Open Access

Berl Münch Tierärztl Wochenschr 127, 349–358 (2014)
DOI 10.2376/0005-9366-127-349

© 2014 Schlütersche Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG
ISSN 0005-9366

Korrespondenzadresse:
inga.ruddat@tiho-hannover.de

Eingegangen: 10.03.2014
Angenommen: 01.07.2014

http://vetline.de/open-access/158/3216/

Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung, WHO Collaborating Centre for Research and Training in Veterinary Public Health, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover[1]
Institut für Nutztiergenetik, Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee[2]

Statistische Verfahren zur Beschreibung von phänotypischen Empfindlichkeitsdaten

Statistical methods for description of phenotypic susceptibility data

Inga Ruddat[1], Kristina Kadlec[2], Stefan Schwarz[2], Lothar Kreienbrock[1]

Zusammenfassung

Diese Arbeit gibt eine Übersicht über statistische Verfahren zur Deskription von Empfindlichkeitsdaten. Die Datengrundlage für Resistenzstudien stellen häufig minimale Hemmkonzentrationen (MHKs), gemessen für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe, dar. Aus Sicht der statistischen Methodenlehre sind (semi-) quantitative MHK-Werte ordinal skaliert und sollten daher auch mit für ordinale Daten geeigneten statistischen Verfahren ausgewertet werden.
Zur Beschreibung der Resistenzlage pro Wirkstoff bietet sich zunächst die Häufigkeitsverteilung der MHK-Werte an. Resistenzmuster können anhand von Häufigkeiten der Resistenzprofile beschrieben werden. Genauere Einblicke in Auftreten und Veränderungen von gleichzeitiger Resistenz gegenüber verschiedenen Wirkstoffen liefert die systematische Analyse der Abhängigkeitsstruktur. Des Weiteren können Unterschiede zwischen Resistenzprofilen durch Anwendung geeigneter Distanzmaße quantifiziert werden und gängige Verfahren der multivariaten Statistik zur Deskription und komplexeren Analyse von Empfindlichkeitsdaten herangezogen werden. Um Ergebnisse verschiedener Studien vergleichbarer zu machen, ist es wünschenswert, so viel Informationsgehalt wie möglich darzustellen und dabei eine einheitliche Struktur zu verfolgen.

Schlüsselwörter: Resistenzmuster, MHK, Abhängigkeitsstruktur, multivariate Analyse

Summary

This paper summarizes statistical methods to describe susceptibility data. A frequent data basis in resistance studies are minimum inhibitory concentrations (MICs), measured for different antimicrobial agents. In the statistical context these (semi) quantitative MIC values are ordinal scaled. Therefore, they should be analysed with statistical tools appropriate for ordinal data.
The resistance situation for each antimicrobial agent is often described using frequency distributions of MIC values. Resistance patterns can be described by frequencies of resistance profiles. More detailed insights into appearance and changes of simultaneous resistance against different agents are provided by a systematic analysis of dependency structure in susceptibility data. Furthermore, the calculation of differences between resistance profiles using appropriate distance measures enables the application of common methods of multivariate statistic for description and more complex analysis of susceptibility data. To improve the comparability of study results, it is desirable to present as much information as possible in a uniform way.

Keywords: resistance pattern, MIC, dependency structure, multivariate analysis

U.S. Copyright Clearance Center Code Statement:
0005-9366/2014/12709-349 $ 15.00/0

Einleitung

Antimikrobielle Resistenz stellt ein großes Problem in der Human- und Tiermedizin dar. Folglich wird eine Vielzahl von Studien veröffentlicht, die antimikrobielle Empfindlichkeitsdaten enthalten. Um Studienergebnisse vergleichbarer zu machen, ist es wünschenswert, dass neben einer standardisierten Messung der Daten auch bei der Darstellung der Ergebnisse eine einheitliche Struktur verfolgt wird. Im Kontext von Resistenzmonitoring und -surveillance gibt es dazu im Wesentlichen zwei Hauptfragestellungen. So ist es einerseits von Interesse, zu untersuchen, wie sich die Resistenzsituation für einzelne Wirkstoffe entwickelt. Zum anderen steht die Erkennung neuer Resistenzmuster bzw. von Veränderungen in bestehenden Resistenzmustern im Fokus.

Die Datengrundlage stellen in der Regel minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) dar, deren Messung eine gängige Methode zur quantitativen Bestimmung des Grads der Empfindlichkeit eines bakteriellen Erregers gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff ist. Im Rahmen dieser Arbeit werden zunächst die statistischen Eigenschaften von MHK-Werten beschrieben. Anschließend werden gängige statistische Methoden zur Deskription von Resistenzverteilungen einzelner Wirkstoffe sowie zur Deskription von Resistenzmustern und Verteilungen von Resistenzprofilen dargestellt. Zur systematischen Untersuchung von gleichzeitig auftretenden Resistenzen gegen verschiedene Wirkstoffe wurden von Ruddat et al. (2012) Verfahren entwickelt, die hier zusammenfassend wiedergegeben werden. Sie ermöglichen es, insbesondere in großen Datensätzen, auffällige Resistenzmuster zu erkennen. Die Kenntnis solcher Abhängigkeitsstrukturen in Empfindlichkeitsdaten ist ein essenzieller Schritt im Rahmen der Interpretation von weiterführenden Analysen, wie z. B. Ursache-Wirkungs-Modellen zur Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf die Entstehung und Verbreitung von antimikrobiellen Resistenzen. Abschließend wird die Möglichkeit erläutert, Empfindlichkeitsdaten distanzbasiert im Kontext bekannter multivariater statistischer Verfahren auszuwerten. Alle dargestellten Verfahren werden anhand der Empfindlichkeitsdaten eines Kollektivs von MRSA-Isolaten veranschaulicht.

Statistische Eigenschaften von phänotypischen Empfindlichkeitsdaten

MHK-Werte

Eine gängige Methode zur Bestimmung des Grads der Empfindlichkeit eines bakteriellen Erregers gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff ist die Messung des MHK-Werts mittels Bouillon-Mikrodilution. Hierzu werden kommerziell verfügbare Mikrotiterplatten verwendet, in deren Vertiefungen unterschiedliche Konzentrationen der zu prüfenden Wirkstoffe – üblicherweise in einer zweifachen Verdünnungsreihe – enthalten sind. Der MHK-Wert entspricht der niedrigsten Konzentration eines Wirkstoffs, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum vorhanden ist, und wird in µg/ml bzw. mg/l angegeben (Schwarz et al., 2003). Diese Größe ist per Definition quantitativ, jedoch ist die Anzahl der möglichen Werte abhängig von den im Testpanel der Mikrotiterplatte getesteten Konzentrationsstufen des jeweiligen Wirkstoffs und somit diskret beschränkt. So werden z. B. im Rahmen des G*ERM*-Vet-Programms für den Wirkstoff Chloramphenicol zehn Konzentrationsstufen im Bereich 0,5–256 mg/l geprüft. Wird das Bakterienwachstum durch eine Konzentration von beispielsweise 4 mg/l des Wirkstoffs gehemmt, während es eine Konzentration von 2 mg/l noch nicht getan hat, ist die realisierte MHK 4 mg/l. Die wahre MHK liegt jedoch irgendwo zwischen 2 mg/l und 4 mg/l. Wird das Bakterienwachstum bereits durch die niedrigste geprüfte Konzentration gehemmt, ist der tatsächliche Wert kleiner als oder gleich diese(r) Konzentration. Für MHK-basierte Berechnungen wird in diesen Fällen die MHK als niedrigste getestete Konzentration festgelegt. Ist die Empfindlichkeit eines Isolats so gering, dass das Wachstum nicht durch die höchste getestete Konzentration eines Wirkstoffs gehemmt wird, bedeutet dies, dass die MHK größer als die höchste getestete Konzentration ist.

