

RESISTENZBESTIMMUNGEN schnell wachsender Bakterien (Agardiffusionstest)

1. ALLGEMEINES

Die Bestimmung der Empfindlichkeit von veterinärmedizinischen Krankheitserregern gegen die zu prüfenden Chemotherapeutika (Antibiotika, Sulfonamide und andere antimikrobiell wirksame Stoffe) erfolgt auf festen Kulturmedien im Agar-Diffusionstest. Es werden dazu wahlweise handelsübliche Wirkstoffträger (Papierblättchen, Mehrfachträger, Preßlinge) verwendet, die eine definierte Menge eines oder mehrerer Chemotherapeutika enthalten.

Die Richtlinien zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika sind in den deutschen Normen DIN 58 940 und DIN 58 944 niedergelegt.

2. PRINZIP

Aus diagnostischem Material isolierte Bakterien (und die Kontrollstämme) werden auf der Oberfläche von antagonistens-freien Kulturmedien (z.B. Mueller-Hinton-Agar, Iso-Sensitest-Agar und andere gleichwertige) homogen verteilt, anschließend werden Testblättchen oder andere Wirkstoffträger aufgelegt und nach einer Vordiffusionszeit von 30 min über 18 ± 2 h, bei verlangsamtem Wachstum auch bis zu 72h, bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ bebrütet.

Aufgrund der Diffusion des Chemotherapeutikums in das Kulturmedium wird das Wachstum empfindlicher Keime bis zu einer bestimmten Konzentration gehemmt, so daß mehr oder weniger große, wachstumsfreie Hemmhöfe entstehen. Die Hemmhöfe werden einzeln ausgewertet (Messung des Durchmessers) und nach einem Bewertungsschlüssel mit "Sensibel"(S), "Intermediär"(I) oder "Resistent"(R) beurteilt. Zur Qualitätssicherung werden ein oder alle Kontrollstämme (Staph. aureus ATCC 25 923, Staph. aureus ATCC 29 213, E. coli ATCC 25 922, Enterococcus faecalis ATCC 29 212, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27 853) bei jedem Ansatz mitgeführt, um die Richtigkeit des Tagesansatzes beurteilen zu können.

3. GEWINNUNG DES UNTERSUCHUNGSMATERIALS

Die Erreger sind als Reinkulturen anzuzüchten und diese zur Resistenzbestimmung zu verwenden.

Bei der Entnahme von Kolonien der zu prüfenden Bakterienkultur ist darauf zu achten, daß alle Kolonien die für eine bestimmte Bakterienart charakteristischen Formen und Merkmale aufweisen.

4. DURCHFÜHRUNG DER UNTERSUCHUNG

Ein mehrmaliges Passagieren der Bakterien ist zu vermeiden, da in der invitro-Subkultur ein Verlust von Resistenzplasmiden möglich ist.

Zur Sicherung eines repräsentativen Querschnittes werden immer mehrere (4-5) gleichartige Kolonien der gleichen Keimspezies erfaßt. In Abhängigkeit von den Wachstumseigenschaften des zu prüfenden Keimes wird Kulturmaterial in 3 bzw. 5 ml Bouillon bei $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 2-4 h oder ggf.länger (wie z.B. bei Pasteurellen, Listerien) bebrütet, um eine ausgeprägte logarithmische Wachstumsphase zu erzielen. Um ein Wachstum dicht stehender, jedoch noch nicht konfluierender Einzelkolonien zu erreichen, werden die Reinkulturen, wenn notwendig, weiter bearbeitet (Verdünnung mit sterilen Kulturmedien usw. s. Tabelle 1).

4.1. KULTURMEDIEN

Für die Resistenzprüfung gilt derzeit Mueller-Hinton-Medium als Referenz-Kulturmedium. Es kann jedoch auch ein anderes anerkanntes, antagonistenfrees Kulturmedium verwendet werden.

Für Kulturmedien (außer Mueller-Hinton) müssen die Beziehungen zwischen minimaler Hemmkonzentration (MHK) und Hemmhofdurchmesser (HHD) bekannt sein bzw. ermittelt werden, damit entsprechende Umschlagpunkte für die Einstufung festgelegt und eine sichere Bewertung des HHD erfolgen kann.

