

**Aus der Arbeitsgruppe Ophthalmologie
am Zentrum für veterinärmedizinisch klinische Services des Tierklinikums
der Freien Universität Berlin**

**Das aerobe Bakterienspektrum der erkrankten Pferdeaugenoberfläche
und seine Resistenzlage**

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

vorgelegt von
Ann-Kathrin Schieder
Tierärztin aus Kassel

Berlin 2023

Journal-Nr.

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erste Gutachterin: Univ.-Prof. Dr. J. Corinna Eule

Zweite/r Gutachter/in:

Dritte/r Gutachter/in:

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Tag der Promotion:

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1 Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche des Pferdes	2
2.1.1 Konjunktiva	2
2.1.2 Kornea	3
2.1.3 Aufgaben der Augenoberfläche	3
2.2 Mikroorganismen auf der gesunden Augenoberfläche des Pferdes	4
2.2.1 Bakterien	4
2.2.2 Pilze	4
2.2.3 Einflussfaktoren auf das Keimwachstum	5
2.3 Entzündliche Augenerkrankungen der Augenoberfläche	6
2.3.1 Konjunktivitis	6
2.3.2 Keratitis	7
2.3.3 Mikroorganismen erkrankter Pferdeaugen	8
2.4 Die Bedeutung ausgewählter gramnegativer Gattungen in der Literatur	9
2.4.1 <i>Pantoea</i>	9
2.4.2 <i>Pseudomonas</i>	9
2.4.3 <i>Acinetobacter</i>	10
2.4.4 <i>Escherichia</i>	10
2.4.5 <i>Moraxella</i>	10
2.5 Antibiotikatherapie	11
2.6 Antibiotikaresistenz	12
2.6.1 Definition und Entstehung	12
2.6.2 Methoden der Resistenztestung	12
3. Eigene Untersuchungen	15
3.1 Zusammenstellung der eigenen Publikationen	15
3.1.1 Schieder A-K, Müller E, Heusinger A, Eule J C (2021): Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – Geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes. <i>Pferdeheilkunde</i> 37(3), 292–301; DOI 10.21836/ PEM20210311	15
3.1.2 Schieder A-K, Müller E, Heusinger A, Eule J C (2023): Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes. <i>Pferdeheilkunde</i> 39(1), 12-23;25 DOI 10.21836/PEM20230102	25

Inhaltsverzeichnis

3.2 Eigenanteilbeschreibung.....	36
4. Diskussion	37
4.1 Studiendesign	37
4.2 Keimspektrum.....	38
4.3 Einordnung ausgewählter gramnegativer Gattungen.....	40
4.4 Einflussfaktoren auf das Keimwachstum	42
4.4.1 Jahreszeit.....	42
4.4.2 Pferdealter	42
4.4.3 Antibiotische Vorbehandlung	43
4.5 Antibiotikatherapie	44
4.5.1 Methodik der Resistenztestung	44
4.5.2 Anwendung ausgewählter antibiotischer Wirkstoffe.....	45
4.5.3 Antibiogrammpflicht.....	47
4.6 Fazit und Ausblick.....	48
5. Zusammenfassung	49
6. Summary	51
7. Literaturverzeichnis.....	52
8. Publikationsverzeichnis	57
9. Danksagung.....	58
10a) Finanzierungsquellen.....	59
10b) Erklärung zu Interessenskonflikten.....	59
11. Selbständigkeitserklärung.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abb.1 Schematische Darstellung der Augenoberfläche	S. 2
Abb.2 Umwidmungskaskade ab 28.01.2022	S. 45

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EAV	equines Arteritisvirus
et al.	und andere
etc.	et cetera
ggf.	gegebenenfalls
IBK	Infektiöse Bovine Keratokonjunktivitis
i.d.R.	in der Regel
IMMK	immunmedierte Keratitis
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization – Time of flight
MHK	minimale Hemmkonzentration
o.g.	oben genannt/en
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
sp.	species (Singular)
spp.	species (Plural)
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
VETIDATA	Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht
VO	Verordnung
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Das Mikrobiom der Augenoberfläche des Pferdes setzt sich aus Bakterien und Pilzen zusammen (Andrew et al. 2003). Vorausgehende Studien beschäftigten sich sowohl mit der bakteriellen Besiedlung gesunder als auch erkrankter Pferdeaugen. Allerdings stammten diese aus Ländern, deren Klima nicht mit den klimatischen Bedingungen in Deutschland vergleichbar ist. Weiterhin wurden dabei verschiedene Einflussfaktoren auf das Keimwachstum diskutiert, wie beispielsweise antibiotische Vorbehandlung, Alter des Tieres und Jahreszeit – teilweise mit widersprüchlichen Ergebnissen.

Pferde sind häufig von entzündlichen Augenerkrankungen wie Konjunktivitis und Keratitis betroffen. Primär bakteriell bedingte Infektionen sind zwar selten, jedoch treten nach Vorschädigung durch Noxen bakterielle Sekundärinfektionen auf. Hierbei kommt es zur Infiltration von Mikroorganismen der Standortflora oder von eingebrachten Erregern. (Eule und Schmidt 2017a; Eule und Schmidt 2017b; Gemensky-Metzler et al. 2005). Für den praktischen Tierarzt ist daher vor allem von Interesse, welche Mikroorganismen an Infektionen beteiligt sind.

So war es ein Ziel der vorliegenden Studie, das Keimspektrum entzündlich erkrankter Pferdeaugen in Deutschland, als Vertreter der kühlgemäßigten Klimazone, zu bestimmen und die vorgenannten Einflussfaktoren noch einmal unter anderen Bedingungen zu betrachten.

Sind Bakterien am Krankheitsprozess beteiligt, wird eine lokale Antibiotikatherapie notwendig. Um den Patienten einerseits eine optimale Therapie und damit den größtmöglichen Behandlungserfolg zu ermöglichen und andererseits auch zur Resistenzvermeidung im Sinne der Antibiotikaleitlinien, sollte die Auswahl des antibiotischen Augenpräparats sorgfältig erfolgen. Hierfür sind neben den ophthalmologischen Fertigkeiten und der Erfahrung des Behandlers, um das Krankheitsgeschehen einordnen zu können, auch Kenntnisse über das Keimspektrum und seiner Resistenzlage erforderlich. Um Komplikationen zu vermeiden, kann das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung jedoch oftmals nicht abgewartet werden, bevor mit der Antibiotikatherapie begonnen wird. Die Abbildung des Resistenzspektrums der detektierten Keime gegenüber in der Praxis gebräuchlichen antibiotischen Wirkstoffen war daher in dieser Studie von weiterem Interesse.

2. Literaturübersicht

2.1 Anatomie und Physiologie der Augenoberfläche des Pferdes

2.1.1 Konjunktiva

Das Pferdeauge hat eine besonders große Oberfläche, die von Konjunktiva (Bindehaut) und Kornea (Hornhaut) gebildet wird.

