using tryptone from Oxoid Limited (Basingstoke, UK).

Table S5: Official MIC ranges of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and its MICs after testing in SP4 broth for 72 ± 2 h at 37 °C.

Antimicrobial agent	Time (h)	Quantity of replicates (n = 5) and their MIC ^a values (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
Clindamycin	20			-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-				
	72 ± 2			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5				
Erythromycin	20		-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-				
	72 ± 2		-	-	-	-	-	-	-	4	1	-	-	-				
Pirlimycin	20			-	-	-	-	-	-	1	-	4	-	-				
	72 ± 2			-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-				
Quinupristin/dalfopristin	20		-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	4	-				
	72 ± 2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5*			
Tylosin	20				-	-	-	-	-	4	1	-	-	-	-	-		
	72 ± 2				-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-		
Linezolid	20			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	72 ± 2			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
Oxacillin + 2 % NaCl	20		-	-	-	-	-	-	-	-	-	5						
72 ± 2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	1*					
Vancomycin	20		-	-	-	-	-	-	2	-	1	2	-	-				
	72 ± 2		-	-	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-				

Blue shading outlined with vertical bars visualize the CLSI-defined QC ranges of *E. faecalis* ATCC 29212 after testing in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) and incubation for 16 – 20 h (CLSI 2020, 2023); The white areas visualize the tested range of concentrations; * MICs equal to or higher than the concentrations of the test range.

Table S6: Official MIC ranges of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 and its MICs after testing in SP4 broth for 72 ± 2 h at 37 °C.

Antimicrobial agent	Time (h)	Quantity of replicates (n = 5) and their MIC ^a values (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
Clindamycin	20			-	-	1	4	-	-	-	-	-	-	-	-				
	72 ± 2			-	-	-	3	2	-	-	-	-	-	-	-				
Erythromycin	20		-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-					
	72 ± 2		-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-					
Pirlimycin	20			-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-					
	72 ± 2			-	-	-	-	-	2	3	-	-	-	-					
Quinupristin/dalfopristin	20							5											
	72 ± 2									4	1								
Tylosin	20				-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-				
	72 ± 2				-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-				
Linezolid	20									5									
	72 ± 2										5								
Oxacillin + 2 % NaCl	20		-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-					
72 ± 2		-	-	-	-	2	2	-	1	-	-	-	-	-					
Vancomycin	20		-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-					
	72 ± 2		-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-					

Blue shading outlined with vertical bars visualize the CLSI-defined QC ranges of *S. aureus* ATCC 29213 after testing in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) and incubation for 16 - 20 h (CLSI 2020, 2023); The white areas visualize the tested range of concentrations; * MICs equal to, lower or higher than the concentrations of the test range.

References

- CLSI. 2018. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 4th edition. CLSI VET08-ED4. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2020. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET01S, 5th edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. 2023. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 6th edition. CLSI VET01S ED6:2023. In: Clinical and Laboratory Standards Institute.

4. Übergreifende Diskussion

1. Erregerauswahl

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden AST-Verfahren als Bouillon-Mikrodilutionsmethode für die folgenden fünf geflügel- oder rinderpathogenen Erreger entwickelt: *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* und *M. gallisepticum*. Für alle fünf Erreger liegen derzeit keine anerkannten AST-Methoden in internationalen Standards zur Empfindlichkeitsprüfung vor. Um valide Ergebnisse einer bakteriellen Empfindlichkeitsprüfung zu erhalten, sollte eine Testung der Erreger aber möglichst nach standardisierten Methoden erfolgen. Obwohl sich die fünf untersuchten bakteriellen Spezies in vielen Merkmalen (z.B. Koloniemorphologie, Wirtsspektrum, Wachstumsanforderungen) unterscheiden, haben sie gemeinsam, dass sie als anspruchsvoll gelten oder zu anspruchsvollen Familien gezählt werden (HANSEN et al. 2013; CLOTHIER et al. 2019; BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; GELGIE et al. 2022; MAROUF et al. 2022). Anspruchsvolle Bakterienspezies stellen im Vergleich zu schnell wachsenden, anspruchslosen Spezies wie *E. coli*, höhere Anforderungen an die Anzucht in Laboren. Für das Wachstum anspruchsvoller Organismen ist in der Regel ein komplexes Nährmedium mit speziellen Zusätzen (z.B. Blut oder Blutkomponenten, DNS, Hefeextrakt, Kalzium, Pyridoxal) erforderlich (CLSI 2010; CLSI 2011). Darüber hinaus benötigen einige als anspruchsvoll geltende Bakterienspezies vergleichsweise längere Inkubationszeiten oder eine Bebrütung in einer besonderen Atmosphäre, wie zum Beispiel einer Atmosphäre mit CO₂-Anreicherung (CLSI 2010). Aufgrund der besonderen Wachstumsanforderungen der in diese Arbeit einbezogenen Erreger wurde davon ausgegangen, dass die Standardmethoden für die AST schnell wachsender Organismen nicht verwendet werden können und komplexere Medien und modifizierte Anzuchtbedingungen anzuwenden sind. Um aber dennoch AST-Methoden für diese fünf Bakterienspezies zu entwickeln, die sich für eine spätere Übernahme in Standards für Empfindlichkeitstests eignen, waren mehrere Schritte erforderlich, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

1.1. Akquise von Isolaten

Um eine neue AST-Methode zu validieren und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, ist es wichtig, möglichst viele Isolate der zu untersuchenden Spezies zu testen. Diese

sollten nach Möglichkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten und von verschiedenen Tierarten isoliert worden sein, damit die Eignung der Methode für eine möglichst große Breite an Isolaten gezeigt werden kann. Während es für die Spezies *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* problemlos möglich war, zeitnah eine ausreichende Anzahl von Isolaten für die Methodvalidierung zu gewinnen, erwies sich die Isolatakquise von *M. bovis* und *M. gallisepticum* als sehr schwierig. Grund hierfür könnte sein, dass isolierte *M. bovis*- und *M. gallisepticum*-Isolate in Laboren nicht regulär dauerkonserviert werden. Zudem wenden Diagnostiklabore zur Erregeridentifikation von Mykoplasmen häufig molekularbiologische Methoden (z.B. PCR, Real-time-PCR) an (SELBITZ 2023b). Im Rahmen der Herdendiagnostik verwenden wiederum viele Labore zum Nachweis von *M. bovis* und *M. gallisepticum* serologische Methoden wie kommerzielle ELISA-Tests (engl: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (REGISTER 2013; ALI et al. 2015; SELBITZ 2023b).

1.1.1. Auswahl von Testisolaten

Für wichtige Validierungsschritte im Rahmen der Methodenentwicklung (z.B. Wachstumsversuche zur Auswahl eines geeigneten AST-Mediums oder multiple Empfindlichkeitstests zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit der Testergebnisse) ist die Auswahl einiger „Testisolate“ notwendig, die besondere Anforderungen erfüllen müssen. Sie sollten nicht nur unterschiedlichen Ursprungs (Isolationsjahr, Region, Tierart) sein, sondern auch möglichst epidemiologisch unverwandt sein, was häufig durch eine Feintypisierung bestätigt wird. Eine Feintypisierung von Bakterienisolaten lässt sich dabei durch verschiedene Methoden durchführen (SIMAR et al. 2022). Die Makrorestriktion mit anschließender Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) ist eine traditionelle Methode, die auf einem enzymatischen Verdau der genomischen DNS und der Trennung der DNS-Fragmente durch ein elektrisches Feld basiert (HERSCHLEB et al. 2007). Die traditionelle Methode galt lange Zeit als die am häufigsten verwendete Feintypisierungsmethode (LI et al. 2021), wurde für die meisten Bakterien umfassend validiert und liefert meist zuverlässige Ergebnisse (TENOVER et al. 1995). Der Nachteil ist, dass Makrorestriktionsanalysen zeitaufwändig sind, fragmentbasierte Ergebnisse liefern, die schwer zwischen Laboren vergleichbar sind und nur einen geringen Probendurchsatz erlauben (SIMAR et al. 2022). Um den Probendurchsatz zu erhöhen und basengenaue Ergebnisse zu erhalten, wurden zunehmend sequenzbasierte Methoden zur Feintypisierung (z.B. MLST, cgMLST)

entwickelt und ersetzen mehr und mehr die fragmentbasierten Methoden (SABAT et al. 2013). Das „Multilocus Sequencing Typing“ (MLST) beispielsweise beruht auf Sequenzierungen von konservierten bakteriellen „Housekeeping-Genen“, in denen allelische Punktmutationen detektiert und zur Typisierung verwendet werden (MAIDEN et al. 2013). Aktuell werden häufig die Daten aus WGS-Analysen zur Typisierung von Bakterien (z.B. *core genome* MLST) verwendet. Mit den Ergebnissen lassen sich auch Unterschiede zwischen hochverwandten Isolaten nachweisen. Allerdings sind WGS-Analysen und das dafür benötigte Equipment immer noch kostenintensiv, obgleich die Methode auch zunehmend für kleinere Labore rentabel wird (SIMAR et al. 2022). WGS-Analysen gewinnen daher mehr und mehr an Bedeutung für die epidemiologische Überwachung von infektionsbedingten Krankheitsausbrüchen (COLL et al. 2020; SIMAR et al. 2022).

Da für die Auswahl der erforderlichen Testisolate für die Methodenentwicklung keine sequenzbasierten Daten erforderlich waren und nur der Ausschluss von epidemiologisch verwandten Isolaten erfolgen sollte, sowie nur wenige Isolate in die Feintypisierungsanalysen einbezogen werden sollten, wurde in dieser Arbeit die als zuverlässig geltende Methode der Makrorestriktionsanalyse durchgeführt. Einen ähnlichen Ansatz verfolgten PRÜLLER et al. (2015a) und PRÜLLER et al. (2017), die Methoden zur standardisierten AST von *B. bronchiseptica* und *Glaesserella parasuis* entwickelten.

1.1.1.1. Makrorestriktionsanalysen von *Av. gallinarum*-, *Av. paragallinarum*-, *B. avium*- und *M. bovis*-Isolaten

Für die vier Spezies *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium* und *M. bovis* lagen bereits zu Beginn der Arbeiten ausreichend Isolate vor, sodass zwischen 15 und 59 Isolate mit möglichst unterschiedlicher Herkunft in die Makrorestriktionsanalysen einbezogen wurden. Für keine dieser vier Spezies stand eine PFGE-Standardmethode zur Verfügung, weshalb auf der Grundlage des von RIBOT et al. (2006) standardisierten Protokolls (für *E. coli* O157:H7, *Salmonella* und *Shigella*) für alle vier Spezies Methoden zur Makrorestriktionsanalyse entwickelt wurden. Für die einbezogenen Isolate aller vier Spezies wurden gut auswertbare Bandenmuster erzielt, so dass die Methode als für die Feintypisierung geeignet erschien. Nach der Erstellung von Dendrogrammen wurde zur Identifizierung von PFGE-Clustern mit der Software BioNumerics (Applied Maths N.V.) in Anlehnung an zuvor veröffentlichte Studien ein

Cut-off-Wert von 80 % gewählt (MCDOUGAL et al. 2003; BOSCH et al. 2010). Zur Beurteilung der Klonalität der untersuchten Isolate wurden die Kriterien für die Typisierung von Bakterien nach TENOVER et al. (1995) herangezogen. Wiesen Isolate kein identisches Bandenmuster auf, wurden diese nach den Interpretationskriterien von TENOVER et al. (1995) als nicht verwandt eingestuft. Die typische Anzahl der Bandenunterschiede bei eng verwandten Isolaten liegt zwischen zwei und drei, bei wahrscheinlich verwandten Isolaten zwischen vier und sechs Banden (TENOVER et al. 1995). Als epidemiologisch nicht verwandte Isolate stuften die zuletzt genannten Autoren solche ein, die sich in ≥ 7 Fragmenten voneinander unterscheiden. Bei einem Vergleich der Ergebnisse der Makrorestriktionsanalysen von *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* mit anschließender Clusteranalyse zeigte sich für beide Spezies, dass sowohl eng verwandte als auch nicht verwandte Isolate vorkamen. Während einige Isolate sich unterscheidende Fragmentmuster mit einer Übereinstimmung von < 80 % aufwiesen, zeigten andere nahezu oder vollständig identische Fragmentmuster. Da es jedoch noch keine weiteren veröffentlichten Ergebnisse zu PFGE-Clusteranalysen von *Avibacterium* spp. gibt, konnte kein Vergleich mit anderen Isolatsammlungen durchgeführt werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* deuten die Ergebnisse der PFGE-Clusteranalysen von *B. avium* auf eine allgemein hohe Klonalität innerhalb der Spezies hin. So wiesen die meisten *B. avium*-Fragmentmuster eine Übereinstimmung von über 80 % auf. Die für *B. avium* erhobenen Daten korrelieren mit Ergebnissen einer im Jahr 2012 veröffentlichten Studie, die die epidemiologische Verwandtschaft von elf brasilianischen *B. avium* analysierte und ebenfalls eine hohe genetische Verwandtschaft der untersuchten Isolate feststellte (GRESPLAN et al. 2012). Auch für *B. bronchiseptica* oder *B. pertussis* wurde zuvor eine hohe genetische Klonalität festgestellt (MUSSER et al. 1987; BEALL et al. 1995; BINNS et al. 1998; PRÜLLER et al. 2015a), sodass davon auszugehen ist, dass dies ein gemeinsames Merkmal der Gattung *Bordetella* ist. Im Gegensatz dazu wurde in dieser Arbeit für *M. bovis* eine geringe Klonalität der analysierten Isolate festgestellt. Die Mehrheit der untersuchten *M. bovis* zeigte anhand der generierten Bandenmuster eine Ähnlichkeit zwischen etwa 25 bis 80 %, was unter dem angewendeten Cut-Off-Wert von 80 % liegt. BIDDLE et al. (2005) und BECKER et al. (2020) stellten ebenfalls eine geringe Klonalität untersuchter amerikanischer oder europäischer *M. bovis* unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Sma*I, *Mlu*I oder *Kpn*I fest.

Zu Beginn der praktischen Arbeit mit *M. gallisepticum* waren nur fünf Isolate verfügbar. Diese wurden von verschiedenen Vogelarten (Huhn, Humboldt-Pinguin, unbekannte Geflügelart) isoliert und stammen aus unterschiedlichen Jahren (vor 2007 bis 2021) und geografischen Regionen (Deutschland, Vereinigtes Königreich). Daher wurden diese fünf *M. gallisepticum* direkt als Testisolate ausgewählt und es wurden keine Makrorestriktionsanalysen durchgeführt.

2. Medienauswahl für die zu testenden Bakterienspezies

Ein Medium für die standardisierte AST sollte verschiedene Kriterien erfüllen. Es sollte in der Lage sein, sichtbares Wachstum aller zu testenden Bakterienisolate in den Vertiefungen von inkubierten Mikrotiterplatten zu erzielen, damit die MHK-Werte zuverlässig abgelesen werden können (CLSI 2018a). Neben dem sichtbaren Wachstum sollte das Medium auch eine ausreichende Keimkonzentration der zu untersuchenden Bakterienisolate ermöglichen. Dies ist wichtig, da ein Mindestwachstum der zu testenden Bakterien auf eine Konzentration von 10^7 KbE/ml erforderlich ist, um das für die standardisierte AST erforderliche Inokulum einzustellen (CLSI 2011; CLSI 2020). Weiterhin sollte das Medium für Routinelabore verfügbar sein und keine oder nur wenige Inhaltsstoffe enthalten, die die Aktivität der zu testenden Wirkstoffe beeinträchtigen (CLSI 2018a). Auch sollte es keine oder nur wenige Inhaltsstoffe enthalten, die das Wachstum des zu testenden Isolats negativ beeinflussen. So ist beispielsweise zu beachten, dass die im nativen Serum enthaltenen Komplementfaktoren zu einer Wachstumshemmung eines zu testenden Bakterienisolats führen können (LI et. al 2017). Dadurch wäre mit einer Beeinflussung der MHK-Werte (zu niedrig) zu rechnen. Darüber hinaus sollte ein Medium für die standardisierte AST eine gute Chargenreproduzierbarkeit aufweisen, da die Charge der verwendeten Medienkomponenten einen Einfluss auf die MHK-Werte haben kann (BAARS und OPFERKUCH 1979; BARNES und HODGES 1984).

Um für jeden der fünf einbezogenen Spezies ein geeignetes Medium für die standardisierte AST zu finden, erfolgte zunächst eine umfangreiche Literaturrecherche. In einem ersten Schritt wurde geprüft, ob internationale Standards bereits Medien enthalten, die für die AST von eng verwandten Erregern anerkannt sind. Diese in Standards enthaltenen Medien haben den allgemeinen Vorteil, dass sie bereits alle kostspieligen und zeitaufwändigen Validierungsschritte (z.B. Prüfung von

Wechselwirkungen zwischen Medienkomponenten und Wirkstoffen, Eignungsprüfung anerkannter QC-Stämme) durchlaufen haben, die zur Anerkennung erforderlich sind. Der nächste Schritt bestand darin, herauszufinden, ob und welche Medien in zuvor veröffentlichten Studien für die AST des zu testenden Erregers verwendet wurden. Weiterhin wurden auch Medien in die Auswahl einbezogen, die zuvor für die AST von eng verwandten Erregern verwendet worden waren, die demselben Genus (z.B. *B. bronchiseptica* für *B. avium*, *M. pneumoniae* für *Mycoplasma* spp.) oder der gleichen Familie (z.B. *Pasteurellaceae* für *Avibacterium* spp.) angehören.

2.1. Medienvorauswahl für *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium*

Im Gegensatz zu den anderen in die Arbeit einbezogenen Spezies sind für *Av. gallinarum* bisher keine Studien zur Empfindlichkeitstestung im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren veröffentlicht worden. Auch wenn *Av. gallinarum* nicht hämophil ist, kultivieren Labore diesen Erreger auf Blut- oder NAD-haltigen Medien (z.B. Columbia-Blutmedium, Haemophilus-Medium) (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; DSMZ). In die Versuche zur Medienauswahl für diesen Erreger wurde daher nicht nur die nicht supplementierte CAMHB, sondern ähnlich wie für *B. avium* auch das VFM und die CAMHB+LHB gewählt. Um die Abhängigkeit des Erregers gegenüber dem V-Faktor zu testen, wurden zusätzlich zwei weitere CAMHB-basierte Medien einbezogen, die entweder 1 % Hühnerserum (v/v) (CAMHB+CS) oder 0,0025 % NADH (v/v) (CAMHB+NADH) enthielten. Darüber hinaus wurde die CAMHB plus 0,0025 % NADH (v/v) plus 1 % hitzeinaktiviertes Hühnerserum (v/v) (CAMHB+CS+NADH) hinzugezogen. Dieses neue Medium wurde von HEUVELINK et al. (2018) und LUNA-CASTREJÓN et al. (2021) für die AST des nah verwandten Erregers *Av. paragallinarum* eingesetzt, nachdem es von PRÜLLER et al. (2017) für die standardisierte AST des V-Faktor-abhängigen Erregers *G. parasuis* empfohlen wurde. Infolgedessen wird die CAMHB+CS+NADH im kommenden CLSI-Dokument VET06 als neues Medium für die AST von *G. parasuis* empfohlen werden (persönliche Kommunikation).

Literaturrecherchen zu *Av. paragallinarum* ergaben, dass dieser Erreger höhere Anforderungen an ein Nährmedium stellt als *Av. gallinarum* und *B. avium*. So enthalten die üblicherweise für *Av. paragallinarum* verwendeten Nährmedien den Zusatz von NAD, NaCl und/oder Hühnerserum (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; DSMZ), auch wenn nicht jedes *Av. paragallinarum*-Isolat für das Wachstum in

Nährmedien auf NAD und/oder Hühnerserum angewiesen ist (HINZ 1973; MOUAHID et al. 1994; GARCIA et al. 2004; FALCONI-AGAPITO et al. 2015). Für diesen Erreger wurde deshalb neben dem Standardmedium CAMHB auch die CAMHB+CS+NADH, CAMHB+LHB und das VFM für die experimentelle Testung gewählt. Im Laufe der Arbeiten mit *Av. paragallinarum* verschlechterte sich jedoch die Produktverfügbarkeit des im VFM enthaltenen Supplement CTM, so dass in CLSI-Dokumenten als Alternative die Mueller-Hinton fastidious broth medium with yeast extract (MHF-Y) empfohlen wurde (CLSI 2019). Daher wurde die MHF-Y in die vergleichenden Versuche zur Eignung der Nährmedien aufgenommen (CLSI 2019). Da *Av. paragallinarum* zu den hämophilen Spezies zählt, wurde zudem noch das für die AST der hämophilen Bakterienspezies *Haemophilus influenzae* und *Haemophilus parainfluenzae* anerkannte Haemophilus-Testmedium (HTM) einbezogen (CLSI 2016).

Literaturrecherchen zu *B. avium* ergaben, dass nur in wenigen Studien Ergebnisse zur Bouillon-Mikrodilutionstestung dieses Erregers veröffentlicht wurden. MORTENSEN et al. (1989) verwendeten zur AST von *B. avium* die Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon (CAMHB). Dieses Medium gilt gemäß dem CLSI als Standardmedium für die Testung schnellwachsender Organismen (CLSI 2020). Auch PRÜLLER et al. (2015a) empfehlen die CAMHB für die standardisierte AST des nah verwandten Erregers *B. bronchiseptica* (CLSI 2020). Da Labore zur Kultivierung von *B. avium* erfolgreich das Columbia-Blutmedium verwenden (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; DSMZ), wurden zusätzlich zwei bluthaltige Medien hinzugezogen, die vom CLSI für die AST anspruchsvoller Bakterien akzeptiert sind. Dazu zählte das Veterinary Fastidious Medium (VFM) (z.B. empfohlen für *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *H. somni*) und die CAMHB mit 2,5 % lysiertem Pferdeblut (CAMHB+LHB) (z.B. empfohlen für *Streptococcus pneumoniae* und *Neisseria meningitidis*) (CLSI 2016; CLSI 2020).

2.2. Medienvorauswahl für *M. bovis* und *M. gallisepticum*

Mykoplasmen benötigen zum Wachstum komplexe Spezialmedien mit zahlreichen Zusätzen (z.B. DNS, Hefeextrakt, Tierseren, Peptone) (SELBITZ 2015b). Aufgrund der hohen Anforderungen an ein Nährmedium war daher davon auszugehen, dass herkömmliche Medien wie die CAMHB nicht für die AST von *M. bovis* und *M. gallisepticum* geeignet sind. Eine weitere Herausforderung bestand darin, dass viele Mykoplasmen im Vergleich zu anderen Bakterien in bebrüteten Flüssigkulturen keine sichtbare Trübung aufweisen (GAUTIER-BOUCHARDON et al. 2014; KÄBISCH et al.

2023). Die Zugabe eines pH-Farbindikators in Kombination mit einem Substrat ist daher eine gängige Alternative für die Wachstumsdetektion von Mykoplasmen. Verstoffwechselt der Erreger saure (z.B. Glukose) oder basische (z.B. Arginin) Metaboliten, bewirkt der zugesetzte pH-Indikator aufgrund der auftretenden pH-Änderung einen Farbwechsel im bebrüteten Medium (HANNAN 2000). Im Vergleich zu Resazurin (Synonym: Alamarblau) ist Phenolrot der einzige pH-Indikator, der für Nährmedien (Mycoplasma-Bouillon, SP4-Bouillon) vom CLSI für die AST von humanpathogenen Mykoplasmen akzeptiert ist (CLSI 2011). Darüber hinaus ergab die Literaturrecherche, dass Phenolrot der bisher am häufigsten verwendete pH-Indikator für die AST von *M. bovis* und *M. gallisepticum* ist (HANNAN et al. 1997; AYLING et al. 2000; GAUTIER-BOUCHARDON et al. 2002; THOMAS et al. 2003; GERCHMAN et al. 2009; AMMAR et al. 2016; JOSI et al. 2018; LIU et al. 2020; DE JONG et al. 2021). Aus diesem Grund wurden für die Untersuchungen zu *M. bovis* und *M. gallisepticum* ausschließlich Medien gewählt, die Phenolrot als pH-Indikator enthalten. Bei der Auswahl eines geeigneten Substratzusatzes im Medium war zu beachten, dass es selbst innerhalb der Gattung *Mycoplasma* große Unterschiede in der Substratnutzung gibt (BLANCHARD und BROWNING 2005). Demgemäß wurden die folgenden fünf glukosehaltigen Medien für die Wachstumsexperimente ausgewählt, die bereits in anderen Studien für die AST von *M. bovis* eine gute Eignung zeigten: die Friis-Bouillon (FRIIS 1975), die modifizierte Standard Mycoplasma Bouillon (ROSENGARTEN et al. 1994; GERCHMAN et al. 2009), die modifizierte PPLO-Bouillon (BOKMA et al. 2020) und die SP4-Bouillon (CLSI 2011). Obwohl *M. gallisepticum* Glukose anstelle von Arginin fermentiert (EDWARD und KANAREK 1960), empfiehlt die DSMZ Arginin als Substrat für diesen Erreger (DSMZ). Daher wurden für diese Spezies arginin- oder glukosehaltige Medien ausgewählt: die Mycoplasma-Bouillon und die SP4-Bouillon (CLSI 2011) sowie die bereits zur AST dieses Erregers verwendete modifizierte Frey-Bouillon (LI et al. 2010) und Friis-Bouillon (Friis 1975; de Jong et al. 2021).

2.3. Wachstumsexperimente

Zu Beginn einer Empfindlichkeitstestung ist eine definierte Keimkonzentration im Nährmedium einzustellen. Ist die Keimkonzentration des Inokulums zu hoch, sind bei vielen Wirkstoffen (z.B. Aminoglykoside, β -Laktame, Makrolide) höhere MHK-Werte zu erwarten, auch bekannt als Inokulum-Effekt (KELLY und MATSEN 1976; BROOK 1989; CARBON 1998; SMITH und KIRBY 2018). Umgekehrt sind bei zu niedrig

eingestellten Keimkonzentrationen des Inokulums niedrigere MHK-Werte zu erwarten. Für häufig isolierte (z.B. *Enterobacterales*) und anspruchsvolle Bakterienspezies (z.B. *A. pleuropneumoniae*, *H. somni*, *Streptococcus* spp.) sieht das CLSI in den Prüfvorschriften ein Inokulum einer Konzentration von etwa 5×10^5 KbE/ml vor (zulässige Konzentrationsspanne: $2 - 8 \times 10^5$ KbE/ml) (CLSI 2017; CLSI 2020). Für die AST von humanpathogenen Mykoplasmen ist eine Inokulumkonzentration von 10^4 bis 10^5 KbE/ml in den entsprechenden Prüfvorschriften gefordert (CLSI 2011). Diese in den Standards angegebenen Werte sollten daher in der vorliegenden Arbeit als Inokulumkonzentrationen verwendet werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl herkömmlicher Bakterien in einer flüssigen Bakteriensuspension können verschiedene Methoden verwendet werden. Zu den gängigsten Methoden zählt die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) und das Plattenzählverfahren zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE) (HAZAN et al. 2012; MYERS et al. 2013; BEAL et al. 2020). Eine einfache Methode zur Schätzung der Zellzahl ist die Messung der OD_{600} -Werte (OD_{600}) (MYERS et al. 2013; BEAL et al. 2020). OD_{600} -Messgeräte messen den Grad der Lichtstreuung, der durch das Vorhandensein von Partikeln in einer Bakterienkultur verursacht wird. Dadurch ist der OD_{600} -Wert umso höher, je mehr Mikroorganismen sich in der Suspension befinden. Diese Messungen sind extrem schnell, kostengünstig und einfach zu handhaben (BEAL et al. 2020). Ein Nachteil ist, dass die OD_{600} nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterscheiden kann (BHAT et al. 2021). Zur Bestimmung der Anzahl von koloniebildenden Einheiten (KbE) kann die Plattenzählmethode verwendet werden (MILLER 1972; HAZAN et al. 2012; CAYER et al. 2020; MICHELUTTI et al. 2020). Aus einer bebrüteten Bakteriensuspension werden dabei serielle Verdünnungsreihen hergestellt, von denen definierte Volumina auf Agarplatten ausplattiert werden. Nach einer definierten Inkubationszeit werden die Kolonien visuell oder digital ausgezählt und die KbE/ml anhand bekannter Formeln zurückberechnet. Ein Nachteil ist, dass die Methode vergleichsweise zeitaufwändig ist, da das Ergebnis in der Regel erst nach ein bis drei Tagen vorliegt (HAZAN et al. 2012). Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, dass nahe beieinander liegende Kolonien fälschlicherweise häufig als eine einzige Kolonie gezählt werden, so dass von einer Unterschätzung der KbE/ml ausgegangen werden muss (HAZAN et al. 2012). Die Handhabung von Mykoplasmen und ihre Quantifizierung stellt für diagnostische Labore eine größere Herausforderung dar als

bei schnellwachsenden, anspruchslosen Bakterien. In bebrüteten Flüssigkulturen führen die meisten Mykoplasmen im Gegensatz zu anderen Bakterien (wie *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium*) wie bereits erwähnt nicht zu einer sichtbaren Trübung (GAUTIER-BOUCHARDON et al. 2014; KÄBISCH et al. 2023), so dass keine OD₆₀₀-Messung zur Inokulumeinstellung angewendet werden kann. Aufgrund der geringen Koloniegröße und des Fehlens einer Zellwand können auf Agar gewachsene Mykoplasmenkolonien zudem üblicherweise nur mit speziellen Mikroskopen (z.B. Stereomikroskop) zuverlässig quantifiziert werden (WAITES et al. 2012; SELBITZ 2023b). Gängige Methoden zur Bestimmung der Keimzahl und Inokulumeinstellung (z.B. direkte Koloniesuspensionsmethode gemäß CLSI-Supplement VET01S) sind daher nicht für *Mycoplasma* spp. geeignet. Als Goldstandard für die Quantifizierung von *Mycoplasma* spp. gelten die Determination von Farbverändernden Einheiten (engl.: colour changing units, angegeben als ccu/ml) oder die quantitative Keimzahlbestimmung (KbE/ml) (STEMKE und ROBERTSON 1982; ASSUNÇÃO et al. 2006). Wenngleich HANNAN (2000) beide zuletzt genannten Methoden für die AST veterinärmedizinischer Mykoplasmen empfiehlt, wurde in dieser Arbeit aus Gründen der Praktikabilität und der besseren Sensitivität die Methode der quantitativen Keimzahlbestimmung gewählt. Das Verfahren ist in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2

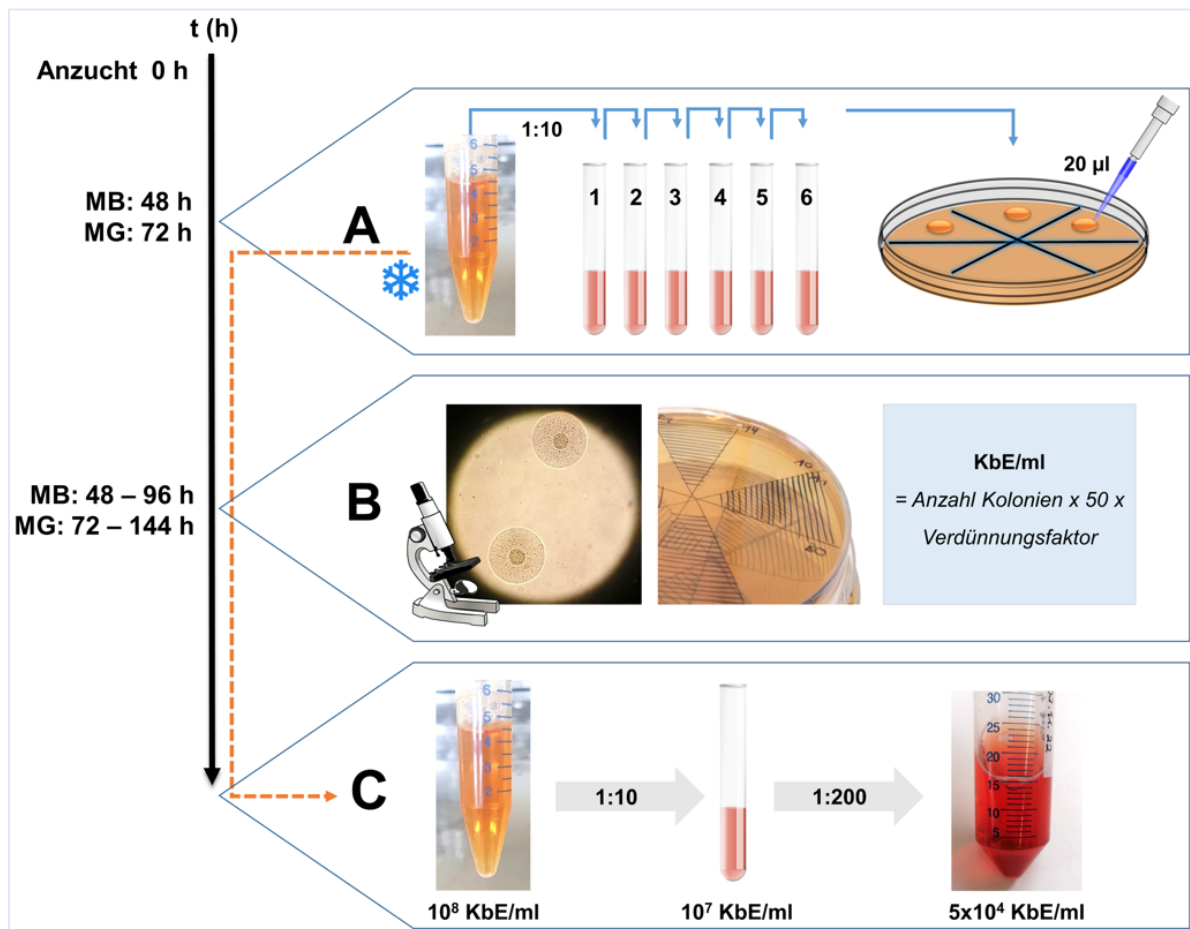


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Verfahrens zur InokulumEinstellung für Empfindlichkeitstestungen von *M. bovis* und *M. gallisepticum*.