Der pH-Wert des gegossenen Kulturmediums ist mit den Angaben des Herstellers zu vergleichen, da pH-Änderungen die HHD einiger Wirkstoffe stark verändern können.

Keime wie Actinobacillus, Bordetellen, Clostridien, Actinomyces, Erysipelothrix, Pasteurellen, Streptococcen sowie weitere können auf Kulturmedium mit 5 Vol. %igem Rinder- oder Schafblutzusatz geprüft werden. Ein Blutzusatz zum Kulturmedium kann die Prüfung mit Sulfonamid- und Sulfonamid + Trimethoprim-Wirkstoffträgern durch Förderung eines Restwachstums (Mikrokoloniebildung) stören.

Bei Staphylokokken ist entspr. DIN 58 940, Teil 4 die Empfindlichkeit gegen natürliche und halbsynthetische Penicilline nur mit Benzylpenicillin (nicht gegen Ampicillin/Amoxicillin) und mit Oxacillin (nicht gegen Cephalosporine) zu prüfen.

Die Schichtdicke des gegossenen Agars soll 3,0 bis 3,5 mm betragen (20 ± 1 ml Füllmenge für Petrischalen, 90 mm Durchmesser).

Die Platten sind vor der Beimpfung 10 - 30 min im Brutschrank vorzutrocknen. Die gegossenen Platten sind sehr kühl ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) nach den Angaben des Herstellers, max. jedoch 10 Tage lang, aufzubewahren.

4.2. BEIMPFUNG DES KULTURMEDIUMS

Prinzip: Eine ausreichende Menge der Erregeraufschwemmung wird auf die Oberfläche des Kulturmediums aufgebracht und gleichmäßig verteilt. Das Inokulum soll

so beschaffen sein, daß es nach der Aussaat und nach der Bebrütung zu dicht stehenden Einzelkolonien, jedoch noch nicht zu konfluierendem Wachstum ("Rasenbildung") kommt.

Die nachfolgend genannten Methoden können wahlweise (unter Beachtung des Prinzips) angewandt werden:

a) Direkt-Methode

Kulturmaterial wird in ausreichender Menge (4 - 5 Kolonien) bzw. nach Angabe mittels Öse (2,5 mm Innendurchmesser) abgenommen und in 3 bzw. 5 ml Bouillon (s. Tabelle 1) homogen verteilt und für 2 h bzw. 4 h (Pasteurellen, Bordetellen, Clostridien) bei $36 \pm 1^\circ \text{C}$ kultiviert.

Die Beimpfung der Agaroberfläche erfolgt entweder:

- durch Verteilen von 0,1 ml der unverdünnten Bouillon (alle Bakteriengattungen außer Enterobacteriaceae und Staphylococcus) mit dem Drigalski-Spatel (s. Tabelle 1) oder
- durch Ausstrich einer Bakterienaufschwemmung in steriler physiologischer Kochsalzlösung (s. Tabelle 1) mittels sterilem Wattetupfer oder
- Überschwemmen der Agaroberfläche mit der Bakterienaufschwemmung und anschließendem Dekantieren oder Absaugen mit einer Pasteurpipette.

b) Indirekte Keimzahlbestimmung und -einstellung

Ca. 5 - 8 Kolonien werden mit einer Öse oder einem Glasstab berührt und in 5 ml Bouillon homogen verteilt und bei $36 \pm 1^\circ \text{C}$ für 2 - 4 h bebrütet. Anschließend wird die Extinktion der bebrüteten Bouillon bei der Wellenlänge von 650 nm (640 - 670) in einer entsprechenden Küvette gemessen. Sie soll mindestens 0,05 und höchstens 0,10 betragen; anderenfalls ist mit Bouillon zu verdünnen. In gleicher Weise kann die Einstellung der Keimdichte gegen einen Trübungsstandard (z.B. McFarland-Standard No. 0,5 entspricht etwa 10⁸ KBE/ml) vorgenommen werden. Anschließend wird von der in der Keimdichte eingestellten Bouillon eine Öse (3 mm Durchmesser) entnommen und in 5 ml Natriumchloridlösung (154 mmol/l) ausgewaschen. Von dieser Verdünnung wird Material mit einem Wattetupfer auf dem Nährmedium ausgestrichen.