Die Konjunktiva setzt sich aus einem mehrschichtigen, unverhornten Plattenepithel und einer lockeren Bindegewebsschicht zusammen. Anatomisch lässt sich die Konjunktiva in drei Regionen unterteilen: Die Lidbindehaut, die Augenbindehaut und den Fornix.

Der Konjunktivalsack (*Saccus conjunctivae*) ist der Hohlraum, der von der Konjunktiva umschlossen wird. Die Lidbindehaut bedeckt oberes und unteres Augenlid.

Die Augenbindehaut bedeckt den vorderen Teil des Augapfels bis zum *Limbus corneae*.

Der *Limbus corneae* bezeichnet den Grenzbereich zwischen Kornea und Sklera. Der Fornix ist der Übergang, an dem sich Lidbindehaut und Augenbindehaut treffen. Die Fornices sind mit einem mehrschichtigen hochprismatischen Epithel ausgekleidet. Durch eine Duplikatur der Konjunktiva bildet sich im inneren Augenwinkel eine Falte, die Nickhaut (*Plica semilunaris conjunctivae*), die auch als „drittes Augenlid“ bezeichnet wird. In die Nickhaut eingelagert ist der Blinzknorpel (*Cartilago palpebrae III*), der als Schutz vor mechanischen Noxen dient. Nachdem sich die Bindehaut an den Fornices umgeschlagen hat, bedeckt sie einen kleinen Abschnitt der Sklera, bevor das Bindehautepithel in das Epithel der Kornea übergeht. (Smith und Giuliano 2017)

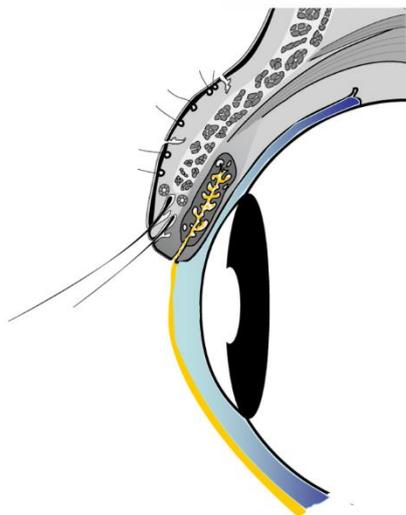


Abb. 1 Schematische Darstellung der Augenoberfläche © J. C. Eule

2.1.2 Kornea

Die äußere Augenhaut (Tunica fibrosa), die den Augapfel umgibt, wird im hinteren großen Abschnitt durch die undurchsichtig weiße Sklera und im vorderen Abschnitt durch die transparente Kornea gebildet. Die Hornhaut weist - von außen nach innen - folgende Schichtung auf:

- vorderes Hornhautepithel (Epithelium anterius)
- Bowman-Membran (vordere Grenzmembran, Lamina limitans anterior)
- Stroma (Substantia propria corneae)
- Descemet-Membran (hintere Grenzmembran, Lamina limitans posterior)
- hinteres Hornhautepithel (Epithelium posterius)

Die äußere Epithelschicht besteht aus einem mehrschichtigen unverhorntem Plattenepithel. Oberflächlich ist das Epithel von einem Tränenfilm überzogen. Die basale Zellschicht des Epithels liegt auf der Bowman-Membran, die als Diffusionsbarriere einen Wassereinstrom in das Stroma verhindert. Die Eigenschicht der Hornhaut besteht aus Kollagenfaserbündeln und wässriger Grundsubstanz. Daneben finden sich auch unlösliches Kollagen, Proteoglykane, Glykosaminoglykane und Ionen. Das Stroma enthält Nervenfasern, aber keine Blut- oder Lymphgefäße. Die Descemet-Membran ist eine breite Basalmembran und liegt dem Stroma an. Das hintere Hornhautepithel ist die innerste Schicht der Kornea und kleidet als einschichtiges Plattenepithel gleichzeitig die vordere Augenkammer aus. Als semipermeable Grenzschicht regelt sie die Diffusion von Wasser, um die Transparenz der Hornhaut aufrechtzuerhalten. (Liebich 2010)

2.1.3 Aufgaben der Augenoberfläche

Die Konjunktiva verbindet den Augapfel (Bulbus oculi) mit den Augenlidern und ermöglicht die reibungsfreie Bewegung des Auges, sowie der Lider. Sie ist von vielen kleinen Blutgefäßen durchsetzt, die das Auge mit Nährstoffen versorgen. Weiterhin enthält sie Becherzellen, deren schleimige Sekrete Bestandteil des präokularen Tränenfilms sind. Ein dichtes Nervengeflecht ermöglicht eine schnelle Schmerzwahrnehmung.

Als Teil der äußersten Schicht schützt die Kornea das Auge vor äußeren Einwirkungen, wie beispielsweise Fremdkörpern, Staub und Rauch, aber auch vor Krankheitserregern wie Bakterien, Pilzen oder Viren. Das Licht fällt durch die Kornea ins Auge. Durch ihre gewölbte Form übernimmt sie zusammen mit der Linse einen Großteil der Lichtbrechung und ist für die scharfe Abbildung von Gegenständen auf der Netzhaut enorm wichtig.

(Brooks und Plummer 2022; Smith und Giuliano 2017)

2.2 Mikroorganismen auf der gesunden Augenoberfläche des Pferdes

2.2.1 Bakterien

Die Augenoberfläche von Pferden ist nicht steril. Auf der Schleimhautoberfläche lebt eine Mikroflora, die sich aus Bakterien und Pilzen zusammensetzt (Andrew et al. 2003). Das aerobe Keimspektrum der Augenoberfläche von augengesunden Pferden und Pferden mit Augenerkrankungen ist in verschiedenen Ländern untersucht worden: Die Bakterienflora einer gesunden Augenoberfläche wird überwiegend von grampositiven Keimen gebildet, wobei auch gramnegative Keime in geringerer Anzahl vorkommen können (Hampson et al. 2018; Zak et al. 2018; Araghi-Sooreh et al. 2014; Johns et al. 2011; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; McLaughlin et al. 1983; Cattabiani et al. 1976). Dabei kam die Gattung *Staphylococcus* in jeder der o.g. Studien häufig vor. Weitere Gattungen, die häufig isoliert werden konnten: *Corynebacterium* (Hampson et al. 2018; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976), *Bacillus* (Hampson et al. 2018; Araghi-Sooreh et al. 2014; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976), *Micrococcus* (Johns et al. 2011; Cattabiani et al. 1976), *Streptomyces* (Gemensky-Metzler et al. 2005; Moore et al. 1988) und *Streptococcus* (Gemensky-Metzler et al. 2005; Cattabiani et al. 1976). Konnten gramnegative Mikroorganismen aus gesunden Pferdeaugen isoliert werden, gehörten diese bevorzugt zu den Gattungen *Moraxella* (Zak et al. 2018; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976), *Acinetobacter* (Johns et al. 2011; Gemensky-Metzler et al. 2005; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976) und *Neisseria* (Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976).