Für MHK-basierte Berechnungen wird in der Regel die nächsthöhere Konzentrationsstufe in der zweifachen Verdünnungsreihe herangezogen. Folglich ist die MHK eine intervallskalierte Größe. Aufgrund der unterschiedlichen Breite der zugrunde liegenden Wertebereiche sollten Messwerte daher als ordinal aufgefasst und mit entsprechenden statistischen Methoden ausgewertet werden. Ausgehend von einer zweifachen Verdünnungsreihe entstehen durch eine log2-Transformation von MHK-Werten äquidistante Abstände von 1 und Berechnungen sollten basierend auf diesen Werten durchgeführt werden. Die Verteilungen von MHK-Werten eines Wirkstoffs in einer Population untersuchter Bakterien haben häufig eine bimodale Form. Diese entsteht dadurch, dass es in einem Untersuchungskollektiv von Isolaten eine Gruppe von empfindlichen Isolaten mit niedrigen MHK-Werten geben kann und eine Gruppe mit höheren MHK-Werten, deren Empfindlichkeit durch einen erworbenen Resistenzmechanismus reduziert ist.

Qualitative Interpretation von MHK-Werten

Die quantitativen Messwerte der Empfindlichkeitsprüfung können durch sogenannte Interpretationskriterien qualitativ beurteilt werden. Diese müssen entsprechend der verwendeten Durchführungsvorschrift gewählt werden. Es gibt zwei unterschiedliche Typen von Interpretationskriterien. Für Surveillance-Fragestellungen bietet es sich an, Isolate durch epidemiologische Cut-off-Werte als Wildtyp oder Nicht-Wildtyp einzustufen, wodurch binäre Daten entstehen. Im klinischen Kontext sollten klinische Grenzwerte verwendet werden, durch die Isolate als sensibel (s), intermediär (i) oder resistent (r) eingestuft werden, sodass wiederum ordinale Daten entstehen. Zur Betrachtung von Resistenzprofilen wird oft diese dreistufige Information pro Wirkstoff weiter vereinfacht und zu einer binären Information zusammengefasst. Hierbei finden sich Studien, in denen sensible und intermediäre Isolate gemeinsam als nicht-resistent (nr) aufgefasst werden (z. B. Alali et al., 2009), aber auch Studien, in denen intermediäre und resistente Isolate als nicht-sensibel (ns) interpretiert werden (z. B. Bhavnani et al., 2003). Aus den (s, i, r)-Profilen entstehen somit (nr, r)-Profile bzw. (s, ns)-Profile.

Da diese qualitativen Daten selbst bereits Ergebnis eines Interpretationsschrittes sind, ist es generell sinnvoll, bei Resistenzuntersuchungen mit den originalen MHK-Werten zu arbeiten. Die im Rahmen dieser Ausführungen beschriebenen Methoden werden aber sowohl hinsichtlich der Auswertung von MHK-Werten als auch

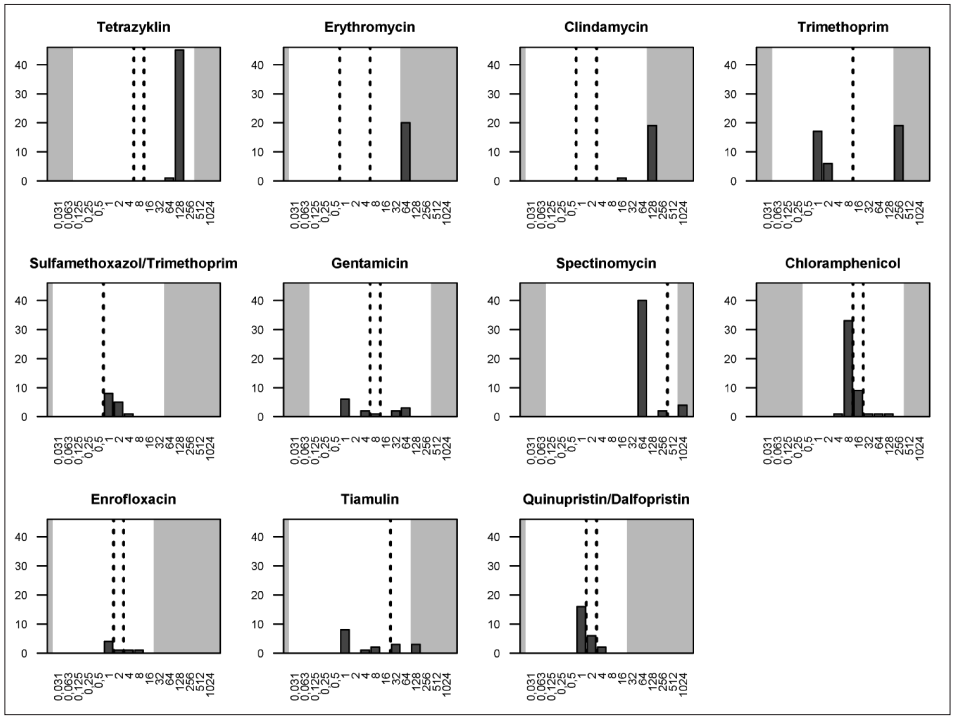


ABBILDUNG 1: *Grafische Darstellung der wirkstoffspezifischen MHK-Häufigkeitsverteilungen, gemessen in mg/l von 46 ST398 MRSA-Isolaten nach Kadlec et al. (2009); grau hinterlegt sind die Konzentrationsstufen, die im Testpanel nicht getestet wurden; - - zeigen die verwendeten klinischen Grenzwerte.*

hinsichtlich der Auswertung von durch klinische Grenzwerte beurteilten qualitativen Empfindlichkeitsdaten beschrieben. Der Übersichtlichkeit halber wird im Folgenden nicht explizit auf durch epidemiologische Cut-off-Werte beurteilte Daten hingewiesen. Jedoch können die hier beschriebenen und für binäre Daten geeigneten Verfahren auch auf diese angewendet werden.

Datenstruktur

Wurden für ein Kollektiv von Isolaten die Empfindlichkeiten gegen verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe getestet, kann die Struktur der Daten wie in Tabelle 1 aufgefasst werden, in der MHK-Werte für jedes Isolat und für jeden getesteten Wirkstoff dargestellt sind. Stehen lediglich qualitativ beurteilte Daten zur Verfügung, können diese in analoger Form in einem Datenblatt aufgeführt werden. In einem solchen Datenblatt sind die beobachteten Empfindlichkeiten für die verschiedenen Isolate gegenüber einem Wirkstoff spaltenweise aufgeführt. Des Weiteren entspricht das Resistenzprofil eines Isolats den Werten einer Zeile des Datenblattes. Aus statistischer Sicht wird ein solches Resistenzprofil auch als multivariate Größe aufgefasst, sodass Verfahren der multivariaten Statistik zu dessen Auswertung herangezogen werden können.

TABELLE 1: *Datenstruktur von MHK-Werten für p antimikrobielle Wirkstoffe von n Isolaten*

Isolat	Wirkstoff				
	1	2	…	p	
1	mhk_{11}	mhk_{12}	…	mhk_{1p}	← Resistenzprofil von Isolat 1
2	mhk_{21}	mhk_{22}	…	mhk_{2p}	
…	…	…	…	…	
n	mhk_{n1}	mhk_{n2}	…	mhk_{np}	
	↑ Beobachtungen für Wirkstoff 1				

Beispiel-Datensatz

Um im Folgenden eine systematische Darstellung der statistischen Analysen von Resistenzdaten vorzunehmen, stehen Empfindlichkeitsdaten von 46 porzinen MRSA ST398 Isolaten aus dem nationalen Resistenzmonitoringprogramm GERM-Vet von 2008 zur Verfügung, die bereits ausführlich von Kadlec et al. (2009) beschrieben wurden. Von den 30 getesteten antimikrobiellen Wirkstoffen wurden Daten für elf repräsentative Wirkstoffe aus unterschiedlichen Wirkstoffklassen ausgewählt. Die Empfindlichkeitsbestimmung wurde mittels Bouillon-Mikrodilution gemäß den Vorgaben des CLSI (2008) durchgeführt. Die Isolate wurden anhand von klinischen Grenzwerten als sensibel (s), intermediär (i) oder resistent (r) entsprechend CLSI-Dokument M31-A3 (2008) klassifiziert. Für Enrofloxacin wurden die für Ciprofloxacin anerkannten Grenzwerte entsprechend CLSI-Dokument M100-S23 (CLSI, 2013) verwendet. Falls CLSI-Grenzwerte für bestimmte Wirkstoffe nicht verfügbar waren, wurden Isolate mit sehr hohen MHK-Werten, welche sich zusätzlich noch deutlich von den normalverteilten MHK-Werten unterschieden, als resistent erachtet. Diese Klassifizierung wurde durch den Nachweis entsprechender Resistenzgene oder resistenzvermittelnder Mutationen gestützt (Kadlec und Schwarz, 2009; Hauschild et al., 2012; Wendlandt et al., 2014). Dies war der Fall für Spectinomycin (≥ 512 mg/l) und Tiamulin (≥ 32 mg/l). Eine Liste der Wirkstoffe ist in Tabelle 2 dargestellt.