Bei den Kontrollstämmen Staph. aureus ATCC 29 213, Staph. aureus ATCC 25 923 und E. coli ATCC 25 922 wird ein dichtstehendes semikonfluierendes Wachstum erreicht, wenn die Keimdichte 10⁵-10⁶ KBE/ml beträgt.

4.3. Aufbringen der Wirkstoffträger

Nach dem Trocknen des Inokulums werden die Wirkstoffträger auf die beimpfte Agaroberfläche aufgebracht.

Die Testblättchen, -tabletten bzw. -sterne werden mit einem Applikator bzw. steriler Pinzette einzeln aufgelegt oder mittels Dispenser ausgestoßen. Sie müssen dem Kulturmedium vollständig anliegen bzw. diesem leicht angedrückt werden. Pro 90 mm-Petrischale sollen nicht mehr als 6, pro 150 mm-Petrischale nicht mehr als 8 Wirkstoffträger aufgebracht werden.

Grundsätzlich muß - auch bei Verwendung von Dispensern - der Abstand der Wirkstoffträger untereinander und vom Rand der Petrischale so bemessen sein, daß das Messen der Hemmhöfe nicht durch sich berührende oder überschneidende Hemmhofränder beeinträchtigt wird.

Bei zu großen Hemmhöfen, die eine Ablesung verhindern, kann ein Test nach Vergrößerung der Abstände der Testblättchen wiederholt werden.

Die für die Resistenzbestimmung verwendete Bakterienkultur ist bis zur endgültigen Befundmitteilung aufzubewahren.

4.4 Vordiffusions- und Bebrütungsdauer

Zur Vordiffusion der Chemotherapeutika in das Nährmedium bleiben die beimpften und mit Wirkstoffträgern beschickten Platten 30 min bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ mit dem Deckel nach unten stehen. Anschließend sind die Platten über 18 ± 2 h oder über eine längere, dem Wachstum des Keimes angemessene Zeit bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ zu bebrüten. Langsam wachsende Keime sind über längere Zeit, bei entsprechender Temperatur zu inkubieren.

5. AUSWERTUNG UND BEURTEILUNG

Es werden nur solche Ansätze ausgewertet, bei denen der Bakterienrasen aus dicht stehenden, jedoch nicht oder nur teilweise konfluierenden Einzelkolonien besteht und die Hemmhofdurchmesser der Kontrollstämme im Toleranzbereich liegen. Anderenfalls ist die Bestimmung zu wiederholen!.*

Die Durchmesser der entstandenen Hemmhöfe werden mit einer geeigneten Meßvorrichtung (z.B. Schiebelehre, Stechzirkel, umgebautes Lesegerät, Schablonen, Videokamera) gemessen, die eine Ablesegenauigkeit von 1 mm gestattet.

Die Ablesung der Platten erfolgt zweckmäßigerweise bei geöffneter Oberschale im schrägfallenden Gegenlicht auf dunklem Untergrund oder ggf. im geschlossenen Zustand am Boden gegen indirektes, diffuses Licht bzw. den dem Auswertegerät entsprechenden Bedingungen.

¹ Anmerkung:

Ein zu dichtes Inokulum kann zu Fehlern durch zu kleine Hemmhöfe führen. Bei zu dünnem Inokulum kann das Ergebnis neben zu großen Hemmhöfen auch durch das Fehlen eines deutlichen Hemmhofrandes beeinträchtigt werden.

Als Grenzen der Hemmhöfe gelten die Ränder des deutlich in der Koloniegröße reduzierten Wachstums. Bei der Sulfonamid-Testung tritt häufig ein Ring mit verkleinerten Kolonien auf, der bereits als Stoffeintrwirkung beurteilt wird. Die Durchmesser der entstehenden Hemmhöfe werden gemessen und in vollen mm angegeben.

Ein Restwachstum von Kolonien in normaler Größe innerhalb der Hemmhöfe (mehr als drei Einzelkolonien) deutet auf das Auftreten resistenter Varianten im Inokulum hin.