2.2.2 Pilze

Pilze sind physiologische Mikroorganismen auf der Augenoberfläche des Pferdes (Moore et al. 1988; Samuelson et al. 1984). Anders als Bakterien scheinen Pilze die Augenoberfläche nicht dauerhaft, sondern nur vorübergehend zu besiedeln (Andrew et al. 2003). In einer Studie aus Brasilien, konnten keine jahreszeitlich bedingten Unterschiede festgestellt werden. Jedoch konnten bei niedrigeren Temperaturen und verstärktem Windaufkommen mehr Pilzisolat angezüchtet werden. Vermutet wurde ein Zusammenhang mit Pollenflug (Rosa et al. 2003). Da Pilze ubiquitär vorkommen, scheinen der Kontakt zu pflanzlichem Material (Heu, Stroh u.a. Einstreumaterialien) und die Exposition zu Dreck / Staub eine Rolle zu spielen (Andrew et al. 1998). So war bei Pferden in reiner Stallhaltung die Besiedlungsdichte der Augenoberfläche mit Pilzen erhöht (Rosa et al. 2003). Am häufigsten konnten *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* und *Cladosporium* von der gesunden

2. Literaturübersicht

Augenoberfläche des Pferdes isoliert werden (Rosa et al. 2003; Andrew et al. 1998; Samuelson et al. 1984; McLaughlin et al. 1983)

2.2.3 Einflussfaktoren auf das Keimwachstum

Die Standortflora der Augenoberfläche verursacht ohne vorausgegangene Schädigung keine Erkrankung. Vielmehr verhindert die physiologische Bakterienflora durch das Prinzip der Konkurrenz um Nährstoffe und die Absonderung von Stoffwechselprodukten, die antimykotische Eigenschaften haben können, dass sich pathogene Mikroorganismen, insbesondere Pilze, ansiedeln können (Matthews 1994).

Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass das okulare Keimspektrum gesunder Pferdeaugen nicht bei allen Pferden gleich ist. Es variiert nicht nur zwischen unterschiedlichen äußeren Bedingungen wie geographischer Lage und Klima, sondern wird zudem durch individuelle Faktoren wie beispielsweise Alter und Geschlecht beeinflusst (Johns et al. 2011; Tolar und Hendrix 2005; Andrew et al. 2003). Unterschiedliche Ergebnisse gibt es jedoch zu der Frage, wie signifikant der Einfluss der genannten Faktoren ist. Teilweise sind die Unterschiede nur gering, teilweise sind die Studienergebnisse konträr. So zeigte sich bei einer Studie in Großbritannien, dass die Pferde, die gramnegative Bakterienisolate aufwiesen, signifikant älter waren als die Tiere mit einer ausschließlich grampositiven Bakterienflora (Johns et al. 2011). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse einer Studie aus Florida, bei der sich die okularen Bakterienisolate nicht signifikant zwischen den Jahreszeiten unterschieden, dafür aber ein vermehrtes Vorkommen von gramnegativen Keimen und Pilzen bei jüngeren Tieren beobachtet worden ist (Andrew et al. 2003).

2.3 Entzündliche Augenerkrankungen der Augenoberfläche

2.3.1 Konjunktivitis

Die häufigste Erkrankung der Konjunktiva ist die Entzündung (Konjunktivitis).

Konjunktividen können beim Pferd sowohl einseitig als auch häufig beidseitig auftreten.

Da das Bindehautepithel in das Epithel der Hornhaut übergeht, greift der Erkrankungsprozess häufig auf die Hornhaut über, und es entwickelt sich eine Keratokonjunktivitis. (Eule und Schmidt 2017a)

Unterscheiden lassen sich primäre und sekundäre Konjunktividen. Erkrankungen des Auges wie Hornhauterkrankungen, Keratokonjunktivitis sicca („trockenes Auge“), Dakryozystitis (Entzündung des Tränensacks), Uveitis (Entzündung der mittleren Augenhaut) oder Glaukom (Erkrankungen, bei denen der Sehnerv geschädigt wird) sind als Ätiologien sekundärer Konjunktividen beschrieben (Smith und Giuliano 2017).

Die Ursachen für primäre Konjunktividen sind vielfältig. Sehr häufig sind allergische Reaktionen und irritative Prozesse, etwa infolge von Pollenflug, Staubexposition oder Fremdkörperwirkungen (Einstreu, Raufutter, Insekten u.a.). Neben Traumen und UV-Strahlung spielen Krankheitserreger eine Rolle. Die equinen Herpesviren 1, 2 und 5, das equine Influenzavirus Typ A2, das equine Adenovirus, sowie das equine Arteritis-Virus (EAV) zählen zu den viralen Erregern. Pilzinfektionen, beispielsweise durch *Aspergillus* spp., treten insbesondere bei feucht-warmem Klima auf. Auch Parasiten wie *Thelazia lacrymalis* oder *Onchocerca* spp. können ursächlich sein. Primär bakteriell bedingte Konjunktividen, etwa durch *Moraxella equi*, *Streptococcus equi*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira* sp., Chlamydien, Mycoplasmen u.a., sind beim Pferd eher selten, jedoch können bakterielle Sekundärinfektionen auftreten. (Eule und Schmidt 2017a; Smith und Giuliano 2017; Brooks 2010)

Auch im Rahmen systemischer Erkrankungen können Konjunktividen auftreten.

Da die Bindehaut lymphatisches Gewebe enthält, kann sie sich leicht entzünden. Die Schwere des klinischen Bildes kann erheblich variieren. Zu den Symptomen zählen die „Abwehrtrias“: Lidkrampf (Blepharospasmus), Tränenfluss (Epiphora) und Lichtscheue (Photophobie), sowie Rötung (Hyperämie), Ödematisierung der Bindehaut (Chemosis) und Exsudation (serös, mukös, fibrinös, membranös oder purulent). (Smith und Giuliano 2017; Brooks 2010)

Zur Diagnosefindung sollte eine gründliche Augenuntersuchung erfolgen. Hierzu gehören der Schirmer Tränentest, der Fluoreszeintest und die Messung des Augeninnendrucks, sowie auch die Untersuchung mit der Spaltlampe und die Funduskopie (Untersuchung des Augenhintergrundes). Bei chronischen Geschehen, bei mukopurulentem Augenausfluss,

2. Literaturübersicht

sowie bei jedem Verdacht auf bakterielle Sekundärinfektionen sollten außerdem mykologische, bzw. bakteriologische Kulturen inklusive Empfindlichkeitstestung angelegt und zytologische Ausstriche beurteilt werden. (Smith und Giuliano 2017)

Nach Spülungen zur Entfernung der Exsudate richtet sich die Therapie nach der zugrundeliegenden Ursache. Vorsicht geboten ist bei der lokalen Anwendung von Steroiden, da diese Pilzinfektionen begünstigen können (Smith und Giuliano 2017).