Deskription von Empfindlichkeitsdaten pro getestetem Wirkstoff

Häufigkeitsverteilung

Eine komprimierte und detaillierte Beschreibung der Resistenzlage jedes einzelnen Wirkstoffs erfolgt in der Regel durch die tabellarische Darstellung der wirkstoffspezifischen MHK-Häufigkeitsverteilungen (Tab. 2). Hierbei werden zeilenweise die antimikrobiellen Wirkstoffe aufgelistet und spaltenweise die verschiedenen getesteten Konzentrationsstufen aufgeführt. In die Zellen der Tabelle wird die beobachtete Anzahl der Isolate pro Wirkstoff und Konzentrationsstufe eingetragen. Durch Einfärbung der Zellen wird gekennzeichnet, welche Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe geprüft wurden. Außerdem werden durch entsprechende Markierungen die verwendeten Grenzwerte zur qualitativen Beurteilung der Werte angegeben. In Tabelle 2 ist eine solche Häufigkeitsverteilung für die 46 MRSA ST398 Isolate dargestellt. Alternativ können die wirkstoffspezi-

TABELLE 2: *Tabellarische Darstellung der wirkstoffspezifischen MHK-Häufigkeitsverteilungen von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009); grau hinterlegt sind die im Testpanel nicht geprüften Konzentrationsstufen; | zeigen die verwendeten klinischen Grenzwerte.*

Wirkstoff	Anzahl der Isolate mit MHK-Werten (mg/l) von …																		MHK$_{50}$	MHK$_{90}$	s %	i %	r %
	0,031	0,063	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024							
TET			0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	45	0	0		128	128	0,0	0,0	100,0
ERY	0	0	0	10	16	0	0	0	0	0	0	20					0,5	64	56,5	0,0	43,5
CLI	0	3	17	5	1	0	0	0	0	1	0	0	19				0,25	128	56,5	0,0	43,5
TMP		0	0	0	4	17	6	0	0	0	0	0	0	19			2	256	58,7	-	41,3
SXT*	0	16	9	1	6	8	5	1	0	0	0	0					0,125	2	69,6	-	30,4
GEN			0	6	26	6	0	2	1	0	2	3	0	0	0		0,5	16	86,9	2,2	10,9
SPE			0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	2	0	4	64	128	91,3	-	8,7
CHL				0	0	0	0	1	33	9	1	1	1	0	0		8	16	73,9	19,6	6,5
ENR	0	0	20	17	2	4	1	1	1	0	0						0,25	1	93,5	2,2	4,3
TIA	0	0	0	0	29	8	0	1	2	0	3	0	3				0,5	32	87,0	-	13,0
SYN	0	0	0	2	20	16	6	2	0	0	0						1	2	82,6	13,0	4,4

TET: Tetrazyklin, ERY: Erythromycin, CLI: Clindamycin, TMP: Trimethoprim, SXT: Sulfamethoxazol/Trimethoprim (19/1), GEN: Gentamicin, SPE: Spectinomycin, CHL: Chloramphenicol, ENR: Enrofloxacin, TIA: Tiamulin, SYN: Quinupristin/Dalfopristin
*aufgeführt sind die beobachteten MHKs für TMP

fischen MHK-Verteilungen mit zugehörigem Prüfbereich und Grenzwerten grafisch dargestellt werden (Abb. 1).

MHK$_{50}$ und MHK$_{90}$

Übliche Maße zur Deskription von MHK-Verteilungen sind der MHK$_{50}$- und der MHK$_{90}$-Wert. Der MHK$_{50}$-Wert ist die Wirkstoffkonzentration, bei der mindestens 50 % der Isolate der Stichprobe in ihrem Wachstum gehemmt werden, und entspricht somit dem Median der Stichprobe. Formal lässt sich dieses Maß nach Schwarz et al. (2010) für einen antimikrobiellen Wirkstoff durch

$$MHK_{50} = \begin{cases} mhk_{(n \times 0,5)} & \text{falls n gerade} \\ mhk_{((n+1) \times 0,5)} & \text{falls n ungerade} \end{cases}$$

bestimmen. Hierbei bezeichnen $mhk_{(1)}$, $mhk_{(2)}$, …, $mhk_{(n)}$ die geordnete Stichprobe der MHK-Werte von n Isolaten eines Wirkstoffs. Der MHK$_{90}$-Wert ist die Wirkstoffkonzentration, bei der mindestens 90 % der Isolate der Stichprobe in ihrem Wachstum gehemmt werden, und entspricht somit dem 90%-Quantil bzw. dem 90%-Perzentil der Stichprobe. Formal ergibt sich dieses Maß durch

$$MHK_{90} = \begin{cases} mhk_{(t)} & \text{falls } n \times 0,9 \text{ eine ganze Zahl ist und } t = n \times 0,9 \\ mhk_{(t)} & \text{falls } n \times 0,9 \text{ keine ganze Zahl ist und t die auf } n \times 0,9 \text{ folgende ganze Zahl} \end{cases}$$

Die so berechneten Maßzahlen für die 46 MRSA ST398 Isolate sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Davon ausgehend, dass MHK-Werte ordinal skaliert sind und häufig eine bimodale Struktur der Daten auftritt, sind andere statistische Kenngrößen wie beispielsweise die Angabe von arithmetischen Mittelwerten oder Standardabweichungen der beobachteten MHK-Werte formal nicht sinnvoll, da sie nicht adäquat interpretiert werden können.

Anteile für qualitative Empfindlichkeitsdaten

Für die wirkstoffspezifische Beschreibung von qualitativ beurteilten Empfindlichkeitsdaten werden üblicherweise die relativen Häufigkeiten, d. h. die Anteile, der einzelnen Kategorien angegeben. Diese können ebenfalls in der Tabelle der MHK-Häufigkeitsverteilung genannt werden, wie es für die dreistufige Information s, i, r in Tabelle 2 erfolgt ist.