6. Bewertung

Die gemessenen Hemmhofdurchmesser (HHD) sind den Bewertungsstufen

- sensibel (Symbol S bzw. s,
früher empfindlich = E)
- intermediär (Symbol I,
früher mäßig oder gering empfindlich = e)
- resistent (Symbol R)

entsprechend den Angaben in Tabelle 2 - für jeden Wirkstoff getrennt - zuzuordnen. Der Bewertung S, I oder R liegt die Korrelation zwischen den minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) und dem Hemmhofdurchmesser (HHD) zugrunde, entsprechende Regressionsbeziehungen sind für viele Wirkstoffe veröffentlicht worden (s. Tabelle 2).

Bei intermediär beurteilten Erregern sollte in der Veterinärmedizin infolge des Fehlens einer "Hochdosierung" keine Therapie mit diesem Wirkstoff empfohlen werden. In der Jahresstatistik mit dem PC-Erfassungsprogramm RESI wird das Symbol "I" zu "R" dazugezählt, sodaß der Resistenzprozentsatz (%) die mit "I" und "R" beurteilten Stämme wiedergibt.

7. ANWENDUNG, HALTUNG UND PFLEGE DER KONTROLLSTÄMME

Zur Beurteilung der Gültigkeit des Ansatzes werden folgende Kontrollstämme mitgeführt²:

Staphylococcus aureus ATCC 25 923, ident. DSM 1104

² Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
Mascheroder Weg 1b
38124 Braunschweig
(Abgabe der Kontrollstämme)

Staphylococcus aureus ATCC 29 213, ident. DSM 2569

Escherichia coli ATCC 25 922, ident. DSM 1103

Enterococcus faecalis ATCC 29 212, ident. DSM 2570

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27 853, ident. DSM 1117

Bei den Kontrollplatten werden bei einwandfreiem Testsystem die in den Tabellen 3a - c angegebenen Hemmhofdurchmesser auf Mueller-Hinton-Agar und Iso-Sensitest-Agar erreicht. Die aufgeführten Mittelwerte können um das Streuungsmaß s bzw. $2s$ schwanken. Diese Werte sind auf andere Kulturbedingungen (andere Kulturmedien, Einsaatdichte, Beladung des Wirkstoffträgers, usw.) nicht übertragbar.

Ein Unter- oder Überschreiten der in den Tabellen angegebenen Durchmesser bzw. ihrer Schwankungsbreite $x \pm s$ bzw. $x \pm 2s$ macht eine Überprüfung des Testsystems und Abstellen der Ursache erforderlich.

Stammhaltung

Die Kontrollstämme werden auf eine Mischung aus 95 Volumenteilen Nähragar und 5 Volumenteilen Schaf- oder Rinderblut verimpft, bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ für 18 h bebrütet und bei $2 - 8^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Im Abstand von 1 Woche werden die Mikroorganismen auf neue Kulturmedien überimpft.

8. BEFUNDMITTEILUNG

Die Weitergabe des Untersuchungsergebnisses erfolgt zweckmäßiger auf einem Formblatt mit Angabe des Beurteilungsergebnisses: S, I, R bzw. N (letzteres für: nicht untersucht). Die Symbole sind als Fußnote oder als Anlage (s. Anlage 1 im RESI) zu erläutern.

Der Befund ist vom Laborleiter zu bestätigen.

9. AUFBEWAHRUNG

Die Testblättchen sind bei $2 - 8^\circ\text{C}$ in den Originalverpackungen aufzubewahren. Die Kartuschen sind vor Gebrauch aus der Packung zu nehmen und 1 - 2 Stunden auf Raumtemperatur zu erwärmen.

Tabelle 1:

Richtmengen zur Herstellung von semikonfluierenden Kulturen für die Resistenzbestimmung, Direktmethode, Beimpfung mittels Wattetupfer

Keimart	Inokulum- menge	Bouillon- menge	Anreicherung		Temp.	Beimpfung des Kultur- mediums	Nähr- medium
			Inkuba- tionszeit				
Salmonellen, E. coli, Citrobacter u. weitere Enterobacteria- ceen	3-5 Kolonien von 0,5-1,0 mm	5 ml	2 h		36 ± 1°C		
Proteus, Pseudomonas	1/4 Öse Kultur					1 Öse in 3 ml phys. Kochsalzlösung	ohne Blutzusatz
Staphylo- kokken	ca. 6 Kolo- nien von 1 mm	3 ml	2 h		36 ± 1°C		
Strepto- kokken, Listerien, Rotlauf, Actinomyces (Corynebact.)	1/2 Öse Kultur	3 ml	2 h		36 ± 1°C		
						Bouillon unverdünnt	mit Blutzusatz
Pasteurellen, Bordetellen	1/2 Öse Kultur	5 ml	4 h		36 ± 1°C		
Clostridien	3 Kolo- nien von 1 mm O	Maltose- Fleisch- Bouillon	mind. 4 h		36 ± 1°C		Dextrose- Blutagar