MB, *M. bovis*; MG, *M. gallisepticum*; **A**: 10-fache serielle Verdünnung einer 48 h (MB) oder 72 h (MG) bebrüteten Bakteriensuspension (100 µl in je 900 µl SP4-Bouillon) und Ausplattieren von 20 µl jeder Verdünnung auf vorgetrocknete SP4-Agarplatten, die zuvor mit einem Permanentmarker unterteilt wurden; **B**: Zählung der gewachsenen Kolonien und Rückrechnung der Keimzahl der bis zum Test eingefrorenen Bakteriensuspension anhand der in CLSI-Dokument M43-A definierten Formel ($\text{KbE/ml} = \text{Anzahl gezählter Kolonien} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$); **C**: Beginn des Empfindlichkeitstests durch Auftauen der zuvor eingefrorenen Ausgangskultur mit bekannter Keimzahl und Einstellen der vom CLSI geforderten Inokulumdichte ($10^4 - 10^5$ KbE/ml) (CLSI 2011).

Die Keimzahlmethode ist bereits vom CLSI für die AST von humanpathogenen Mykoplasmen anerkannt (CLSI 2011) und kürzlich von KÄBISCH et al. (2013) für die standardisierte AST von *M. hyorhinis* empfohlen worden. Ein weiteres Argument für die Bestimmung der KbE/ml und gegen die Bestimmung der farbverändernden Einheiten war, dass eine farbverändernde Einheit gelegentlich mehr als eine Zelle umfasst und daher nicht sensitiv genug ist (JANETZKO et al. 2014; ACKERMAN et al. 2019). Eine weitere häufig zur Quantifizierung veterinärmedizinischer *Mycoplasma* spp. eingesetzte Methode ist die Durchflusszytometrie (ASSUNÇÃO et al. 2005; ASSUNÇÃO et al. 2006), die aufgrund der kostenintensiven Anschaffung für die Routinediagnostik jedoch ungeeignet erschien. Eine kostenintensive aber zeitsparende Möglichkeit ist die Quantifizierung mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR) mit dem Vorteil einer schnellen Bearbeitungszeit von meist nur wenigen Stunden. Eine mögliche Fehlerquelle und damit ein Nachteil dieser Methode besteht jedoch darin, nicht zwischen toten und lebenden Zellen differenzieren zu können (ZENG et al. 2016). Dies ist insofern problematisch, da eine fehlerhafte Einstellung des für eine standardisierte AST erforderlichen Inokulums dadurch möglich ist. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit zur Inokulumeinstellung von Mykoplasmen die Bestimmung der KbE/ml gewählt.

2.3.1. Wachstumsversuche mit *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium*

2.3.1.1. Medienvorauswahl durch Bestimmung des sichtbaren Wachstums von *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum*

Das visuelle Erkennen von bakteriellem Wachstum in Mikrotiterplatten ist eine Grundvoraussetzung für die Ablesung von MHK-Werten (CLSI 2018a). Bereits zu Beginn der Laborarbeit mit *B. avium* zeigte sich, dass dieser Erreger auch in einfachen Nährmedien (z.B. BHI, CAMHB) zu einer starken Trübung führt, so dass eine direkte Auswahl von Medien für die Wachstumsexperimente für diesen Erreger möglich war. Andere Beobachtungen wurden für *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* gemacht, von denen nicht alle Isolate zu einer starken Trübung der bebrüteten Bakteriensuspensionen führten. Um für diese beiden Bakterienspezies eine Vorauswahl an potenziell geeigneten Nährmedien zu treffen, wurde daher das sichtbare Wachstum einer Anzahl an Isolaten (n = 13 für *Av. gallinarum*, n = 15 für *Av. paragallinarum*) in Mikrotiterplatten-Vertiefungen untersucht, die nicht mit Antibiotika beschichtet waren. Konnte mit einem Medium kein sichtbares Wachstum für alle

getesteten Isolate erzielt werden, so wurde es von den nachfolgenden Experimenten zur Erstellung von Wachstumskurven ausgeschlossen.

Auch wenn nach einer Inkubation über 20 h bei $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ alle untersuchten *Av. gallinarum* in den sechs getesteten Medien sichtbares Wachstum zeigten, wurden zwei der Medien (CAMHB+LHB und VFM) von den nachfolgenden Keimzahlbestimmungen mit diesem Erreger ausgeschlossen. Der Grund dafür war die bräunliche Farbe der bebrüteten Medien, die es erschwerte, das Wachstum einiger *Av. gallinarum* visuell zu erkennen. Nach 48 h Inkubation bei $35 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ führten nur zwei der sechs getesteten Medien (CAMHB+CS+NADH und VFM) zu sichtbarem Wachstum aller getesteten *Av. paragallinarum*, obwohl jedes dieser Medien, mit Ausnahme der CAMHB, für anspruchsvolle Erreger konzipiert ist. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf das im Vergleich zu *Av. gallinarum* anspruchsvollere Wachstumsverhalten von *Av. paragallinarum* und die Abhängigkeit einiger *Av. paragallinarum* vom V-Faktor zurückzuführen (BLACKALL und SORIANO 2020). Da *Av. paragallinarum* für ein optimales Wachstum einen NaCl-Gehalt von 0,5 bis 1,5 % benötigt (RIMLER et al. 1977), könnte auch ein abweichender NaCl-Gehalt im Medium zu schlechteren Resultaten einiger Medien geführt haben. Ähnliche Erkenntnisse hat PRÜLLER (2016) für den nah verwandten Erreger *G. parasuis* gewonnen, der wie *Avibacterium* spp. zu der Familie der *Pasteurellaceae* zählt, nachdem die Autorin das Wachstumsverhalten von *G. parasuis* in CAMHB+LHB und der HTM untersucht hatte. Wie *Av. paragallinarum* zeigten auch die von PRÜLLER (2016) untersuchten *G. parasuis*-Isolate gutes Wachstum in der VFM, jedoch nicht CAMHB+LHB und HTM. Für die weiteren Untersuchungen zur Keimzahlbestimmung von *Av. paragallinarum* wurden in der vorliegenden Studie daher nur die CAMHB+CS+NADH und das VFM einbezogen.

2.3.1.2. Erstellung von Wachstumskurven für *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium*

Da *Av. gallinarum* und *B. avium* in einer bebrüteten Bakteriensuspension zu einer starken Trübung des Mediums führen, konnte bei beiden Erreger die OD₆₀₀-Methode (zusätzlich zur kulturbasierten Keimzahlbestimmung) bei der Erstellung von Wachstumskurven angewendet werden. Beim Vergleich der OD₆₀₀-Werte und KbE/ml fiel allerdings auf, dass diese nicht korrelieren. Während in allen Medien ausreichende Keimkonzentrationen von $\geq 10^7$ KbE/ml gemessen wurden, waren die OD₆₀₀-Werte von Medien mit farbigen Bestandteilen (z.B. CAMHB+CS+NADH, CAMHB+CS,

CAMHB+LHB, VFM) höher als die von Medien ohne farbige Bestandteile (z.B. nicht supplementierte CAMHB). Als Grund dafür wird angenommen, dass Blutbestandteile während der Inkubation nachdunkeln und fälschlicherweise höhere OD₆₀₀-Werte anzeigen. PRÜLLER (2016) berichtete bei OD₆₀₀-Messungen mit *B. bronchiseptica* über ähnliche Abweichungen und führte dies auf farbige Medienkomponenten (z.B. Erythrozyten, Hefeextrakt) zurück. Zusätzlich zu den OD₆₀₀-Messungen wurden mit allen Erregern kulturbasierte Keimzahlbestimmungen durchgeführt. Auf diese Weise konnte ermittelt werden, welche der getesteten Medien ausreichendes Wachstum von $\geq 10^7$ KbE/ml aller getesteten Bakterienisolate ermöglichen, was für die Einstellung eines standardisierten Inokulums gemäß CLSI-Anforderungen erforderlich ist (CLSI 2020). Überraschenderweise zeigten in der eigenen Arbeit *Av. gallinarum* (nach 18 – 24 h Inkubation) und *B. avium* (nach 20 h Inkubation), die häufig in bluthaltigen Medien kultiviert werden (BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; DSMZ), auch in der nicht supplementierten CAMHB ohne Zusätze ausreichendes Wachstum von $\geq 10^7$ KbE/ml. Aufgrund der vielen bekannten Vorteile (geringer Gehalt an Inhibitoren, gute Chargenreproduzierbarkeit, Standardmedium für häufig isolierte und schnell wachsende Organismen, kommerziell verfügbar, kostengünstige und einfache Herstellung) (BILINSKAYA et al. 2020; BRODGEN et al. 2018; CLSI 2020; CLSI 2018c, CLSI 2013) dieses Mediums wurde daher die nicht supplementierte CAMHB für die AST von *Av. gallinarum* und *B. avium* ausgewählt. Im Gegensatz zu *Av. gallinarum* und *B. avium* wies *Av. paragallinarum* in den bebrüteten Bakteriensuspensionen nur eine schwache Trübung auf, so dass auf OD₆₀₀-Messungen bei diesem Erreger verzichtet wurde. Infolge von Keimzahlbestimmungen und der Erstellung von Wachstumskurven zeigte sich jedoch, dass beide für *Av. paragallinarum* getesteten Medien (CAMHB+CS+NADH und VFM) nach 24 – 48 h Inkubation ausreichendes Wachstum ermöglichten. Wachstumskurven für diesen Erreger mit denselben Medien wurden im Rahmen anderer Studien bislang nicht veröffentlicht, so dass ein Vergleich der Ergebnisse nicht möglich war. PRÜLLER et al. (2017) zeigten jedoch, dass der eng verwandte Erreger *G. parasuis* ebenfalls gutes Wachstum in VFM zeigte. Um eine Auswahl zwischen der CAMHB+CS+NADH und dem VFM für die AST von *Av. paragallinarum* treffen zu können, wurden daher weitere Faktoren berücksichtigt. Da die CAMHB+CS+NADH im Gegensatz zum VFM eine bessere Ablesbarkeit des sichtbaren Wachstums in den Mikrotiterplatten zeigte und eine bessere Produktverfügbarkeit verspricht, fiel die endgültige Wahl auf dieses neue

Medium. Es sei auch darauf hingewiesen, dass *Av. paragallinarum* bereits zuvor mit CAMHB+CS+NADH in Bouillon-Mikrodilutionstests geprüft wurde und in diesem Medium gutes sichtbares Wachstum zeigte (LUNA-CASTREJÓN et al. 2021; HEUVELINK et al. 2018).

2.3.2. Wachstumsversuche mit *M. bovis* und *M. gallisepticum*

In den Wachstumstests zur Bestimmung des sichtbaren Wachstums in Mikrotiterplatten wurde festgestellt, dass nur die SP4-Bouillon bei allen getesteten Isolaten beider Bakterienspezies sichtbares Wachstum erzielte. Diese Beobachtungen decken sich mit den Empfehlungen der DSMZ, die für die Kultivierung beider Erreger die SP4-Bouillon bei einer Inkubation über 48 bis 72 h bei 37 °C empfiehlt (DSMZ). Die anderen in den Vergleich einbezogenen Medien erzeugten hingegen kein oder nur bei einigen Isolaten sichtbares Wachstum von *M. bovis* und *M. gallisepticum*. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten, da diese Medien in publizierten Studien für die AST der getesteten Bakterienspezies verwendet worden waren. In verschiedenen Studien wurde beispielsweise sichtbares Wachstum von *M. bovis* in der Eaton-Bouillon beschrieben (AYLING et al. 2000; AYLING et al. 2014; LIU et al. 2020), wenn der Erreger in der Bouillon-Mikrodilutionsmethode getestet wurde. Ein Grund für diese Unterschiede könnte darin liegen, dass Isolate anderer Herkunft oder Isolationsjahre getestet wurden. Allerdings belegen die anschließend generierten Wachstumskurven, dass die SP4-Bouillon das einzige getestete Medium ist, das bei allen getesteten *M. bovis* und *M. gallisepticum* zu gutem Wachstum von $\geq 10^7$ KbE/ml führte. Diese Keimkonzentration ist aber die vom CLSI vorgegebene Mindestvoraussetzung für die AST humanpathogener Mykoplasmen, bei der das Inokulum auf 10^4 bis 10^5 KbE/ml eingestellt wird (CLSI 2011). BÜRGI et al. (2018) berichteten von ähnlichen Ergebnissen für *M. bovis* und ermittelten nach 72 h Inkubation in der SP4-Bouillon Keimkonzentrationen von 10^7 – 10^9 KbE/ml. Ein Grund für das im Vergleich zu den anderen Medien bessere Wachstum von *M. bovis* und *M. gallisepticum* in der SP4-Bouillon könnte die nährstoffreiche Zusammensetzung dieses Mediums sein. Ein Vergleich der Medienbestandteile zeigt, dass die SP4-Bouillon tendenziell mehr Medienbestandteile (z.B. CMRL-1066 (10X), Hefehydrolysat Yeastolate) enthält (CLSI 2011). Ein weiterer Grund für die differierenden Ergebnisse der Wachstumsexperimente könnten Unterschiede bei der Einstellung des initialen pH-Werts des Mediums sein. Während die SP4-Bouillon üblicherweise auf einen pH-Wert

von 7,4 bis 7,6 eingestellt wird (CLSI 2011), lagen diese Werte für einige der anderen getesteten Medien höher. Initiale pH-Werte zwischen 7,6 und 7,8 wurden beispielsweise für die Eaton-Bouillon, das Frey-Medium oder die Standard *M. bovis*-Bouillon eingesetzt (GERCHMAN et al. 2009; KHATOON et al. 2018; AYLING et al. 2000; LIU et al. 2020). Dabei ist zu bedenken, dass der eingestellte pH-Wert des Mediums die Farbe und damit auch die Ablesbarkeit des sichtbaren Wachstums beeinflusst. Zudem hat der pH-Wert einen direkten Einfluss auf die Struktur und Funktion bakterieller Proteine sowie auf Stoffwechselprozesse innerhalb der Bakterienzelle (SÁNCHEZ-CLEMENTE et al. 2018; RAZMI et al. 2023), so dass das Bakterienwachstum durch den pH-Wert im Medium stark beeinflusst wird (SHEPARD und LUNCEFORD 1965; RATZE et al. 2018; RAZMI et al. 2023).

Auf der Grundlage der Ergebnisse der durchgeführten Wachstumsexperimente wurde die SP4-Bouillon als Testmedium für die AST beider Erreger ausgewählt. Von allen getesteten Medien war dies das einzige Medium, das bei allen getesteten Isolaten sichtbares Wachstum hervorrief. Die SP4-Bouillon hat zudem den Vorteil, dass sie bereits vom CLSI für die AST von humanpathogenen Mykoplasmen akzeptiert ist (CLSI 2011), und auch kürzlich von JOSI et al. (2018) erfolgreich für die AST von *M. bovis* verwendet wurde.

3. Auswahl von antimikrobiellen Wirkstoffen für die Bouillon-Mikrodilutionstestung

Die Eignung des ausgewählten Mediums für die AST wurde durch fünf unabhängige MHK-Bestimmungen mit jeweils fünf epidemiologisch nicht verwandten Testisolaten untersucht. Abhängig von dem zu testenden Erreger wurde dazu ein Panel von 16 oder 24 antimikrobiellen Wirkstoffen und/oder -Kombinationen verwendet. Die in dieser Arbeit eingesetzten wirkstoffbestückten Mikrotiterplatten (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, UK) werden vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) für das nationale Resistenzmonitoring eingesetzt und umfassen daher verschiedene Wirkstoffe unterschiedlicher Antibiotikaklassen. Sie enthalten eine Vielzahl von Wirkstoffen, die derzeit in der EU für den Einsatz bei lebensmittelliefernden Tieren zugelassen sind. Für die AST der Gram-negativen und geflügelassoziierten Erreger *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* wurden drei Layouts mit insgesamt 24 antimikrobiellen Wirkstoffen oder -Kombinationen verwendet. Aufgrund der für Mykoplasmen grundsätzlich limitierten Wirkstoffauswahl

wurden für den rinderpathogenen Erreger *M. bovis* zwei Mikrotiterplatten-Layouts mit insgesamt 16 Wirkstoffen eingesetzt. Um die in der Geflügelproduktion häufig eingesetzten Makrolid-Antibiotika Erythromycin und Tylosin in die Tests mit *M. gallisepticum* einzubeziehen (XIA et al. 2015; BOTTINELLI et al. 2022), wurde zusätzlich ein drittes Layout verwendet. Für diesen Erreger stand somit ein Panel von insgesamt 24 Wirkstoffen oder Wirkstoffkombinationen zur Verfügung. Gegen einige der einbezogenen Wirkstoffe (z.B. Nalidixinsäure) weisen *M. bovis* und *M. gallisepticum* allerdings eine intrinsische Resistenz auf (LYSNYANSKY und AYLING 2016; LA CRUZ et al. 2020). Dies war für die Beurteilung der erarbeiteten Methoden von Vorteil, da im Falle einer intrinsischen Resistenz hohe MHK-Werte zu erwarten sind und mit der Methode erzielt werden sollten.

4. Austestung von Inkubationszeiten und -bedingungen und Bestimmung der Homogenität der MHK-Werte

Die Inkubationsbedingungen (Atmosphäre, Temperatur) haben einen Einfluss auf die MHK-Werte (WHITE et al. 2001). Beispielsweise wurde beschrieben, dass Kohlendioxid (CO₂) die MHK-Werte für Aminoglykoside, Makrolide oder Tetrazykline beeinflussen kann (JOHNSON et al. 1999; BATARD et al. 2005; LONSWAY et al. 2009). Daneben hat auch die Inkubationszeit einen großen Einfluss auf die Ergebnisse einer Empfindlichkeitsprüfung (WHITE et al. 2001; EGERVÄRN et al. 2007; LAURE et al. 2021). Einige antimikrobielle Wirkstoffe verlieren mit der Zeit ihre Wirksamkeit (GAUTIER-BOUCHARDON 2018; LAURE et al. 2021), sodass die MHK-Werte nach längerer Inkubationszeit tendenziell höher sind (WHITE et al. 1991; WAITES et al. 2012). Um valide Empfindlichkeitsdaten zu erhalten, ist es daher notwendig, die MHK-Werte rechtzeitig abzulesen, bevor ein Wirkstoffverlust eintritt. Wenn jedoch das zu testende Bakterienisolat zu diesem Zeitpunkt noch keine ausreichende Keimkonzentration erreicht hat, kann ein zu frühes Ablesen der MHK-Werte zu niedrigeren MHK-Werten oder zur fehlenden Ablesbarkeit der Mikrotiterplatten führen. Um die Eignung der erarbeiteten Methoden zu beurteilen, wurde die Homogenität der MHK-Werte durch fünf unabhängig voneinander durchgeführte Empfindlichkeitstests zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und die ermittelten Werte verglichen. Dazu wurden die exakten und wesentlichen MHK-Übereinstimmungen berechnet. Die exakte MHK-Übereinstimmung definiert den Prozentsatz identischer MHK-Werte, die dem MHK-Modus (dem am häufigsten gemessenen MHK-Wert in Bezug auf ein Isolat

und einen Wirkstoff) entsprachen. Die wesentliche MHK-Übereinstimmung gibt den Prozentsatz an, der eine Abweichung von ± 1 Verdünnungsstufe vom MHK-Modus erlaubt (CLSI 2018a). Ebenso wurden die Methoden hinsichtlich ihrer Praktikabilität für die Routinediagnostik geprüft, indem die Ablesbarkeit der MHK-Endpunkte in den Mikrotiterplatten-Vertiefungen beurteilt wurde. Die MHK-Werte wurden grundsätzlich manuell und visuell abgelesen, da dies im CLSI-Dokument M23 für die Validierung einer neuen AST-Methode gefordert wird (CLSI 2018a). Für die AST schnell wachsender Organismen tierischen Ursprungs ist in den Prüfvorschriften des CLSI eine Inkubationstemperatur von 35 ± 2 °C in einer aeroben Atmosphäre angegeben (CLSI 2020). Für die AST humanpathogener Mykoplasmen sieht das CLSI hingegen eine Inkubationstemperatur von 37 °C in einer aeroben Atmosphäre vor (CLSI 2011). In Übereinstimmung mit den entsprechenden Prüfvorschriften wurde zur Inkubation der inokulierten Mikrotiterplatten mit *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* eine Inkubationstemperatur von 35 ± 2 °C und für *M. bovis* und *M. gallisepticum* eine Inkubationstemperatur von 37 °C in einer Atmosphäre ohne CO₂-Zusatz gewählt.

4.1. Bestimmung der Homogenität der MHK-Werte von *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium*

Die MHK-Werte schnell wachsender Bakterien werden gemäß den Prüfvorschriften des CLSI nach einer Inkubationszeit von 16 bis 20 h abgelesen (CLSI 2020). Literaturrecherchen ergaben, dass die Bakterienspezies *Av. gallinarum* (24 – 48 h), *Av. paragallinarum* (24 – 168 h) und *B. avium* (48 – 72 h) möglicherweise längere Inkubationszeiten benötigen (CCUG; DSMZ; JEONG et al. 2017; SORIANO-VARGAS 2020; SELBITZ 2023c; SELBITZ 2023d). Obwohl keine der drei untersuchten Bakterienspezies die stationäre Phase vor 20 h Inkubation bei 35 ± 2 °C erreichte (ersichtlich aus den Wachstumskurven), wurde diese Phase früher als zu den in der Literatur empfohlenen Inkubationszeiten erreicht (CCUG; DSMZ; JEONG et al. 2017; SORIANO-VARGAS 2020; SELBITZ 2023c; SELBITZ 2023d). Auf der Grundlage der erstellten Wachstumskurven wurden die MHK-Werte für diese Erreger daher nicht nur zwischen 16 – 20 h Inkubation, sondern auch zu den folgenden Zeiten abgelesen: *Av. gallinarum* nach 20 und 24 h Inkubation, *Av. paragallinarum* nach 20, 22, 24 und 48 h Inkubation und *B. avium* nach 20 h Inkubation.

Auch wenn *Av. gallinarum* zuvor gutes Wachstum in der nicht supplementierten CAMHB zeigte, wurde nach nur drei unabhängigen MHK-Bestimmungen mit diesem

Standardmedium MHK-Werte für diesen Erreger detektiert, die um bis zu sieben Verdünnungsstufen voneinander abwichen. Da dies auf eine schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hindeutet und eine Verlängerung der Inkubationszeit auf Basis der Wachstumskurven (Beginn der Sterbephase ab 24 h) nicht zielführend erschien, wurde die Methodenentwicklung mit der nicht supplementierten CAMHB für *Av. gallinarum* vorzeitig abgebrochen und die Eignung eines anderen Mediums getestet. Zu diesem Zweck wurde die CAMHB+CS+NADH gewählt. Im Gegensatz zur nicht supplementierten CAMHB wird dieses Medium mit Hühnerserum und NADH versetzt. Obwohl eine Supplementierung für die Kultivierung von *Av. gallinarum* in CAMHB nicht notwendig ist, da der Erreger zu den nicht hämophilen *Avibacterium* spp. gezählt wird (SORIANO-VARGAS 2020), wurden bei der AST mit CAMHB+CS+NADH nach 20 und 24 h Inkubation homogene MHK-Werte ermittelt, die um maximal ± 2 Verdünnungsstufen von den ermittelten MHK-Modi abwichen. Dass die Zugabe von Medienzusätzen zu homogeneren MHK-Werten führen kann, zeigten bereits die Ergebnisse von RIESENBERG et al. (2017). Die letztgenannten Autoren ermittelten einen höheren Anteil homogener MHK-Werte von *Arcobacter butzleri* in CAMHB mit 5 % fetalem Rinderserum (engl.: fetal bovine serum, FBS) als in reiner CAMHB. In dieser Arbeit konnten anhand der für *Av. gallinarum* ermittelten MHK-Werte hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen von 96 – 100 % kalkuliert werden, die die CLSI-Mindestanforderung für eine neue AST-Methode übertrafen (CLSI 2018a). Daraus lässt sich ableiten, dass als Testmedium die CAMHB+CS+NADH für eine standardisierte AST von *Av. gallinarum* bei einer Inkubationszeit von 20 – 24 h bei 35 ± 2 °C geeignet zu sein scheint. Andere Ergebnisse wurden für den nah verwandten Erreger *Av. paragallinarum* erzielt. Obgleich HEUVELINK et al. (2018) und LUNA-CASTREJÓN et al. (2021) MHK-Werte für *Av. paragallinarum* in der CAMHB+CS+NADH nach 22 h Inkubation ermittelten, war dies in dieser Arbeit nicht möglich. Der Grund dafür war, dass zu diesem Zeitpunkt nicht alle *Av. paragallinarum* in den Mikrotiterplattenvertiefungen sichtbares Wachstum zeigten, so dass für sie keine MHK-Werte bestimmt werden konnten. Da die CCUG und die DSMZ zur Kultivierung von *Av. paragallinarum* längere Inkubationszeiten von 48 – 168 h empfehlen und wie aus Publikation 4 ersichtlich einige *Av. paragallinarum*-Isolate erst nach 48 h Inkubation die stationäre Wachstumsphase erreichten, schien eine Verlängerung der Inkubationszeit notwendig zu sein. Diese Annahme bestätigte sich, da nach 24 h Inkubation der früheste Zeitpunkt war, an dem bei allen Testisolaten

visuell MHK-Werte ablesbar waren. Längere Inkubationszeiten sind auch erforderlich, um die MHK-Werte für verwandte Bakterienarten zuverlässig zu bestimmen. PRÜLLER et al. (2018) zeigten, dass *G. parasuis* in der CAMHB+CS+NADH nach 24 h Inkubation homogene MHK-Werte aufweist, die maximal drei Verdünnungsstufen von den ermittelten MHK-Modi abweichen. Im Gegensatz dazu wichen die MHK-Werte von *Av. paragallinarum* zu diesem Zeitpunkt um bis zu ≥ 7 Verdünnungsstufen von den ermittelten MHK-Modi ab. Um für diesen Erreger eine bessere Reproduzierbarkeit der Testergebnisse zu erzielen, wurde die Inkubationszeit auf 48 h verlängert. Mit nur einer Ausnahme (± 3 Verdünnungsstufenabweichungen für Streptomycin) waren die MHK-Werte zu diesem Zeitpunkt zu 100 % homogen oder wichen maximal ± 2 Verdünnungsstufen von den MHK-Modi ab. Daraus resultierten hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen von 96 – 100 %, die die CLSI-Voraussetzung für die Akzeptanz einer neuen AST-Methode übertrafen (CLSI 2018a). Auch wenn eine 48 stündige Inkubationszeit die Bebrütungszeiten für einige anspruchsvolle Keime (18 – 24 h für *P. multocida* und *M. haemolytica*; 20 – 24 h für *A. pleuropneumoniae*, *H. somni* und *Streptococcus* spp.) bei der AST überschreitet, so gibt es aber dennoch Ausnahmen in den AST-Standards, bei denen die Bebrütungszeit auf bis zu 48 h verlängert wurde (z.B. für *Campylobacter jejuni*) (CLSI 2020). Die CAMHB+CS+NADH scheint somit für die standardisierte AST von *Av. paragallinarum* bei einer Inkubation für 48 h bei 35 ± 2 °C geeignet zu sein. Anders als für *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* wurden für *B. avium* homogene MHK-Werte nach 20 h Inkubation in der nicht supplementierten CAMHB bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt wichen die ermittelten MHK-Werte nur einmal um maximal zwei Verdünnungsstufen von den MHK-Modi ab, woraus sich hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen von durchschnittlich 99,67 % ergaben. Dies übertrifft die vom CLSI geforderte Voraussetzung von ≥ 90 % essentieller MHK-Übereinstimmung für die Anerkennung einer neuen AST-Methode (CLSI 2018a), sodass die nicht supplementierte CAMHB für die standardisierte AST von *B. avium* empfohlen wurde. Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit zuvor veröffentlichten Ergebnissen der nah verwandten Bakterienspezies *B. bronchiseptica* ergab Unterschiede hinsichtlich der optimalen Inkubationszeit zur Erzielung homogener MHK-Werte. So stellten PRÜLLER et al. (2015a) bei der Eignungsprüfung der nicht supplementierten CAMHB für die harmonisierte AST von *B. bronchiseptica* fest, dass eine Inkubation über 20 h in einigen Fällen zu inhomogenen MHK-Werten führte. Daraufhin verlängerten die zuletzt

genannten Autoren die Inkubationszeit auf 24 h, was die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse verbesserte. Studien zur Eignungsprüfung der Bouillon-Mikrodilutionstestung anderer Bakterienspezies (z.B. *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. hinzii*) derselben Gattung wurden derzeit noch nicht publiziert. Die von LAUNAY et al. (2021) veröffentlichten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass auch für *B. hinzii*, ähnlich wie für *B. bronchiseptica*, eine längere Inkubationszeit von 24 h erforderlich sein könnte, um unter Verwendung der CAMHB homogene MHK-Werte zu ermitteln.