Deskription von Resistenzprofilen und -mustern

Häufigkeitsverteilung

Eine Beschreibung der Resistenzmuster einer Stichprobe erfolgt häufig in tabellarischer Form durch Auflistung der verschiedenen Resistenzprofile mit Angabe der Häufigkeiten, wobei für jeden Wirkstoff zwischen nicht-resistent und resistent bzw. sensibel und nicht-sensibel unterschieden wird (Tab. 3). Anhand einer solchen Darstellung kann zudem abgelesen werden, wie häufig und welche Mehrfachresistenzen auftreten. Einzelne Publikationen präsentieren grafische Darstellungen einer Häufigkeitsverteilung von Resistenzprofilen. Williams et al. (2013) verwenden ein übliches Säulendiagramm mit Angabe des 0/1 kodierten Profils als Achsenbeschriftung (Abb. 2). Bei dieser Darstellungsweise erhält der Betrachter primär die Information, wie gleichmäßig bzw. ungleichmäßig häufig die verschiedenen Resistenzprofile in der Stichprobe auftreten. Um welche Muster es sich im Speziellen handelt, kann anhand der Achsen-

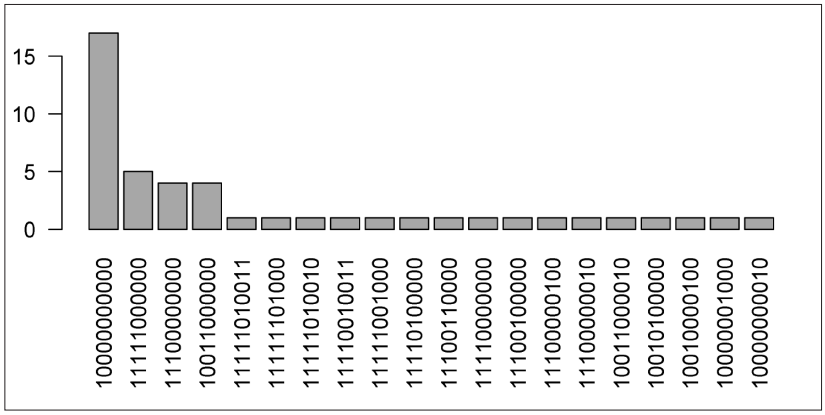


ABBILDUNG 2: *Profilhäufigkeitsverteilung der 46 MRSA ST398 Isolate nach Kadlec et al. (2009); die Profile unterscheiden zwischen resistent (1) und nicht-resistent (0) für jeden antimikrobiellen Wirkstoff in folgender Reihenfolge: Tetrazyklin, Erythromycin, Clindamycin, Trimethoprim, Sulfamethoxazol/Trimethoprim, Gentamicin, Spectinomycin, Chloramphenicol, Enrofloxacin, Tiamulin, Quinupristin/Dalfopristin.*

und Abbildungsbeschriftung nachvollzogen werden, ist aber visuell nicht sehr eingängig. Eine inhaltlich tiefere Beschreibung von Resistenzmustern kann mithilfe von unterschiedlich eingefärbten Feldern in einem Rastergitter erfolgen (z. B. Scaria et al., 2010). Neben der Darstellung von binären Profilen kann hierbei auch durch drei verschiedene Farbabstufungen pro Wirkstoff zwischen einem sensiblen, intermediären bzw. resistenten Testergebnis unterschieden werden. Die Häufigkeiten der Profile können dabei visuell über die Darstellung jedes beobachteten Profils (Abb. 3) oder komprimiert über die Darstellung jedes auftretenden Profils mit Angabe der beobachteten Häufigkeit (Abb. 4) erfolgen. Beide Vorgehensweisen liefern durch die zweidimensionale Darstellung zwei Aspekte der Datenbeschreibung. Zum einen werden Resistenzmuster gelistet, an denen abgelesen werden kann, wie viele und welche Mehrfachresistenzen auftreten (zeilenweise Information). Außerdem wird ein Überblick über die Testergebnisse pro Wirkstoff gegeben (spaltenweise Information).

TABELLE 3: *Tabellarische Darstellung der Häufigkeitsverteilung von (nr, r)-Profilen der Resistenzeigenschaften zusätzlich zur Methicillin-Resistenz der 46 MRSA ST398 Isolate nach Kadlec et al. (2009) (für Abkürzungen der Wirkstoffe s. Tab. 2)*

Nr.	Profil	Häufigkeit	%
1	TET	17	37,0
2	TET+ERY+CLI+TMP+SXT	5	10,9
3	TET+ERY+CLI	4	8,7
4	TET+TMP+SXT	4	8,7
5	TET+ERY+CLI+TMP+SXT+SPE+TIA+SYN	1	2,2
6	TET+ERY+CLI+TMP+SXT+GEN+CHL	1	2,2
7	TET+ERY+CLI+TMP+SXT+SPE+TIA	1	2,2
8	TET+ERY+CLI+TMP+SPE+TIA+SYN	1	2,2
9	TET+ERY+CLI+TMP+SXT+CHL	1	2,2
10	TET+ERY+CLI+TMP+GEN	1	2,2
11	TET+ERY+CLI+GEN+SPE	1	2,2
12	TET+ERY+CLI+TMP	1	2,2
13	TET+ERY+CLI+GEN	1	2,2
14	TET+ERY+CLI+TIA	1	2,2
15	TET+ERY+CLI+ENR	1	2,2
16	TET+TMP+SXT+TIA	1	2,2
17	TET+TMP+GEN	1	2,2
18	TET+TMP+ENR	1	2,2
19	TET+CHL	1	2,2
20	TET+TIA	1	2,2

Diversität

Zur Beschreibung der Diversität von Resistenzprofilen einer Stichprobe bietet es sich an, die Anzahl der verschiedenen beobachteten Profile in Relation zum Stichprobenumfang anzugeben. Dieser Wert kann als Schätzung der Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte Isolate unterschiedliche Resistenzprofile zeigen, interpretiert werden (Pleydell et al., 2010). Je größer der beobachtete Wert ist, desto höher ist die Diversität der Profile. Für die 46 MRSA ST398 Isolate wurden 25 verschiedene (s, i, r)-Profile beobachtet. Dies ergibt als Wahrscheinlichkeit, dass zwei Isolate unterschiedliche Profile zeigen, einen Wert von 54,3 %.

Analyse der Abhängigkeitsstruktur

In einer Bakterienpopulation treten verstärkt bestimmte Resistenzmuster auf, wobei gleichzeitig auftretende Resistenzen gegen mehrere Wirkstoffe z. B. durch eine ähnliche chemische Struktur oder einen ähnlichen Wirkmechanismus der Wirkstoffe, durch genetisch verknüpfte Resistenzmechanismen oder durch einen gleichzeitigen Therapieeinsatz der Wirkstoffe erfolgen können. Eine Quantifizierung von gleichzeitig auftretenden Resistenzen erfolgt durch eine systematische Analyse der Abhängigkeitsstruktur von Empfindlichkeitsdaten. Die Ergebnisse einer solchen Analyse sind geeignet, um im Rahmen von Monitoring und Surveillance von antimikrobieller Resistenz Dynamiken in Resistenzmustern über die Zeit zu beobachten. Des Weiteren kann das Auffinden neuer Resistenzmuster hypothesengenerierend für die diagnostische Forschung sein, indem durch Sequenzanalysen die verantwortlichen Resistenzmechanismen und deren Organisation untersucht werden. Außerdem sind Kenntnisse dieser Strukturen essenziell für die geeignete Interpretation von Ergebnissen komplexerer statistischer Analysen. Durch folgende von Ruddat et al. (2012) beschriebene Verfahren kann eine solche systematische Analyse der Abhängigkeitsstrukturen in phänotypischen Empfindlichkeitsdaten erfolgen.