Tabelle 3a:

Mittel- und Streuungswerte der Hemmhofdurchmesser der Kontrollstämmen

Teststamm: **Staph. aureus ATCC 25 923**

Nährmedium:	Mueller-Hinton-Agar ohne Blutzusatz		Iso-Sensitest-Agar ohne Blutzusatz		
pH-Wert:	7,2				
Wirkstoff Symbol in Klammern: nach DIN 58959-13 Bbl 1: Ausg. 06/1997	Bela- dung	Mittl. HHD in mm	Streuungs- maß	Mittl. HHD in mm	Streuungs- maß
		x (n=45 ... 51)	± s	x (n=52)	± s
1.) Tetracyclin (TET)	30 µg	36,2	1,7	38,9	1,3
2.) Sulfamethoxa- zol + Trime- thoprim (SXT)	25 µg	35,5	1,6	37,2	1,4
3.) Ampicillin (AMP)	10 µg	42,3	1,2	43,2	1,0
4.) Gentamicin (GEN)	10 µg	32,8	1,1	34,4	1,1
5.) Kanamycin (KAN)	30 µg	33,3	1,1	34,5	1,1
6.) Chloramphenicol (CMP)	30 µg	33,2	1,5	34,4	1,2
7.) Enrofloxacin (ENR)	5 µg	34,6	1,3	36,6	1,2
8.) Penicillin (PEN)	10 IE	44,0	1,4	46,6	1,2
9.) Cloxacillin (OB, CX)	5 µg	37,8 (n=10)	0,9	37,8	0,6
10.) Erythromycin (ERY)	15 µg	33,9	1,8	34,8	1,1
11.) Lincomycin (LIN)	15 µg	35,8	2,0	33,9	1,0
12.) Oleandomycin (OLE)	15 µg	33,0	1,1	30,6	0,9

13.) Rifampicin (RAM)	2 µg	35,8	1,0	38,2	1,1
--------------------------	------	------	-----	------	-----

Tabelle 3b:

Mittel- und Streuungswerte der Hemmhofdurchmesser der Kontrollstämmen

Teststamm: **Staph. aureus ATCC 29 213**

Nährmedium:	Mueller-Hinton-Agar ohne Blutzusatz	Iso-Sensitest-Agar ohne Blutzusatz
-------------	--	---------------------------------------

pH-Wert: 7,2

Wirkstoff Symbol	Bela- dung	Mittl. HHD in mm	Streuungs- maß	Mittl. HHD in mm	Streuungs- maß
in Klammern: nach DIN 58959-13 Bbl 1: Ausg. 06/1997		\bar{x} (n=43- 53)	$\pm s$	\bar{x} (n=52)	$\pm s$
1.) Tetracyclin (TET)	30 µg	33,7	1,1	37,5	1,2
2.) Sulfamethoxazol + Trimethoprim (SXT)	25 µg	33,0	1,1	35,3	1,4
3.) Ampicillin (AMP)	10 µg	27,3	0,9	29,6	1,1
4.) Gentamycin (GEN)	10 µg	27,8	0,9	29,3	0,8
5.) Kanamycin (KAN)	30 µg	28,0	0,9	29,4	1,1
6.) Chloramphenicol (CMP)	30 µg	32,0	1,1	33,6	1,2
7.) Enrofloxacin (ENR)	5 µg	32,2	1,0	34,9	1,3
8.) Penicillin (PEN)	10 IE	25,6	1,0	28,9	1,5
9.) Cloxacillin (OB, CX)	5 µg	34,2 (n=15)	0,9	36,1	1,1
10.) Erythromycin (ERY)	15 µg	32,6	1,5	33,7	1,1
11.) Lincomycin (LIN)	15 µg	36,7	1,6	33,1	0,9
12.) Oleandomycin	15 µg	32,2	1,7	30,2	1,0