4.2. Bestimmung der Homogenität der MHK-Werte von *M. bovis* und *M. gallisepticum*
Da viele kürzlich veröffentlichte Studien eine Inkubationszeit von bis zu 72 h zur AST von *M. bovis* anwendeten (Bokma et al. 2020; Kinnear et al. 2020; Ammar et al. 2022), wurden die MHK-Werte für diesen Erreger zu drei Zeitpunkten (nach 24 ± 2 h, 48 ± 2 h und 72 ± 2 h) abgelesen. Die MHK-Werte für *M. gallisepticum* wurden zu fünf Zeitpunkten (nach 24 ± 2 h, 48 ± 2 h, 72 ± 2 h, 96 ± 2 h und 168 ± 2 h) geprüft, da diese Zeitpunkte bereits in einigen Studien für diesen Erreger verwendet wurden (Gautier-Bouchardon et al. 2002; Wu et al. 2005; Li et al. 2010; Ammar et al. 2016; DE JONG et al. 2021). Nach 24 ± 2 h Inkubation war für keinen der beiden Erreger sichtbares Wachstum festzustellen. Auch wenn diese Beobachtungen mit den Ergebnissen der Wachstumsexperimente übereinstimmen, weichen diese Ergebnisse von denen von KLEIN et al. (2017) ab. KLEIN et al. (2017) wendeten zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *M. bovis* unter Einsatz der modifizierten Eaton-Bouillon eine Inkubationszeit von 24 ± 6 h bei einer Temperatur von 35 ± 1 °C an. Wenn *M. bovis*-Isolate nach dieser Zeit zu keiner sichtbaren Farbveränderung des Mediums führten, verlängerten die Autoren die Inkubationszeit um weitere 24 h. Dies zeigt, dass einige *M. bovis*-Isolate längere Inkubationszeiten für ein zuverlässiges Wachstum benötigen, das für das visuelle Ablesen von MHK-Werten erforderlich ist. Diese Annahme wurde auch durch die weiteren Ergebnisse dieser Arbeit untermauert. Obwohl einige *M. bovis*- und *M. gallisepticum*-Testisolate bereits nach 48 ± 2 h Inkubation gut ablesbare MHK-Werte aufwiesen, waren die MHK-Werte für alle Testisolate erstmals nach 72 ± 2 h Inkubation ablesbar. Die kürzeste Inkubationszeit, bei der die MHK-Werte aller getesteten Isolate abgelesen werden können, wird empfohlen, da mit zunehmender Inkubationszeit ein Effektivitätsverlust der antimikrobiellen Wirkstoffe und somit höhere MHK-Werte zu erwarten sind (EGERVÄRN et al. 2006; MOUTON et al. 2018). Darüber hinaus ermöglichen schnellere AST-Ergebnisse eine schnellere gezielte

Antibiotikabehandlung, was mit einem besseren Therapieerfolg und geringeren Behandlungskosten einhergehen kann (VAN DEN BIJLLAARDT et al. 2017; SMITH und KIRBY 2019; CHEN et al. 2021). Für *M. gallisepticum* wurden auch nach 96 ± 2 h und 168 ± 2 h Inkubation homogene MHK-Werte detektiert, die die CLSI-Voraussetzungen für eine neue AST-Methode erfüllen. Auch andere Studien konnten von *M. gallisepticum* nach einer Inkubationszeit von 168 h erfolgreich MHK-Werte ablesen (WU et al. 2005; LI et al. 2010; AMMAR et al. 2016). Eine kürzere Inkubationszeit über 72 ± 2 h Inkubation scheint für diesen Erreger dennoch empfehlenswert zu sein. So ist es aus praktischen Gründen für diagnostische Labore von Vorteil, für *M. bovis* und *M. gallisepticum* dieselbe Methode anwenden zu können. Zudem verschieben sich MHK-Werte nach einer längeren Inkubationszeit, da die Potenz der antimikrobiellen Wirkstoffe mit der Zeit nachlassen kann (WAITES et al. 2012). Aus klinischer Sicht ist eine kürzere Inkubationszeit zudem vorzuziehen, da das Ergebnis der Empfindlichkeitstestung eher vorliegt und die Therapie ggf. darauf angepasst werden kann (KUMAR et al. 2006; KARVELLAS et al. 2015). Im Hinblick auf die Ablesbarkeit der MHK-Werte von *M. bovis* und *M. gallisepticum* war bemerkenswert, dass in einigen Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht nur ein deutlicher Farbwechsel des zugesetzten Indikators von Rot nach Gelb angezeigt wurde, sondern auch eine Knöpfchenbildung in den Vertiefungen zu beobachten war. Durch Ausplattieren der Bakteriensuspensionen wurde jedoch das Wachstum von *M. bovis* bzw. *M. gallisepticum* bestätigt und eine Kontamination des Mediums ausgeschlossen. Ein möglicher Grund für diese Knöpfchenbildung könnte eine Biofilmbildung sein, zu der einige *M. bovis*- und *M. gallisepticum*-Isolate innerhalb einer Inkubationszeit von 24 bis 72 h fähig sind (MCAULIFFE et al. 2006; CHEN et al. 2012). Zusammenfassend wurde neben der guten Ablesbarkeit der MHK-Werte nach 72 ± 2 h Inkubation für beide Erreger in der SP4-Bouillon eine gute Reproduzierbarkeit der Testergebnisse erreicht. Es ergaben sich hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen (*M. bovis* 92 – 100 %, *M. gallisepticum* 96 – 100 %), die die Voraussetzung zur Akzeptanz einer AST-Methode von ≥ 90 % wesentlicher MHK-Übereinstimmung übertreffen (CLSI 2018a). Da davon auszugehen ist, dass bei Wirkstoffen gegenüber denen Mykoplasmen intrinsisch resistent sind hohe MHK-Werte auftreten, wurden Daten für solche Wirkstoffe aus den Kalkulationen ausgeschlossen, ebenso wie MHK-Werte, die außerhalb der getesteten Wirkstoffkonzentrationen lagen.

5. Eignung von Qualitätskontrollstämmen zur Qualitätskontrolle

Standardisierte AST-Methoden beinhalten nicht nur Informationen zu den Testbedingungen, sondern auch Angaben dazu, welche QC-Stämme (z.B. *E. coli* ATCC® 25922) zur Qualitätskontrolle geeignet sind (CLSI 2020; CLSI 2018a; CLSI 2011). Dafür verwendete Stämme sollen von einer anerkannten Stammsammlung (z.B. American Type Culture Collection, ATCC®) stammen und eine stabile antimikrobielle Empfindlichkeit aufweisen (CLSI 2018a). Um einen Einfluss der verwendeten Medien, Inkubationsbedingungen und -zeiten auf die MHK-Werte dieser CLSI-anerkannten QC-Stämme auszuschließen, wurden die QC-Stämme in wiederholten Experimenten unter den AST-Testbedingungen für die jeweiligen Erreger getestet. Bei Abweichungen der ermittelten MHK-Werte von den CLSI-definierten MHK-Bereichen (sogenannte *QC ranges*) wurde die Eignung von Typstämmen für eine Qualitätskontrolle gemäß der CLSI-Richtlinie M23 überprüft (CLSI 2018a).

Die für *B. avium* empfohlene AST-Methode weicht unter Einsatz der nicht supplementierten CAMHB nicht von der Prüfvorschrift für Bakterien von Tieren (z.B. für *Enterobacterales*, *B. bronchiseptica*) gemäß CLSI-Supplement VET01S ab, so dass der gängige QC-Stamm *E. coli* ATCC® 25922 für die Qualitätskontrolle verwendet werden kann und eine aufwändige Validierung eines neuen QC-Stammes nicht notwendig ist. Dies war von Vorteil, da die Etablierung neuer QC-Stämme durch die notwendigen wiederholten Testungen und den Vergleich der MHK-Werte in verschiedenen Laboren äußerst kosten- und zeitintensiv ist. Für die AST der anderen vier Erreger (*Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *M. bovis*, *M. gallisepticum*) zeigte sich jedoch, dass für deren AST noch nicht in AST-Standards aufgeführte Medien oder eine Anpassung der Inkubationszeit erforderlich sind, so dass eine Eignungsprüfung von QC-Stämmen für diese Erreger notwendig war.

Für die AST von *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* wird das neue Medium CAMHB+CS+NADH empfohlen. PRÜLLER et al. (2017) berichteten, dass die MHK-Werte gängiger QC-Stämme (*E. coli* ATCC® 25922, *En. faecalis* ATCC® 29212, *S. aureus* ATCC® 29213, *A. pleuropneumoniae* ATCC® 27090) in diesem Medium für viele antimikrobielle Wirkstoffe nach 24 h Inkubation bei 35 ± 2 °C innerhalb der akzeptierten QC-Bereiche lagen. Da der *E. coli* ATCC® 25922 ein gut etablierter QC-Stamm in Veterinärlaboren ist, wurde seine Eignung als QC-Stamm für die AST von *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* getestet. Nach der in dieser Arbeit für *Av. gallinarum* empfohlenen Inkubationszeit von 20 und 24 h lagen die MHK-Werte des

QC-Stammes *E. coli* ATCC® 25922 in den vom CLSI vorgegebenen QC-Bereichen. HEUVELINK et al. (2018) ermittelten nach einer ähnlich langen Inkubation von 22 h sowohl für *E. coli* ATCC® 25922 als auch zusätzlich für *S. aureus* ATCC® 29213 MHK-Werte, die innerhalb der vom CLSI definierten QC-Bereiche lagen. Für die standardisierte AST von *Av. paragallinarum* wird in dieser Arbeit dasselbe Medium bei einer vergleichbar längeren Inkubationszeit von 48 h empfohlen. Nichtsdestotrotz wurden auch zu diesem Zeitpunkt nach fünf unabhängigen MHK-Bestimmungen mit dem *E. coli* ATCC® 25922 Stamm mit nur einer Ausnahme (+1 Verdünnungsstufe über dem akzeptierten Bereich für Cephalothin) MHK-Werte ermittelt, die innerhalb der vom CLSI für diesen QC-Stamm akzeptierten Bereiche lagen. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie und den Ergebnissen von HEUVELINK et al. (2018) kann daher geschlossen werden, dass der CLSI-anerkannte QC-Stamm *E. coli* ATCC® 25922 für die Qualitätskontrolle der für *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum* erarbeitete AST-Methode geeignet ist. Eine aufwändige Etablierung neuer QC-Stämme scheint somit ähnlich wie für *B. avium* nicht erforderlich zu sein. Verglichen dazu war die Eignungsprüfung eines geeigneten QC-Stammes für die AST von *M. bovis* und *M. gallisepticum* eine größere Herausforderung, da die SP4-Bouillon als Medium verwendet wird. Für die Qualitätskontrolle der AST von humanpathogenen Mykoplasmen mit demselben Medium empfiehlt das CLSI den QC-Stamm *M. pneumoniae* ATCC® 29342 (CLSI 2011). Zu beachten ist allerdings, dass dieser QC-Stamm im Vergleich zu *M. bovis* und *M. gallisepticum* (72 ± 2 h) eine längere Inkubation von 96 – 144 h erfordert (CLSI 2011). Von Nachteil ist auch, dass *M. pneumoniae* sehr kleine Kolonien (etwa <100 µm im Durchschnitt) bildet, sodass Laboratorien zur Quantifizierung der Kolonien ein Stereomikroskop benötigen (WAITES und TALKINGTON 2014). Um die Handhabung durch veterinärmedizinische Labore zu erleichtern, wurde in dieser Arbeit die Eignung von vier häufig verwendeten und weniger anspruchsvollen QC-Stämmen unter Anwendung der direkten Koloniesuspensionsmethode (gemäß CLSI-Supplement VET01S) geprüft. Nach fünf unabhängigen Testungen lagen die MHK-Werte der Stämme *A. pleuropneumoniae* ATCC® 27090, *E. coli* ATCC® 25922, *En. faecalis* ATCC® 29212 und *S. aureus* ATCC® 29213 in der SP4-Bouillon für einige Wirkstoffe außerhalb der für sie akzeptierten MHK-Bereiche. Derartige Abweichungen sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass diese üblichen QC-Stämme routinemäßig mit anderen Medien (z.B. nicht supplementierte CAMHB) und zu anderen Inkubationsbedingungen (z.B. 16 – 20 h bei

35 ± 2 °C) getestet werden (CLSI 2020). Diese QC-Stämme schienen demnach nicht für die Qualitätskontrolle der für *M. bovis* und *M. gallisepticum* erarbeiteten AST-Methoden geeignet zu sein, sodass die Etablierung eines neuen QC-Stammes notwendig erschien. Zu diesem Zweck schien die Validierung einer tierpathogenen *Mycoplasma* spp. (z.B. *M. bovis* DSM 22781^T) am besten geeignet zu sein, da die Kontrolle die gesamte Methode einschließlich der komplexen InokulumEinstellung umfassen würde. Nach zwanzig unabhängigen Replikationen mit dem *M. bovis* DSM 22781^T waren nicht für alle Wirkstoffe MHK-Bereiche definierbar, da einige MHK-Werte unter oder über der getesteten Wirkstoffkonzentration lagen. Dagegen lagen die MHK-Werte von zwölf antimikrobiellen Wirkstoffen zu ≥95 % innerhalb von 2 – 4 Verdünnungsstufen und erfüllen damit die CLSI-Anforderungen an einen neuen QC-Stamm (CLSI 2018a). Ähnliche MHK-Werte für denselben Stamm wurden bereits in vorherigen Studien ermittelt (HANNAN et al. 1989; GERCHMAN et al. 2009; SULYOK et al. 2014; HEUVELINK et al. 2016; GARCÍA-GALÁN et al. 2020). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher auf eine sehr gute Eignung dieses bisher noch nicht vom CLSI akzeptierten Stammes als zukünftiger QC-Stamm für die mit *M. bovis* und *M. gallisepticum* entwickelte AST-Methode hin. Eine weitere Validierung dieses Stammes als neuer QC-Stamm gemäß CLSI-Dokument M23 wird somit empfohlen.

6. Einfluss der Bezugsquelle von Medienbestandteilen auf die MHK-Werte

Die Bezugsquelle und Charge einzelner Medienbestandteile können einen Einfluss auf die MHK-Werte bakterieller Erreger haben (BAARS und OPFERKUCH 1979; BARNES und HODGES 1984). Um mögliche Einflüsse der Bezugsquellen der verwendeten Mediumkomponenten auf die MHK-Werte ausschließen zu können, wurden die fünf zuvor getesteten Testisolate erneut mit Mediumkomponenten anderer Hersteller getestet und die Ergebnisse mit den zuvor ermittelten MHK-Werten verglichen.

Nach einer weiteren Empfindlichkeitstestung der fünf zuvor getesteten *B. avium*-Testisolate mit der nicht supplementierten CAMHB eines anderen Herstellers wurden hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen von 90 – 100 % festgestellt. Diese Ergebnisse können auf die allgemein bekannte gute Chargenreproduzierbarkeit dieses Mediums zurückgeführt werden. Da *Av. gallinarum* zunächst mit der nicht supplementierten CAMHB getestet wurde und dieses handelsübliche Medium nahezu keine chargenabhängigen Schwankungen der MHK-Werte verursachen soll (CLSI 2018c), wurden mit diesem Erreger keine vergleichbaren Untersuchungen

durchgeführt. Bei den Untersuchungen mit *Av. paragallinarum* wurden unter Verwendung verschiedener Quellen von Hühnerserum und NADH hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen von 93,33 – 100 % ermittelt, die die CLSI-Anforderung von ≥ 90 % Übereinstimmung für eine neue AST-Methode erfüllen (CLSI 2018a). Unter Verwendung desselben Mediums stellten PRÜLLER et al. (2017) bei Untersuchungen mit *G. parasuis* ebenfalls fest, dass die Quelle und Charge von Hühnerserum und NADH keine signifikante Auswirkung auf die MHK-Werte hatten. Im Vergleich zur nicht supplementierten CAMHB und CAMHB+CS+NADH ist die für *M. bovis* und *M. gallisepticum* empfohlene SP4-Bouillon reichhaltiger an Medienzusätzen. Medienbestandteile mit einem besonders großen Anteil stellen fötales Kälberserum (FBS), Trypton und Yeastolate dar (CLSI 2011), wobei deren Qualität von Hersteller zu Hersteller schwanken kann. Beispielsweise ist bekannt, dass die Qualität von handelsüblichem FBS von der Entnahme- und Verarbeitungsmethode abhängt, was sich in unterschiedlichen Gehalten an freien Fettsäuren äußert (BOONE et al. 1971). Dennoch ergab ein Vergleich der MHK-Werte der jeweils fünf zuvor getesteten Testisolate mit denen eines weiteren Empfindlichkeitstests mit FBS, Trypton und Yeastolate anderer Hersteller hohe wesentliche MHK-Übereinstimmungen von 90 – 100 %. Über ein ebenfalls hohes Maß an Übereinstimmung berichtete eine Multilaborstudie, die die MHK-Werte von *M. pneumoniae* QC-Referenzstämmen in kommerzieller und nicht kommerzieller SP4-Bouillon verglich (CLSI 2011). Insgesamt deuten die Ergebnisse also darauf hin, dass sich Medienzusätze unterschiedlicher Produzenten für die Herstellung der nicht supplementierten CAMHB (zur Testung von *B. avium*), CAMHB+CS+NADH (zur Testung von *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum*) und SP4-Bouillon (zur Testung von *M. bovis* und *M. gallisepticum*) eignen und nur geringe Variationen der MHK-Werte unter den erarbeiteten Testbedingungen zu erwarten sind.

7. Bewertung und Literaturvergleich der antimikrobiellen Empfindlichkeit

Ergaben sich bei den MHK-Bestimmungen eine gute Ablesbarkeit und Homogenität der MHK-Werte, wurden die übrigen für die Studien gesammelten Isolate mit der entwickelten Methode getestet. Dadurch konnten MHK-Verteilungen der fünf Bakterienspezies aufgezeigt und, wenn eine ausreichende Anzahl an Isolaten zur Verfügung stand, MHK_{50} - und MHK_{90} -Werte ermittelt werden. Vollständige

Übersichten zu den MHK-Werten sind den entsprechenden Veröffentlichungen und Manuskripten zu entnehmen.

7.1. Bewertung der MHK-Werte einer größeren Isolatsammlung

Unter Anwendung der für alle fünf einbezogenen Erreger erarbeiteten Methoden waren für alle verfügbaren Feldisolate und Referenzstämme gut ablesbare MHK-Werte detektierbar. Da für diese Erreger keine anerkannten Grenzwerte zur Verfügung stehen, war eine Einteilung der untersuchten Isolate in sensibel, intermediär oder resistent nicht möglich. Frühere Studien interpretierten die antimikrobielle Empfindlichkeit dieser fünf Bakterienspezies unter Berücksichtigung von Empfehlungen, wie sie beispielhaft von FALES et al. 1986 und BLACKALL 1988 für *Av. paragallinarum* oder von BLACKALL et al. 1995 und BEACH et al. 2012 für *B. avium* verwendet wurden. Bei einem Vergleich dieser in Publikationen empfohlenen Grenzwerte lassen sich jedoch Unterschiede bei einigen Wirkstoffen feststellen. Beispielsweise klassifizierten BLACKALL et al. (1995) *B. avium*-Isolate mit einer MHK von $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin als resistent. Demgegenüber lag der von BEACH et al. (2012) empfohlene Grenzwert für Tetrazyklin zwei Verdünnungsstufen höher, bei $> 8 \mu\text{g/ml}$. Weil eine valide Interpretation von MHK-Werten aber nur auf der Basis gültiger klinischer Grenzwerte für definierte Erreger-Wirkstoff-Kombinationen bestehen kann (BYWATER et al. 2006), wurde die antimikrobielle Empfindlichkeit der untersuchten Bakterienkollektive nur auf der Grundlage der ermittelten MHK-Verteilungen bewertet. Bei den Gram-negativen Erregern *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* wurden für einige Wirkstoffe (z.B. Ciprofloxacin bei *B. avium*, Florfenicol bei *Av. gallinarum* und *Av. paragallinarum*) unimodale MHK-Verteilungen bei gleichzeitig niedrigen $\text{MHK}_{50/90}$ -Werten beobachtet, was auf eine gute Sensitivität der Isolate gegenüber diesen Wirkstoffen hinweist. Für andere Wirkstoffe (z.B. Nalidixinsäure bei *Av. paragallinarum*) waren bi-, multimodale oder über mehrere Verdünnungsstufen reichende MHK-Verteilungen ersichtlich, was im Allgemeinen auf das Vorhandensein resistenter Nicht-Wildtyp-Subpopulationen mit erhöhten MHK-Werten für diese Wirkstoffe hindeutet (MORRISEY et al. 2014). Besonders auffällig waren die für diese drei geflügelpathogenen Erreger beobachteten bi-, multimodalen oder über mehrere Verdünnungsstufen hinausgehenden MHK-Verteilungen für Tetrazykline (Doxyzyklin, Tetrazyklin) und/oder Trimethoprim/Sulfamethoxazol. Bi- oder multimodale MHK-Verteilungen wurden bereits in früheren Studien bei anderen geflügelpathogenen

Bakterienspezies (z.B. *Acinetobacter baumannii*, *Av. endocarditidis*, *Gallibacterium anatis*, *Ornithobacterium rhinotracheale*) für Tetrazykline und/oder Trimethoprim/Sulfamethoxazol detektiert (YEN et al. 2020; SCHMITZ et al. 2023). Da diese Wirkstoffe in der Geflügelproduktion häufig gegen klinisch manifeste Infektionen eingesetzt werden, die u.a. durch *Avibacterium* spp. oder *B. avium* verursacht werden (FICKEN 1983; KELLY et al. 1986; BLACKALL und SORIANO-VARGAS 2020; GUO et al. 2022), sind geflügelpathogene Bakterienisolate mit erhöhten MHK-Werten gegen diese Wirkstoffklassen als bedenklich einzustufen, da sie nicht mit den häufig eingesetzten Antibiotika therapierbar sind. Hier zeigt sich der Nutzen einer verfügbaren AST-Methode. Da Daten aus kleinen Populationen (etwa zehn bis 30 Isolate) die MHK₅₀- und MHK₉₀-Werte beeinflussen können (SCHWARZ et al. 2010b), wurde für die 16 getesteten *M. gallisepticum*-Isolate im Gegensatz zu den 132 getesteten *M. bovis*-Isolaten keine Kalkulation dieser Werte vorgenommen. Für einige Wirkstoffe (z.B. β -Laktame, Colistin, Trimethoprim) wiesen jedoch beide Erreger insgesamt hohe MHK-Werte auf, was auf die intrinsische Resistenz der Mykoplasmen zurückgeführt werden kann (BÉBÉAR und PEREYRE 2005; GAUTIER-BOUCHARDON 2018). Da bei Vorliegen einer intrinsischen Resistenz hohe MHK-Werte zu erwarten sind (CHIS et al. 2022), ist dies ein weiterer Hinweis auf die Eignung der entwickelten Methoden. Bimodale oder breite MHK-Verteilungen sowie hohe MHK₉₀-Werte von *M. bovis* (hier beobachtet für Aminoglykoside, Fluorchinolone und Makrolide) deuten auf Isolate mit erworbener Resistenz hin (MICHAEL et al. 2020; FERREIRA et al. 2022). Da diese Wirkstoffe häufig zur Prävention oder Behandlung von *M. bovis*-Infektionen bei Rindern oder *M. gallisepticum*-Infektionen bei Geflügel eingesetzt werden (LYSNYANSKY und AYLING 2016; BOTTINELLI et al. 2022, ZHANG et al. 2022), sind auch diese Isolate kritisch zu betrachten. Unimodale und niedrige MHK_{50/90}-Werte für Florfenicol, Streptogramine oder Tetrazykline weisen hingegen auf eine gute Empfindlichkeit der getesteten Mykoplasmen-Isolate hin. Besonders zu beachten ist die hohe Empfindlichkeit gegenüber Tetrazyklinen, da Chlortetrazyklin, Doxyzyklin und Oxytetrazyklin in der Veterinärmedizin häufig zur Therapie von Mykoplasmen-Infektionen eingesetzt werden (LYSNYANSKY und AYLING 2016; BOTTINELLI et al. 2022).

Bei Betrachtung der Empfindlichkeitsdaten einzelner Isolate fiel bei allen fünf Bakterienspezies auf, dass manche Isolate im Vergleich zu den restlichen getesteten Isolaten erhöhte MHK-Werte für ≥ 3 Wirkstoffklassen zeigten und nach den Kriterien

wie von MÜLLER et al. (2018) beschrieben als phänotypisch multiresistent einzustufen sind. Ein Beispiel ist ein *Av. gallinarum*-Isolat, das im Vergleich zu den restlichen *Av. gallinarum*-Isolaten höhere MHK-Werte für die folgenden fünf Wirkstoffklassen aufwies: β -Laktame (64 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin; ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ Penicillin), Tetrazykline (32 $\mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin; 128 $\mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin), Chinolone (128 $\mu\text{g/ml}$ Nalidixinsäure), Makrolide (128 $\mu\text{g/ml}$ Tilmicosin; ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ Tulathromycin) und Folatsynthesehemmer (32/608 $\mu\text{g/ml}$ Trimethoprim/Sulfamethoxazol). Eine phänotypische Multiresistenz kann auf verschiedene Resistenzmechanismen zurückzuführen sein, unter anderem auf das Vorhandensein spezifischer Resistenzgene oder eine verstärkte Expression von Genen, die z.B. Efflux-Pumpen kodieren (DU et al. 2018; CATALANO et al. 2022). Dabei stellen multiresistente Erreger in mehrfacher Hinsicht ein großes Problem dar. Einerseits sind Infektionen, die durch multiresistente Erreger verursacht werden, aufgrund der begrenzten Wirkstoffauswahl schwieriger oder gar nicht zu behandeln (BASSETTI et al. 2019; DI LODOVICO et al. 2022; TENG 2023). Andererseits besteht bei multiresistenten Erregern das Risiko des Transfers von Resistenzdeterminanten, etwa über den Austausch von mobilen genetischen Elementen wie konjugativen Plasmiden, die resistenzvermittelnde Gene tragen (BOTTERY et al. 2016; SHEN et al. 2022; WALAS et al. 2023). Der Nachweis von Bakterienisolaten mit erhöhten MHK-Werten gegen mehrere Wirkstoffklassen ist daher aus klinischer und epidemiologischer Sicht ein wichtiges Alarmsignal, das eingehende Untersuchungen der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen erfordert (KOWALSKA-KROCHMAL und DUDEK-WICHER 2021).