Korrelation zwischen MHK-Werten

Der Zusammenhang zwischen MHK-Werten zweier antimikrobieller Wirkstoffe kann mithilfe des für ordinale Daten geeigneten Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ρ analysiert werden, der Werte zwischen –1 (negative Korrelation) und +1 (positive Korrelation) annimmt. Ein Ergebnis nahe +1 deutet in diesem Anwendungsgebiet darauf hin, dass wenn die MHK-Werte für den einen Wirkstoff erhöht sind, sie es auch für den anderen sind (unabhängig von Überschreitungen qualitativer Interpretationskriterien). Zur Visualisierung des Zusammenhangs können sogenannte Jittered Scatterplots verwendet werden. Hierzu werden zu jeder Beobachtung kleine Zufallszahlen addiert, wodurch

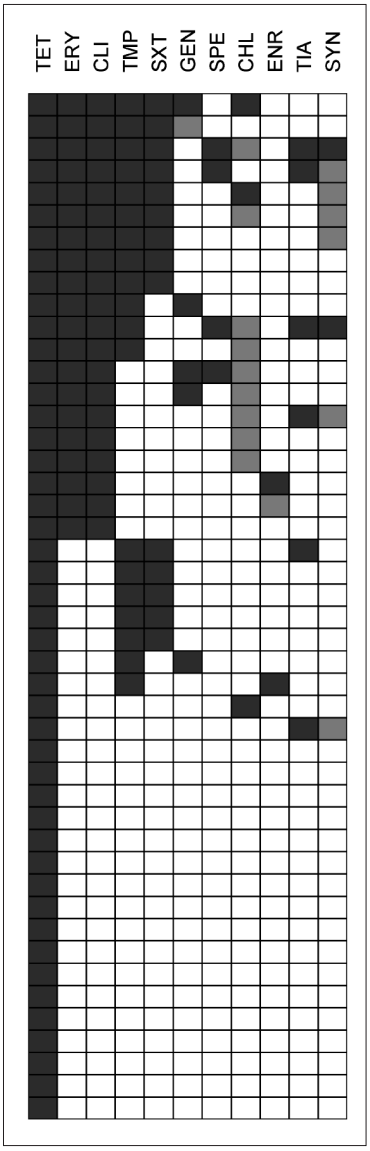
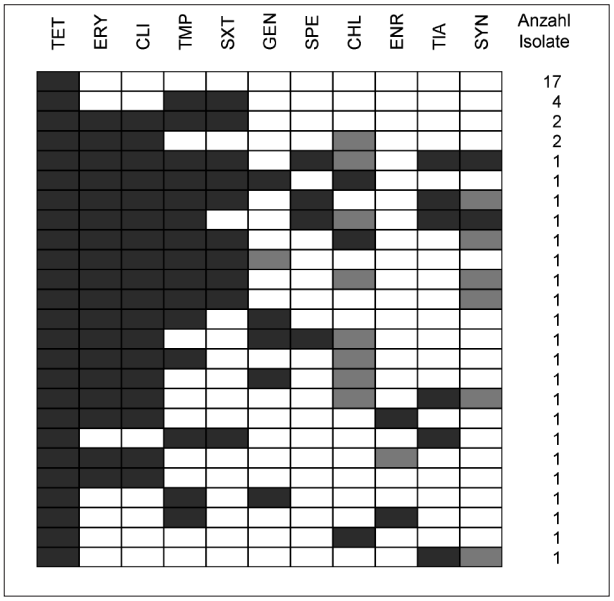


ABBILDUNG 3: *Darstellung der Resistenzmuster für 46 MRSA ST398 Isolate nach Kadlec et al. (2009); eine Zeile entspricht dem (s, i, r)-Profil eines Isolats: weiße Felder markieren ein sensibles Ergebnis, hellgraue Felder markieren ein intermediäres Ergebnis und dunkelgraue Felder ein resistentes Ergebnis (für Abkürzungen der Wirkstoffe s. Tab. 2).*

ABBILDUNG 4: *Darstellung der Resistenzmuster mit Angabe der Häufigkeiten für (s, i, r)-Profile von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009); weiße Felder markieren ein sensibles Ergebnis, hellgraue Felder markieren ein intermediäres Ergebnis und dunkelgraue Felder ein resistentes Ergebnis (für Abkürzungen der Wirkstoffe s. Tab. 2).*



überlappende Datenpunkte dargestellt werden können. Beispiel für eine hohe Korrelation zwischen den MHK-Werten der 46 MRSA ST398 Isolate ist die Betrachtung von Erythromycin und Clindamycin mit einem ρ von 0,929, während die Kombination von Clindamycin und Trimethoprim keinen auffälligen Zusammenhang zeigt (ρ = 0,245). Die Jittered Scatterplots beider Vergleiche sind in Abbildung 5 dargestellt.

Assoziation zwischen qualitativen Empfindlichkeitsdaten

Die Assoziation zwischen qualitativen Empfindlichkeitsdaten zweier antimikrobieller Wirkstoffe kann mithilfe von Kontingenztafeln untersucht werden. Grafisch können die beobachteten Häufigkeiten ähnlich wie in einem Jittered Scatterplot dargestellt werden. Hohe Häufigkeiten auf der Hauptdiagonalen eines solchen „Kontingenzplots" sprechen für einen möglichen Zusammenhang zwischen den Resistenzeigenschaften. Für die Auswertung großer Datensätze bietet es sich an, anstelle der Darstellung einzelner Punkte die Häufigkeiten in den Kontingenzplots durch Farbkodierungen anzugeben (Ruddat et al., 2012). Zur Quantifizierung der Assoziation können der Resistenzindex R und der Suszeptibilitätsindex S herangezogen werden. Der Resistenzindex ist definiert als die Wahrscheinlichkeit eines Isolats, für alle betrachteten Wirkstoffe gleichzeitig resistent zu sein, wenn es für mindestens einen Wirkstoff resistent ist. Für die Betrachtung zweier Wirkstoffe lässt er sich durch

$$R = \frac{\text{Anzahl Isolate (für Wirkstoff 1 resistent \underline{und} für Wirkstoff 2 resistent)}}{\text{Anzahl Isolate (für Wirkstoff 1 resistent \underline{und/oder} für Wirkstoff 2 resistent)}}$$

berechnen. Der Suszeptibilitätsindex ist analog zur Messung der gleichzeitigen Suszeptibilität definiert. Für die Betrachtung zweier Wirkstoffe lässt er sich durch

$$S = \frac{\text{Anzahl Isolate (für Wirkstoff 1 sensibel \underline{und} für Wirkstoff 2 sensibel)}}{\text{Anzahl Isolate (für Wirkstoff 1 sensibel \underline{und/oder} für Wirkstoff 2 sensibel)}}$$

berechnen. Die Formeln beider Indices können für die gleichzeitige Betrachtung mehrerer Wirkstoffe zur Messung von Multiresistenzen angepasst werden. Außerdem können exakte Konfidenzintervalle angegeben werden (Ruddat et al., 2012). Beide Maße nehmen Werte zwischen 0 und 1 an. Sind die Werte beider Indices für die gleiche Wirkstoffkombination nahe 1, bedeutet dies, dass Isolate häufig gleichzeitig resistent und gleichzeitig sensibel gegen die betrachteten Wirkstoffe sind. Dies kann beispielsweise auf eine genetische Verknüpfung der entsprechenden Resistenzmechanismen oder eine Kreuzresistenz hindeuten, sodass diese Maßzahlen vor allem dazu geeignet sind, die empirischen Zusammenhänge in Populationen zu beschrieben. Dies ist vor allem bei Vergleichen von Populationen über die Zeit oder auch zwischen Regionen von Bedeutung. Generell sollten Interpretationsansätze aber nur unter Einbezie-

TABELLE 4: *Kontingenztafeln der qualitativen Empfindlichkeitsdaten von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009) für Erythromycin und Clindamycin sowie Trimethoprim und Clindamycin*

s		Erythromycin			Trimethoprim	
		i	r	s	r	
Clindamycin	s	26	0	0	19	7
	i	0	0	0	0	0
	r	0	0	20	8	12

hung von Kontingenztafeln bzw. -plots angestellt werden. Des Weiteren ist eine vollständige Interpretation von detektierten Auffälligkeiten nur durch weitergehende mikrobiologischen Charakterisierungen möglich.

Hohe Assoziationen lassen sich für die 46 MRSA ST398 Isolate zwischen Erythromycin und Clindamycin mit R = 1 und S = 1 beobachten. Keine Auffälligkeiten zeigt die Kombination von Clindamycin und Trimethoprim mit R = 0,444 und S = 0,559. Die zugrunde liegenden Kontingenztafeln sind in Tabelle 4 sowie die Kontingenzplots in Abbildung 6 dargestellt.