Bei Primärinfektionen ist die Prognose gut, da die Infektionen meist innerhalb einer Woche auf die topische Therapie ansprechen. Viral bedingte Infektionen können allerdings rezidivierend sein. Die Prognose sekundärer Konjunktividen ist abhängig von der zugrunde liegenden Erkrankung. (Smith und Giuliano 2017; Brooks 2010)

2.3.2 Keratitis

Die Keratitis ist eine Entzündung der Hornhaut des Auges. Auch bei Keratitiden ist eine bakterielle Beteiligung meist sekundär. Häufig kommt es beim Pferd zu traumatischen Hornhautverletzungen (Brooks und Plummer 2022). Neben Mikroorganismen wie Bakterien, Pilzen, Viren und ganz selten Parasiten, können auch Funktionsstörungen ursächlich sein, wie beispielsweise ein Mangel an Tränenflüssigkeit bei Keratokonjunktivitis sicca oder Fazialisparese oder eine ungenügende Verteilung des Tränenfilms durch Lidfehlstellungen. Bei der immunmedierten Keratitis (IMMK) kommt es durch eine Fehlregulation des Immunsystems zu einer Entzündung der Hornhaut. (Eule und Schmidt 2017b)

Keratitiden lassen sich nach dem Ausdehnungsgrad der Entzündung einteilen. Bei der Keratitis superficialis ist nur das äußere Hornhautepithel, bei der interstitiellen Form auch die mittlere Schicht der Hornhaut, das Stroma betroffen. Die ulzerative Keratitis ist charakterisiert durch umschriebenen Substanzverlust des Korneagewebes, wobei Tiefe und Ausdehnung unterschiedlich sein können (Eule und Schmidt 2017b).

Die ulzerative Keratitis kommt beim Pferd häufig vor. Häufigste Ursachen beim Pferd sind Traumen oder Fremdkörpereinwirkungen. Die prominente Lage der Augen seitlich am Kopf, sowie die große Augenoberfläche begünstigen dies. Die Lebensweise des Fluchttiers Pferd birgt ein großes Verletzungsrisiko. Werden okuläre Strukturen durch Noxen vorgeschädigt, kann es zu einer Infiltration von Mikroorganismen der Standortflora oder von eingebrachten Bakterien oder Pilzen kommen. Eine zunächst unkomplizierte Verletzung kann durch diese Sekundärinfektion erheblich verkompliziert werden (Gemensky-Metzler et al. 2005; McClellan 1997). Proteasen und Kollagenasen der Bakterien lassen das Kollagen des Stromas „einschmelzen“. Kommt es zur Rupturierung der Descemet-Membran, sind die möglichen Folgen wie Irisprolaps oder Kammerwasserabfluss verheerend. (Eule und Schmidt 2017b)

2. Literaturübersicht

Die Symptome gleichen denen der Konjunktivitis. Es bestehen zumeist starke Schmerzen, die zu einem ausgeprägten Blepharospasmus führen.

Die Diagnose erfolgt anhand einer gründlichen Augenuntersuchung unter Berücksichtigung des vorderen Augensegments hinsichtlich einer Uveitis, einer Entzündung der mittleren Augenhaut, die sich aus der Regenbogenhaut (Iris), dem Ziliarkörper (Corpus ciliare) und der Aderhaut (Choroidea) zusammensetzt. Um Hornhautdefekte sichtbar zu machen, wird die Hornhaut mit Fluorescein angefärbt. Von Konjunktiva und Kornea sind Abstriche und Geschabsel für die zytologische und mikrobiologische Untersuchung zu entnehmen - auch dann, wenn eine Infektion nicht ersichtlich ist. (Brooks und Plummer 2022; Eule und Schmidt 2017b)

Die Therapie setzt sich zusammen aus der Bekämpfung der Ursache, der licht- und lärmgeschützten Aufstallung des Pferdes in einer möglichst staubarmen Umgebung, der Antibiotikatherapie und der Uveitisprophylaxe/-therapie durch Atropin-Augentropfen. Neben der medikamentösen Therapie kann eine chirurgische Versorgung notwendig werden. Sind intraokulare Strukturen beteiligt, wird der Einsatz systemisch wirksamer nichtsteroidaler Antiphlogistika empfohlen. Pilzinfektionen sind i.d.R. lokal mit Antimykotika über mehrere Wochen zu behandeln, in schwierigen Fällen ist auch eine systemische Verabreichung möglich, hierbei sind jedoch die Nebenwirkungen zu beachten. (Eule und Schmidt 2017b)

Die Prognose ist abhängig von der Ausdehnung des Substanzverlusts der Hornhaut und dem Therapiezeitpunkt. Je früher die Therapie erfolgt, desto günstiger die Prognose. Mykosen sprechen insgesamt schlechter auf die Therapie an. Im Heilungsverlauf kommt es unabhängig von den beteiligten Mikroorganismen zur Narbenbildung. (Eule und Schmidt 2017b)

2.3.3 Mikroorganismen erkrankter Pferdeaugen

Waren die Augen an Keratitis erkrankt, war *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* unter den grampositiven Keimen die am häufigsten isolierte Spezies (Mustikka et al. 2020; Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Brooks et al. 2000; Moore et al. 1995; McLaughlin et al. 1983). Auch Vertreter der Gattung *Staphylococcus* (Mustikka et al. 2020; Kuroda et al. 2015; Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Moore et al. 1995; McLaughlin et al. 1983) wurden häufig isoliert. Von den gramnegativen Keimen konnten die Gattungen *Pseudomonas* (Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Moore et al. 1995; McLaughlin et al. 1983; Moore et al. 1983) und *Acinetobacter* (Moore et al. 1995; Moore et al. 1983), sowie die Familie der Enterobacteriaceae (Moore et al. 1995; Moore et al. 1983) am häufigsten nachgewiesen werden. Vor allem Pseudomonaden und Enterobakterien werden mit infizierten Hornhautläsionen in Verbindung gebracht (Gemensky-Metzler et al. 2005;

2. Literaturübersicht

Sweeney und Irby 1996; McLaughlin et al. 1983; Moore et al. 1983). Als prädisponierend für Pilzinfektionen gelten lokale Behandlungen mit Antibiotika oder Kortikosteroiden (Sansom et al. 2005; Andrew et al. 1998). *Aspergillus* spp. sind die häufigsten Erreger equiner ulzerativer Keratomykose (Sansom et al. 2005; Andrew et al. 1998; Moore et al. 1983).