7.2. Literaturvergleich der Empfindlichkeitsdaten

Es ist sicherlich zu empfehlen, ermittelte Empfindlichkeitsdaten mit zuvor veröffentlichten Daten derselben Bakterienspezies zu vergleichen. Eine wichtige Voraussetzung dafür sind die Anwendung derselben Testmethode und Interpretationskriterien (SCHWARZ et al. 2010). Zunächst erlaubt ein Vergleich der MHK-Werte Rückschlüsse darauf, ob eine Resistenzentwicklung zeitlich oder geographisch bedingt sein kann. Andererseits lässt sich durch die epidemiologische Resistenzüberwachung (Antibiotika-Resistenz-Surveillance) die Ausbreitung resistenter Stämme feststellen, was wiederum einen Beitrag zur Festlegung von Kontrollmaßnahmen (z.B. Antibiotic Stewardship) leistet (JOHNSON 2015; SALAM et al. 2023). Weiterhin kann ein Vergleich von MHK-Werten helfen, die Validität der

verwendeten Methode zu beurteilen. Im Gegensatz zu *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* und *M. gallisepticum* wurden für *Av. gallinarum* zuvor keine quantitativen Empfindlichkeitsdaten veröffentlicht, so dass ein Vergleich von MHK-Werten für diesen Erreger nicht möglich war. Qualitative Empfindlichkeitsdaten von *Av. gallinarum* wurden im Anschluss an Agardiffusionstests (MUSHIN et al. 1977) oder nicht-definierte Durchführungsmethoden (AL FADEL SALEH et al. 1995; ARASHIMA et al. 1999; AHMED et al. 2002) publiziert. Die vor über 20 Jahren publizierten Studien berichteten im Gegensatz zu dieser Arbeit über eine allgemein gute phänotypische antimikrobielle Empfindlichkeit von *Av. gallinarum*, darunter gegenüber Tetrazyklin. Da anerkannte Interpretationskriterien zur Beurteilung der Empfindlichkeit von *Av. gallinarum* fehlen, kann allerdings davon ausgegangen werden, dass aufgrund der Detektion großer Hemmhofdurchmesser (HHD) auf eine gute Empfindlichkeitslage geschlossen wurde. Ein einschlägiger Literaturvergleich der MHK-Werte von *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* und *M. gallisepticum* ist in den Tabellen 2 – 5 dargestellt. Es ist jedoch zu beachten, dass die in die Vergleiche einbezogenen Studien unterschiedliche Methoden zur Durchführung der Bouillon-Mikrodilutionstests verwendeten, so dass eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht gegeben ist.

Tabelle 2: Vergleich publizierter Minimaler Hemmkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) von *Avibacterium paragallinarum*

Referenz	AMC ^a	AMP	CFP	CTX	CQN	XNL	CEF	CIP	CST	DOX	ENRO	FFN	GEN	IPM	MAR	NAL	NEO	PEN	STR	TIA	TET	TIL	SXT ^b	TUL
BLACKALL 1988		<0,063 -0,5															<0,063 -32	<0,063 -1	<0,063 ->64		<0,063 -16			
BLACKALL et al. 1989		<0,063 -0,5															<0,063 -32	<0,063 -1	<0,063 ->64		<0,063 -16			
HSU et al. 2007		$\leq 0,5$ ->128															$\leq 0,5$ ->128		$\leq 0,5$ ->128		$\leq 0,5$ -64		$1 \rightarrow 128$	
NOONKHOKHETKONG et al. 2013		$\leq 0,25$ -8				$\leq 0,25$ -4		$\leq 0,25$ ->256		$\leq 0,25$ -128	$\leq 0,25$ ->256					$\leq 0,25$ ->256				$\leq 0,25$ ->256			$\leq 0,25$ ->256	
HEUVELINK et al. 2018		$\leq 0,063$ -0,5																	$\leq 0,063$ -1		$\leq 0,25$ ->16		$\leq 0,031$ -0,5	
LUNA-CASTREJÓN et al. 2021		$\leq 0,063$ -0,25									$\leq 0,25$ -0,5								$\leq 0,063$ -1		$\leq 0,25$ -1		$\leq 0,031$ -0,063	
XU et al. 2022a		1-128																		1->512		0,5-32		
GUO et al. 2022		<0,063 -16				<0,063 -4				0,125 -32	<0,063 -64	<0,063 -128	<0,063 -64											
ZHU et al. 2022		<0,12 -64							0,12 ->64		<0,03 ->16	<0,5 ->256	<0,12 ->16					0,25 ->64				0,5-64		
GÜTGEMANN et al. 2024	$\leq 0,03$ -0,5	$\leq 0,03$ -0,5	$\leq 0,06$ -0,5	$\leq 0,015$ -0,06	$\leq 0,015$ -0,5	$\leq 0,03$ -0,5	$\leq 0,06$ -0,5	$\leq 0,008$ -2	0,25 ->128	0,12 -32	$\leq 0,008$ -8	$\leq 0,12$ -4	$\leq 0,12$ -4	$\leq 0,015$ -0,12	$\leq 0,08$ -4	$\leq 0,06$ -128	$\leq 0,12$ -64	$\leq 0,015$ -2	0,5 ->1024	0,06 -16	$\leq 0,12$ -128	0,25-8	$\leq 0,015$ -8	0,25-8

Alle Werte wurden auf drei Dezimalstellen gerundet. AMC, Amoxicillin/Clavulansäure; AMP, Ampicillin; CFP, Cefoperazon; CTX, Cefotaxim; CQN, Cefquinom; XNL, Ceftiofur; CEF, Cephalothin; CIP, Ciprofloxacin; CST, Colistin; DOX, Doxyzyklin; ENRO, Enrofloxacin; FFN, Florfenicol; GEN, Gentamicin; IPM, Imipenem; MAR, Marbofloxacin; NAL, Nalidixinsäure; NEO, Neomycin; PEN, Penicillin; STR, Streptomycin; TIA, Tiamulin; TET, Tetrazyklin; TIL, Tilmicosin; SXT, Trimethoprim/Sulfamethoxazol; TUL, Tulathromycin; ^a die Daten beziehen sich auf die Konzentration von Amoxicillin; ^b die Daten beziehen sich auf die Konzentration von Trimethoprim.

Tabelle 3: Vergleich publizierter Minimaler Hemmkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) von *Bordetella avium*

Referenz	AMC ^a	AMP	CFP	CTX	CQN	XNL	CEF	CIP	CST	DOX	ENRO	FFN	GEN	IPM	MAR	NAL	NEO	PEN	STR	TIA	TET	TIL	SXT ^b	TUL	
MORTENSEN et al. 1989		0,25-2	≤ 2	$\leq 0,5-8$			$\leq 1-4$						2					> 2			1-16			$\leq 0,5-16$	
BLACKALL et al. 1995		0,25-1																	8-16		1->128			16->128	
BEACH et al. 2012								0,25-2						$< 1-> 8$							$< 1-> 8$			$< 0,5-> 4$	
SZABÓ et al. 2015	$\leq 0,03-0,12$									$\leq 0,03-0,12$															
GÜTGEMANN et al. 2022a	0,06-2	0,06-2	0,06-1	0,12-8	0,5-8	0,25-8	0,5-2	0,5-1	0,5-4	$\leq 0,06-16$	0,25-1	1-32	1-4	0,25-1	0,25-1	2-16	2-8	0,25-16	8->1024	$\leq 0,12-128$	4->128	8-128	0,06- ≥ 64	4-32	

AMC, Amoxicillin/Clavulansäure; AMP, Ampicillin; CFP, Cefoperazon; CTX, Cefotaxim; CQN, Cefquinom; XNL, Ceftiofur; CEF, Cephalothin; CIP, Ciprofloxacin; CST, Colistin; DOX, Doxzyklyn; ENRO, Enrofloxacin; FFN, Florfenicol; GEN, Gentamicin; IPM, Imipenem; MAR, Marbofloxacin; NAL, Nalidixinsäure; NEO, Neomycin; PEN, Penicillin; STR, Streptomycin; TIA, Tiamulin; TET, Tetrazyklyn; TIL, Tilimicosin; SXT, Trimethoprim/Sulfamethoxazol; TUL, Tulathromycin; ^a die Daten beziehen sich auf die Konzentration von Amoxicillin; ^b die Daten beziehen sich auf die Konzentration von Trimethoprim.

Tabelle 4: Einschlägiger Vergleich publizierter Minimaler Hemmkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) von *Mycoplasma bovis*

Referenz	CIP	DOX	ENRO	FFN	GEN	MAR	NEO	STR	TET	TIA	TIL	TUL
AYLING et al. 2000				1-64							4->128	
ROSENBUSCH et al. 2005			0,03-4	0,06-8							0,5->128	
GODINHO 2008												$\leq 0,063$ ->64
GERCHMAN et al. 2009			0,08-2,5			0,32-5					0,5-128	
SOEHNLEN et al. 2011			0,025-3,2	<1-32					0,05->12,8			
KROEMER et al. 2012						0,5-4						
HENDRICK et al. 2013			0,03-4	0,06-32							0,5-128	1-32
AYLING et al. 2014			0,12->32	0,5-32		0,25->32					1->32	0,25->128
KAWAI et al. 2014			0,25-1								32->128	
SULYOK et al. 2014			0,078 \geq 10	4-8	2-16	0,312 \geq 10			$\geq 0,25$ -16		$\geq 0,5$ - ≥ 128	
BARBERIO et al. 2016		0,25-32	$\leq 0,125$ -16	0,5-4						0,625-0,5	2 \geq 32	
HEUVELINK et al. 2016			0,0313-16								0,5->1024	0,5->1024
KONG et al. 2016	0,125-1	$\leq 0,03$ -0,5	$\leq 0,03$ -0,5	2-8							1-128	
ANHOLT et al. 2017			$\leq 0,12$ -2	0,25-8	1-16		4-32			0,5-32	4-64	1-64
KLEIN et al. 2017			0,12->64	0,5->64		0,25->64						0,032-32
KLEIN et al. 2019			0,125-32	0,5-32		0,25->64					0,25->64	0,032-64
JELINSKI et al. 2020			$\leq 0,12$ -16	$\leq 0,25$ -8							2 ≥ 256	$\leq 0,25$ - ≥ 256
BOKMA et al. 2020		$\leq 0,06$ -4	$\leq 0,06$ -64	0,25-32						$\leq 0,03$ -4	8->128	
LIU et al. 2020		0,25-16	0,125-2	1-64						0,25-0,5		
GÜTGEMANN et al. 2023	0,06-16	$\leq 0,06$ -4	0,12-16	0,5-8	0,5-128	0,12 ≥ 32	8 ≥ 128	2-512	$\leq 0,12$ -8	$\leq 0,03$ -2	$\leq 0,06$ - ≥ 256	0,5 ≥ 64

CIP, Ciprofloxacin; DOX, Doxzyklin; ENRO, Enrofloxacin; FFN, Florfenicol; GEN, Gentamicin; MAR, Marbofloxacin; NEO, Neomycin; STR, Streptomycin; TET, Tetrazyklin; TIA, Tiamulin; TIL, Tilmicosin; TUL, Tulathromycin

Tabelle 5: Einschlägiger Vergleich publizierter Minimaler Hemmkonzentrationswerte ($\mu\text{g/ml}$) von *Mycoplasma gallisepticum*

Referenz	CIP	CLI	DOX	ENRO	ERY	FFN	GEN	MAR	NEO	PIR	QD*	STR	TET	TIA	TIL	TUL	TYL
TANNER und WU 1992					$\leq 0,25 > 32$												$\leq 0,25-8$
BRADBURY et al. 1994																	0,008-12
HANNAN et al. 1997				0,025-1										0,0005-0,25			0,0025-10
GAUTIER-BOUCHARDON et al. 2002				$\leq 0,03-0,5$	$\leq 0,03-16$									$\leq 0,03$			$\leq 0,03-0,5$
GERCHMAN et al. 2011				0,025- ≥ 10											$\leq 0,0032- \geq 10$		$\leq 0,0032-5$
GHARAIBEH und AL-RASHDAN 2011	$\leq 0,031-2$		$\leq 0,031-0,125$	$\leq 0,031$	$\leq 0,031- \geq 64$	0,125-4	1-32							$\leq 0,031$	$\leq 0,031-32$		$\leq 0,031-2$
AMMAR et al. 2016					0,25-32									0,031-2			0,062-2
GRÓZNER et al. 2016			0,078- >10	1,25- >10		2-32								0,156-5	$\leq 0,25- > 64$		$\leq 0,25- > 64$
BEYLEFELD et al. 2018				0,04-1										0,01-2			0,01-16
KHATOON et al. 2018				0,78-25	0,78-25										0,78-6,25		0,78-25
MORROW et al. 2020			$\leq 0,039-0,156$	$\leq 0,039-5$		0,5-4								$\leq 0,039$	$\leq 0,25- > 64$		$\leq 0,25-8$
DE JONG et al. 2021			0,16-1	0,031-16										0,002-0,5	$< 0,001-64$		0,004-8
BOTTINELLI et al. 2022			0,25-2	0,5- >16	$\leq 0,5- > 8$	$\leq 0,5-4$								$\leq 0,007825-0,25$	$\leq 0,0312- > 32$		$\leq 0,007825- > 32$
KACHABI et al. 2023																	2-8
MANUSKRIFT 1	0,015- ≥ 32	0,5-32	$\leq 0,06-0,5$	0,03-16	0,03- ≥ 64	2-8	16-128	0,03-16	≥ 128	1-32	0,03-0,12	4-64	$\leq 0,12-2$	$\leq 0,03-0,25$	$\leq 0,06- \geq 256$	0,12- ≥ 64	$\leq 0,06-16$

CIP, Ciprofloxacin; CLI, Clindamycin; DOX, Doxyzyklin; ENRO, Enrofloxacin; ERY, Erythromycin; FFN, Florfenicol; GEN, Gentamicin; MAR, Marbofloxacin; NEO, Neomycin; PIR, Pirlimycin; QD, Quinupristin/Dalfopristin; STR, Streptomycin; TET, Tetrazyklin; TIA, Tiamulin; TIL, Tilmicosin; TUL, Tulathromycin; TYL, Tylosin; *Konzentration von Quinupristin

Ähnlich wie in dieser Arbeit wurde in zuvor veröffentlichten Studien über Isolate mit erhöhten MHK-Werten für verschiedene Wirkstoffe berichtet. Wie aus Tabellen 1 und 2 zu entnehmen ist, wurde zum Beispiel bereits zuvor über *Av. paragallinarum*- und *B. avium*-Isolate mit erhöhten MHK-Werten für Tetrazykline und Trimethoprim/Sulfamethoxazol berichtet (HSU et al. 2007; NOONKHOKHETKONG et al. 2013; HEUVELINK et al. 2018; GUO et al. 2022; ZHU et al. 2022). Wie in dieser Arbeit wurde zudem zuvor über eine vergleichsweise geringere Empfindlichkeit von *M. bovis*- oder *M. gallisepticum*-Isolaten gegenüber Aminoglykosiden, Fluorchinolonen und/oder Makroliden berichtet, nachdem diese mittels Agardilution (SIUGZDAITE et al. 2012; SATO et al. 2013; SATO et al. 2017; JAY et al. 2021) oder Bouillon-Mikrodilution (GERCHMAN et al. 2011; LYSNYANSKY und AYLING 2016; MORROW et al. 2020; DE JONG et al. 2021) getestet wurden. Nichtsdestotrotz zeigen die speziesbezogenen Literaturvergleiche der MHK-Werte von *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* und *M. gallisepticum* auch klare Unterschiede. Beispielsweise ermittelten BOKMA et al. (2020) nach der MHK-Bestimmung von *M. bovis* bis zu sieben Verdünnungsstufen niedrigere $MHK_{50/90}$ -Werte für Neomycin ($MHK_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$; $MHK_{90} = 2 \mu\text{g/ml}$) und Streptomycin ($MHK_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$; $MHK_{90} = 1 \mu\text{g/ml}$) als diese Arbeit. Eine mögliche Ursache dafür könnte eine Veränderung der Empfindlichkeit im Laufe der Zeit sein. Bereits im Jahr 2014 berichteten GAUTIER-BOUCHARDON et al. (2014) über einen Anstieg der MHK_{50} -Werte für Tilmicosin (von 2 auf $>128 \mu\text{g/ml}$) und Tulathromycin (von 16 auf $128 \mu\text{g/ml}$) und damit über eine Verschlechterung der Empfindlichkeit von französischen *M. bovis* im Laufe von 30 Jahren. Ein weiterer Grund für die studienübergreifenden Unterschiede zwischen den MHK-Werten könnte aber auch die Untersuchung von Isolaten unterschiedlicher regionaler Herkunft sein. Da die in den Vergleich einbezogenen *M. bovis*-Isolate jedoch aus derselben geografischen Region (Europa) und einem ähnlichen Zeitraum (2014 bis 2021) stammen, sind zeitliche und regionale Einflüsse auf die Empfindlichkeit gegenüber antimikrobielle Wirkstoffe in diesem Fall unwahrscheinlich. Angesichts der Tatsache, dass die MHK-Werte von einigen Referenzstämmen in der Literatur mehr als drei Verdünnungsstufen voneinander abweichen (z.B. bei einem Vergleich der von SULYOK et al. 2014 und BOKMA et al. 2020 veröffentlichten MHK-Werte des *M. bovis*-Typstammes PG45) und die Empfindlichkeit von Referenzstämmen im Laufe der Zeit und von Labor zu Labor stabil und reproduzierbar sein sollten (KING und BROWN 2001), könnte die Verwendung unterschiedlicher

Testparameter für die AST eine wahrscheinliche Ursache für diese Unterschiede sein. Wie aus den Tabellen 6 – 9 hervorgeht, nutzten zuvor publizierte Studien zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* oder *M. gallisepticum* verschiedene Inkubationsbedingungen (Inkubationszeit- und temperatur) und Medien. Bemerkenswert ist, dass auch die Zugabe von Medienzusätzen und deren prozentuale Anteile (z.B. 0,0025 – 0,01 % NADH) variieren. Da die Testbedingungen die *in-vitro*-Aktivität antimikrobieller Wirkstoffe beeinflussen können, beispielsweise durch Veränderungen der Ionenkonzentration oder des pH-Werts, und sich somit auf die MHK-Werte auswirken (LI et al. 2017; LOOSE et al. 2020; FEßLER et al. 2023), führt diese Variabilität zu Unsicherheiten bei der Evaluation der Empfindlichkeitsdaten und erschwert die Interpretation der Befunde. Um konsistente und vergleichbare Empfindlichkeitsdaten zu gewährleisten, werden daher dringend standardisierte Methoden für die AST der in dieser Arbeit einbezogenen Erreger benötigt. Der Einsatz standardisierter Testbedingungen könnte die Vergleichbarkeit der MHK-Werte und deren Validität erhöhen und damit eine zuverlässigere Informationsgrundlage für therapeutische Entscheidungen und die epidemiologische Überwachung liefern.

Tabelle 6: Einschlägiger Vergleich publizierter Methoden zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *Avibacterium paragallinarum*

Referenz	Isolate		Medium		Inkubation	
	Anzahl	Herkunft	Basis	Zusätze	t (h)	T (°C)
BLACKALL 1988	75	AUS	TMB	0,0025 % NADH, 1 % Hühnerserum, 5 % Oleic Albumin Complex	24	37
BLACKALL et al. 1989	92	AUS, DEU, JPN, ZAF, USA	TMB	0,0025 % NADH, 1 % Hühnerserum, 5 % Oleic Albumin Complex	24	37
HSU et al. 2007	18	TWN	BHI	5 % Schweineserum, 0,01 % NADH	24	37
NOONKHOKHETKONG et al. 2013	18	THA	TMB	0,0025 % NADH, 1 % Hühnerserum, 5 % Oleic Albumin Complex	24	37
HEUVELINK et al. 2018	44	NLD	CAMHB	1 % Hühnerserum, 0,0025 % NADH	22	37
LUNA-CASTREJÓN et al. 2021	8	MEX	CAMHB	1 % Hühnerserum, 0,0025 % NADH	22	35
XU et al. 2022a	6	CHN, USA	^a	^a	^a	^a
GUO et al. 2022	40	CHN	TMB	10 % Fetales Kälberserum, 0,0025 % NADH	20	37
ZHU et al. 2022	38	CHN	CAMHB	10 % Hühnerserum, 0,0025 % NAD	^a	^a
GÜTGEMANN et al. 2024	83	BEL, BRA, DEU, ECU, ESP, GB, GP, JPN, MEX, NLD, PER, USA, ZAF, ZWE	CAMHB	1 % Hühnerserum, 0,0025 % NADH	48	35 ± 2

AUS, Australien; BHI, Hirn-Herz-Infusions-Bouillon; CAMHB, Kationen-adjustierte Mueller-Hinton-Bouillon; BEL, Belgien; BRA, Brasilien; CHN, China; DEU, Deutschland; ECU, Ecuador; ESP, Spanien; GB, Vereinigtes Königreich; GP, Guadeloupe; JPN, Japan; MEX, Mexiko; NADH, Nicotinamidadenindinukleotid reduziert; NLD, Niederlande; PER, Peru; t, Inkubationszeit; T, Inkubationstemperatur; THA, Thailand; TWN, Taiwan; TMB, Test Medium Broth; USA, Vereinigte Staaten von Amerika; ZAF, Südafrika; ZWE, Simbabwe ^aDie Testbedingungen wurden nicht genau spezifiziert.

Tabelle 7: Einschlägiger Vergleich publizierter Methoden zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *Bordetella avium*

Referenz	Isolate		Medium		Inkubation	
	Anzahl	Herkunft	Basis	Zusätze	t (h)	T (°C)
MORTENSEN et al. 1989	10	USA	CAMHB	Keine	22-24	35
BLACKALL et al. 1995	16	AUS	ISB ^c	Keine	24	37
BEACH et al. 2012	12	USA	MHB	Keine	18-24	37
SZABÓ et al. 2015	19	HUN	MHB	Keine	24	37
GÜTGEMANN et al. 2022a	49	DEU, NLD, POL	CAMHB	Keine	20	35 ± 2 °C

AUS, Australien; DEU, Deutschland; HUN, Ungarn; ISB, Isosensitest-Bouillon; NLD, Niederlande; POL, Polen; USA, Vereinigte Staaten von Amerika; t, Inkubationszeit; T, Inkubationstemperatur.

Tabelle 8: Einschlägiger Vergleich publizierter Methoden zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *Mycoplasma bovis*

Referenz	Inokulumdichte	Medium	Inkubation		
		Bouillon	pH-Wert	t (h)	T (°C)
AYLING et al. 2000	OD ₄₅₀ ; 5x10 ⁶ KbE/ml	Eaton-Bouillon ^a	7,6-7,8	48	37
THOMAS et al. 2003	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Hayflick-Bouillon ^b	k. A.	24-96	37
ROSEBUSCH et al. 2005	2x10 ³ -2x10 ⁵ ccu ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^c	k. A.	48	37 + 5 % CO ₂
GODINHO 2008	10 ³ -10 ⁵ KbE/ml	Mycoplasma-Bouillon ^d	7,5	*	36 ± 1
GERCHMAN et al. 2009	10 ⁴ -10 ⁵ ccu ml	Standard <i>M. bovis</i> -Bouillon ^e	7,8	96	37
SOEHNLEN et al. 2011	3x10 ³ -3x10 ⁵ KbE/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^f	k. A.	24	37 + 5 % CO ₂
KROEMER et al. 2012	10 ⁵ -10 ⁶ KbE/ml	Ergänzte Mycoplasma-Bouillon ^g	k. A.	≤168	36 ± 2 + 6 % CO ₂
HENDRICK et al. 2013	2x10 ³ -2x10 ⁵ ccu/ml	Ergänzte Hayflick-Bouillon ^b	k. A.	48	37 + 5 % CO ₂
AYLING et al. 2014	OD ₄₅₀ ; 5x10 ⁵ KbE/ml	Eaton-Bouillon	k. A.	48	37
KAWAI et al. 2014	10 ⁵ KbE/ml	Ergänzte Mycoplasma-Bouillon ^h	k. A.	72	37
SULYOK et al. 2014	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Ergänzte Mycoplasma-Bouillon ^g	7,8	168	37
BARBERIO et al. 2016	10 ⁴ UCC/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon	k. A.	>18	37 ± 1
HEUVELINK et al. 2016	0,5x10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ⁱ	k. A.	48	37
KONG et al. 2016	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon	k. A.	**	37 + 5 % CO ₂
ANHOLT et al. 2017	McFarland 0,5	Ergänzte Mueller-Hinton-Bouillon	k. A.	24-96	34-37 + 5 % CO ₂
KLEIN et al. 2017	5x10 ⁵ KbE/ml	Modifizierte Hayflick-Bouillon ^b	k. A.	24-48	35 ± 1
JOSI et al. 2018	10 ⁴ -10 ⁵ KbE/ml	SP4-Bouillon	k. A.	48	37
CAI et al. 2019	10 ³ -10 ⁵ KbE/ml	Modifizierte Hayflick-Bouillon ^b	k. A.	24-96	37 + 5 % CO ₂
KLEIN et al. 2019	5x10 ⁵ KbE/ml	Modifizierte Eaton-Bouillon ^a	k. A.	24-48	35 ± 1
JELINSKI et al. 2020	10 ³ -10 ⁵ KbE/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^j	k. A.	48-72	37 + 5 % CO ₂
BOKMA et al. 2020	10 ³ -10 ⁵ KbE/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^j	7,8	48-72	37
GARCÍA-GALÁN et al. 2020	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	pH-Medium ^k	k. A.	48	37
KINNEAR et al. 2020	10 ³ -10 ⁵ KbE/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^j	k. A.	48-72	37 + 5 % CO ₂
LIU et al. 2020	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Eaton-Bouillon	7,6-7,8	48	37 + 5 % CO ₂
AMMAR et al. 2022	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^g	7,8	24-72	37 + 5-7 % CO ₂
GÜTGEMANN et al. 2023	10 ⁴ -10 ⁵ KbE/ml	SP4-Bouillon	7,4-7,6	72± 2	37

ccu/ml, farbverändernde Einheiten pro Milliliter; k. A., keine definierten Angaben; PPLO, Pleuropneumonia-like organism; t, Inkubationszeit; T, Inkubationstemperatur; ^aGemäß NICHOLAS und BAKER 1998; ^bGemäß HAYFLICK 1965; ^cHergestellt durch Remel Inc. (Kansas City, USA); ^dHergestellt durch Mycoplasma Experience® (Reigate, UK); ^eGemäß ROSENGARTEN et al. 1994; ^fHergestellt durch University of California Davis Biological Media Services (Davis, USA); ^gHergestellt durch Oxoid; ^hHergestellt nach Kanto Chemical Co. Inc. (Tokyo, Japan); ⁱHergestellt nach Becton Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA); ^jHergestellt nach BD Difco, Fisher Scientific (Waltham, USA); ^kGemäß GÓMEZ-MARTÍN et al. 2012; *Inkubation bis eine Farbveränderung auftrat, die den voreingestellten pH-Kontrollen entsprach; **Gemäß LYSNYANSKY et al. 2015.

Tabelle 9: Einschlägiger Vergleich publizierter Methoden zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *Mycoplasma gallisepticum*

Referenz	Inokulumdichte	Medium	pH-Wert	Inkubation	
		Bouillon		t (h)	T (°C)
TANNER und WU 1992	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Chanock-Medium ^a	7,5	18-30	36 ± 1
MIGAKI et al. 1993	6x10 ⁷ -2x10 ⁸ KbE/ml	Modifiziertes Chanock-Medium ^a	7,5	18-30	36 ± 1
BRADBURY et al. 1994	10 ³ -10 ⁴ ccu/well	Mycoplasma-Bouillon ^b	7,8	24-48, 336	k. A.
HANNAN et al. 1997	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Avian Mycoplasma Liquid Medium ^c	7,6	*	36
GAUTIER-BOUCHARDON et al. 2002	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Frey-Medium ^d	k. A.	48-120	37
WU et al. 2005	10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium ^e	k. A.	120-168	37
GERCHMAN et al. 2008	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium ^f	k. A.	**	37
LYSNYANSKY et al. 2008	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium ^f	k. A.	**	37
LI et al. 2010	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium ^f	k. A.	120-168	37
GERCHMAN et al. 2011	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium ^f	k. A.	**	37
GHARAIBEH und AL-RASHDAN 2011	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Frey-Medium ^e	k. A.	**	37
LYSNYANSKY et al. 2012	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium ^f	k. A.	**	37
CHEN et al. 2015	1x10 ⁶ KbE/ml	k. A.	k. A.	36	37 + 5% CO ₂
XIAO et al. 2015	Etwa 1x10 ⁵ ccu/ml	<i>M. gallisepticum</i> -Medium ^g	k. A.	**	37
AMMAR et al. 2016	10 ⁴ -10 ⁵ KbE/ml	Ergänzte PPLO-Bouillon ^h	k. A.	120-168	37
ELBEHIRY et al. 2016	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Fray-Medium	k. A.	**	37
GRÓZNER et al. 2016	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Ergänzte Mycoplasma-Bouillon ⁱ	7,8	**	#
XIAO et al. 2016	2x10 ⁵ ccu/ml	<i>M. gallisepticum</i> -Medium ^g	k. A.	**	37
ZHANG et al. 2016	10 ⁷ KbE/ml	Modifiziertes <i>M. gallisepticum</i> -Medium ^g	7,8	*	37 + 5% CO ₂
BEYLEFELD et al. 2018	10 ³ -10 ⁵ ccu/ml	Modifiziertes Frey-Medium	7,6	**	#
KHATOON et al. 2018	10 ³ -10 ⁵ KbE/ml	Frey-Medium	7,8	*	36
HUANG et al. 2019	10 ⁵ -10 ⁷ KbE/ml	Modifiziertes <i>M. gallisepticum</i> -Medium ^g	7,8	*	37 + 5% CO ₂
MORROW et al. 2020	10 ⁴ -10 ⁵ ccu/ml	Frey-Medium ^j	k. A.	48-72	37
DE JONG et al. 2021	5x10 ⁵ KbE/ml	Friis-Bouillon ^k	k. A.	≤120	35 ± 1
BOTTINELLI et al. 2022	10 ⁴ ccu/ml	Avian Mycoplasma Liquid Medium ^c	k. A.	24-48	37 ± 1
ZHANG et al. 2022	10 ⁵ KbE/ml	<i>M. gallisepticum</i> -Medium ^g	7,8	**	37 + 5% CO ₂

ccu/ml, farbverändernde Einheiten pro Milliliter; KbE/ml, Koloniebildende Einheiten pro Milliliter; k. A., keine Angaben; PPLO, Pleuropneumonia-like organism; t, Inkubationszeit; T, Inkubationstemperatur; ^aGemäß CHANOCK et al. (1962), ^bGemäß BRADBURY (1977), ^cHergestellt durch Mycoplasma Experience® (Reigate, UK), ^dGemäß FREUNDT 1983; ^eGemäß Frey et al. (1968), ^fGemäß KLEVEN und LEVISOHN 1996; ^gHergestellt durch Qingdao Hope Bio-Technology Co., Ltd (Qingdao, Shandong, China); ^hGemäß KLEVEN 2003, Basismedium hergestellt durch Oxoid; ⁱHergestellt durch Oxoid; ^jGemäß FREY et al. 1968 modifiziert nach HANNAN (2000) und KREIZINGER et al. (2017); ^kGemäß FRIIS 1975; *Inkubation bis eine Farbveränderung auftrat, die den voreingestellten pH-Kontrollen entsprach; **Durchführung gemäß HANNAN (2000): Inkubation bis eine Farbveränderung auftrat, die den voreingestellten pH-Kontrollen entsprach; # Durchführung gemäß HANNAN (2000): Inkubation bei 36 ± 1 °C.