(OLE)

13.) Rifampicin (RAM)	2 µg	33,9	1,3	36,7	1,2
--------------------------	------	------	-----	------	-----

Tabelle 3c:

Mittel- und Streuungswerte der Hemmhofdurchmesser der Kontrollstämmen

Teststamm: **E. coli ATCC 25 922**

Nährmedium:	Mueller-Hinton-Agar ohne Blutzusatz	Iso-Sensitest-Agar ohne Blutzusatz
-------------	--	---------------------------------------

pH-Wert: 7,2

Wirkstoff Symbol in Klammern: nach DIN 58959-13 Bbl 1: Ausg. 06/1997	Bela- dung	Mittl. HHD in mm	Streuungs- maß	Mittl. HHD in mm	Streuungs- maß
		\bar{x} (n=50 bis 61)	$\pm s$	\bar{x} (n=53)	$\pm s$
1.) Tetracyclin (TET)	30 µg	31,0	1,2	33,5	1,1
2.) Sulfamethoxazol + Trimethoprim (SXT)	25 µg	33,9	1,5	36,1	1,3
3.) Ampicillin (AMP)	10 µg	24,6	1,4	24,1	1,5
4.) Gentamycin (GEN)	10 µg	30,0	1,4	30,0	1,2
5.) Kanamycin (KAN)	30 µg	29,8	1,5	31,2	1,2
6.) Chloramphenicol (CMP)	30 µg	33,8	1,5	34,4	1,1
7.) Enrofloxacin (ENR)	5 µg	41,5	1,7	44,0	1,9
8.) Neomycin (NEO)	30 µg	28,4	1,3	28,5	1,1
9.) Streptomycin (STR)	25 µg	29,1	1,7	27,5	1,0
10.) Colistinsulfat (COL)	10 µg	20,8	0,7	20,8	0,9
11.) Polymyxin B (POL)	300 E	19,5	0,8	21,5	1,0
12.) Nitrofurantoin (NFT)	100 µg	27,6	1,7	29,4	1,0

13.) Furazolidon (FUR)	100 µg	35,1	1,7	35,5	2,0
---------------------------	--------	------	-----	------	-----

Anlage 1:

Mögliche Fehlerquellen bei der Resistenzprüfung gemäß Arbeitsanweisung durch Abweichungen von den festgelegten Laborbedingungen

1. Schichthöhe des Nährmediums, Soll 3,0 - 3,5 mm (20 ml pro Petrischale \varnothing 90 mm, stichprobenartig messen lassen!), pH bei der Zubereitung kontrollieren.
2. Verbrauch von fertigen Platten innerhalb von max. 10 Tagen (Aufbewahrung 2 - 8 °C)
3. Verkleinerte Kolonien (Mikrokolonien) bei Sulfonamiden u.a. in einer Übergangszone zu normalen Kolonien sind als beginnende Hemmung zu bewerten; der Hemmhofdurchmesser ist bis an den Rand der normal wachsenden, dichtstehenden Kolonien zu messen.
4. Ungeeignete (z.B. zu hohe) Dichte der bebrüteten Bouillon führt zum rasenartigen Bakterienwachstum und damit insbes. bei Sulfonamiden zu verkleinerten Hemmhöfen.
Ziel: Semikonfluierendes Koloniewachstum! Empfehlungen zur Verdünnung s. Tabelle 1.
5. Bei Verdacht auf vorzeitiges Absinken der Aktivität Nachtestung bzw. Paralleltestung der Testblättchen.
6. Beim Berühren der Auswurfstutzen des Dispensers mit der Agaroberfläche
- Schablone in Form eines Ringes um die Petrischale anfertigen.
7. Bei zu kleinen Petrischalen (\varnothing 8,5 cm) - Dispenser durch Schablone zentrieren.
8. Verwendung verfallener oder falsch aufbewahrter Platten oder Testblättchen.
9. Falsche Vorbereitung oder Aufbewahrung des Trübungsstandards (Mc Farland).
10. Verfrühte Ablesung (vor 16 - 18stündiger Inkubationszeit).
11. Fehler infolge Schätzens oder beim Ausmessen der Hemmhöfe.
12. Verwendung von Mischkulturen mit resistenten Anteilen.
13. Ausführung des Tagesansatzes ohne interne Qualitätskontrolle mit Referenzstämmen.