2.4 Die Bedeutung ausgewählter gramnegativer Gattungen in der Literatur

2.4.1 *Pantoea*

Pantoea spp. sind in der Natur weit verbreitet. Sie befinden sich auf der Pflanzenoberfläche und sind auch als Endophyten im Pflanzeninneren zu finden, sowie in Wasser, Boden, Staub und Körpern einiger Arthropoden und Wirbeltiere (Walterson und Stavrinides 2015). In der Literatur wird *Pantoea agglomerans* beim Pferd mit Plazentitis und Abort in Verbindung gebracht (Henker et al. 2020; Hong et al. 1993). In der Humanmedizin ist *P. agglomerans* als opportunistischer Krankheitserreger bekannt, beispielsweise nach Verletzungen durch Pflanzenmaterial oder in Verbindung mit einem Krankenhausaufenthalt (Dutkiewicz et al. 2016). Auch Fälle von Endophthalmitiden sind beschrieben (Venincasa et al. 2015; Sudhalkar et al. 2014)

2.4.2 *Pseudomonas*

Auch Pseudomonaden sind ubiquitär in der Natur verbreitet. Man findet sie in Boden, Wasser und organischem Material. In Veterinär- und Humanmedizin sind sie als opportunistische Infektionserreger beschrieben (Songer und Post 2005b). Beim Pferd können sie aus infektiösen Augenerkrankungen isoliert werden (Sweeney und Irby 1996; McLaughlin et al. 1983; Moore et al. 1983). Im Gegenzug können sie aber auch regelmäßig auf der Oberfläche des gesunden Pferdeauges nachgewiesen werden (Hampson et al. 2018; Johns et al. 2011; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003). *Pseudomonas aeruginosa* besitzt viele wichtige Pathogenitätsfaktoren wie Fimbrien, Proteasen, Exo- und Endotoxine. Durch Aktivierung kornealer Proteasen kommt es zur Kollagenolyse des Stromas, was bis zum Totalverlust des Stromagewebes und der Perforation der Kornea führen kann (Brooks und Plummer 2022). Daher zählt *Psd. aeruginosa* zu den virulentesten Infektionserregern des Pferdeauges (Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003). Trotzdem gelang auch ein Nachweis aus einem gesunden Pferdeauge (Zak et al. 2018).

2.4.3 *Acinetobacter*

Acinetobacter spp. besitzen eine hohe Tenazität und kommen frei in der Natur in Boden und Wasser vor, sind aber auch bei Mensch und Tier Bestandteil der physiologischen Haut- und Schleimhautflora (Robert Koch-Institut 2020). Andere Autoren werten das Vorkommen von *Acinetobacter* auf der Pferdehaut als Umgebungskontamination (Zubrod et al. 2004). In der Humanmedizin sind *Acinetobacter* spp., insbesondere *Acinetobacter baumannii*, als Erreger nosokomialer Infektionen bekannt. Dabei zeigen sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Resistenzbildung (Robert Koch-Institut 2020). Beim Pferd sind nosokomiale Infektionen mit *Acinetobacter baumannii* im Zusammenhang mit Thrombophlebitis, Infektionen des tiefen Respirationstrakts und Fohlensepsis beschrieben (van der Kolk et al. 2019).

2.4.4 *Escherichia*

Escherichia coli gehört beim Menschen und allen warmblütigen Tieren zur physiologischen Darmflora. In die Umwelt gelangt *E. coli* nur durch Fäkalien (Heesemann 2001), daher gilt er auch als Indikatorkeim für fäkale Verunreinigungen. In den vorausgehenden Studien konnte *E. coli* sowohl aus gesunden (Hampson et al. 2018; Araghi-Sooreh et al. 2014; Johns et al. 2011; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003) als auch erkrankten Pferdeaugen (Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Moore et al. 1995) isoliert werden.

2.4.5 *Moraxella*

Moraxellen sind auf der Haut, mukösen Membranen und der Konjunktiva von Säugetieren zu finden und werden meist als harmlose Kommensalen gewertet (Songer und Post 2005a). In der Literatur konnten sie aus gesunden Pferdeaugen (Hampson et al. 2018; Zak et al. 2018; Johns et al. 2011; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Cattabiani et al. 1976) als auch aus erkrankten Augen (Seeger et al. 2021; Mustikka et al. 2020; Liu et al. 2014; Sauer et al. 2003; Huntington et al. 1987; Hughes und Pugh 1970) isoliert werden. *Moraxella bovis* ist der Erreger der Infektiösen Bovinen Keratokonjunktivitis (IBK). *Moraxella bovoculi* verfügt über ähnliche Pathogenitätsfaktoren und konnte in Verbindung mit IBK in Abwesenheit von *M. bovis* bei Rindern isoliert werden (Loy und Brodersen 2014). In einer anderen Veröffentlichung wurde davon ausgegangen, dass neben *M. bovis* auch andere Erreger, darunter *M. bovoculi*, IBK hervorrufen können (Zheng et al. 2019). Es gibt einige weitere Studien, die *M. bovoculi* mit Konjunktivitis (Huntington et al. 1987; Hughes und Pugh 1970) und Keratokonjunktivitis (Seeger et al. 2021; Liu et al. 2014) in Verbindung bringen.

2.5 Antibiotikatherapie

Die antibiotische Therapie von Konjunktividen und Keratitiden erfolgt i.d.R. durch topische Augenpräparate, die mehrmals am Tag verabreicht werden müssen. Wenn notwendig, z.B. bei sehr schmerzhaften Prozessen, ist auch die Applikation über einen transpalpebralen Katheter möglich (Brooks und Plummer 2022). Die Auswahl des Antibiotikums sollte auf dem Ergebnis der Zytologie, der bakteriologischen Untersuchung und der Empfindlichkeitstestung basieren. Da die bakteriologische Untersuchung mit 2-4 Tagen Dauer zeitaufwendig ist, besteht die Gefahr, dass sich die bakterielle Infektion unbehandelt zwischenzeitlich weiter ausbreitet, was den weiteren Krankheitsverlauf verschlimmern und das Risiko von empfindlichen Komplikationen, wie etwa den Verlust der Sehfähigkeit, erhöht (Gemensky-Metzler et al. 2005). Aus diesem Grund werden für die initiale Antibiotikatherapie Breitspektrum-Antibiotika, wie Oxytetracyclin oder auch bewährte Kombinationen antibiotischer Wirkstoffe empfohlen (Smith und Giuliano 2017; Brooks 2010; Matthews 2009). Bei Therapieversagen kann das Antibiotikum dem bakteriologischen Untersuchungsergebnis entsprechend gewechselt werden (Brooks 2010; Sauer et al. 2003). Eine weitere Möglichkeit ist die Auswahl des Antibiotikums zur Erstbehandlung nach dem Ergebnis eines Grampräparats (Matthews 2009). Außerdem sind bei der Auswahl eines antibiotischen Präparats die rechtlichen Rahmenbedingungen zu beachten, die sich u.a. aus dem Gesetz über den Verkehr mit Tierarzneimitteln und zur Durchführung unionsrechtlicher Vorschriften betreffend Tierarzneimittel (Tierarzneimittelgesetz) ergeben.