8. Untersuchungen zum Resistenzgenotyp mittels PCR- und Ganzgenomsequenzanalysen

Bei allen fünf getesteten Bakterienspezies wurden Isolate ermittelt, die im Vergleich zu den anderen getesteten Isolaten erhöhte MHK-Werte für verschiedene Wirkstoffe aufweisen. Resistenzmechanismen von Mykoplasmen basieren zu überwiegenden Teilen auf chromosomalen Mutationen (WU et al. 2005; LYSNYANSKY und AYLING 2016; HUANG et al. 2019). Im Gegensatz dazu beruhen Resistenzen bei Gram-negativen Bakterien häufig auf dem Vorliegen von Resistenzgenen (z.B. *bla*-Gene, *tet*-Gene) (PARTRIDGE 2011; GAUBA und RAHMAN 2023). Um die Aussagekraft der entwickelten Methoden der phänotypischen Resistenztestung zu prüfen und die Übereinstimmung zwischen dem ermittelten MHK-Wert und dem Resistenzgenotyp zu prüfen, wurden bei den Gram-negativen Bakterien *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* Resistenzgenanalysen durchgeführt. Da in diesem Schritt der Methodenentwicklung überprüft werden sollte, ob die mit der entwickelten AST-Methode ermittelten erhöhten MHK-Werte auf dem Vorliegen von Resistenzgenen beruhten, wurden hierfür gezielte PCR-Assays zur Detektion von Resistenzgenen angewendet. Die Resultate trugen auch dazu bei, die Resistenzsituation der Erreger zu bewerten. Einen besonderen Schwerpunkt der Arbeit mit *Av. paragallinarum* bildeten zudem die Ergebnisse von WGS-Analysen von 62 Isolaten, die vom Royal GD (Deventer, Niederlande) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Daten halfen, zusätzlich zu den PCR-Analysen, die Genome der getesteten *Av. paragallinarum*-Isolate umfassender auf das Vorhandensein von Resistenzgenen zu untersuchen und die genotypische Resistenzsituation dieses Erregers einzuschätzen.

8.1. Korrelation zwischen den Ergebnissen der MHK-Bestimmungen und Resistenzgenanalysen

Bei allen drei Gram-negativen Spezies zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen den beobachteten erhöhten MHK-Werten und den Ergebnissen der PCR-Analysen zum Nachweis von Resistenzgenen, was auf eine gute Eignung der entwickelten AST-Methoden hinweist, resistente Isolate durch die phänotypische Testung zu erkennen. Dies zeigte sich insbesondere bei Isolaten mit höheren MHK-Werten für Tetrazykline ($\geq 2 \mu\text{g/ml}$ Doxyzyklin, $\geq 8 \mu\text{g/ml}$ Tetrazyklin), bei denen in allen Fällen mindestens eines der Tetrazyklin-Resistenzgene *tet(A)*, *tet(B)* oder *tet(H)* nachgewiesen wurde. *tet*-Gene zählen zu den häufig nachgewiesenen

Resistenzgenen bei kommensalen und pathogenen Bakterien und wurden bereits zuvor in *Av. paragallinarum* [*tet(A)*, *tet(B)*, *tet(M)*] und *B. avium* (*tet(A)*) sowie nah verwandten Erregern [z.B. *tet(A)* in *B. bronchiseptica*] detektiert (NOONKHOKHETKONG et al. 2015; PRÜLLER et al. 2015; ERFAN et al. 2018; DI FRANCESCO et al. 2021; CAO et al. 2024). Allerdings veröffentlichten nicht alle der letztgenannten Studien (z.B. ERFAN et al. 2018) MHK-Werte für solche Isolate, in denen Resistenzgene nachgewiesen wurden. Die zusätzliche Angabe von MHK-Werten wäre jedoch von Bedeutung für eine Bestimmung der Resistenzsituation und damit auch der klinischen Relevanz solcher Resistenzgen-tragenden Isolate. Während bei Tetrazyklinen und anderen Wirkstoffen (z.B. Florfenicol) in der eigenen Studie eine gute Korrelation zwischen den MHK-Werten und den PCR-Ergebnissen festgestellt wurde, war dies bei anderen Wirkstoffen nicht immer der Fall. Obwohl ein *B. avium*-Isolat eine hohe MHK von 128 µg/ml für Streptomycin und das Vorhandensein des Streptomycin-Resistenzgens *aadA1* aufwies, konnte bei einem anderen *B. avium*-Isolat mit einer höheren MHK von 1024 µg/ml Streptomycin keines der getesteten Streptomycin-Resistenzgene durch PCR-Analysen nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen machten PRÜLLER et al. (2015), die mittels PCR-Analysen kein Streptomycin-Resistenzgen in *B. bronchiseptica*-Isolaten mit einer ähnlich hohen MHK von ≥1024 µg/ml Streptomycin detektierten. Zu bedenken ist jedoch, dass die PCR-Methode nur spezifische DNS-Zielsequenzen amplifiziert (GALHANO et al. 2021). Eine Ursache für den fehlenden Nachweis von Streptomycin-vermittelten Resistenzgenen in *B. avium*-Isolaten mit erhöhter MHK für Streptomycin könnte somit sein, dass aufgrund der großen Vielfalt bekannter Streptomycinresistenz-vermittelnder Gene (z.B. *ant(3'')-Ia*, *aph(3'')-Id*, *strA*, *strB*) (SHAW et al. 1993) nur eine begrenzte Anzahl dieser Gene in die PCR-Analysen einbezogen wurden und die dabei verwendeten Primer das durch Gesamtgenomsequenzierungen des Isolates detektierte Gen *aadA11* nicht detektierten. Ein weiterer Grund für die negativen PCR-Resultate könnte auch das Vorliegen einer Streptomycin-Resistenz sein, die durch chromosomale Punktmutationen im ribosomalen *rpsL*-Gen vermittelt werden (NAIR et al. 1993; SPRINGER et al. 2001; LYU et al. 2019). Diese Punktmutationen könnten die Bindungsstelle für Streptomycin im Ribosom modifizieren und eine phänotypische Resistenz verursachen, die durch PCR-basierte Methoden schwer zu identifizieren ist. Aus diesem Grund wurde eine Gesamtgenomanalyse des durch hohe MHK-Werte auffälligen *B. avium*-Isolates durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass der hohe MHK-Wert

von ≥ 1024 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin durch ein auf einem Integron der Klasse II-lokalisierten *aadA11*-Gen vermittelt wurde. Gesamtgenom-Sequenzanalysen liefern somit im Vergleich zu PCR-Tests weiterreichende genetische Informationen zur Charakterisierung von Resistenzdeterminanten in Bakterienisolaten.

8.2. Untersuchungen zur genotypischen Resistenzlage von *Av. gallinarum*-, *Av. paragallinarum*- und *B. avium*-Isolaten

Neben der Bewertung der Validität der entwickelten Bouillon-Mikrodilutionsmethoden konnten die PCR-Ergebnisse auch Informationen zur genotypischen Resistenzsituation von *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* liefern. Bei allen drei Erregern wurden Isolate detektiert, die Resistenzdeterminanten trugen. Besonders auffällig war der Nachweis von *Av. gallinarum*- und *B. avium*-Isolaten, die Träger mehrerer Gene waren, die Resistenzen gegenüber ≥ 3 verschiedenen Wirkstoffklassen vermitteln können. Diese Isolate zeigten erhöhte MHK-Werte für diese Wirkstoffe und sind entsprechend der von MAGIORAKOS et al. (2012) genannten Klassifikation als multiresistent einzustufen. Auch bei anderen geflügelassoziierten Erregern (z.B. *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* oder *Salmonella* spp.) wurden im Laufe der letzten Jahre multiresistente Isolate nachgewiesen (AL-ANSARI et al. 2021; MOHAMED et al. 2022; TIGABIE et al. 2023; JAISWAL et al. 2024). Multiresistente Isolate sind aufgrund der begrenzten Behandlungsmöglichkeiten ein ernstes Problem und werden unter anderem auf den häufigen oder unsachgemäßen Einsatz von antimikrobiellen Wirkstoffen, auch in der Geflügelproduktion, zurückgeführt (VAN DUIJKEREN et al. 2019; SREEJITH et al. 2020; KALANTARI et al. 2021; CASTELLO et al. 2023). Eine Weitergabe von Antibiotikaresistenzgenen bei geflügelpathogenen Erregern erfolgt häufig durch horizontalen Gentransfer, zum Beispiel über Resistenzgen-tragende Plasmide (MANCABELLI et al. 2016; OLADEINDE et al. 2021). Studien zum Nachweis von Plasmiden (die für eine Resistenz gegen Sulfonamide, Streptomycin und/oder Tetrazykline vermitteln) in *B. avium* wurden bereits Mitte bis Ende der 1980er Jahre publiziert (LUGINBUHL et al. 1984; LUGINBUHL et al. 1986; JACKWOOD et al. 1987). Etwas später wiesen MORRIS und LUGINBUHL (1992) auch konjugative Plasmide bei *B. avium* nach, die Streptomycin- oder Tetrazyklin-Resistenzgene trugen. Wie ANTOINE und LOCHT (1992) feststellten, können bei dem nah verwandten Erreger *B. bronchiseptica* vorkommende Plasmide durch Transformation oder Konjugation auf

Isolate derselben Spezies oder auf andere Bakterienspezies (z.B. in *E. coli*, *B. pertussis*, *Vibrio cholerae*, *Rhizobium meliloti*, *Pseudomonas putida*) übertragen werden. Eine Übertragung auf *B. avium* könnte daher ebenfalls, zumindest *in vitro*, möglich sein. Während HSU et al. (2007) bereits resistenzvermittelnde Plasmide in *Av. paragallinarum* entdeckt haben, wurden bisher noch keine Ergebnisse zum Nachweis von Resistenzgen-tragenden Plasmiden in *Av. gallinarum* veröffentlicht. Aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen *Av. paragallinarum* und *Av. gallinarum* könnte aber ein Transfer von genetischem Material zwischen den Spezies möglich sein. Da beide Bakterienspezies im Respirationstrakt von Geflügel vorkommen, erscheint auch ein regelmäßiges Resistenz-Monitoring von *Av. gallinarum* als sinnvoll. Im Gegensatz zu *Av. gallinarum* wurden Resistenzgene in *Av. paragallinarum* und *B. avium* bereits in früheren Studien durch PCR-Analyse identifiziert (Tabelle 10). Einige der nachgewiesenen Resistenzgene (z.B. *sul*-Gene, *tet*-Gene) wurden bei beiden Erregern nachgewiesen, was dem häufigen Vorkommen dieser Resistenzgene entspricht. Andere Resistenzgene wurden hingegen nur in einer der beiden Bakterienspezies detektiert, darunter Aminoglykosid- (Nachweis von *strA* in *Av. paragallinarum* oder *aadA1* in *B. avium*) oder Phenicol-Resistenzgene (Nachweis von *floR* in *B. avium*). Ob hier speziesspezifische Unterschiede im Vorkommen der Resistenzgene vorliegen, kann aufgrund der limitierten Anzahl an getesteten Isolaten nicht bestimmt werden. Unterschiede im Resistenzgen-Spektrum können generell darauf zurückzuführen sein, dass der Antibiotikaeinsatz (Wirkstoffart und –Dosis, Zulassungsstatus) von der Wirtstierart abhängt (RICHTER et al. 2009; SANDER et al. 2022) und Bakterien daher einem individuellen Selektionsdruck unterliegen. So ist zu vermerken, dass *B. avium* vor allem in Putenherden vorkommt (REGISTER und JACKWOOD 2020), während *Av. paragallinarum* vorwiegend in Hühnerbeständen verbreitet ist (CLOTHIER et al. 2019; ARMOUR 2020). Zu berücksichtigen ist auch die Tatsache, dass bei herkömmlichen PCR-Tests nur die Präsenz von Targetgenen untersucht wird (ZANKARI et al. 2012).

Tabelle 10: Vergleich der in dieser und anderen Studien durch PCR-Analysen nachgewiesenen antimikrobiellen Resistenzgene bei *Avibacterium paragallinarum* und *Bordetella avium*

Antimikrobielle Wirkstoffklasse	Detektierte Resistenzgene	Referenz
Aminoglykoside		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>strA</i>	BYARUGABA et al. (2011)
<i>Bordetella avium</i>	<i>aadA1</i>	ERFAN et al. (2018); GÜTGEMANN et al. (2022a)
β-Laktame		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>bla_{ROB-1}</i>	NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
	<i>bla_{TEM}</i>	BYARUGABA et al. (2011)
<i>Bordetella avium</i>	-	
Folsäure-Antagonisten		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>sul1</i>	
	<i>sul2</i>	BYARUGABA et al. (2011); NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
<i>Bordetella avium</i>	<i>dfrB1/2/3</i>	GÜTGEMANN et al. (2022a)
	<i>sul1</i>	ERFAN et al. (2018); GÜTGEMANN et al. (2022a)
	<i>sul2</i>	GÜTGEMANN et al. (2022a)
Phenicole		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	-	
<i>Bordetella avium</i>	<i>floR</i>	GÜTGEMANN et al. (2022a)
Tetrazykline		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>tet(A)</i>	BYARUGABA et al. (2011); NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
	<i>tet(B)</i>	GÜTGEMANN et al. (2024); NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
	<i>tet(C)</i>	BYARUGABA et al. (2011);
	<i>tet(M)</i>	NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
<i>Bordetella avium</i>	<i>tet(A)</i>	ERFAN et al. (2018); GÜTGEMANN et al. (2022a)
Makrolide		
<i>Avibacterium paragallinarum</i>	<i>erm(A)</i>	NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
	<i>erm(B)</i>	NOONKHOKHETKONG et al. (2013)
<i>Bordetella avium</i>	-	

-, es wurde kein antimikrobielles Resistenzgen mittels PCR-Analysen nachgewiesen.

Da die Bestimmung von Resistenzdeterminanten zur Überwachung und Kontrolle (z.B. Entwicklung neuer Antibiotika) von Resistenzen beiträgt (ZANKARI et al. 2012; MCADAMS et al. 2019; BANERJEE und PATEL 2023), wären weitere Studien zur Untersuchung der Resistenzmechanismen wichtig. Dies scheint insbesondere für *Av. gallinarum* relevant zu sein, da für die Bakterienspezies im Vergleich zu *Av. paragallinarum* und *B. avium* noch keine weiteren Informationen über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen verfügbar sind. Hierfür bieten sich insbesondere WGS-Analysen an, die im Gegensatz zu PCR-Analysen nicht nur bekannte, sondern

auch bisher unbekannte Resistenzgene identifizieren können (ZANKARI et al. 2012; BERENDONK et al. 2015).

8.2.1. Ganzgenomsequenzanalysen zur weiterführenden Untersuchung der Resistenzsituation von *Av. paragallinarum*

Für 62 der getesteten *Av. paragallinarum* wurden vom Royal GD WGS-Analysen durchgeführt und die Ergebnisse für die Studie zur Verfügung gestellt. Es zeigte sich, dass bei fast einem Drittel der untersuchten Isolate Sequenzen identifiziert wurden, die eine hohe Nukleotidsequenzidentität zu mindestens einem der folgenden Resistenzgene zeigten: Aminoglykoside (*aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*), β -Laktame (*bla_{TEM-1B}*), Colistin (*mcr*), Phenciole (*catA2*), Sulfonamide (*sul2*) und Tetrazykline [*tet(B)*, *tet(H)*]. Autoren einer kürzlich veröffentlichten Studie untersuchten *Av. paragallinarum*-Isolate mittels WGS-Analysen und identifizierten (ähnlich wie diese Arbeit) eine hohe Anzahl an Isolaten, die vermutlich Resistenz-vermittelnde Gene gegenüber Aminoglykosiden, β -Laktamen, Sulfonamiden und Tetrazyklinen aufwiesen (CAO et al. 2024). Weitere Studien zur Funktionalität dieser Resistenzgene wären daher notwendig, um ihre tatsächliche Resistenzvermittlung in *Av. paragallinarum* zu belegen. Ferner könnte untersucht werden, ob diese Resistenzgene in andere Bakterienspezies transferiert (z.B. über mobile genetische Elemente) und dort exprimiert werden können und so bei diesen Spezies zu höheren MHK-Werten führen.

Betrachtete man die geografische Herkunft der untersuchten *Av. paragallinarum*-Isolate, so stellte man fest, dass die Mehrheit der Resistenzgen-tragenden Isolate aus Amerika oder Europa und nicht aus Afrika stammte. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass viele Staaten in Amerika und Länder in Europa eine intensivere Nutztierhaltung betreiben, anders als die extensive Nutztierhaltung in vielen Regionen Afrikas (ILEA 2009; THORNTON 2010). Eine intensive Tierhaltung geht in der Regel mit einer höheren Besatzdichte und dem häufigeren Antibiotikaeinsatz einher, was die Selektion oder Entwicklung von Resistenzen begünstigt (MARSHALL und LEVY 2011; LANDERS et al. 2012).

9. Laborvergleichsstudie der entwickelten Methode für *B. avium*

Um die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse, die Durchführbarkeit in unterschiedlichen Laboren und damit die Zuverlässigkeit einer neuen Methode nachzuweisen, ist es meist sinnvoll, Laborvergleichsstudien durchzuführen. Wenn

diese Studien nachweisen, dass die neu entwickelte Methode einheitliche Ergebnisse liefert, auch wenn sie von anderen Personen und Laboratorien ausgeführt wird, können die Laborvergleichsstudien dazu beitragen, dass die Methode in einen Standard oder ein Dokument für neue AST-Methoden aufgenommen wird. In Zusammenarbeit mit dem BVL wurde daher eine Laborvergleichsstudie mit der erarbeiteten Methode für *B. avium* durchgeführt, um die Routinetauglichkeit der Methode und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen. Insgesamt elf Labore nahmen an der Laborvergleichsstudie teil, sodass die empfohlene Mindestzahl von ≥ 8 teilnehmenden Laboren erreicht wurde (HORWITZ 1994). Die teilnehmenden Labore führten drei Replikationen mit dem *B. avium*-Typstamm, einem *B. avium*-Feldisolat und dem QC-Stamm *E. coli* ATCC® 25922 durch. Abweichungen von ± 1 Verdünnungsstufe bezogen auf die MHK-Werte je Bakterienisolat, Labor und Wirkstoff galten als akzeptabel, sodass diese Ergebnisse als korrekt gewertet wurden (mit dem Modalwert gleichgesetzt). Da eines der teilnehmenden Labore ein anderes Testmedium zur Bouillon-Mikrodilutionstestung von *B. avium* einsetzte, wurden die Ergebnisse dieses Labors bei der Auswertung ausgeschlossen. Voraussetzung für eine erfolgreiche Teilnahme der Labore war, dass 80 % der MHK-Werte korrekt bestimmt wurden. Die Analyse der Ergebnisse der anderen zehn Laboratorien ergab, dass 98,23 % der ermittelten MHK-Werte innerhalb des akzeptablen Bereichs lagen. Der *B. avium*-Typstamm (83,89 %) zeigte im Vergleich zum Feldstamm (92,36 %) und *E. coli*-Referenzstamm (98,75 %) eine vergleichbar niedrigere Übereinstimmung. Dennoch wurde die Voraussetzung von ≥ 80 % der MHK-Werte, die innerhalb ± 1 Verdünnungsstufe liegen müssen, bei beiden Testisolaten erfüllt (STOCK et al. 2001). Die Auswertung der Ergebnisse von zehn teilnehmenden Laboren ergab, dass neun Labore eine Übereinstimmung von 87,6 – 96,76 % der MHK-Werte innerhalb des akzeptierten Bereiches erzielten, und die Labore so die Mindestvoraussetzung einer erfolgreichen Teilnahme erfüllten. Mit einer Übereinstimmung von 70,83 % verfehlte eines der Labore die Anforderung, wobei niedrige Testleistungen auf einen möglicherweise geringen Erfahrungsstand im Umgang mit anspruchsvollen Erregern wie *B. avium* zurückgeführt werden konnte (STUBBERFIELD et al. 2020). Die Auswertung in Bezug auf die antimikrobiellen Wirkstoffe zeigte, dass bei 21 von 24 getesteten Wirkstoffen eine Übereinstimmung der MHK-Werte von 83,33 – 100 % erreicht wurde. Nur die MHK-Werte für Cefoperazon, Ceftiofur und Tiamulin zeigten lediglich 74,44 – 78,89 % Übereinstimmung bei Anwendung der Testmethode in der

Laborvergleichsstudie. Ähnliche Beobachtungen wurden im Rahmen von Laborvergleichsstudien mit anderen Erregern gemacht. PRÜLLER (2016) stellte nach einem Ringversuch mit *B. bronchiseptica* hohe Abweichungen in den MHK-Werten für Ceftiofur fest und brachte dies mit möglichen wirkstoffbedingten Ursachen in Verbindung. WALLMANN et al. (2006) stellten für Cefoperazon hohe Fehlerquellen bei der MHK-Bestimmung fest, so dass auch in der vorliegenden Studie eine wirkstoffspezifische Interaktion als Ursache in Betracht gezogen werden muss. Die mit *B. avium* durchgeführte Laborvergleichsstudie wies aber im Allgemeinen auf eine gute Routinetauglichkeit und Reproduzierbarkeit der in CLSI-Supplement VET01S definierten Standardmethode für *B. avium* hin. Die Übereinstimmungsquoten übertrafen in den meisten Fällen die Mindestanforderungen des CLSI, was die Möglichkeit der künftigen Integration in bestehende CLSI-Dokumente unterstreicht.

5. Schlussfolgerung

Für alle fünf in diese Arbeit einbezogenen tierpathogenen Erreger wurden geeignete Methoden zur standardisierten antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung unter Verwendung der Bouillon-Mikrodilutionsmethode entwickelt, die für veterinärmedizinische Diagnoselaboratorien geeignet zu sein scheinen. Unter Verwendung der folgenden Testbedingungen wurden homogene MHK-Werte ermittelt, die die Anforderungen des Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) für eine neue Methode erfüllen:

- ***Av. gallinarum***: CAMHB+CS+NADH als Testmedium bei einer Inkubation für 20 – 24 h bei 35 ± 2 °C in aerober Atmosphäre
- ***Av. paragallinarum***: CAMHB+CS+NADH als Testmedium bei einer Inkubation für 48 h bei 35 ± 2 °C in aerober Atmosphäre
- ***B. avium***: nicht supplementierte CAMHB als Testmedium bei einer Inkubation für 20 h bei 35 ± 2 °C in aerober Atmosphäre
- ***M. bovis***: SP4-Bouillon als Testmedium bei einer Inkubation für 72 ± 2 h bei 37 °C in aerober Atmosphäre
- ***M. gallisepticum***: SP4-Bouillon als Testmedium bei einer Inkubation für 72 ± 2 h bei 37 °C in aerober Atmosphäre

Bei allen fünf Bakterienspezies wurden Isolate identifiziert, die erhöhte MHK-Werte für verschiedene Wirkstoffklassen mit klinischer Relevanz (z.B. Aminoglykoside, Fluorchinolone, Makrolide, Tetracycline) aufwiesen. Durch PCR- und WGS-Analysen wurden bei mehreren *Av. gallinarum*-, *Av. paragallinarum*- und *B. avium*-Isolaten mit erhöhten MHK-Werten spezifische Resistenzdeterminanten nachgewiesen. Es zeigte sich dabei eine gute Übereinstimmung des (mit den entwickelten AST-Methoden ermittelten) Resistenzphänotyps mit dem Genotyp. Einige der Resistenzdeterminanten (z.B. *floR* in *B. avium*) wurden erstmals durch diese Arbeit bei einem oder mehreren der Erreger nachgewiesen. Auch multiresistente *Av. gallinarum*-, *Av. paragallinarum*- und *B. avium*-Isolate konnten im Rahmen der Studie identifiziert werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit von Resistenztestungen und standardisierten AST-Methoden, wie sie in dieser Arbeit entwickelt wurden.

6. Zusammenfassung

Franziska Gütgemann

Entwicklung von Methoden zur Empfindlichkeitstestung von *Avibacterium gallinarum* und *Avibacterium paragallinarum*, *Bordetella avium*, *Mycoplasma* („*Mycoplasma*opsis“) *bovis* und *Mycoplasma* („*Mycoplasma*moides“) *gallisepticum* im Mikrodilutionsverfahren

Die Ausbreitung antibiotikaresistenter Krankheitserreger in der Human- und Veterinärmedizin gibt weltweit Anlass zur Sorge. Die Anwendung standardisierter antimikrobieller Empfindlichkeitstests (AST) ist ein wichtiges Hilfsmittel, um eine gezielte Therapie von Infektionen durchführen zu können. Auch wenn für viele bakterielle Erreger bereits anerkannte AST-Standardmethoden zur Verfügung stehen, fehlen diese für einige bakterielle Erreger. Dies galt auch für die tierpathogenen Bakterienspezies *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* und *M. gallisepticum*. Ziel dieser Arbeit war es daher, für diese fünf Spezies geeignete Methoden zur standardisierten AST im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren zu entwickeln, die einen routinemäßigen Einsatz in veterinärdiagnostischen Laboratorien ermöglichen und quantitative Empfindlichkeitsdaten in Form von minimalen Hemmkonzentrations (MHK)-Werten) bestimmen.

Zu Beginn der Arbeiten wurden für alle fünf Bakterienspezies-Isolate für die Durchführung der Untersuchungen akquiriert. Mit Ausnahme von *M. gallisepticum* wurden anhand von Makrorestriktionsanalysen jeweils fünf epidemiologisch nicht verwandte Testisolate für nachfolgende Arbeitsschritte identifiziert. Um ein geeignetes Medium für die Bouillon-Mikrodilutionstests zu finden, wurden anschließend umfangreiche Wachstumsexperimente mit verschiedenen Medien durchgeführt. Alle getesteten *Av. gallinarum*- und *B. avium*-Isolate zeigten ein gutes Wachstum in der Kationen-adjustierten Mueller-Hinton-Bouillon (CAMHB), die vom Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) für die AST schnell wachsender Mikroorganismen empfohlen wird. *Av. paragallinarum* zeigte nur in CAMHB plus 1 % Hühnerserum + 0,0025 % NADH (CAMHB+CS+NADH) ausreichendes Wachstum, ein Medium, welches für die standardisierte AST des eng verwandten Erregers *G. parasuis* vorgeschlagen wurde. Da Mykoplasmen in der Regel keine sichtbare

Trübung in der bebrüteten Bakterienkultur zeigen, wurden für die Wachstumsexperimente mit *M. bovis* und *M. gallisepticum* komplexe Spezialmedien mit einem pH-Indikator verwendet. Beide Mykoplasmen-Spezies zeigten ausreichendes Wachstum ausschließlich in der SP4-Bouillon, die vom CLSI für die AST humanpathogener Mykoplasmen akzeptiert ist. Anschließend wurden wiederholte Empfindlichkeitstests zur Ermittlung der exakten (Anforderung von fünf identischen MHK-Werten) und essentiellen (MHK-Modus, der eine Abweichung von ± 1 Verdünnungsstufe akzeptiert) MHK-Übereinstimmungen durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der MHK-Werte zu bewerten. Je nach getesteter Spezies wurde dazu ein Panel von 16 oder 24 antimikrobiellen Wirkstoffen einbezogen. Bei Verwendung der nicht supplementierten CAMHB und einer Inkubation von 20 h bei 35 ± 2 °C in aerober Atmosphäre wurde eine gute Homogenität der MHK-Werte von *B. avium* nachgewiesen. Obwohl das gleiche Medium gutes Wachstum von *Av. gallinarum* zeigte, wurde eine geringe Homogenität der MHK-Werte von *Av. gallinarum* in dem Medium festgestellt. Aus diesem Grund wurde die Eignung der CAMHB+CS+NADH analysiert, die ebenfalls gutes Wachstum von *Av. gallinarum* ermöglichte. In diesem Medium wurden nach einer Inkubation für 20 bis 24 h bei 35 ± 2 °C in aerober Atmosphäre homogene MHK-Werte bestimmt. Unter Verwendung des gleichen Mediums wurden auch für die eng verwandte Spezies *Av. paragallinarum* homogene MHK-Werte ermittelt, wobei dafür eine längere Inkubationszeit von 48 h erforderlich ist. Für die besonders anspruchsvollen Erreger *M. bovis* und *M. gallisepticum* wurden nach einer Inkubation von 72 ± 2 h bei 37 °C in aerober Atmosphäre homogene MHK-Werte in der SP4-Bouillon erzielt. Insgesamt führten diese Testbedingungen bei allen fünf Erregern zu hohen exakten und wesentlichen MHK-Übereinstimmungen, die die Anforderungen des CLSI erfüllen. Es zeigte sich, dass sich herkömmliche Qualitätskontrollstämme (QC-Stämme) für die Qualitätskontrolle der AST von *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und *B. avium* eignen. Ein Eignungstest dieser QC-Stämme für die Qualitätskontrolle der für *M. bovis* und *M. gallisepticum* entwickelten AST-Methode ergab, dass viele MHK-Werte außerhalb der vom CLSI akzeptierten MHK-Bereiche lagen. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Eignung eines Typstammes für die Qualitätskontrolle gemäß der CLSI-Richtlinie M23 geprüft. Zwanzig Empfindlichkeitstests mit dem *M. bovis*-Typstamm DSM 22781^T ergaben homogene MHK-Werte, die die CLSI-Anforderungen an einen neuen QC-Stamm erfüllen.