Anlage 2:

Veterinärmedizinische Chemotherapeutika, für die kommerziell Wirkstoffträger angeboten werden (Kurzbezeichnungen -soweit schon klassifiziert- entspr. DIN 58959-13 Bbl 1: 1997-06)

Wirkstoff	gebräuchliche Beladung in µg, E bzw. DIN-Empf.	Parallelresistenzen
Beta-Laktame		
Penicillin (PEN) DIN-Empfehlung:	10 IE	Benzylpenicilline, Penicillin V
Oxacillin (OXA) DIN-Empfehlung:	5	Isoxazolympenicilline (Cloxa-, Diclaxa-, Flucloxacillin)
Ampicillin (AMP) DIN-Empfehlung:	10	Aminopenicilline (z.B. Amoxicillin)
Amoxicillin+Clavulan- säure (AMC)	20+10	
Cephalexin (CL) DIN-Empfehlung:	30	Gruppenresistenzen, nur begrenzt übertragbar
Cefoperazon (CPZ) DIN-Empfehlung:	30	
Aminoglykoside		
Gentamicin (GEN) DIN-Empfehlung:	10	häufig zu Kanamycin, Neomycin, Paromomycin
Neomycin (NEO)	30	Kanamycin, Framycetin, Paromomycin, Streptomycin
Framycetin (FRA) = Neomycin B	100	Neomycin, Kanamycin, Paromomycin, Streptomycin
Kanamycin (KAN)	30	Neomycin, Paromomycin,
Apramycin (APR)	30	
Streptomycin (STR)	25	Dihydrostreptomycin
Spectinomycin (SPT)	10	nicht sicher bekannt (Streptomycin?)

Makrolide

Erythromycin (ERY) DIN-Empfehlung:	15	teilweise gegen Oleandomycin; Tylosin?
Tylosin (TLS)		Erythromycin?, evtl. Spectinomycin
Oleandomycin (OLE)	15	sehr häufig zu Spiramycin und Erythromycin
Spiramycin (SPM)	100	häufig zu anderen Makroliden

Lincomycine

Lincomycin (LIN) DIN-Empfehlung:	15	Clindamycin, Erythromycin, Spiramycin
Novobiocin (N bzw. NV bzw. NB)	30	keine Parallelresistenzen

Tetracycline

Tetracyclin (TE bzw. TET) DIN-Empfehlung:	30	zu allen Tetracyclinen
Chlortetracyclin (CTE)	30	zu allen Tetracyclinen
Oxytetracyclin (OTE)	30	zu allen Tetracyclinen
Doxycyclin (DOX)	30	zu allen Tetracyclinen

Chloramphenicol

Chloramphenicol (CMP) DIN-Empfehlung:	30	Thiamphenicol?
---	----	----------------

Polypeptide

Colistin (= Polymyxin E) (COL)	10; 25	Polymyxin
Polymyxin B (POL)	300 E	Colistin
Bacitracin (BTZ)	10 E	

Rifamycine

Rifampicin (RAM)	2; 30	Rifamycin
------------------	-------	-----------

Quinolone (= Chinolone)

Enrofloxacin (ENR)	5	Ciprofloxacin?
--------------------	---	----------------

Nitro-Imidazole

Metronidazol (MTR)	5; 80	Dimetridazol
--------------------	-------	--------------

Nitrofurane

Nitrofurantoin (NFT) DIN-Empfehlung:	100	häufig zu anderen Nitrofuranen
---	-----	--------------------------------

Furazolidon (FUR)	100	häufig zu anderen Nitrofuranen
-------------------	-----	--------------------------------

Sulfonamide / - Kombinationen

ca. 13 verschiedene Derivate (S 3)	300	alle Sulfonamide (mit Einschränkung)
------------------------------------	-----	--------------------------------------

Sulfamethoxazol + Trimethoprim (SXT)	23,75 + 1,25	alle potenzierten Sulfonamide
--------------------------------------	--------------	-------------------------------