Distanzbasierte Auswertung

Da einzelne Resistenzinformationen von Isolaten einer Bakterienpopulation gegen verschiedene Wirkstoffe nicht unabhängig sind, ist es sinnvoll, das Resistenzprofil eines Isolats im Rahmen der statistischen Auswertung als Ganzes zu betrachten und somit eine multivariate Auswertung vorzunehmen. Verfahren der multivariaten Statistik basieren häufig auf der Auswertung von sogenannten Distanzen, durch welche die Ähnlichkeit bzw. Unterschiedlichkeit zwischen verschiedenen Individuen gemessen wird. Hierzu werden jeweils die Beobachtungen zweier Individuen mithilfe eines Distanzmaßes verglichen, wobei gilt: Je größer die Distanz, desto stärker unterscheiden sich die Beobachtungen. Welches Distanzmaß konkret gewählt wird, hängt vom Skalenniveau der betrachteten Variablen sowie der fachinhaltlichen Fragestellung ab.

Für eine sinnvolle Berechnung von Distanzen zwischen phänotypischen Empfindlichkeitsdaten ist es notwendig, basierend auf pharmakologischer, mikrobiologischer, klinischer und epidemiologischer Expertise festzulegen, welche Wirkstoffe gemeinsam im Resistenzprofil betrachtet werden sollen. Resistenzen gegen verschiedene Wirkstoffe, die durch den gleichen Resistenzmechanismus hervorgerufen werden, würden beispielsweise bei gleichzeitiger Betrachtung stärker gewichtet werden als andere. Für den hier betrachteten Beispieldatensatz haben sich durch die Analyse der Abhängigkeitsstrukturen hohe Zusammenhänge zwischen Erythromycin und Clindamycin gezeigt. Dies basiert auf der ausschließlichen Präsenz der Gene *erm*(A), *erm*(B) und/oder *erm*(C), die alleinig oder in diversen Kombinationen bei den Isolaten dieses Testkollektivs vorkommen (Kadlec et al., 2009). Diese Gene kodieren für Methylasen, welche die gemeinsame Bindungsstelle für Makrolide (z. B. Erythromycin) und Lincosamide (z. B. Clindamycin) in der 23S rRNA der Ribosomen chemisch modifizieren, sodass Vertreter beider Wirkstoffklassen nicht mehr an ihre Zielstrukturen binden können. Aufgrund dieser hier auftretenden Kreuzresistenz (Werckenthin et al., 2005; Wendlandt et al., 2013) wird die ursprüngliche Zahl von elf Wirkstoffen daher auf zehn eingeschränkt und Clindamycin von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

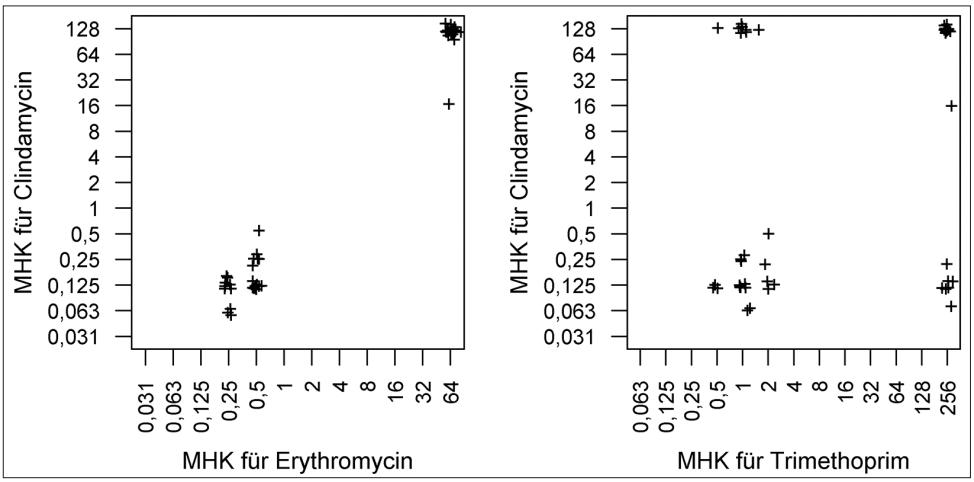


ABBILDUNG 5: *Jittered Scatterplots der MHK-Werte von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009) für Erythromycin und Clindamycin sowie Trimethoprim und Clindamycin.*

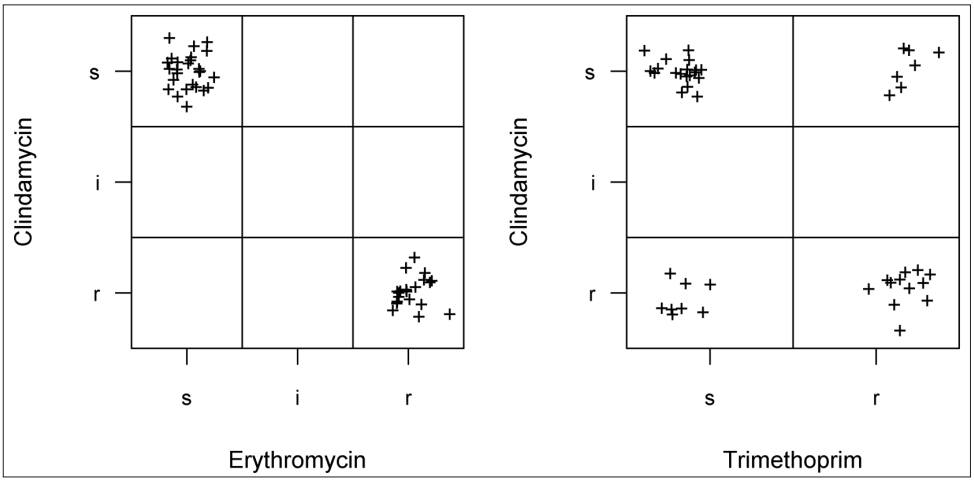


ABBILDUNG 6: *Kontingenzplots der qualitativen Empfindlichkeitsdaten von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009) für Erythromycin und Clindamycin sowie Trimethoprim und Clindamycin.*

Distanzen zwischen Resistenzprofilen

Bei **binär kodierten Resistenzprofilen** wird pro Wirkstoff zwischen zwei Eigenschaften unterschieden, z. B. nicht-resistent und resistent. Die Distanz zwischen den Profilen zweier Isolate kann in diesem Fall mithilfe des sogenannten Simple Matching-Koeffizienten quantifiziert werden. Dieser zählt, für wie viele Wirkstoffe unterschiedliche Testergebnisse beobachtet wurden, und liegt somit zwischen 0 (identische Profile) und der Anzahl der getesteten Wirkstoffe (komplett unterschiedliche Profile). Für die (nr, r)-Profile der 46 MRSA ST398 Isolate werden Distanzen zwischen 0 und 7 gemessen, was bedeutet, dass sich die Profile der Isolate in maximal sieben Testergebnissen für die hier

betrachteten zehn Wirkstoffe unterscheiden. Das Mittel aller Distanzen ist 2,318.

Bei **(s, i, r)-Profilen** wird pro Wirkstoff zwischen drei möglichen Testergebnissen unterschieden: sensibel, intermediär und resistent. Da die Kategorien in eine Reihenfolge gebracht werden können, d. h. ordinaler Natur sind, ist es sinnvoll, Unterschiede zwischen den einzelnen Kategorien zu gewichten. Wird z. B. für den gleichen Wirkstoff für ein Isolat ein sensibles Testergebnis beobachtet und für ein anderes ein resistentes Testergebnis, kann dieser Unterschied mit 1 gewertet werden, während ein Unterschied zwischen sensibel und intermediär bzw. intermediär und resistent nur mit 0,5 gewertet wird. Bei Wahl dieser Gewichtungen liegt auch dieses Distanzmaß zwischen 0 und der Anzahl der getesteten Wirkstoffe. Dieses Distanzmaß entspricht der sogenannten Manhattan-Distanz (auch City-Block-Metrik) für ordinale Beobachtungen. Für die (s, i, r)-Profile der 46 MRSA ST398 Isolate werden bei Betrachtung der zehn Wirkstoffe Abstände zwischen 0 und 6,5 gemessen. Das Mittel aller Distanzen ist 2,594.