Ein Vergleich von MHK-Werten unter Verwendung von Medienkomponenten verschiedener Hersteller zeigte eine allgemein gute Reproduzierbarkeit der MHK-Werte für alle in die Studie einbezogenen Erreger. Eine gute Eignung der für *B. avium* entwickelten Methode zeigte sich zudem durch die Ergebnisse einer Laborvergleichsstudie, die in Zusammenarbeit mit dem BVL durchgeführt wurde. Bei allen Erregern wurden Isolate identifiziert, die im Vergleich zu den anderen Isolaten erhöhte MHK-Werte für verschiedene Wirkstoffklassen (z.B. Aminoglykoside, Fluorchinolone, Makrolide, Tetracykline) aufwiesen. Um die Übereinstimmung zwischen dem MHK-Wert und dem Resistenzgenotyp zu überprüfen, wurden mit *Av. gallinarum*-, *Av. paragallinarum*- und *B. avium*-Isolaten mit erhöhten MHK-Werten PCR-Analysen durchgeführt, um antimikrobielle Resistenzgene nachzuweisen, und es wurde eine gute Übereinstimmung festgestellt. Die Ergebnisse dieser PCR-Analysen sowie die der WGS-Analysen von *Av. paragallinarum* zeigten zudem, dass einige dieser Isolate mehrere Gene trugen, die eine Resistenz gegen verschiedene Wirkstoffklassen vermitteln. In dieser Arbeit gelang auch erstmals der Nachweis der folgenden Resistenzgene bei *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* und/oder *B. avium*: *aadA11*, *aph(3'')-Ib*, *bla_{TEM-1}*, *catA2*, *dfrA14*, *dfrB1/2/3*, *floR*, *mcr-like*, *sul2*, *tet(B)* und *tet(H)*. Da Resistenzen bei Mykoplasmen in der Regel auf chromosomale Mutationen zurückzuführen sind, wurden mit *M. bovis* und *M. gallisepticum* keine Resistenzgenanalysen durchgeführt. Die bei *M. bovis* und *M. gallisepticum* festgestellten bimodalen oder breiten MHK-Verteilungen für Aminoglykoside, Fluorchinolone oder Makrolide sind jedoch ein Hinweis auf das Vorliegen resistenter Isolate.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Promotionsarbeit entwickelten Bouillon-Mikrodiutionsmethoden für eine standardisierte AST der fünf tierpathogenen Erreger *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* und *M. gallisepticum* geeignet sind. In future, these methods may help to select the most suitable antibiotic in case treatment is necessary and to counteract antimicrobial resistance selection in these pathogens.

7. Summary

Franziska Gütgemann

Entwicklung von Methoden zur Empfindlichkeitstestung von *Avibacterium gallinarum* und *Avibacterium paragallinarum*, *Bordetella avium*, *Mycoplasma* („*Mycoplasma*posis“) *bovis* und *Mycoplasma* („*Mycoplasma*moides“) *gallisepticum* im Mikrodilutionsverfahren

The spread of antibiotic-resistant pathogens in human and veterinary medicine is a cause of worldwide concern. However, the use of standardized antimicrobial susceptibility testing (AST) is an important tool for the targeted treatment of infections. Although approved AST standard methods are already available for many bacterial pathogens, they are lacking for some bacterial species, such as the animal pathogenic bacterial species *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* and *M. gallisepticum*. The aim of this work was therefore to develop suitable methods for standardized AST of these five species using the broth microdilution method. The methods should be suitable for routine use in veterinary diagnostic laboratories and determine quantitative susceptibility data as minimal inhibitory concentration (MIC) values.

At the beginning of the work, isolates of all five bacterial species were collected for the investigations. With the exception of *M. gallisepticum*, macrorestriction analyses were performed to identify five epidemiologically unrelated test isolates for the subsequent working steps. In order to find a suitable medium for broth microdilution testing, extensive growth experiments were performed with different media. All *Av. gallinarum* and *B. avium* isolates tested showed good growth in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB), which is the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommended medium for AST of fast-growing organisms. *Av. paragallinarum* showed sufficient growth only in CAMHB plus 1% chicken serum + 0.0025% NADH (CAMHB+CS+NADH), a medium proposed for standardized AST of the closely related pathogen *G. parasuis*. Since mycoplasmas usually do not show visible growth in inoculated and incubated culture media, complex media with a pH indicator were used for *M. bovis* and *M. gallisepticum* growth experiments. Both mycoplasma species showed sufficient growth exclusively in the SP4 broth, a medium accepted by the CLSI

for AST of human pathogenic mycoplasmas. Repeated susceptibility testing was then performed to determine the exact (requirement of five identical MIC values) and essential (MIC mode accepting ± 1 dilution level deviation) MIC agreements in order to assess the reproducibility of MIC values. Depending on the species tested, a panel of 16 or 24 antimicrobial agents was included. Using the unsupplemented CAMHB and an incubation time of 20 h at 35 ± 2 °C in aerobic atmosphere, good homogeneity of *B. avium* MIC values was demonstrated. Although the same medium allowed good growth of *Av. gallinarum*, insufficient homogeneity of MIC values was observed in this medium. For this reason, the suitability of CAMHB+CS+NADH was analyzed, which also allowed good growth of *Av. gallinarum*. Homogeneous MIC values were determined in this medium after an incubation time of 20 to 24 h at 35 ± 2 °C in an aerobic atmosphere. Using the same medium, homogeneous MIC values were also determined for the closely related species *Av. paragallinarum*, whereby a longer incubation time of 48 h is required. For the highly fastidious species *M. bovis* and *M. gallisepticum*, homogeneous MIC values were obtained in SP4 broth after incubation for 72 ± 2 h at 37 °C in an aerobic atmosphere. Overall, these test conditions led to high exact and essential MIC agreements for all five species, which fulfilled the requirements of the CLSI for a new AST method. It was shown that the usual quality control strains (QC strains) are suitable for quality control purposes during AST of *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* and *B. avium*. However, testing these QC strains for quality control purposes for the AST methods developed for *M. bovis* and *M. gallisepticum* showed that many MIC values were outside the CLSI accepted MIC ranges. Therefore, the next step was to test the suitability of a type strain for quality control purposes, according to CLSI guideline M23. Twenty-fold repeated susceptibility tests with the *M. bovis* type strain DSM 22781T resulted in homogeneous MIC values that fulfill the CLSI requirements for a new QC strain.

A comparison of MIC values using media components from different manufacturers showed a good reproducibility of MIC values for all pathogens included in the study. The suitability of the method developed for *B. avium* was also demonstrated by the results of a comparative interlaboratory trial carried out in collaboration with the Federal Office of Consumer Protection and Food Safety (BVL).

For all pathogens, isolates were identified that showed increased MIC values for different classes of antimicrobials (e.g. aminoglycosides, fluoroquinolones, macrolides, tetracyclines) compared to other isolates of the collection. To evaluate the correlation

between resistance phenotype and genotype, PCR analyses were carried out with *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* and *B. avium* isolates showing elevated MIC values to antimicrobials. However, the results indicated a good agreement. The results of these PCR analyses and of whole genome sequence analyses of *Av. paragallinarum* also showed that some isolates carry multiple genes that confer resistance to different classes of antibiotics. In this work, the following resistance genes were detected the first time in *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum* and/or *B. avium*: *aadA11*, *aph(3'')-Ib*, *bla_{TEM-1}*, *catA2*, *dfrA14*, *dfrB1/2/3*, *floR*, *mcr-like*, *sul2*, *tet(B)* and *tet(H)*. Since resistance in mycoplasmas is usually due to chromosomal mutations, no resistance gene analyses were carried out with *M. bovis* and *M. gallisepticum*. However, the bimodal or broad MIC distributions observed for aminoglycosides, fluoroquinolones or macrolides in *M. bovis* and *M. gallisepticum* indicate the presence of resistant isolates.

In summary, the broth microdilution methods developed in this doctoral thesis are suitable for standardized AST of the five animal pathogenic bacterial species *Av. gallinarum*, *Av. paragallinarum*, *B. avium*, *M. bovis* and *M. gallisepticum*. In future, these methods may help to select the most suitable antibiotic if treatment is necessary in order to counteract antimicrobial resistance selection in these pathogens.

8. Literaturverzeichnis

ACKERMAN, M. G., D. A. SCHNEIDER, K. N. K. BAKER u. T. E. BESSER (2019):
Comparison of three methods of enumeration for *Mycoplasma ovipneumoniae*.

J. Microbiol. Methods 165, 105700

AHMED, K.; P. P. SEIN, M. SHAHNAWAZ u. A. A. HOOSEN (2002):

Pasteurella gallinarum neonatal meningitis.

Clin. Microbiol. Infect. 8(1), 55–57

AL FADEL SALEH, M.; M. S. AL-MADAN, H. H. ERWA, I. DEFONSEKA, S. Z. SOHEL
u. S. K. SANYAL (1995):

First case of human infection caused by *Pasteurella gallinarum* causing infective
endocarditis in an adolescent 10 years after surgical correction for truncus arteriosus.

Pediatrics 95(6), 944–948

AMMAR, A. M, N K. ABD EL-AZIZ, A. A. GHARIB, H. K. AHMED u. A. E. LAMEAY
(2016):

Mutations of domain V in 23S ribosomal RNA of macrolide-resistant *Mycoplasma
gallisepticum* isolates in Egypt.

J. Infect. Dev. Ctries. 10(8), 807–813

ANHOLT, R. M., C. KLIMA, N. ALLAN, H. MATHESON-BIRD, C. SCHATZ, P.
AJITKUMAR, S. J. OTTO, D. PETERS, K. SCHMID, M. OLSEN, T. MCALLISTER u.
B. RALSTON (2017):

Antimicrobial susceptibility of bacteria that cause bovine respiratory disease complex
in Alberta, Canada.

Front. Vet. Sci. 4, 207

ANWAR, S., B. SIVALINGAM, N. VIJAYAKUMAR, K. VIVEK, L. P. K. PERUMAL u. E.
A. PRABHA (2022):

An in vitro comparison of the effect of wound irrigating solution (0.01% hypochlorous
acid) and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*.

J. Pharm. Bioallied Sci. 14(1), 796-801

ARASHIMA, Y., K. KATO, R. KAKUTA, T. FUKUI, K. KUMASAKA, T. TSUCHIYA u. K.
KAWANO (1999):

First case of *Pasteurella gallinarum* isolation from blood of a patient with symptoms of
acute gastroenteritis in Japan.

Clin. Infect. Dis. 29(3), 698–699

ARBEITSKREIS ANTIBIOTIKARESISTENZ: Erarbeitung neuer klinischer Grenzwerte.
Deutsche Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.

Online verfügbar unter: <http://antibiotikaresistenz.dvg.net/index.php?id=1912>

ARMOUR, N. K. (2020): *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: *Diseases of Poultry* 14, S. 911–929. Editor: SWAYNE, D. E., 14te Edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell

ARP, L. H. u. S. M. MCDONALD (1985):

Influence of temperature on the growth of *Bordetella avium* in turkeys and in vitro.

Avian Dis. 29(4), 1066–1077

ARP, L. H. u. N. F. CHEVILLE (1984):

Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*.

Am. J. Vet. Res. 45(10), 2196–2200

ASSUNÇÃO, P., R. DIAZ, J. COMAS, C. M. R. DE GALARRETA, O. R. GONZÁLEZ-LLAMAZARES u. J. B. POVEDA (2005):

Evaluation of *Mycoplasma hyopneumoniae* growth by flow cytometry.

J. Appl. Microbiol. 98(5), 1047–1054

ASSUNÇÃO, P., R. S. ROSALES, M. RIFATBEGOVIĆ, N. T. ANTUNES, C. DE LA FE, C. M. RUIZ DE GALARRETA u. J. B. POVEDA (2006):

Quantification of mycoplasmas in broth medium with sybr green-I and flow cytometry.

Front. Biosci. 11, 492–497

AYLING, R. D., S. E. BAKER, M. L. PEEK, A. J. SIMON u. R. A. NICHOLAS (2000):

Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against recent field isolates of *Mycoplasma bovis*.

Vet. Rec. 146(26), 745–747

AYLING, R. D., R. S. ROSALES, G. BARDEN u. F. L. GOSNEY (2014):

Changes in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from Great Britain.

Vet. Rec. 175(19), 486

BAARS, B. u. W. OPFERKUCH (1979):

Wichtige Parameter des Agar-Diffusions-Testes zur bakteriellen Antibiotika-Resistenz-Bestimmung.

Lab. Medizin 3(7–8), 129–135

BARBERIO, A., B. FLAMINIO, S. DE VliegHER, K. SUPRÉ, V. KROMKER, C. GARBARINO, N. ARRIGONI, G. ZANARDI, L. BERTOCCHI, F. GOBBO, S. CATANIA u. P. MORONI (2016):

Short communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates identified in milk from dairy cattle in Belgium, Germany, and Italy.

J. Dairy Sci. 99(8), 6578–6584

BARNES, W. G. u. G. R. HODGES (1984): The Aminoglycoside antibiotics. A guide to therapy. Roca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group (CRC revivals)

BATARD, E., M. E. JUVIN, C. JACQUELINE, D. BUGNON, J. CAILLON, G. POTEL u. H. B. DRUGEON (2005):

Influence of carbon dioxide on the MIC of telithromycin for *Streptococcus pneumoniae*: an in vitro-in vivo study.

Antimicrob. Agents Chemother. 49(1), 464–466

BEACH, N. M., S. THOMPSON, R. MUTNICK, L. BROWN, G. KETTIG, R. PUFFENBARGER, S. B. STOCKWELL, D. MIYAMOTO u. L. TEMPLE (2012):

Bordetella avium antibiotic resistance, novel enrichment culture, and antigenic characterization.

Vet. Microbiol. 160(1–2), 189–196

BEALL, B., P. K. CASSIDAY u. G. N. SANDEN (1995):

Analysis of *Bordetella pertussis* isolates from an epidemic by pulsed-field gel electrophoresis.

J. Clin. Microbiol. 33(12), 3083–3086

BÉBÉAR, C., S. PEREYRE u. O. PEUCHANT (2011):

Mycoplasma pneumoniae: susceptibility and resistance to antibiotics.

Future Microbiol. 6(4), 423–431

BECKER, C. A. M., C. AMBROSET, A. HULEUX, A. VIALATTE, A. COLIN, A. TRICOT, M.-A. ARCANGIOLI u. F. TARDY (2020):

Monitoring *Mycoplasma bovis* diversity and antimicrobial susceptibility in calf feedlots undergoing a respiratory disease outbreak.

Pathogens 9(7), 593

BEIJERINCK, M. W. (1889):

L'auxanographie, ou la méthode de l'hydrodiffusion dans la gélatine appliquée aux recherches microbiologiques.

Arch. néerl. Sci. 23, 367

BENEDETTI, F., S. CURRELI u. D. ZELLA (2020):

Mycoplasmas-host interaction: Mechanisms of inflammation and association with cellular transformation.

Microorganisms 8(9), 1351

BENGTSSON, B. u. C. GREKO (2014):

Antibiotic resistance – consequences for animal health, welfare, and food production.

Ups. J. Med. Sci. 119(2), 96–102

BERMAN, T. S., Z. BARNETT-ITZHAKI, T. BERMAN u. E. MAROM (2023):

Antimicrobial resistance in food-producing animals: towards implementing a one health based national action plan in Israel.

Isr J Health Policy Res. 12(1), 18

BEYLEFELD, A., P. WAMBULAWAYE, D. G. BWALA, J. J. GOUWS, O. M. LUKHELE, D. B. R. WANDRAG u. C. ABOLNIK (2018):

Evidence for multidrug resistance in nonpathogenic mycoplasma species isolated from South African poultry.

Appl. Environ. Microbiol. 84(21), e01660-18

BIDDLE, M. K., L. K. FOX, M. A. EVANS u. C. C. GAY (2005):

Pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Mycoplasma* isolates from various body sites in dairy cattle with *Mycoplasma mastitis*.

J. Am. Vet. Med. 227(3), 455–459

BINNS, S. H., A. J. SPEAKMAN, S. DAWSON, M. BENNETT, R. M. GASKELL u. C. A. HART (1998):

The use of pulsed-field gel electrophoresis to examine the epidemiology of *Bordetella bronchiseptica* isolated from cats and other species.

Epidemiol. Infect. 120(2), 201–208

BISGAARD, M., H. CHRISTENSEN, K. P. BEHR, G. BARON u. J. P. CHRISTENSEN (2005):

Investigations on the clonality of isolates of *Pasteurella gallinarum* obtained from turkeys in Germany.

Avian Pathol. 34(2), 106–110

BISGAARD, M., J. P. CHRISTENSEN, A. M. BOJESEN, u. H. CHRISTENSEN (2007):

Avibacterium endocarditidis sp. nov., isolated from valvular endocarditis in chickens.
Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57(8), 1729–1734

BLACKALL, P. J. (1988):

Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*.

Avian Dis. 32(4), 742–747

BLACKALL, P. J., L. E. EAVES u. D. G. ROGERS (1989):

Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drug resistance patterns.

Avian Dis. 33(3), 491

BLACKALL, P. J., L. E. EAVES u. M. FEGAN (1995):

Antimicrobial sensitivity testing of Australian isolates of *Bordetella avium* and the *Bordetella avium*-like organism.

Aust. Vet. J. 72(3), 97–100

BLACKALL, P. J., H. CHRISTENSEN, T. BECKENHAM, L. L. BLACKALL u. M. BISGAARD (2005):

Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov.

Int. J. Syst. Evol. 55(1), 353–362

BLACKALL, P. J. u. E. SORIANO-VARGAS (2020): Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Diseases of Poultry*, S. 890–906. Editor: SWAYNE, D. E., 14te Edition. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell

BLANCHARD, A. u. G. BROWNING, G. (2005): *Mycoplasmas: Molecular biology pathogenicity and strategies for control*: Norfolk, UK: Horizon Bioscience

BLAND, M. P., A. A. BICKFORD, B. R. CHARLTON, G. C. COOPER, F. SOMMER u. G. CUTLER (2002):

Case report: A severe infectious coryza infection in a multi-age layer complex in central California.

51st Western Poultry Disease Conference/XXVII Convencion Anual ANECA.

BOKMA, J., L. GILLE, K. DE BLEECKER, J. CALLENS, F. HAESEBROUCK, B. PARDON u. F. BOYEN (2020):

Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal, dairy and beef herds.

Antibiotics 9(12), 882

BOONE, C. W., N. MANTEL, T. D. CARUSO, E. KAZAM u. R. E. STEVENSO (1971):
Quality control studies on fetal bovine serum used in tissue culture.

In vitro 7(3), 174–189

BOSCH, T., A. J. DE NEELING, L. M. SCHOULS, K. W. VAN DER ZWALUW, J. A. J. W. KLUYTMANS, H. GRUNDMANN u. X. W. HUIJSDENS (2010):

PFGE diversity within the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal lineage ST398.

BMC Microbiol. 10, 40

BOTTINELLI, M., M. GASTALDELLI, M. PICCHI, A. DALL'ORA, L. CRISTOVAO BORGES, A. S. RAMÍREZ, A. MATUCCI u. S. CATANIA (2022):

The monitoring of *Mycoplasma gallisepticum* minimum inhibitory concentrations during the last decade (2010-2020) seems to reveal a comeback of susceptibility to macrolides, tiamulin, and lincomycin.

Antibiotics 11(8), 1021

BOYCOTT B. R., H. R. WYMAN u. F. C. WONG (1984):

Alcaligenes faecalis rhinotracheitis in Manitoba turkeys.

Avian Dis. 28(4), 1110–1114

BRADBURY, J. M. (1977):

Rapid biochemical tests for characterisation of the Mycoplasmatales.

J. Clin. Microbiol. 5, 531–535

BRADBURY, J. M., C. A. YAVARI u. C. J. GILES (1994):

In vitro evaluation of various antimicrobials against *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by the micro-broth method, and comparison with a commercially-prepared test system.

Avian Pathol. 23(1), 105–115

BÜRGI, N., C. JOSI, S. BÜRKI, M. SCHWEIZER u. P. PILO (2018):

Mycoplasma bovis co-infection with bovine viral diarrhoea virus in bovine macrophages.

Vet. Res. 49(1), 2

BURMEISTER, A. R. (2015):

Horizontal gene transfer.

Evol. Med. Public Health 1, 193–194

BUTAYE, P., L. A. DEVRIESE u. F. HAESEBROUCK (1998):

Effects of different test conditions on MICs of food animal growth-promoting antibacterial agents for enterococci.

J. Clin. Microbiol. 36(7), 1907–1911

BYARUGABA, D. K., U. M. MINGA, P. S. GWAKISA, E. KATUNGUKA-RWAKISHAYA, M. BISGAARD, H. CHRISTENSEN u. J. E. OLSEN (2011):

Demonstration of antibiotic resistance genes *strA*, *bla*_{TEM}, *tetA*, *tetC* and *sul2* in *Avibacterium paragallinarum*.

Afr J Microbiol Res 5(22), 3624–3627

BYWATER, R., P. SILLEY u. S. SIMJEE (2006):

Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements.

Vet. Microbiol. 118(1-2), 158–159

CABEZÓN, E., J. RIPOLL-ROZADA, A. PEÑA, F. DE LA CRUZ, I. ARECHAGA (2015):

Towards an integrated model of bacterial conjugation.

FEMS Microbiol. Rev. 39(1), 81–95

CAI, H. Y., R. MCDOWALL, L. PARKER, E. I. KAUFMAN u. J. L. CASWELL (2019):

Changes in antimicrobial susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* over time.

Can. J. Vet. Res. 83(1), 34–41

CANESCHI, A., A. BARDHI, A. BARBAROSSA u. A. ZAGHINI (2023):

The use of antibiotics and antimicrobial resistance in veterinary medicine, a complex phenomenon: a narrative review.

Antibiotics 12(3), 487

CANTÓN, R. u. M. I. MOROSINI (2011):

Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics.

FEMS Microbiol Rev. 35(5), 977–991

CARTER, G. R. (1984): Genus I. Pasteurella. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, S. 552–557. Vol. 1. Editoren: Kreig, N. R. u. J. G. Holt, Baltimore/London, US/UK: Williams & Wilkins

CARTER, B., G. WU, M. J. WOODWARD u. M. F. ANJUM (2008):

A process for analysis of microarray comparative genomics hybridisation studies for bacterial genomes.

BMC Genet. 29(9), 53

CCUG: Culture Collection University of Gothenburg.

Online verfügbar unter <https://www.ccug.se/>

CHANOCK, R. M., L. HAYFLICK u. M. F. BARILE MF (1962):

Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 48(1), 41–49

CHECCUCCI, A., P. TREVISI, D. LUISE, M. MODESTO, S. BLASIOLI, I. BRASCHI u. P. MATTARELLI (2020):

Exploring the animal waste resistome: The spread of antimicrobial resistance genes through the use of livestock manure.

Front Microbiol. 11, 1416

CHEN, H., S. YU, M. HU, X. HAN, D. CHEN, X. QIU u. C. DING (2012):

Identification of biofilm formation by *Mycoplasma gallisepticum*.

Vet. Microbiol. 161(1-2), 96–103

CHEN, L., D. YANG, Z. PAN, L. LAI, J. LIU, B. FANG u. S. SHI (2015):

Synthesis and antimicrobial activity of the hybrid molecules between sulfonamides and active antimicrobial pleuromutilin derivative.

Chem. Biol. Drug Des. 86(2), 239–245

CHEN, C. u. W. HONG (2021):

Recent development of rapid antimicrobial susceptibility testing methods through metabolic profiling of bacteria.

Antibiotics 10(3), 311

CHEN, Q., T. DHARMARAJ, P. C. CAI, E. B. BURGNER, N. L. HADDOCK, A. J. SPAKOWITZ u. P. L. BOLLYKY (2022):

Bacteriophage and bacterial susceptibility, resistance, and tolerance to antibiotics.

Pharmaceutics 14(7), 1425

CHIANG, Y. N., J. R. PENADÉS u. J. CHEN (2019):

Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical.

PLoS Pathog. 15(8), e1007878

CHRISTENSEN, H., F. DZIVA, J. E. OLSEN u. M. BISGAARD (2002):

Genotypical heterogeneity of *Pasteurella gallinarum* as shown by ribotyping and 16S rRNA.

Avian Pathol. 31(6), 603–610

CLARK, S. R. u. L. FROEBEL (2020): Turkey industry annual report – Current health and industry issues facing the US turkey industry. Online verfügbar unter:

<https://www.huvepharma.com/news/article/2020-turkey-industry-annual-report-current-health-and-industry-issues-facing-the-us-turkey-industry/>

CLOTHIER, K. A., A. TORAIN u. S. REINL (2019):

Surveillance for *Avibacterium paragallinarum* in autopsy cases of birds from small chicken flocks using a real-time PCR assay.

J. Vet. Diagn. Invest 31(3), 364–367

CLSI (2011): Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas; approved guideline. CLSI document M43-A. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2013): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 4te Edition. CLSI document VET01-A4. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2017): Methods for antimicrobial susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET06. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018a): Development of in vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters. 5te Edition. CLSI guideline M23. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018b): Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. 9te Edition. CLSI standard M11. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2018c): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11te Edition. CLSI standard M07. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2019): Replacement broth medium for Veterinary Fastidious Medium and new *Actinobacillus pleuropneumoniae* ATCC® 27090 and *Histophilus somni* ATCC® 700025 minimal inhibitory concentration quality control ranges. Recipients of VET01, 5te Edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2020): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET01S, 5te Edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2023): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. CLSI supplement VET01S, 6te Edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

CLSI (2024): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI supplement M100. 34te Edition. In: Clinical and Laboratory Standards Institute

COX, G. u. G. D. WRIGHT (2013):

Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions.

Int. J. Med. Microbiol. 303(6-7), 287–292

DACHE, A, A. DONA u. A. EJESO (2021):

Inappropriate use of antibiotics, its reasons and contributing factors among communities of Yirgalem town, Sidama regional state, Ethiopia: A cross-sectional study.

SAGE Open Med. 9:20503121211042461

DAFALE, N. A., S. SRIVASTAVA u. H. J. PUROHIT (2020):

Zoonosis: An emerging link to antibiotic resistance under “one health approach”.

Indian J. Microbiol. 60(2), 139–152

DAHMS, C., N. O. HÜBNER, A. KOSSOW, A. MELLMANN, K. DITTMANN u. A. KRAMER (2015):

Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany.

PLoS One. 10(11), e0143326

DANKMEIER, S. B. AL-NAWAS u. P. M. SHAH (2003):

Empfindlichkeitsprüfung von *Candida* Species unter Anwendung des kommerziellen Agardiffusionsverfahrens mit LD 2-Ringen für die Routinediagnostik.

Laboratoriums Medizin 27(9-19), 322–407

DART (2020): Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier. Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. Online verfügbar unter: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/antibiotika-resistenzstrategie.html>

DART (2030): Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier. Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie. Online verfügbar unter: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/antibiotika-resistenzen/dart-2030.html>

DAVIES, J. u. D. DAVIES (2010):
Origins and evolution of antibiotic resistance.
Microbiol Mol Biol Rev. 74(3), 417–33

DAVISON, J. (1999):
Genetic exchange between bacteria in the environment.
Plasmid 42(2), 73–91

DI FRANCESCO, A., D. SALVATORE, S. SAKHRIA, E. CATELLI, C. LUPINI, M. S. ABBASSI, G. BESSOUSSA, S. BEN YAHIA u. N. BEN CHEHIDA (2021):
High frequency and diversity of tetracycline resistance genes in the microbiota of broiler chickens in Tunisia.
Animals 11(2), 377

DING, D., B. WANG, X. ZHANG, J. ZHANG, H. ZHANG, X. LIU, Z. GAO u. Z. YU (2023):
The spread of antibiotic resistance to humans and potential protection strategies.
Ecotoxicol Environ Saf. 254, 114734

DOREY, L. u. P. LEES (2017):
Impact of growth matrix on pharmacodynamics of antimicrobial drugs for pig pneumonia pathogens.
BMC Vet. Res. 13(1), 192

DROUAL, R., H. L. SHIVAPRASAD, C. U. METEYER, D. P. SHAPIRO u. R. L. WALKER (1992):
Severe mortality in broiler chickens associated with *Mycoplasma synoviae* and *Pasteurella gallinarum*.
Avian Dis. 36(3), 803–807

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. Online verfügbar unter <https://www.dsmz.de/>

DUDEK, K., R. A. J. NICHOLAS, E. SZACAWA u. D. BEDNAREK (2020):
Mycoplasma bovis infections: Occurrence, pathogenesis, diagnosis and control.
Pathogens 9(12), 994

EFSA BIOHAZ PANEL (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS),
KOUTSOUMANIS, K., A. ALLENDE, A. ALVAREZ-ORDÓÑEZ, D. BOLTON, S.
BOVER-CID, M. CHEMALY, R. DAVIES, A. DE CESARE, L. HERMAN, F. HILBERT,
R. LINDQVIST, M. NAUTA, G. RU, M. SIMMONS, P. SKANDAMIS, E. SUFFREDINI,
H. ARGÜELLO-RODRÍGUEZ, W. DOHMEN, C. F. MAGISTRALI, B. PADALINO, B.-
A. TENHAGEN, J. THRELFALL, R. GARCÍA FIERRO, B. GUERRA, E. LIÉBANA, P.
STELLA U. P. PEIXE (2022):
Transmission of antimicrobial resistance (AMR) during animal transport
EFSA Journal 20(11), 7586

EGERVÄRN, M., H. LINDMARK, S. ROOS, G. HUYS u. S. LINDGREN (2007):
Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing
of lactic acid bacteria.
Antimicrob. Agents Chemother. 51(1), 394–396

EHSAN, M., M. HASSANZADEH, A. BARRIN, M. H. BOZORGMEHRI FARD, M.
ASKARI BADOUEI, A. GHALYANCHILANGEROUDI, L. TEMPLE u. S. TURKYILMAZ
(2020):
A study on isolation and molecular identification of *Bordetella avium* from Iranian
commercial and backyard broiler turkeys within 2016-2018.
Arch. Razi Inst. 75(2), 179–186

ELBEHIRY, A., M. ALDAIBAIB u. E. MARZOUK (2016):
Serological, rapid molecular characterization and antibiogram resistance for field
isolates of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken in Saudi Arabia.
Alex. J. Vet. Sci. 49(2), 70–79

ERFAN, A. M., J. BADR u. M. ABD-ELHALIM (2018):
First record of *Bordetella avium* in Egyptian Turkey flocks.
Bioscience Research 15(3), 2583–2590

ERICSON, H. M. u. J. C. SHERRIS (1971):

Antibiotic sensitivity testing. Report of an international collaborative study.

Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 217, 1+

EUCAST (2021): European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Online verfügbar unter: <http://www.eucast.org/>

EWERS, C. u. WIELER, L. H. (2015): *Pasteurellaceae*. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, S. 223–246. 10te Edition. Editoren: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P., Stuttgart, DE: Verlag Enke

FAJARDO, A., N. MARTÍNEZ-MARTÍN, M. MERCADILLO, J. C. GALÁN, B. GHYSELS, S. MATTHIJS, P. CORNELIS, L. WIEHLMANN, B. TÜMMLER, F. BAQUERO u. J. L. MARTÍNEZ (2008):

The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens.

PloS one 3(2), e1619

FALCONI-AGAPITO, F., L. E. SARAVIA, A. FLORES-PÉREZ u. M. FERNÁNDEZ-DÍAZ (2015):

Naturally occurring β -nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Avibacterium paragallinarum* isolate in Peru.

Avian Dis. 59(2), 341–343

FICKEN, M.D. (1983):

Antibiotic aerosolization for treatment of *Alcaligenes rhinotracheitis*.

Avian Dis. 27(2), 545–548

FLEMING A. (1929):

On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*.

Br. J. Exp. Pathol. 10(3), 226–236

FOUNOU, L. L., R. C. FOUNOU u. S. Y. ESSACK (2016):

Antibiotic resistance in the food chain: A developing country-perspective.

Front Microbiol. 7, 1881

FREDERIKSEN, W. u. B. TØNNING (2001):

Possible misidentification of *Haemophilus aphrophilus* as *Pasteurella gallinarum*.

Clin. Infect. Dis. 32(6), 987–989

FREUNDT, E. A. (1955):

The classification of the pleuropneumonia group of organisms (*Borrelomycetales*).

Int. Bull. Bacteriol. Nomencl. Taxon. 5, 67–78

FREUNDT, E. A. (1983): Culture media for classic mycoplasmas. Vol. I: Mycoplasma Characterization. In: *Methods in Mycoplasmaology*, S. 127–135. 1ste Edition. Editor: RAZIN, S., Cambridge, MA, USA: Academic Press

FREUNDT, E. A., R. F. WHITCOMB, M. F. BARILE, S. RAZIN u. J. G. TULLY (1984): Proposal for elevation of the Family *Acholeplasmataceae* to ordinal rank: Acholeplasmatales.

Int J Syst Bacteriol. 34(3), 346–349

FRIESE, A., J. SCHULZ, K. ZIMMERMANN, B. A. TENHAGEN, A. FETSCH, J. HARTUNG u. U. RÖSLER (2013):

Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity.

Appl Environ Microbiol. 79(8), 2759–2766

FRIIS, N. F. (1975):

Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suis pneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey.

Nord. Vet. Med. 27(6), 337–339

FUCHS, P. C., A. L. BARRY u. S. D. BROWN (2001):

Influence of variations in test methods on susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicillin, azithromycin, clarithromycin, and telithromycin.

J. Clin. Microbiol. 39(1), 43–46

GAJIC, I., J. KABIC, D. KEKIC, M. JOCICEVIC, M. MILENKOVIC, D. MITIC CULAFIC, A. TRUDIC, L. RANIN u. N. OPAVSKI (2022):

Antimicrobial susceptibility testing: a comprehensive review of currently used methods. Antibiotics 11(4), 427

GARCÍA-GALÁN, A., L.-X. NOUVEL, E. BARANOWSKI, A. GÓMEZ-MARTÍN, A. SÁNCHEZ, C. CITTI u. C. DE LA FE (2020):

Mycoplasma bovis in Spanish cattle herds: Two groups of multiresistant isolates predominate, with one remaining susceptible to fluoroquinolones.

Pathogens 9(7), 545

GAUTIER-BOUCHARDON, A. V., A. K. REINHARDT, M. KOBISCH u. I. KEMPF (2002):

In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*.

Vet: Microbiol. 88(1), 47–58

GAUTIER-BOUCHARDON, A. V., S. FERRÉ, D. LE GRAND, A. PAOLI, E. GAY u. F. POUMARAT (2014):

Overall decrease in the susceptibility of *Mycoplasma bovis* to antimicrobials over the past 30 years in France.

PloS one 9(2), e87672

GAUTIER-BOUCHARDON, A. V. (2018):

Antimicrobial resistance in *Mycoplasma* spp.

Microbiol. Spectr. 6(4)

GELGIE, A. E., M. G. KORSA u. O. KERRO DEGO (2022):

Mycoplasma bovis mastitis.

Curr. Res. Microb. Sci. 3, 100123

GERCHMAN, I., I. LYSNYANSKY, S. PERK u. S. LEVISOHN (2008):

In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from meat-type turkeys.

Vet. Microbiol. 131(3-4), 266–276

GERCHMAN, I., S. LEVISOHN, I. MIKULA u. I. LYSNYANSKY (2009):

In vitro antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolated in Israel from local and imported cattle.

Vet. Microbiol. 137(3-4), 268–275

GERCHMAN, I., S. LEVISOHN, I. MIKULA, L. MANSO-SILVÁN u. I. LYSNYANSKY (2011):

Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry.

Vet. Res. 42, 90

GHARAIBEH, S. u. M. AL-RASHDAN (2011):

Change in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* field isolates.

Vet. Microbiol. 150(3-4), 379–383

GODINHO, K. S. (2008):

Susceptibility testing of tulathromycin: interpretative breakpoints and susceptibility of field isolates.

Vet. Microbiol. 129(3-4), 426–432

GOER, A, L. S. BLANCHARD, A. VAN BELKUM, K. J. LOFTUS, T. P. ARMSTRONG, S. G. GATERMANN, D. SHORTRIDGE, B. J. OLSON, J. K. MEECE, T. R. FRITSCH, M. POMPILIO, D. HALIMI u. C. FRANCESCHI (2022):

Multicenter evaluation of the Novel ETEST fosfomicin for antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacterales*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus* Species.

J Clin Microbiol. 60(7), e0002122

GÓMEZ-MARTÍN, A., C. DE LA FE, J. AMORES, A. SÁNCHEZ, A. CONTRERAS, A. PATERNA, A. J. BUENDÍA u. J. C. CORRALES (2012):

Anatomic location of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma agalactiae* in naturally infected goat male auricular carriers.

Vet. Microbiol. 157(3-4), 355–362

GONZALEZ, R. N., P. M. SEARS, R. A. MERRILL u. G. L. HAYES (1992):

Mastitis due to *Mycoplasma* in the state of New York during the period 1972-1990.

Cornell Vet. 82(1), 29–40

GRAF, F. E., M. PALM, J. WARRINGER u. A. FAREWELL (2019):

Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance.

Drug Dev. Res. 80(1), 19–23

GRESPLAN, A., O. CAMERA, T. KNÖBL, C. R. GOMES, M. R. FELIZARDO, T. S. P. FERREIRA, D. D. S. GOBBI, M. MORENO, A. A. SANCHES, C. S. A. FERREIRA, A. J. P. FERREIRA u. A. M. MORENO (2012):

Virulence and molecular aspects of *Bordetella avium* isolated from cockatiel chicks (*Nymphicus hollandicus*) in Brazil.

Vet. Microbiol. 160(3-4), 530–534

GRÓZNER, D., Z. KREIZINGER, K. M. SULYOK, Z. RÓNAI, V. HRIVNÁK, I. TURCSÁNYI, S. JÁNOSI u. M. GYURANECZ (2016):

Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma* sp. 1220 strains isolated from geese in Hungary.

BMC Vet Res. 12(1), 170

GUO, M., X. CHEN, H. ZHANG, D. LIU, Y. WU u. X. ZHANG (2022):

Isolation, serovar identification, and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* from chickens in China from 2019 to 2020.

Vet. Sci. 9(1), 27

GÜTGEMANN, F., A. MÜLLER, Y. CHURIN, A. JUNG, A.-S. BRAUN, M. YUE u. C. KEHRENBURG (2022a):

Development of a harmonized method for antimicrobial susceptibility testing of *Bordetella avium* using broth microdilution and detection of resistance genes.

J. Appl. Microbiol. 132(3), 1775–1787

GÜTGEMANN, F., A. MÜLLER, Y. CHURIN, A. JUNG, F. KUMM, A. HEUVELINK, M. YUE u. C. KEHRENBURG (2022b):

Proposal of a method for harmonized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium gallinarum*.

J. Clin. Microbiol. 60(8), e0041922

GÜTGEMANN, F., MÜLLER, A., CHURIN, Y., KUMM, F., BRAUN, A.-S., YUE, M, EISENBERG, T., ENTORF, M., PETERS, T. u. C. KEHRENBURG (2023):

Toward a method for harmonized susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* by broth microdilution.

J. Clin. Microbiol. 61(8), e0190522

GÜTGEMANN, F., HEUVELINK, A., MÜLLER, A., CHURIN, Y., BUTER, R., JUNG, A., FEBERWEE, A., WIEGEL, J., KUMM, F., BRAUN, A.-S., YUE, M., SORIANO-VARGAS, E., SWANEPOEL, S., BOTTELDOORN, N., KIRCHNER, M. u. C. KEHRENBURG (2022b):

Recommendation of a standardized broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Avibacterium paragallinarum* and resistance monitoring.

J. Clin. Microbiol. 62(3), e0101123

HANNAN, P. C., P. J. O'HANLON u. N. H. ROGERS (1989):

In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens.

Res. Vet. Sci. 46(2), 202–211

HANNAN, P. C., G. D. WINDSOR, A. DE JONG, N. SCHMEER u. M. STEGEMANN (1997):

Comparative susceptibilities of various animal-pathogenic mycoplasmas to fluoroquinolones.

Antimicrob. Agents Chemother. 41(9), 2037–2040

HANNAN, P. C. (2000):

Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International research programme on comparative mycoplasmaology.

Vet. Res. 31(4), 373–395

HANSEN, M. J., M. F. BERTELSEN, R. DIETZ, C. SONNE u. A. M. BOJESEN (2013):
A simple and novel method for retrieval of *Pasteurellaceae* from swab samples collected in the field.

MicrobiologyOpen 2(5), 795–797

HARRINGTON, A. T., J. A. CASTELLANOS, T. M. ZIEDALSKI, J. E. CLARRIDGE u. B. T. COOKSON (2009):

Isolation of *Bordetella avium* and novel *Bordetella* strain from patients with respiratory disease.

Emerg. Infect. Dis. 15(1), 72–74

HAYFLICK, L. (1965):

Tissue cultures and mycoplasmas.

Tex. Rep. Biol. Med. 23(1), 285+

HENDRICK, S. H., K. G. BATEMAN u. L. B. ROSENGREN (2013):

The effect of antimicrobial treatment and preventive strategies on bovine respiratory disease and genetic relatedness and antimicrobial resistance of *Mycoplasma bovis* isolates in a western Canadian feedlot.

Can. Vet. J. 54(12), 1146–1156

HEUVELINK, A., C. REUGEBRINK u. J. MARS (2016):

Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma bovis* isolates from veal calves and dairy cattle in the Netherlands.

Vet. Microbiol. 189, 1–7

HEUVELINK, A., J. WIEGEL, C. KEHRENBURG, R. DIJKMAN, E. SORIANO-VARGAS u. A. FEBERWEE (2018):

Antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates from outbreaks of infectious coryza in Dutch commercial poultry flocks, 2008-2017.

Vet. Microbiol. 217, 135–143

- HINZ, K. H. (1973):
Beitrag zur Differenzierung von *Haemophilus*-Stämmen aus Hühnern*: I. Mitteilung:
Kulturelle und biochemische Untersuchungen.
Avian Pathol. 2(3), 211–229
- HINZ, K. H. (1976):
Beitrag zur Differenzierung von *Haemophilus*-Stämmen aus Hühnern. IV. Mitteilung:
Untersuchungen Über die Dissoziation von *Haemophilus paragallinarum*.
Avian Pathol. 5, 51–66
- HINZ, K. H., G. GLÜNDER u. H. LÜDERS (1978):
Acute respiratory disease in turkey poultts caused by *Bordetella bronchiseptica*-like
bacteria.
Vet Rec. 103(12), 262–263
- HORWITZ, W. (1994):
Nomenclature of interlaboratory analytical studies (IUPAC Recommendations 1994).
Pure Appl. Chem. 66, 1903
- HSU, Y.-M., H. K. SHIEH, W.-H. CHEN, T.-Y. SUN u. J.-H. SHIANG (2007):
Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium*
paragallinarum strains.
Vet. Microbiol. 124(3-4), 209–218
- HUANG, Z., Y. WU, Z. ZHOU, X. XIA, X. GU, Q. CAI, X. SHEN, H. YANG u. H. DING
(2019):
Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration and resistance analysis of
tilmicosin against *Mycoplasma gallisepticum* in an in vitro dynamic model.
Front. Pharmacol. 10, 670
- HUIJBERS, P. M., A. H. VAN HOEK, E. A. GRAAT, A. P. HAENEN, A. FLORIJN, P.
D. HENGEVELD u. E. VAN DUIJKEREN (2015):
Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and extended-spectrum and *AmpC* β -
lactamase-producing *Escherichia coli* in broilers and in people living and/or working on
organic broiler farms.
Vet Microbiol. 176(1–2), 120–125

- IBEKWE, A. M., A. S. BHATTACHARJEE, D. PHAN, D. ASHWORTH, M. P. SCHMIDT, S. E. MURINDA, A. OBAYIUWANA, M. A. MURRY, G. SCHWARTZ, T. LUNDQUIST, J. MA, H. KARATHIA, B. FANELLI, N. A. HASAN u. C. H. YANG (2023): Potential reservoirs of antimicrobial resistance in livestock waste and treated wastewater that can be disseminated to agricultural land. *Sci Total Environ.* 872, 162194
- JACKWOOD, M. W., Y. M. SAIF u. D. L. COPLIN (1987): Isolation and characterization of *Bordetella avium* plasmids. *Avian Dis.* 31(4), 782–786
- JACKWOOD, M. W., D. A. HILT u. P. A. DUNN (1991): Observations on colonial phenotypic variation in *Bordetella avium*. *Avian Dis.* 35(3), 496–504
- JANETZKO, K., G. RINK, A. HECKER, K. BIEBACK, H. KLÜTER u. P. BUGERT (2014): A single-tube real-time PCR assay for mycoplasma detection as a routine quality control of cell therapeutics. *Transfus. Med. Hemotherapy.* 41(1), 83–89
- JAYĚ, M., F. POUMARAT, A. COLIN, A. TRICOT u. F. TARDY (2021): Addressing the antimicrobial resistance of ruminant mycoplasmas using a clinical surveillance network. *Front. Vet. Sci.* 8, 667175
- JELINSKI, M., A. KINNEAR, K. GESY, S. ANDRÉS-LASHERAS, R. ZAHEER, S. WEESE u. T. A. MCALLISTER (2020): Antimicrobial sensitivity testing of *Mycoplasma bovis* isolates derived from western Canadian feedlot cattle. *Microorganisms* 8(1), 124
- JEONG, O.-M., M.-S. KANG, B.-W. JEON, B.-K. CHOI, Y.-K. KWON, S.-Y. YOON, P. J. BLACKALL, H. S. LEE, S. C. JUNG u. J. H. KIM (2017): Isolation and characterization of *Avibacterium paragallinarum* with different nicotinamide adenine dinucleotide requirements. *Vet. Microbiol.* 205, 62–65
- JOHNSON, J., S. BOUCHILLON u. D. PONTANI (1999):

The effect of carbon dioxide on susceptibility testing of azithromycin, clarithromycin and roxithromycin against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* by broth microdilution and the Etest: Artemis project-first-phase study.

Clin. Microbiol. Infect. 5(6), 327–330

JOHNSON, A. P. (2015):

Surveillance of antibiotic resistance.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 370(1670), 20140080

DE JONG, A., M. YOUALA, U. KLEIN, F. EL GARCH, S. SIMJEE, H. MOYAERT, M. ROSE, A. V. GAUTIER-BOUCHARDON, S. CATANIA, K. GANAPATHY, M. GYURANECZ, F. MÖLLER PALAU-RIBES, A. PRIDMORE u. R. D. AYLING (2021):
Minimal inhibitory concentration of seven antimicrobials to *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from six European countries.

Avian Path. 50(2), 161–173

JOSI, C., S. BÜRKI, A. STOJILJKOVIC, O. WELLNITZ, M. H. STOFFEL u. P. PILO (2018):

Bovine epithelial in vitro infection models for *Mycoplasma bovis*.

Front. Cell. Infect. Microbiol. 8, 329

KÄBISCH, L., A. K. SCHINK, D. HÖLTING, J. SPERGSER, C. KEHRENBURG u. S. SCHWARZ (2023):

Towards a standardized antimicrobial susceptibility testing method for *Mycoplasma hyorhinis*.

Microorganisms 11(4), 994

KAHLMETER, G., D. F. J. BROWN, F. W. GOLDSTEIN, A. P. MACGOWAN, J. W. MOUTON, A. OSTERLUND, A. RODLOFF, M. STEINBAKK, P. URBASKOVA u. A. VATOPOULOS (2003):

European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria.

J. Antimicrob. Chemother. 52 (2), 145–148

KAHLMETER, G., D. F. BROWN, F. W. GOLDSTEIN, A. P. MACGOWAN, J. W. MOUTON, I. ODENHOLT, A. RODLOFF, C. J. SOUSSY, M. STEINBAKK, F. SORIANO u. STETSIOUK O. (2006):

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) technical notes on antimicrobial susceptibility testing.

Clin Microbiol Infect. 12(6), 501–3

KAHLMETER, G. (2014):

Defining antibiotic resistance-towards international harmonization.

Ups J Med Sci. 119(2), 78–86

KAHLMETER, G. u. J. TURNIDGE (2022):

How to: ECOFFs-the why, the how, and the don'ts of EUCAST epidemiological cutoff values.

Clin Microbiol Infect. 28(7), 952–954

KAHLMETER, G. u. J. TURNIDGE (2023):

Wild-type distributions of minimum inhibitory concentrations and epidemiological cut-off values-laboratory and clinical utility.

Clin Microbiol Rev. 36(4), e0010022

KAMARUZAMAN, I. N. A., K. Y. NG, R. H. HAMDAN, N. SHAHARULNIZIM, C. W. S. C. W. ZALATI, M. MOHAMED, M. L. NORDIN, N. Z. I. M. RAJDI, L. ABU-BAKAR u. M. F. H. REDUAN (2021):

Complex chronic respiratory disease concurrent with coccidiosis in broiler chickens in Malaysia: A case report.

J. Adv. Vet. Anim. Res. 8(4), 576–580

KAPOOR, G., S. SAIGAL u. A. ELONGAVAN (2017):

Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians.

J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol. 33(3), 300–305

KARVELLAS, C. J., J. G. ABRALDES, Y. M. ARABI u. A. KUMAR (2015):

Appropriate and timely antimicrobial therapy in cirrhotic patients with spontaneous bacterial peritonitis-associated septic shock: a retrospective cohort study.

Aliment. Pharmacol. Ther. 41(8), 747–757

KAWAI, K., H. HIGUCHI, H. IWANO, A. IWAKUMA, K. ONDA, R. SATO, T. HAYASHI, H. NAGAHATA u. T. OSHIDA (2014):

Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma* isolated from bovine mastitis in Japan.

Anim. Sci. J. 85(1), 96–99

KEHRENBURG, C., S. A. SALMON, J. L. WATTS u. S. SCHWARZ (2001):

Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the *tet(H)* plasmid pMHT1.

J Antimicrob Chemother. 48(5), 631–640

KEHRENBURG, C. u. S. SCHWARZ (2006):

Distribution of florfenicol resistance genes *fexA* and *cfp* among chloramphenicol-resistant *Staphylococcus* isolates.

Antimicrob. Agents Chemother. 50(4), 1156–1163

KELLY, M. T. u. J. M. MATSEN (1976):

In vitro activity, synergism, and testing parameters of amikacin, with comparisons to other aminoglycoside antibiotics.

Antimicrob Agents Chemother. 9(3), 440–447

KELLY B. J., G. Y. GHAZIKHANIAN u. B. MAYEDA (1986):

Clinical outbreak of *Bordetella avium* infection in two turkey breeder flocks.

Avian Dis. 30(1), 234–237

KHATOON, H., F. AFZAL, M. F. TAHIR, M. HUSSAIN u. S. U. KHAN (2018):

Prevalence of mycoplasmosis and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* in commercial chicken flocks of Rawalpindi Division, Pakistan.

PVJ 38(04), 446–448

KING, A., u. D. F. BROWN (2001):

Quality assurance of antimicrobial susceptibility testing by disc diffusion.

J. Antimicrob. Chemother. 48(1), 71–76

KINNEAR, A., T. A. MCALLISTER, R. ZAHEER, M. WALDNER, A. C. RUZZINI, S.

ANDRÉS-LASHERAS, S. PARKER, J. E. HILL u. M. D. JELINSKI (2020):

Investigation of macrolide resistance genotypes in *Mycoplasma bovis* isolates from Canadian Feedlot Cattle.

Pathogens 9(8), 622

KLEIN, U., A. DE JONG, H. MOYAERT, F. EL GARCH, R. LEON, A. RICHARD-

MAZET, M. ROSE, D. MAES, A. PRIDMORE, J. R. THOMSON u. R. D. AYLING

(2017):

Antimicrobial susceptibility monitoring of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma bovis* isolated in Europe.

Vet. Microbiol. 204, 188–193

KLEIN, U., A. DE JONG, M. YOUALA, F. EL GARCH, C. STEVENIN, H. MOYAERT, M. ROSE, S. CATANINA, M. GYURANECZ, A. PRIDMORE u. R. D. AYLING (2019): New antimicrobial susceptibility data from monitoring of *Mycoplasma bovis* isolated in Europe.

Vet. Microbiol. 238, 108432

KLEVEN, S. H. u. S. LEVISOHN (1996): Mycoplasma infections of poultry. World Poultry. In: *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma* (II), S. 283–292

KLEVEN, S. H. (2003):

Recent developments in diagnosis and control. Mycoplasma special.

World Poult. 19, 8–9

KNAB, R., H. PETERSEN, S. RAUTENSCHLEIN u. A. JUNG (2018):

Establishment of a *Bordetella avium* challenge model in turkeys.

Avian Path. 47(3), 227–237

KOLBERT, M. u. P. M. SHAH (2005):

Diffusion oder Dilution: Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung im Routinelabor/Diffusion or Dilution: Antimicrobial Susceptibility Testing in Routine Laboratories.

Laboratoriums Medizin 26(7–8), 420424

KONG, L.-C., D. GAO, B.-Y. JIA, Z. WANG, Y.-H. GAO, Z.-H. PEI, S. M. LIU, J. Q. XIN u. H. X. MA (2016):

Antimicrobial susceptibility and molecular characterization of macrolide resistance of *Mycoplasma bovis* isolates from multiple provinces in China.

J. Vet. Med. Sci. 78(2), 293–296

KOWALSKA-KROCHMAL, B. u. R. DUDEK-WICHER (2021):

The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance.

Pathogens 10(2), 165

KREIZINGER Z., D. GRÓZNER D, K. M. SULYOK, K. NILSSON, V. HRIVNÁK, D. BENČINA u. M. GYURANECZ (2017):

Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma synoviae* strains originating from Central and Eastern Europe.

BMC Vet Res. 13(1), 342

KROEMER, S., D. GALLAND, V. GUÉRIN-FAUBLÉE, H. GIBOIN u. F. WOEHLÉ-FONTAINE (2012):

Survey of marbofloxacin susceptibility of bacteria isolated from cattle with respiratory disease and mastitis in Europe.

Vet. Rec. 170(2), 53

KUMAR, A., D. ROBERTS, K. E. WOOD, B. LIGHT, J. E. PARRILLO, S. SHARMA, R. SUPPES, D. FEINSTEIN, S. ZANOTTI, L. TAIBERG, D. GURKA u. A. KUMAR (2006):

Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock.

Crit. Care Med. 34(6), 1589–1596

LA CRUZ, L. DE, M. BARRERA, L. RIOS, B. CORONA-GONZÁLEZ, C. A. BULNES, A. A DÍAZ-SÁNCHEZ, J. A AGÜERO, E. LOBO-RIVERO u. L. J. PÉREZ (2020):

Unraveling the global phylodynamic and phylogeographic expansion of *Mycoplasma gallisepticum*: Understanding the origin and expansion of this pathogen in Ecuador.

Pathogens 9(9), 674

LALLEMAND, E. A., M. Z. LACROIX, P.-L. TOUTAIN, S. BOULLIER, A. A. FERRAN u. A. BOUSQUET-MELOU (2016):

In vitro degradation of antimicrobials during use of broth microdilution method can increase the measured minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations.

Front. Microbiol. 7, 2051

LAUBE, H., A. FRIESE, C. SALVIATI, B. GUERRA u. U. RÖSLER (2014):

Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas.

Vet Microbiol. 172(3–4), 519–527

LI, B.-B., J.-Z. SHEN, X.-Y. CAO, Y. WANG, L. DAI, S.-Y. HUANG u. C.-M. WU (2010):

Mutations in 23S rRNA gene associated with decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin in *Mycoplasma gallisepticum*.

FEMS Microbiol. Lett. 308(2), 144–149

LI, J., S. XIE, S. AHMED, F. WANG, Y. GU, C. ZHANG, W. CHAI, Y. WU, J. CAI u. G. CHENG (2017):

Antimicrobial activity and resistance: Influencing factors.

Front. Pharmacol. 8, 364

LI, P., T. ZHU, D. ZHOU, W. LU, H. LIU, Z. SUN, J. YING, J. LU, X. LIN, K. LI, J. YING, Q. BAO u. T. XU (2020):

Analysis of resistance to florfenicol and the related mechanism of dissemination in different animal-derived bacteria.

Front. Cell. Infect. Microbiol. 10, 369

LI, F., X.-S. XIONG, Y.-Y. YANG, J.-J. WANG, M.-M. WANG, J.-W. TANG, Q. H. LIU, L. WANG u. B. GU (2021):

Effects of NaCl concentrations on growth patterns, phenotypes associated with virulence, and energy metabolism in *Escherichia coli* BW25113.

Front. Microbiol. 12, 705326

LIU, Y., S. XU, M. LI, M. ZHOU, W. HUO, J. GAO, (2020):

Molecular characteristics and antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* associated with mastitis on dairy farms in China.

Prev. Vet. Med. 182, 105106

LONSWAY, D. R., L. A. JEVITT, J. R. UHL, F. R. COCKERILL, M. E. ANDERSON, M. M. SULLIVAN, E. J. R. DE BK u. J. B. PATEL (2009):

Effect of carbon dioxide on broth microdilution susceptibility testing of *Brucella* spp.

J. Clin. Microbiol. 48(3), 952–956

LOOSE, M., K. G. NABER, A. COATES, F. M. E. WAGENLEHNER u. Y. HU (2020):

Effect of different media on the bactericidal activity of colistin and on the synergistic combination with azidothymidine against *mcr-1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli*.

Front. Microbiol. 11,54

LÜBKE-BECKER, A. (2015): Antimikrobielle Wirkstoffe. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, S. 141–145. 10te Edition. Editoren: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P., Stuttgart, DE: Verlag Enke

LUNA-CASTREJÓN, L. P., R. BUTER, G. I. PANTOJA-NUÑEZ, M. ACUÑA-YANES, K. CEBALLOS-VALENZUELA, M. TALAVERA-ROJAS, C. SALGADO-MIRANDA, A. HEUVELINK, S. DE WIT, E. SORIANO-VARGAS u. A. FEBERWEE (2021):

Identification, HPG2 sequence analysis, and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial layers in Sonora State, Mexico.

Avian Dis. 65(1), 95–101

LYSNYANSKY, I., I. GERCHMAN, S. PERK u. S. LEVISOHN (2008):

Molecular characterization and typing of enrofloxacin-resistant clinical isolates of *Mycoplasma gallisepticum*.

Avian Dis. 52(4), 685–689

LYSNYANSKY, I., I. GERCHMAN, S. LEVISOHN, I. MIKULA, A. FEBERWEE, N. M. FERGUSON, A. H. NOORMOHAMMADI, J. SPERGSER u. H. M. WINDSOR (2012):

Discrepancy between minimal inhibitory concentration to enrofloxacin and mutations present in the quinolone-resistance determining regions of *Mycoplasma gallisepticum* field strains.

Vet. Microbiol. 160(1–2), 222–226

LYSNYANSKY I., I. GERCHMAN, B. FLAMINIO u. S. CATANIA (2015):

Decreased susceptibility to macrolide-lincosamide in *Mycoplasma synoviae* is associated with mutations in 23S ribosomal RNA.