Die Therapiedauer kann sich bei bakteriellen Hornhautgeschwüren u.U. über mehrere Wochen erstrecken (Brooks und Plummer 2022), da es unter und nach lokaler Antibiotikatherapie zu einer Repopulation von Bakterien und Pilze kommen kann (Andrew et al. 2003).

Es wird vermutet, dass lokale Anwendungen antibiotischer Augenpräparate zu einem Shift der überwiegend grampositiven Mikroflora hin zu gramnegativen Bakterien und Pilzen führen. In einer Studie, in der eingeteilt in vier Gruppen, gesunden Pferden verschiedene antibiotische Präparate lokal am Auge appliziert worden sind, zeigte sich eine Woche nach der Anwendung eine vorübergehende Reduktion der grampositiven und -negativen Keime. Die Repopulation der gramnegativen Keime erfolgte später als die der grampositiven Bakterien (Gemensky-Metzler et al. 2005). Eine stabiles Mikrobiom der Augenoberfläche unter lokaler Antibiotikatherapie zeigte eine Studie, in der Next Generation Sequencing angewendet worden ist (Scott et al. 2019).

Um das Risiko resistente Bakterienstämme zu selektieren zu minimieren, wird in der Humanmedizin empfohlen, bei akuten, milden bis moderaten Konjunktividen mit gutem Heilungsverlauf auf eine Antibiotikatherapie zu verzichten. Andererseits sei das Risiko bei

topischer Anwendung durch hohe lokale Wirkstoffspiegel gering. (Aramă 2020)
Unterdosierungen, Langzeittherapien und wiederholte Behandlungen könnten jedoch zum Auftreten resistenter Stämme beitragen (Aramă 2020; Miller 2017; Sandmeyer et al. 2017)

2.6 Antibiotikaresistenz

2.6.1 Definition und Entstehung

Antibiotikaresistenz bezeichnet die Widerstandsfähigkeit von Bakterien gegenüber Antibiotika. Es gibt natürliche (intrinsische) Resistenzen, die alle Stämme einer Art aufgrund ihrer genetischen Ausstattung aufweisen, ein Beispiel ist die Resistenz von β -hämolisierenden Streptokokken gegenüber Aminoglycosiden (Krause et al. 2016). Ist die Resistenz hingegen nur auf einen Teil der Stämme einer natürlichen Population begrenzt, spricht man von erworbener Resistenz. Resistenz wird erworben, indem ein entsprechendes Gen aufgenommen wird, etwa über Plasmide, aber auch durch Mutation eines entsprechenden Gens auf dem eigenen Chromosom des Bakteriums. (Schwarzkopf 2016)

Die Entstehung von Resistenzen ist ein natürlicher Vorgang im Rahmen der Evolution. Erheblich beschleunigt wird die Selektion resistenter Bakterien allerdings durch eine unsachgemäße oder häufige Antibiotikaaanwendung. Die zunehmende Ausbreitung von Resistenzen stellt ein großes Problem bei der Bekämpfung bakterieller Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier dar. Daher ist ein verantwortungsvoller und effizienter Umgang mit antibakteriell wirksamen Wirkstoffen von großer Wichtigkeit. Bei der Auswahl eines geeigneten antibiotischen Wirkstoffes helfen In-vitro-Sensitivitätstests, die die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika prüfen. (Valentin-Weigand 2011)

2.6.2 Methoden der Resistenztestung

Gebräuchliche Techniken sind der Agardiffusionstest und das Dilutionsverfahren. Beim Agardiffusionstest wird ein mit einem Antibiotikum definierter Menge beladenes Plättchen auf einen Nährboden aufgelegt, der vorher mit dem zu prüfenden Bakterium gleichmäßig beimpft worden ist. Der Wirkstoff diffundiert in den Nährboden, wodurch sich um das Plättchen herum ein Konzentrationsgradient bildet. Nach Bebrütung stellt sich bakterielles Wachstum als Trübung dar. Um das Plättchen herum zeigt sich ggf. ein klarer Hemmhof. Sein Durchmesser ist abhängig von der Sensitivität des Erregers gegenüber dem Wirkstoff und ermöglicht die Bewertung in sensibel, intermediär oder resistent. (Valentin-Weigand 2011)

2. Literaturübersicht

Für den Mikrodilutionstest wird mit dem zu prüfenden Keim eine Suspension nach McFarland-Standard hergestellt. Mit dieser Keimsuspension wird eine bereits mit Antibiotika in aufsteigenden Konzentrationen beladene Mikrotiterplatte befüllt. Nach Inkubation erfolgt eine photometrische Auswertung des Wachstums. Ergebnis sind MHK-Werte (MHK = minimale Hemmkonzentration), die kleinste Verdünnungsstufe eines Antibiotikums, bei dem kein bakterielles Wachstum auftritt. Für die klinisch relevante Einteilung in sensibel, intermediär und resistent müssen die MHKs mit Breakpoints (Grenzwerten) verglichen werden, die vom Antibiotikum, dem isolierten Keim, der Tierart und teilweise auch vom Gewebe abhängig sind. Breakpoints liefert für die Veterinärmedizin die CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Beide Verfahren müssen unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. (Valentin-Weigand 2011)

2.6.3 Ergebnisse vorausgegangener Studien

Die Resistenztestung erfolgte in den vorausgehenden Studien mittels Agardiffusionstest (Hampson et al. 2018; Johns et al. 2011; Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003) oder es fand sich keine Angabe bezüglich der verwendeten Methodik (Mustikka et al. 2020; Brooks et al. 2000; Moore et al. 1995). Unterschiede gab es in der Auswahl der getesteten antibiotischen Wirkstoffe.