Zur Messung der Unterschiede zwischen zwei **MHK-Resistenzprofilen** kann pro Wirkstoff auch gezählt werden, um wie viele Konzentrationsstufen sich die Testergebnisse der beiden Isolate unterscheiden, und diese Werte über alle Wirkstoffe aufsummiert werden. Wird zusätzlich pro Wirkstoff der gemessene Unterschied durch die Anzahl der für diesen Wirkstoff im Testpanel untersuchten Konzentrationsstufen dividiert, werden alle Wirkstoffe gleich stark gewichtet und die gemessene Distanz nimmt Werte zwischen 0 (identische Profile) und der Anzahl der getesteten Wirkstoffe (das eine Isolat wurde durch die kleinste Konzentrationsstufe jedes Wirkstoffs gehemmt, während das andere Isolat jeweils durch die höchste Konzentrationsstufe nicht gehemmt werden konnte) an. Die Distanz zwischen zwei beliebigen Isolaten, hier bezeichnet durch Isolat i und Isolat j, ergibt sich somit durch

$$\text{Distanz (Isolat i, Isolat j)} = \sum_{\text{Wirkstoff k}=1}^{p} \frac{\left|\text{Konzentrationsstufe (Isolat i, Wirkstoff k)} - \text{Konzentrationsstufe (Isolat j, Wirkstoff}\right.}{\text{Anzahl der Konzentrationsstufen (Wirkstoff k)}}$$

Das gewählte Distanzmaß entspricht einer Manhattan-Distanz und lässt sich formal über die Anwendung auf logarithmierte MHK-Werte abbilden (Ruddat, 2013).

Resistenzscore

Zur Messung des Grads der antimikrobiellen Resistenz basierend auf Distanzen wird von Ruddat (2013) der Resistenzscore RS vorgeschlagen. Dieser entspricht dem Abstand des Resistenzprofils eines jeden Isolats zu der „größtmöglichen Empfindlichkeit“, die ein Isolat derselben Studie theoretisch haben kann. Die größtmögliche Empfindlichkeit wird je nach Datengrundlage durch ein für die jeweils betrachteten Wirkstoffe vollständig sensibles Profil bzw. durch ein Profil mit den kleinstmöglichen MHK-Werten repräsentiert. Bei Verwendung der oben beschriebenen Distanzmaße nimmt der Resistenzscore Werte zwischen 0 und der Anzahl der getesteten Wirkstoffe an. Für (nr, r)-Profile entspricht der Score der Anzahl resistenter Testergebnisse für das betrachtete Wirkstoffkollektiv. Generell gilt für den Resistenzscore: Je stärker die Empfindlichkeit des betrachteten Isolats beeinträchtigt ist, desto größer ist der Resistenzscore und desto größer ist der Grad der antimikrobiellen Resistenz des Isolats. Die Verteilungen des Resistenzscores für die 46 MRSA ST398 Isolate sind in den Abbildungen 7 (MHK-Profile) und 8 ([nr, r]-Profile) dargestellt.

Komplexere distanzbasierte Verfahren

Die Betrachtung von Distanzen zwischen Empfindlichkeitsdaten ermöglichen verschiedene Ansätze zur Modellierung der antimikrobiellen Resistenz als Zielgröße in Ursache-Wirkungs-Modellen. Solche Modelle ermöglichen beispielsweise Analysen über die Zeit oder die Identifizierung von Risikofaktoren, die einen Einfluss auf die Entstehung und Verbreitung von antimikrobieller Resistenz haben können. Berge et al. (2003) schlagen die Clusteranalyse zur Einteilung von Resistenzprofilen in Kategorien vor, um anschließend diese ordinale Clusterzugehörigkeit als Zielgröße in mehrfaktoriellen generalisierten linearen Regressionsmodellen zu analysieren. Ruddat (2013) diskutiert die Möglichkeit, den Resistenzscore als quantitative Zielgröße (basierend auf MHK-Profilen) bzw. als Zählgröße (basierend auf qualitativen Empfindlichkeitsdaten) in Regressionsmodellen

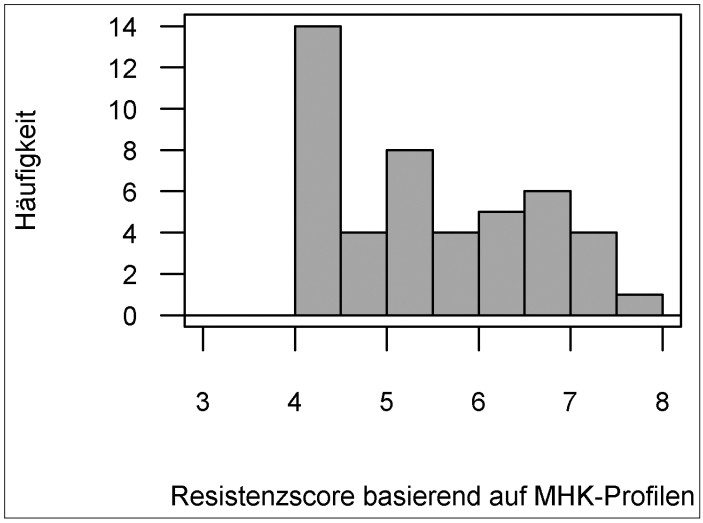


ABBILDUNG 7: *Verteilung des Resistenzscores basierend auf MHK-Profilen von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009).*

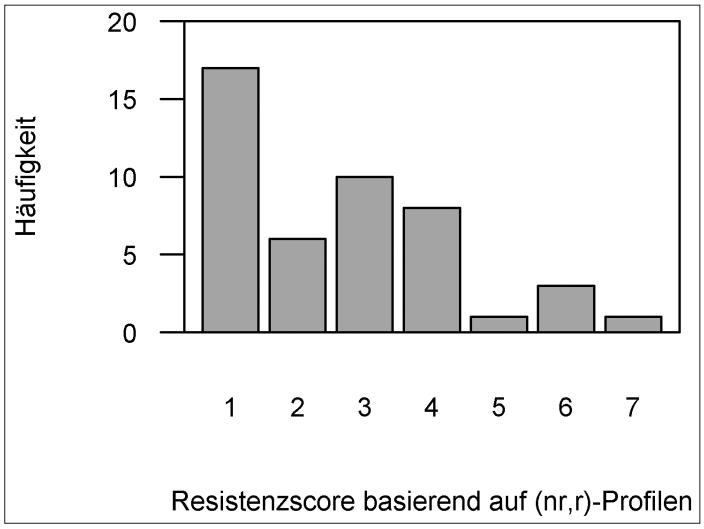


ABBILDUNG 8: *Verteilung des Resistenzscores basierend auf (nr, r)-Profilen von 46 MRSA ST398 Isolaten nach Kadlec et al. (2009).*

zu verwenden. Des Weiteren wird auf die Anwendung des distanzbasierten Permutationstest auf multivariate phänotypische Empfindlichkeitsdaten eingegangen. Dieses nichtparametrische multivariate Verfahren wird von Ruddat et al. (2013) für eine Risikofaktorenanalyse von antimikrobieller Resistenz in humanen *Salmonella* Typhimurium Isolaten genutzt.

Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Übersicht über statistische Verfahren zur Beschreibung von phänotypischen Empfindlichkeitsdaten gegeben. Als Datengrundlage wurden dabei MHK-Werte bzw. durch Interpretationskriterien qualitativ beurteilte Empfindlichkeitsdaten für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe eines Kollektivs von 46 MRSA-Isolaten betrachtet. Aufgrund der eingeschränkten Anzahl von getesteten Konzentrationsstufen sollten MHK-Werte als ordinal skaliert aufgefasst und ausgewertet werden. Gängige Vorgehensweisen belaufen sich im Wesentlichen auf Häufigkeitsverteilungen der beobachteten MHK-Werte pro Wirkstoff mit Angabe einiger Kenngrößen sowie auf Häufigkeitsverteilungen von Resistenzprofilen basierend auf qualitativen Empfindlichkeitsdaten. Grundsätzlich sollte der Informationsgehalt von in Studien präsentierten Ergebnissen so groß wie möglich sein, um die Ergebnisse verschiedener Studien vergleichen zu können. Aufgrund von unterschiedlichen Interpretationskriterien und zudem Änderungen in den Interpretationskriterien über die Zeit lassen letztlich nur die MHK-Werte selbst zuverlässige Interpretationen zu. Die MHK-Verteilungen allein durch MHK_{50} und MHK_{90} ohne Angabe der Verteilung selbst zu charakterisieren, ist nicht ausreichend, da MHK-Verteilungen oft mehrgipflig und asymmetrisch sind. Für die Deskription von Resistenzmustern ist es aufgrund der großen Diversität zwischen den Profilen dagegen oft nicht sinnvoll, MHK-Profile anzugeben, sondern stattdessen Häufigkeitsverteilungen von qualitativ beurteilten Empfindlichkeitsdaten zu betrachten. Für durch klinische Grenzwerte beurteilte Daten ist es dabei wünschenswert, die Häufigkeiten der (s, i, r)-Profile anzugeben und nicht lediglich die von binär kodierten Profilen. In der Literatur werden intermediäre Isolate unterschiedlich interpretiert, entweder als nicht-resistent oder als nicht-sensibel, wodurch ein Vergleich von Ergebnissen verschiedener Studien unmöglich sein kann.

Des Weiteren wurden Verfahren zur systematischen Analyse der Abhängigkeitsstruktur zwischen Empfindlichkeitsdaten verschiedener Wirkstoffe beschrieben. Diese ermöglichen es, Auffälligkeiten bzw. Veränderungen in Resistenzmustern insbesondere bei großen Datensätzen zu beschreiben. Abhängigkeitsstrukturen in Empfindlichkeitsdaten zu erkennen und zu verstehen ist ein wichtiger Schritt im Rahmen der Interpretation von Ursache-Wirkungs-Modellen zur Untersuchung möglicher Einflussfaktoren auf die Entstehung und Verbreitung von antimikrobieller Resistenz (siehe auch Ludwig et al., 2013; Williams et al., 2013). Die vollständige Interpretation von beschriebenen Auffälligkeiten ist jedoch nur durch vertiefende molekulare Analysen möglich.

Komplexere statistische Analysen, wie etwa die Modellierung von antimikrobieller Resistenz als Zielgröße in Regressionsmodellen, werden durch die Analyse von Distanzen zwischen Resistenzprofilen ermöglicht. Hierbei ist es wiederum möglich, direkt MHK-Profile als Datengrundlage zu wählen und somit auch Veränderungen unterhalb bzw. oberhalb von Grenzwerten zu untersuchen. Bei der Wahl des Distanzmaßes zur Messung der Unterschiede zwischen MHK-Profilen sollte das ordinale Skalenniveau beachtet werden, was beispielsweise durch die hier vorgeschlagene Manhattan-Distanz erfolgt.

Conflict of interest

Es bestehen keine geschützten, finanziellen, beruflichen oder anderen persönlichen Interessen an einem Produkt, Service und/oder einer Firma, welche die in diesem Manuskript dargestellten Inhalte oder Meinungen beeinflussen könnten.

Literatur

Alali WQ, Scott HM, Christian KL, Fajt VR, Harvey RB, Lawhorn DB (2009): Relationship between level of antibiotic use and resistance among *Escherichia coli* isolates from integrated multi-site cohorts of humans and swine. Prev Vet Med 90: 160–167.

Berge AC, Atwill ER, Sischo WM (2003): Assessing antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* in young calves using cluster analysis techniques. Prev Vet Med 61: 91–102.

Bhavnani SM, Hammel JP, Forrest A, Jones RN, Ambrose PG (2003): Relationship between patient- and institution-specific variables and decreased antimicrobial susceptibility of gram-negativ pathogens. Clin Infect Dis 37: 344–350.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008): Performance Dtandards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals – Third Edition: Approved Standard M31-A3. CLSI, Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement M100-S23. Wayne, PA, USA.

Hauschild T, Fessler AT, Billerbeck C, Wendlandt S, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S, Kadlec K (2012): Target gene mutations among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *S. aureus* with elevated MICs of enrofloxacin obtained from diseased food-producing animals or food of animal origin. J Antimicrob Chemother 67: 1791–1793.

Kadlec K, Schwarz S (2009): Novel ABC transporter gene, vga(C), located on a multiresistance plasmid from a porcine methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 strain. Antimicrob Agents Chemother 3: 3589–3591.

Kadlec K, Ehricht R, Monecke S, Steinacker U, Kaspar H, Mankertz J, Schwarz S (2009): Diversity of antimicrobial resistance pheno- and genotypes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from diseased swine. J Antimicrob Chemother 64: 1156–1164.

Ludwig A, Berthiaume P, Boerlin P, Gow S, Leger D, Lewis FI (2013): Identifying associations in *Escherichia coli* antimicrobial resistance patterns using additive Bayesian networks. Prev Vet Med 110: 64–75.

Pleydell E, Rogers L, Kwan E, French N (2010): Evidence for the clustering of antibacterial resistance phenotypes of Enterococci within integrated poultry companies. Microbial Ecol 59: 678–688.

Ruddat I (2013): Multivariate Analyse der Basistypisierung von Bakterien unter Berücksichtigung epidemiologischer Informationen. Hannover, TiHo, Diss.

Ruddat I, Schwarz S, Tietze E, Ziehm D, Kreienbrock L (2012): A quantitative approach to analyse linkages between antimicrobial resistance properties in *Salmonella* Typhimurium isolates. Epidemiol Infect 140: 157–167.

Ruddat I, Tietze E, Ziehm D, Kreienbrock L (2013): Associations between host characteristics and antimicrobial resistance of *Salmonella* Typhimurium. Epidemiol Infect 142: 2085–2095. doi: 10.1017/S0950268813003026.

Scaria J, Warnick LD, Kaneene JB, May K, Teng CH, Chang YF (2010): Comparison of phenotypic and genotypic antimicrobial profiles in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from the same dairy cattle farms. Mol Cell Probes 24: 325–345.

Schwarz S, Böttner A, Hafez HM, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Luhofer G, Richter A, Traeder W, Waldmann KH, Wallmann J, Werckenthin C (2003): Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren: Methoden zur in-vitro Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 116: 353–361.

Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W (2010): Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. Vet Microbiol 141: 1–4.

Wendlandt S, Fessler AT, Monecke S, Ehricht R, Schwarz S, Kadlec K (2013): The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. Int J Med Microbiol 303: 338–349.

Wendlandt S, Feßler AT, Kadlec K, Duijkeren Ev, Schwarz S (2014): Identification of the novel spectinomycin resistance gene spd in a different plasmid background among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 and methicillin-susceptible *S. aureus* ST433. J Antimicrob Chemother 69: 2000–2003. doi: 10.1093/jac/dku1067.

Werckenthin C, Böttner A, Hafez HM, Hartmann K, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kuhn T, Luhofer G, Richter A, Schulz B, Schwarz S, Sigge C, Traeder W, Waldmann KH, Wallmann J (2005): Cross-resistance between antimicrobial agents used in veterinary medicine: molecular background and practical consequences for susceptibility testing. Berl Münch Tierärztl Wochenschr 118: 471–480.

Williams A, Christley RM, McKane SA, Roberts VLH, Clegg PD, Williams NJ (2013): Antimicrobial resistance changes in enteric *Escherichia coli* of horses during hospitalisation: Resistance profiling of isolates. Vet J 195: 121–126.

Korrespondenzadresse:
Dr. Inga Ruddat
Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Bünteweg 2
30559 Hannover
inga.ruddat@tiho-hannover.de