Microb Drug Resist. 21(6), 581–589

LYSNYANSKY, I. u. R. D. AYLING (2016):

Mycoplasma bovis: Mechanisms of resistance and trends in antimicrobial susceptibility.

Front. Microbiol. 7, 595

LYU, Q., K. BAI, Y. KAN, N. JIANG, S. P. THAPA, G. COAKER, (2019):

Variation in streptomycin resistance mechanisms in *Clavibacter michiganensis*.

Phytopathology 109(11), 1849–1858

MAGIORAKOS, A.-P., A. SRINIVASAN, R. B. CAREY, Y. CARMELI, M. E. FALAGAS, C. G. GISKE, S. HARBARTH, J. F. HINDLER, G. KAHLMETER, B. OLSSON-LILJEQUIST, D. L. PATERSON, L. B. RICE, J. STELLING, M. J. STRUELENS, A. VATOPOULOS, J. T. WEBER u. D. L. MONNET (2012):

Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.

Clin. Microbiol. Infect. 18(3), 268–281

MANCABELLI, L., C. FERRARIO, C. MILANI, M. MANGIFESTA, F. TURRONI, S. DURANTI, G. A. LUGLI, A. VIAPPIANI, M. C. OSSIPRANDI, D. VAN SINDEREN u. M. VENTURA (2016):

Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens.

Environ Microbiol 18(12), 4727–4738

MAROUF, S., M. A. KHALF, M. ALORABI, A. M. EL-SHEHAWI, A. M. EL-TAHAN, M. E. A. EL-HACK, M. T. EL-SAADONY u. H. M. SALEM (2022):

Mycoplasma gallisepticum: a devastating organism for the poultry industry in Egypt.

Poult Sci. 101(3), 101658

MAUNSELL, F. P., A. R. WOOLUMS, D. FRANCOZM R. F. ROSENBUSCH, D. L. STEP, D. J. WILSON u. E. D. JANZEN (2011):

Mycoplasma bovis infections in cattle.

J. Vet. Intern. Med. 25(4), 772–783

MCAULIFFE, L., R. J. ELLIS, K. MILES, R. D. AYLING u. R. A. J. NICHOLAS (2006):
Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival.

Microbiology 152(4), 913–922

MCDUGAL, L. K., C. D. STEWARD, G. E. KILLGORE, J. M. CHAITRAM, S. K. MCALLISTER u. F. C. TENOVER (2003):

Pulsed-field gel electrophoresis typing of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from the United States: Establishing a national database.

J. Clin. Microbiol. 41(11), 5113–5120

MIFTAHUSSURUR, M., K. A. FAUZIA, I. A. NUSI, P. B. SETIAWAN, A. F. SYAM, L. A. WASKITO, D. DOOHAN, N. RATNASARI, A. KHOMSAN, I. K. ADNYANA, J. AKADA u. Y. YAMAOKA (2020):

E-test versus agar dilution for antibiotic susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: a comparison study.

BMC Res Notes. 13(1), 22

MIGAKI, T. T, A. P. AVAKIAN, H. J. BARNES, D. H. LEY, A. C. TANNER u. R. A. MAGONIGLE (1993):

Efficacy of danofloxacin and tylosin in the control of mycoplasmosis in chicks infected with tylosin-susceptible or tylosin-resistant field isolates of *Mycoplasma gallisepticum*.

Avian Dis. 37(2), 508

- MOHAN, K., F. DZIVA u. D. CHITAURO (2000):
Pasteurella gallinarum: Zimbabwean experience of a versatile pathogen.
 Onderstepoort J. Vet. Res. 67(4), 301–305
- MORROW C. J., Z. KREIZINGER, R. R. ACHARI, K. BEKŐ, C. YVON u. M. GYURANECZ (2020):
 Antimicrobial susceptibility of pathogenic mycoplasmas in chickens in Asia.
 Vet Microbiol. 250, 108840
- MORTENSEN, J. E., A. BRUMBACH u. T. R. SHRYOCK (1989):
 Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Bordetella bronchiseptica* isolates.
 Antimicrob. Agents Chemother. 33(5), 771–772
- MUHAIRWA, A. P., M. M. MTAMBO, J. P. CHRISTENSEN u. M. BISGAARD (2001):
 Occurrence of *Pasteurella multocida* and related species in village free ranging chickens and their animal contacts in Tanzania.
 Vet Microbiol. 78(2), 139–153
- MÜLLER, A., W. JANSEN, N. T. GRABOWSKI, S. MONECKE, R. EHRICHT u. C. KEHRENBURG (2018):
 ESBL- and *AmpC*-producing *Escherichia coli* from legally and illegally imported meat: Characterization of isolates brought into the EU from third countries.
 Int. J. Food Microbiol. 283, 52–58
- MUSHIN, R., R. BOCK u. M. ABRAMS (1977):
 Studies on *Pasteurella gallinarum*.
 Avian Pathol. 6(4), 415–423
- MUSSER, J. M., D. A. BEMIS, H. ISHIKAWA u. R. K. SELANDER (1987):
 Clonal diversity and host distribution in *Bordetella bronchiseptica*.
 J. Bacteriol. Res. 169(6), 2793–2803
- NAIR, J., D. A. ROUSE, G. H. BAI u. S. L. MORRIS (1993):
 The *rpsL* gene and streptomycin resistance in single and multiple drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*.
 Mol. Microbiol. 10(3), 521–527
- NICHOLAS. R. u. S. BAKER (1998): Recovery of Mycoplasmas from animals. In: *Mycoplasma Protocols*, S. 37–43, 104te Edition. Totowa, NJ, USA: Humana Press
- NIKFARJAM, L. u. P. FARZANEH (2011):

Prevention and detection of *Mycoplasma* contamination in cell culture.

Cell J. 13(4), 203–212

NIKFARJAM, L. u. P. FARZANEH (2011):

Prevention and detection of *Mycoplasma* contamination in cell culture.

Cell J. 13(4), 203–212

NOONKHOKHETKONG, T., K. CHUKIATSIRI, J. SASIPREEYAJAN u. N. CHANSIRIPORNCHAI (2013):

Determination of antimicrobial susceptibility, antimicrobial resistance genes and in vivo testing of antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum*.

Thai J. Vet. Med. 43(4), 525–531

ODUGBO, M. O., U. MUSA, S. O. EKUNDAYO, P. A. OKEWOLE u. J. ESILONU (2006):

Bordetella avium infection in chickens and quail in Nigeria: Preliminary investigations.

Vet. Res. Commun. 30, 1–5

OLADEINDE, A., Z. ABDO, M. O. PRESS, K. COOK, N. A. COX, B. ZWIRZITZ, R. WOYDA, S. M. LAKIN, J. C. 4TH THOMAS, T. LOOFT, D. E. COSBY, A. Jr HINTON, J. GUARD, E. LINE, M. J. ROTHROCK, M. E. BERRANG, K. HERRINGTON, G. ZOCK, J. PLUMBLEE LAWRENCE, D. CUDNIK, S. HOUSE, K. INGRAM, L. LARISCY, M. WAGNER, S. E. AGGREY, L. CHAI u. C. RITZ (2021):

Horizontal gene transfer is the main driver of antimicrobial resistance in broiler chicks infected with *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg.

mSystems 6(4), e0072921.

PAGE, L. A. (1962):

Haemophilus infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens.

Am. J. Vet. Res. 23, 85–95

PANIGRAHY, B., L. C. GRUMBLES, R. J. TERRY, D. L. MILLA u. C. F. HALL (1981):

Bacterial coryza in turkeys in Texas.

Poult. Sci. 60(1), 107–113

PARDON, B., J. CALLENS, J. MARIS, L. ALLAIS, W. VAN PRAET, P. DEPREZ u. S. RIBBENS (2020):

Pathogen-specific risk factors in acute outbreaks of respiratory disease in calves.

J. Dairy Sci. 103(3), 2556–2566

PENG, M., S. SALAHEEN u. D. BISWAS (2014): Animal health: Global antibiotic issues. In: Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. S. 346–357. 2te Edition. Editor: VAN ALFEN, N. K., Academic Press

PRÜLLER, S., C. FRÖMKE, H. KASPAR, G. KLEIN, L. KREIENBROCK u. C. KEHRENBURG (2015):

Recommendation for a standardised method of broth microdilution susceptibility testing for porcine *Bordetella bronchiseptica*.

PloS one 10(4), e0123883

PRÜLLER, S. (2016):

Entwicklung von Methoden zur Empfindlichkeitstestung von *Bordetella bronchiseptica* und *Haemophilus parasuis* im Bouillon-Mikrodilutionsverfahren.

Bibliothek der Tierärztlichen Hochschule Hannover

PRÜLLER, S., C. TURNI, P. J. BLACKALL, M. BEYERBACH, G. KLEIN, L. KREIENBROCK, K. STRUTZBERG-MINDER, H. KASPAR, D. MEEMKEN u. C. KEHRENBURG (2017):

Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis*.

J. Clin. Microbiol. 55(1), 264–273

RAFFEL, T. R., K. B. REGISTER, S. A. MARKS u. L. TEMPLE (2002):

Prevalence of *Bordetella avium* infection in selected wild and domesticated birds in the eastern USA.

J. Wildl. Dis. 38(1), 40–46

REGISTER, K. B., R. E. SACCO u. S. C. OLSEN (2013):

Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Mycoplasma bovis*-specific antibody in bison sera.

Clin Vaccine Immunol. 20(9), 1405–1409

RELLER, L. B., M. WEINSTEIN, J. H. JORGENSEN u. M. J. FERRARO (2009):

Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices.

Clin. Infect. Dis. 49(11), 1749–1755

REGISTER, K. B. u. M. W. JACKWOOD (2020): Bordetellosis (Turkey Coryza). In: *Diseases of poultry*, S. 860–889. 14te Edition. Editor: SWAYNE, D. E., Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell

REYGAERT, W. C. (2018):

An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria.

AIMS Microbiol. 4(3), 482–501

RIMLER, R. B., E. B. SHOTTS, J. BROWN u. R. B. DAVIS (1977):

The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of haemophilus species pathogenic to chickens.

J. Gen. Microbiol. 98(2), 349–354

RIMLER, R. B. (1979):

Studies of the pathogenic avian Haemophili.

Avian Dis. 23(4), 1006–1008

ROSENBUSCH, R. F., J. M. KINYON, M. APLEY, N. D. FUNK, S. SMITH u. L. J. HOFFMAN (2005):

In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003.

J. Vet. Diagn. Invest. 17(5), 436–441

ROSENGARTEN, R., A. BEHRENS, A. STETEFELD, M. HELLER, M. AHRENS, K. SACHSE, D. YOGEV u. H. KIRCHHOFF (1994):

Antigen heterogeneity among isolates of *Mycoplasma bovis* is generated by high-frequency variation of diverse membrane surface proteins.

Infect. Immun. 62(11), 5066–5074

SAIF Y. M., P. D. MOORHEAD, R. N. DEARTH u. D. J. JACKWOOD (1980):

Observations on *Alcaligenes faecalis* infection in turkeys.

Avian Dis. 24(3), 665–684

SATO, T., T. OKUBO, M. USUI, H. HIGUCHI u. Y. TAMURA (2013):

Amino acid substitutions in *GyrA* and *ParC* are associated with fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma bovis* isolates from Japanese dairy calves.

J. Vet. Med. Sci. 75(8), 1063–1065

SATO, T., H. HIGUCHI, S.-I. YOKOTA u. Y. TAMURA (2017):

Mycoplasma bovis isolates from dairy calves in Japan have less susceptibility than a reference strain to all approved macrolides associated with a point mutation (G748A) combined with multiple species-specific nucleotide alterations in 23S rRNA.

Microbiol. Immunol. 61(6), 215–224

SCHUG, A. R., A. D. SCHOLTZEK, J. TURNIDGE, M. MEURER, S. SCHWARZ u. A. T. FEßLER (2022):

The biocide susceptibility study group. Development of quality control ranges for biocide susceptibility testing.

Pathogens 11(2), 223

SCHUMACHER, A., T. VRANKEN, A. MALHOTRA, J. J. C. ARTS u. P. HABIBOVIC (2018):

In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 37(2), 187–208

SCHWARZ, S., P. SILLEY, S. SIMJEE, N. WOODFORD, E. VAN DUIJKEREN, A. P. JOHNSON u. W. GAASTRA (2010a):

Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals.

Vet. Microbiol. 141(1–2), 1–4

SCHWARZ, S., P. SILLEY, S. SIMJEE, N. WOODFORD, E. VAN DUIJKEREN, A. P. JOHNSON u. W. GAASTRA (2010b):

Editorial: assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals.

J. Antimicrob. Chemother. 65(4), 601–604

SELBITZ, H.-J. (2023a): Antimikrobielle Wirkstoffe. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, S. 141-145. 11te Edition. Editoren: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P., Stuttgart, DE: Verlag Enke

SELBITZ, H.-J. (2023b): Mykoplasmen: zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, S. 344-359. 11te Edition. Editoren: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P., Stuttgart, DE: Verlag Enke

SELBITZ, H.-J. (2023c): Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, S. 202-265. 11te

Edition. Editoren: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P., Stuttgart, DE: Verlag Enke

SELBITZ, H.-J. (2023d): Gramnegative aerobe/mikroaerophile Stäbchenbakterien und Kokken. In: *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, S. 171-201. 11te Edition. Editoren: SELBITZ, H.-J., TRUYEN, U., VALENTIN-WEIGAND, P., Stuttgart, DE: Verlag Enke

SHAW, K. J., P. N. RATHER, R. S. HARE u. G. H. MILLER (1993):

Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes.

Microbiol. Rev. 57(1), 138–163

SILLEY, P., A. DE JONG, S. SIMJEE u. V. THOMAS (2011):

Harmonisation of resistance monitoring programmes in veterinary medicine: an urgent need in the EU?

Int. J. Antimicrob. Agents 37(6), 504–512

SILLEY, P. (2012):

Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean?

Rev. Sci. Tech. 31(1), 33–41

SIMMONS D. G. u. J. G. GRAY (1979):

Transmission of acute respiratory disease (rhinotracheitis) of turkeys.

Avian Dis. 23(1), 132–138

SIUGZDAITE, J., A. GABINAITIENE u. S. KERZIENE (2012):

Susceptibility of *Mycoplasma bovis* field isolates to antimicrobial agents.

Vet. Med. 57(11), 575–582

SOEHNLEN, M. K., M. E. KUNZE, K. E. KARUNATHILAKE, B. M. HENWOOD, S. KARIYAWASAM, D. R. WOLFGANG u. B. M. JAYARAO (2011):

In vitro antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and a broth microdilution method.

J. Vet. Diagn. Invest. 23(3), 547–551

SPIPKER, T., A. A. LIWIENSKI u. J. J. LIPUMA (2008):

Identification of *Bordetella* spp. in respiratory specimens from individuals with cystic fibrosis.

Clin. Microbiol. Infect. 14(5), 504–506

SPRINGER, B., Y. G. KIDAN, T. PRAMMANANAN, K. ELLROTT, E. C. BÖTTGER u. P. SANDER (2001):

Mechanisms of streptomycin resistance: Selection of mutations in the 16S rRNA gene conferring resistance.

Antimicrob. Agents Chemother. 45(10), 2877–2884

SREEJITH, S., S. SHAJAHAN, P. R. PRATHIUSH, V. M. ANJANA, A. VISWANATHAN, V. CHANDRAN, G. S. AJITH KUMAR, R. JAYACHANDRAN, J. MATHEW u. E. K. RADHAKRISHNAN (2020):

Healthy broilers disseminate antibiotic resistance in response to tetracycline input in feed concentrates.

Microb Pathog 149, 104562

STEMKE, G. W. u. J. A. ROBERTSON (1982):

Comparison of two methods for enumeration of mycoplasmas.

J. Clin. Microbiol. 16(5), 959–961

STOCK, I., K. MACHKA, A. RODLOFF u. B. WIEDEMANN (2001):

Qualitätssicherung und Qualitätskontrollen in der Antibiotika-Empfindlichkeitsbestimmung von Bakterien mit der Mikrodilution.

J. Antimicrob. Chemother. 10, 78–98

STUBBERFIELD, E., M. PRINGLE, A. LANDÉN, K. T. VELDMAN, Y. GEURTS, E. JOUY, L. LE DEVENDEC, J. E. RUBIN, D. G. R. KULATHUNGA, K. A. KRISTENSEN, J. CHANTER, A. BOLLARD, P. JOHNSON, J. MAYCOCK, K. HABIGHORST-BLOME, J. ROHDE u. R. M. CARD (2020):

Validation of an antimicrobial susceptibility testing protocol for *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in an international ring trial.

Vet. Microbiol. 244, 108645

SULYOK, K. M., Z. KREIZINGER, L. FEKETE, V. HRIVNÁK, T. MAGYAR, S. JÁNOSI, N. SCHWEITZER; I. TURCSÁNYI, L. MAKRAI, K. ERDÉLYI u. M. GYURANECZ (2014):

Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma bovis* strains isolated from cattle in Hungary, Central Europe.

BMC Vet. Res. 10, 256

SZABÓ, R., E. WEHMANN u. T. MAGYAR (2015):

Antimicrobial susceptibility of *Bordetella avium* and *Ornithobacterium rhinotracheale* strains from wild and domesticated birds in Hungary.

Acta Vet. Hung. 63(4), 413–424

TANNER, A. C. u. C.-C. WU (1992):

Adaptation of the Sensititre [Registered Trademark] broth microdilution technique to antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma gallisepticum*.

Avian Dis. 36(3), 714

TAN, S. Y. u. Y. TATSUMURA (2015):

Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin.

Singapore Med J. 56(7), 366–367

TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING u. B. SWAMINATHAN (1995):

Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.

J. Clin. Microbiol. 33(9), 2233–2239

TENOVER, F. C. (2001):

Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview.

Clin. Infect. Dis. 33(3), 108–115

THOMAS, A., C. NICOLAS, I. DIZIER, J. MAINIL u. A. LINDEN (2003):

Antibiotic susceptibilities of recent isolates of *Mycoplasma bovis* in Belgium.

Vet. Rec. 153(14), 428–431

TURKYILMAZ, S., S. KIRDAR, F. OCAK u. Ş. HAZIMOĞLU (2009):

Detection of *Bordetella avium* by polymerase chain reaction in the lungs and tracheas of turkeys with pneumonia.

Turkish J. Vet. Anim. Sci. 33(2), 147–150

VAN BELKUM, A., T. T. BACHMANN, G. LÜDKE, J. G. LISBY, G. KAHLMETER, A. MOHESS, K. BECKER, J. P. HAYS, N. WOODFORD, K. MITSAKAKIS, J. MORAN-GILAD, J. VILA, H. PETER, J. H. REX u. W. M. Jr. DUNNE (2019):

Developmental roadmap for antimicrobial susceptibility testing systems.

Nat. Rev. Microbiol. 17(1), 51–62

VAN DUIJKEREN, E., C. SCHWARZ, D. BOUCHARD, B. CATRY, C. POMBA, K. E. BAPTISTE, M. A. MORENO, M. RANTALA, M. Ružauskas, P. SANDERS, C. TEALE, A. L. WESTER, K. IGNATE, Z. KUNSAGI u. H. JUKES (2019):

The use of aminoglycosides in animals within the EU: development of resistance in animals and possible impact on human and animal health: a review.

J. Antimicrob. Chemother. 74(9), 2480–2496

VELAZQUEZ-MEZA, M. E., M. GALARDE-LÓPEZ, B. CARRILLO-QUIRÓZ u. C. M. ALPUCHE-ARANDA (2022):

Antimicrobial resistance: One Health approach.

Vet World 15(3), 743–749

VENTOLA, C. L. (2015):

The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.

P T 40(4), 277–283

VERRAES, C., S. VAN BOXSTAEL, E. VAN MEERVENNE, E. VAN COILLIE, P. BUTAYE, B. CATRY, M. A. DE SCHAEZTEN, X. VAN HUFFEL, H. IMBERECHTS, K. DIERICK, G. DAUBE, C. SAEGERMAN, J. DE BLOCK, J. DEWULF u. L. HERMAN (2023):

Antimicrobial resistance in the food chain: a review.

Int J Environ Res Public Health 10(7), 2643-2669.

VIROLLE, C., K. GOLDLUST, S. DJERMOUN, S. BIGOT u. C. LESTERLIN (2020):

Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: From the cellular to the community level.

Genes 11(11), 1239

WAITES, K. B., L. B. DUFFY, C. M. BÉBÉAR, A. MATLOW, D. F. TALKINGTON, G. E. KENNY, P. A. TOTTEN, D. J. BADE, X. ZHENG, M. K. DAVIDSON, V. D. SHORTRIDGE, J. L. WATTS u. S. D. BROWN (2012):

Standardized methods and quality control limits for agar and broth microdilution susceptibility testing of *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma hominis*, and *Ureaplasma urealyticum*.

J. Clin. Microbiol. 50(11), 3542–3547

WAITES, K. B. u. D. F. TALKINGTON (2014):

Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen.

Clin. Microbiol. Rev. 17(4), 697–728

WALLMANN, J., A. BÖTTNER, H. M. HAFEZ, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFFER, A. RICHTER, S. SCHWARZ, C. SIGGE, W. TRAEDER, K. H. WALDMANN, C. WERCKENTHIN u. E. ZSCHIESCHE (2005):

Ergebnisse eines deutschlandweiten Ringversuches zur Implementierung der Bouillon-Mikrodilution zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) bei Bakterien von Tieren [Results from a German interlaboratory test to establish the broth microdilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of bacteria from animals].

Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 118(5–6), 205–213

WALLMANN, J., A. BÖTTNER, L. GOOSSENS, H. M. HAFEZ, K. HARTMANN, H. KASPAR, C. KEHRENBURG, M. KIETZMANN, D. KLARMANN, G. KLEIN, P. KRABISCH, T. KÜHN, G. LUHOFFER, A. RICHTER, B. SCHULZ, S. SCHWARZ, C. SIGGE, W. TRAEDER, K. H. WALDMANN u. C. WERCKENTHIN (2006):

Results of an interlaboratory test on antimicrobial susceptibility testing of bacteria from animals by broth microdilution.

Int. J. Antimicrob. Agents 27(6), 482–490

WHEAT, P. F. (2001):

History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology.

J. Antimicrob. Chemother. 48(1), 1–4

WHO (1961): Standardization of methods for conducting microbic sensitivity tests: second report of the Expert Committee on Antibiotics. In: *World Health Organization*

WHO (2020): Lack of new antibiotics threatens global efforts to contain drug-resistant infections. Daniela Bagozzi.

Online verfügbar unter: <https://www.who.int/news/item/17-01-2020-lack-of-new-antibiotics-threatens-global-efforts-to-contain-drug-resistant-infections>

WHO (2021): Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report. In: *World Health Organization*

WOAH (2022): List of notifiable terrestrial and aquatic animal diseases. In: *World Organisation for Animal Health*

WU, C.-M., H. WU, Y. NING, J. WANG, X. DU u. J. Jianzhong (2005):

Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA.

FEMS Microbiol. Lett. 247(2), 199–205

XIA, X., C. WU, Y. CUI, M. KANG, X. LI, S. DING u. J. SHEN (2015):

Proteomic analysis of tylosin-resistant *Mycoplasma gallisepticum* reveals enzymatic activities associated with resistance.

Sci. Rep. 5, 17077

XIAO, X., J. SUN, T. YANG, X. FANG, D. WU, Y. Q. XIONG, J. CHENG, Y. CHEN, W. SHI u. Y. H. LIU (2015):

In vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles of valnemulin in an experimental intratracheal *Mycoplasma gallisepticum* infection model.

Antimicrob. Agents Chemother. 59(7), 3754–3760

XIAO, X., J. SUN, T. YANG, X. FANG, J. CHENG, Y. Q. XIONG, Y.-H. LIU (2016):

Pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles of tiamulin in an experimental intratracheal infection model of *Mycoplasma gallisepticum*.

Front. Vet. Sci. 3, 75

XU, J., C. MEI, Y. ZHI, Z-X. LIANG, X. ZHANG u. H.-J. WANG (2022):

Outer membrane vesicle mediated multidrug resistance gene transfer in *Avibacterium paragallinarum*.

bioRxiv 488265

YADAV, J. P., P. TOMAR, Y. SINGH u. S. K. KHURANA (2021):

Insights on *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* infection in poultry: a systematic review.

Anim. Biotechnol. 33(7), 1711–1720

ZENG, D., Z. CHEN, Y. JIANG, F. XUE u. B. LI (2016):

Advances and challenges in viability detection of foodborne pathogens.

Front. Microbiol. 7, 1833

ZHANG, N., X. GU, X. YE, X. WU, B. ZHANG, L. ZHANG, X. SHEN, H. JIANG u. H. DING (2016a):

The PK/PD interactions of doxycycline against *Mycoplasma gallisepticum*.

Front. Microbiol. 7, 653

ZHANG, N., M. ZHOU, X. YAN, J. LIU, S. YUAN, H. YANG, H. DING, D. ZHANG u. Y. BAI (2022):

Pharmacokinetic and pharmacodynamic integration of tilmicosin against *Mycoplasma gallisepticum* in the target infection site in chickens.

Front. Vet. Sci. 9, 952599

ZHOU, Z. C., Y. LIU, Z. J. LIN, X. Y. SHUAI, L. ZHU, L. XU, L. X. MENG, Y. J. SUN u. H. CHEN (2021):

Spread of antibiotic resistance genes and microbiota in airborne particulate matter, dust, and human airways in the urban hospital.

Environ Int. 153, 106501

ZHU, J., Y. CHEN, Y. WU, Y. WANG u. K. ZHU (2022):

Commensal bacteria contribute to the growth of multidrug-resistant *Avibacterium paragallinarum* in chickens.

Front Microbiol. 13, 10105

9. Danksagung

Für die finanzielle Unterstützung des Projektes möchte ich dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) sowie der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin, Frau Prof. Dr. Corinna Kehrenberg. Sie gab mir das Vertrauen, dieses Projekt und die darauf basierende Dissertation zu realisieren. Ihr fundierter Blick auf die faszinierende Welt der Bakterien und Antibiotikaresistenzen motivierte mich stets, die Dissertation mit der gebotenen Sorgfalt und Hingabe abzuschließen.

Einen weiteren herzlichen Dank möchte ich an Dr. Anja Müller richten, die mich nicht nur durch ihr mikrobiologisches Fachwissen, sondern auch durch ihre vielseitigen Interessen inspiriert hat. Auch ihre persönlichen Ratschläge – beispielsweise zum erfolgreichen Chili- und Tomatenanbau – werden mir immer in Erinnerung bleiben.

Auch Dr. Yuri Churin danke ich für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft im Laboralltag und seinen humorvollen Umgang. Seine praktische Unterstützung während der mehrtägigen Wachstumsexperimente, bei denen Messungen rund um die Uhr erforderlich waren, hat mir so manche Müdigkeit erspart.

Mein Dank gilt zudem Frau Dr. Heike Kaspar (BVL) für die hilfreiche Organisation von Mikrotiterplatten und Ringversuchen sowie deren Durchführung und Auswertung.

Für die großzügige Bereitstellung von Bakterienisolaten und die fachliche Unterstützung bedanke ich mich bei Frau Dr. Annet Heuvelink (GD Animal Health, Deventer, Niederlande), Herrn Dr. Tobias Eisenberg (Hessisches Landeslabor), Herrn Dr. Arne Jung (Klinik für Geflügel der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover), Herrn Prof. Dr. Michael Lierz und Frau Dr. Franca Möller Palau-Ribes (Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Universität Gießen) sowie Herrn Dr. Thomas Peters (Milchtierherden-Betreuungs- und Forschungsgesellschaft mbH, MBFG).

Mein Dank gilt auch allen Kolleginnen und Kollegen des IfTN, die mir eine lehrreiche Zeit im Institut ermöglicht haben. Besonders den technischen Mitarbeitenden Claudia, Conny und Jan möchte ich meine Anerkennung aussprechen – für ihre herausragende praktische Arbeit sowie ihre stets freundlichen und unterstützenden Worte. Ein besonderer Dank gebührt all jenen, die mir in schwierigen Zeiten tröstende Worte schenkten und Frustration mit Humor begegneten.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Freunden danken, die mich in dieser von Pandemien geprägten Zeit stets aufgemuntert und unterstützt haben. Ihre Offenheit und ihre Bereitschaft, mir zuzuhören, haben mir geholfen, auch in schwierigen Momenten nicht den Mut zu verlieren. Besonders hervorheben möchte ich Leonie, Hendrik, Kim, Julez und Anne. Und was wäre ich für eine Tierärztin, wenn ich mich nicht auch bei meiner Hündin Hazel bedanken würde – denn sie hat mir mit ihrer fröhlichen Art jeden Feierabend versüßt.

Zu guter Letzt gilt mein tief empfundener Dank meiner Familie, die nie den Glauben an mein Durchhaltevermögen verloren hat. Mein Vater ist stets ein Vorbild für mich. Durch seine hilfsbereite Art lebt er mir vor, wie wichtig es ist, Herausforderungen mit Empathie zu begegnen. Ob in schwierigen Phasen oder bei kleinen Erfolgen – sein Rat und seine Unterstützung sind immer eine feste Konstante in meinem Leben. Ebenso danke ich meiner Mutter, die mir jene Unabhängigkeit vermittelte, die nicht nur für diese Dissertation unverzichtbar ist. Sie ermutigt mich stets, meinen Weg zu gehen und an meine Fähigkeiten zu glauben, und ihre Fürsorge ist ein großer Rückhalt. Ein besonderer Dank gilt auch meinen vier großen Brüdern, die nicht nur mein Selbstbewusstsein gestärkt, sondern auch meine Schlagfertigkeit auf ein völlig neues Niveau gehoben haben. Und auch wenn sich unsere Wege nie kreuzten, möchte ich abschließend meinem Großvater Alfred danken. Seine außergewöhnliche Lebensleistung hat mir die Bedeutung von guter Wissenschaft und medizinischem Fortschritt vor Augen geführt.