In einer australischen Studie wurden gesunde Pferdeaugen beprobt. Hier waren >90% der grampositiven Bakterien gegenüber Bacitracin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin, Fusidinsäure, Levofloxacin, Neomycin und Ofloxacin sensibel. Auch die anderen getesteten Wirkstoffe Cephalothin, Cloxacillin, Gentamicin, Tetracyclin und Tobramycin erreichten Wirksamkeiten über 83%. Bei den gramnegativen Keimen waren alle Isolate sensibel gegenüber Ciprofloxacin und Tobramycin. Hochwirksam zeigten sich Gentamicin, Levofloxacin, Neomycin, Ofloxacin und Tetracyclin. Unter 60% der Isolate waren sensibel gegenüber Cephalothin. Bei Fusidinsäure, Bacitracin und Cloxacillin überwogen die Resistenzen deutlich. (Hampson et al. 2018)

Die Resistenzlage von Bakterienisolaten aus gesunden Pferdeaugen wurde auch in Großbritannien untersucht. Hier überwogen die Gattungen *Acinetobacter* und *Staphylococcus* deutlich. Wirksamkeiten von über 90% erreichten Chloramphenicol, Gentamicin und Tetracyclin. 89% und 87% erreichten Ciprofloxacin, bzw. Neomycin. Gegenüber Fusidinsäure waren insgesamt 65% aller Isolate sensibel, davon 100% bei den Staphylokokken und 18% bei *Acinetobacter* spp. (Johns et al. 2011)

Eine Studie aus Florida testete die Empfindlichkeit verschiedener Antibiotika an elf Isolaten β -hämolisierender Streptokokken, die aus Pferdeaugen mit ulzerativer Keratitis isoliert

2. Literaturübersicht

werden konnten. Alle Isolate verhielten sich gegenüber Bacitracin, Carbenicillin, Cephalothin und Chloramphenicol sensibel, zehn Isolate gegenüber Trimethoprim/Sulfadiazin.

Gegenüber Ampicillin zeigten sich nur sechs Isolate sensibel, gegenüber Enrofloxacin verhielten sich die meisten Isolate intermediär. Zwischen den Aminoglykosiden gab es Unterschiede in der In-vitro-Resistenz. Während alle Isolate resistent gegenüber Kanamycin und Neomycin waren, verhielten sich fünf Isolate gegenüber Gentamicin sensibel. Eine geringe Wirksamkeit zeigten Polymyxin B mit nur zwei sensiblen Isolaten und Tobramycin mit nur einem sensiblen Isolat. (Brooks et al. 2000)

In einer Studie von Keller et al. (2005) war *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* die am häufigsten nachgewiesene Spezies aus Pferdeaugen mit ulzerativer Keratitis. Alle Isolate waren sensitiv gegenüber Ampicillin, Cephalothin, Chloramphenicol, Ciprofloxacin und Trimethoprim/Sulfadiazin. 82% waren empfindlich gegenüber Gentamicin, 64% gegenüber Bacitracin, 21% bei Polymyxin B und 6% bei Neomycin. Die am zweithäufigsten nachgewiesene Spezies war *Pseudomonas aeruginosa* mit einer bestmöglichen Wirksamkeit von Ciprofloxacin, Gentamicin, Neomycin, Polymyxin B und Tobramycin. Alle Isolate waren resistent gegenüber Ampicillin, Bacitracin, Cephalothin, Chloramphenicol, Tetracyclin und Trimethoprim/Sulfadiazin. (Keller und Hendrix 2005)

Nach erfolgter lokaler Antibiotikatherapie konnten signifikant häufiger gramnegative Bakterien nachgewiesen werden als vor der Behandlung infektiöser Keratitiden. Bei den grampositiven Isolaten verhielten sich über 90% der Isolate gegenüber Ticarcillin und Erythromycin sensibel. Gentamicin, Tobramycin, Polymyxin B und Neomycin zeigten sich hocheffektiv gegenüber den gramnegativen Isolaten. Chloramphenicol war sowohl gegenüber grampositiven als auch gegenüber gramnegativen Isolaten unwirksam. Die gramnegativen Isolate, die nach erfolgter Antibiotikatherapie nachgewiesen werden konnten, waren empfindlicher gegenüber Ciprofloxacin, Neomycin, Tobramycin und Amikacin als gegenüber Gentamicin. (Moore et al. 1995)

Eine finnische Studie untersuchte ebenfalls die antimikrobielle Sensitivität von *Strep. equi subsp. zooepidemicus* aus Pferdeaugen mit Keratitis. Alle Isolate waren sensibel gegenüber Penicillin G, Trimethoprim/Sulfadiazin, Erythromycin, Chloramphenicol, Gentamicin und Moxifloxacin. <60% der Isolate zeigten sich empfindlich gegenüber Tetracyclin, gefolgt von Ciprofloxacin mit 40% und Clindamycin mit 33% sensibler Isolate. Keine Wirksamkeit zeigte Fusidinsäure. Hier waren alle getesteten Keime resistent. (Mustikka et al. 2020)

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Zusammenstellung der eigenen Publikationen

3.1.1 Schieder A-K, Müller E, Heusinger A, Eule J C (2021): Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – Geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 37(3), 292–301; DOI 10.21836/ PEM20210311

Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes

A.-K. Schieder et al.

Pferdeheilkunde – Equine Medicine 37 (2021) 3 (Mai/Juni) 292–301

DOI 10.21836/PEM20210311

Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes

Ann-Kathrin Schieder¹, Elisabeth Müller¹, Anton Heusinger¹ und Johanna C. Eule²

¹ LABOKLIN GmbH & Co. KG, Bad Kissingen

² Klinik für kleine Haustiere, Ophthalmologie, Freie Universität Berlin

Zusammenfassung: Pferde sind häufig von entzündlichen Augenerkrankungen betroffen. Eine bakterielle Beteiligung ist meist sekundär, kann den Krankheitsverlauf aber erheblich verkomplizieren. Daher ergibt sich die Notwendigkeit einer zielgerichteten lokalen Antibiotikatherapie. Ziel der Studie war, das aerobe Keimspektrum erkrankter Pferdeaugen und seine Resistenzlage abzubilden. Es wurden 844 Augentupfer von Pferden im Jahr 2018 bakteriologisch untersucht, die im Rahmen der Routinediagnostik eingesandt worden sind. Die Identifizierung der Bakterien erfolgte neben Beurteilung der Kulturmorphologie und Anwendung biochemischer Methoden ergänzend mittels Matrix-Assistierter Laser-Desorption-Ionisierung – Flugzeitanalyse Massenspektrometrie (MALDI-TOF). Die Resistenzbestimmung wurde im Mikrodilutionsverfahren nach der „Breakpoint“-Methode durchgeführt. Acht Prozent der Augentupfer (n = 65/844) waren bakteriologisch negativ. Bei 36% der Abstriche (n = 308/844) wurde eine Mischkultur grampositiver und -negativer Keime nachgewiesen. Ausschließlich grampositives Wachstum zeigte sich bei 31% (n = 264/844) – ausschließlich gramnegatives Wachstum bei 25% (n = 207/844) der Abstriche. Signifikante Unterschiede gab es hierbei im saisonalen Vergleich. Insgesamt konnten 1510 Bakterienisolate angezüchtet werden. Die meisten Isolate gehörten zu den Familien der Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae und Bacillaceae. Weiterhin kamen Streptococcaceae, Moraxellaceae und Pseudomonadaceae häufig vor. Gegenüber den gramnegativen Isolaten (n = 654) erwies sich Enrofloxacin als in vitro am wirksamsten (n = 625/654), gefolgt von Gentamicin (n = 620/654) und Neomycin (n = 618/654). Bei den grampositiven Keimen (n = 767) waren die meisten Isolate gegenüber Florfenicol (n = 713/767), Enrofloxacin (n = 710/767) und Tetracyclin (n = 679/767) in vitro sensibel. Das Keimspektrum der Augenoberfläche kann sich bei Pferden aus vielen verschiedenen Bakterien zusammensetzen. Da sich diese in ihrem Resistenzverhalten teilweise deutlich unterscheiden, ist eine Antibiotigrammstellung anzuraten.

Schlüsselwörter: Pferd, Auge, Konjunktiva, Cornea, Mikrobiologie, Antibiotogramm

Study on the current resistance of the ocular microflora of the horse – suitable locally applicable antibiotics for the initial treatment of conjunctivitis and keratitis in the horse

Horses are frequently affected by ocular inflammatory diseases. In most cases, bacteria are secondary pathogens. However, bacterial infections can complicate the disease progression seriously. Bacteria can infiltrate the eye if it is damaged in any way making targeted local antibiotic treatment necessary to avoid secondary infections. The aim of this study was to determine the aerobic bacteria found in diseased equine eyes and the in vitro effectiveness of locally applicable antibiotics against the isolated bacteria. 844 swabs from the ocular surface of horses were cultured for aerobic bacteria in 2018. All swabs were submitted for routine veterinary diagnostics. Bacterial isolates were identified based on culture morphology, biochemical methods, and matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF). Antibiotic susceptibility testing was performed by microdilution using the breakpoint method with the following antibiotics: oxacillin, gentamicin, neomycin, kanamycin, enrofloxacin, tetracycline, florfenicol and polymyxin. In result no bacterial growth was observed in 8% of the equine eye swabs (n = 65/844). A mixed culture of Gram-positive and Gram-negative bacteria was obtained from 36% of the swabs (n = 308/844). Only Gram-positive bacteria were isolated from 31% of the swabs (n = 264/844), while only Gram-negative bacteria were isolated from 25% (n = 207/844). There were significant differences between the seasons: The majority of mixed cultures of Gram-negative and -positive bacteria and the lowest number of negative cultures were obtained in the autumn. Most of the negative samples were submitted in the winter. A total of 1510 bacterial isolates were obtained during the study. Most of the isolates belonged to the families Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, and Bacillaceae. Streptococcaceae, Moraxellaceae, and Pseudomonadaceae were also common. Antibiotic susceptibility testing was carried out with 1421 of the isolated bacteria. Enrofloxacin was the most effective antibiotic against the Gram-negative isolates (n = 654/625 susceptible to enrofloxacin), closely followed by gentamicin (n = 620/654) and neomycin (n = 618/654). Most of the Gram-positive isolates (n = 767) were sensitive to florfenicol (n = 713/767), enrofloxacin (n = 710/767) and tetracycline (n = 679/767). In conclusion a wide range of Gram-positive and -negative bacteria can be found on the ocular surface in horses. The great differences found in antibiotic resistance pattern between these bacterial strains in some cases highlights the need for susceptibility testing. Looking at the resistance of single bacterial species or bacterial families, the differences become even clearer. Streptococci, for example, have a natural resistance against aminoglycosides while methicillin-resistant staphylococci have a different resistance pattern than that of other Gram-positive bacteria. It is therefore more important to determine the resistance pattern of individual isolates than that of larger groups, e.g. Gram-negative or -positive bacteria. There are only three approved antibiotic compounds for local eye treatment for horses available in Germany. They contain either tetracycline or cloxacillin. A comparison of these two antibiotics showed that tetracycline has a broader spectrum of activity, while cloxacillin is mainly effective against Gram-positive bacteria. Tetracycline therefore appears to be a better choice for initiating treatment. Because of the lack of antibiotic

3. Eigene Untersuchungen

compounds approved for use in horses, off-label use of drugs approved for use in other species or in humans is often necessary. According to the "Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV)", veterinarians are required to perform antibiotic susceptibility testing for any off-label use of an antibiotic.

Keywords: horse, eye, conjunctiva, cornea, microbiology, antibiogram

Zitation: Schieder A.-K., Müller E., Heusinger A., Eule J. C. (2021) Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – Geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 37, 292–301; DOI 10.21836/PEM20210311

Korrespondenz: Ann-Kathrin Schieder, LABOKLIN GmbH & Co. KG, Steubenstraße 4, 97688 Bad Kissingen; schieder@laboklin.com

Eingereicht: 29. März 2021 | **Angenommen:** 21. April 2021

Einleitung

Pferde besitzen im Vergleich mit anderen Tierarten eine besonders große und prominente Augenoberfläche, die von Konjunktiva (Bindehaut) und Kornea (Hornhaut) gebildet wird. Die Entzündung der Bindehaut (Konjunktivitis) ist eine häufige Augenerkrankung beim Pferd. Setzt sich der Krankheitsprozess im Bereich der Hornhaut fort, kommt es zu einer Keratokonjunktivitis. Ist die Entzündung auf die Hornhaut begrenzt, spricht man von Keratitis. Klinische Symptome von Konjunktivitis und Keratitis können sein – die sogenannte „Abwehrtrias“: Lidkrampf (Blepharospasmus), Tränenfluss (Epiphora) und Lichtscheue (Photophobie), sowie Rötung (Hyperämie) und Ödematisierung der Bindehaut (Chemosis) (Brooks et al. 2017, Giuliano 2017).

Primär bakteriell bedingte Konjunktividen sind beim Pferd eher selten. Häufig sind allergische und irritative Prozesse (beispielsweise durch Staub, Pollenflug, Einstreu, Insekten, etc.) oder Traumata ursächlich für eine Bindehautentzündung. Traumen sind auch die häufigste Ursache für Keratitiden. Eine bakterielle Beteiligung ist in den meisten Fällen sekundär (Brooks 2010).

Die Augenoberfläche eines augengesunden Pferdes ist nicht steril. Vielmehr befindet sich auf dieser Schleimhautoberfläche eine Mikroflora, die sich aus Bakterien und Pilzen zusammensetzt (Andrew et al. 2003). Werden okuläre Strukturen durch Noxen vorgeschädigt, kann es zu einer Infiltration von Keimen der Standortflora oder durch eingebrachte pathogene Erreger kommen. Dadurch kann ein zunächst unkompliziertes Krankheitsgeschehen sekundär infiziert und verkompliziert werden (Gemensky-Metzler et al. 2005, McClellan 1997). Im Bereich der Hornhaut wäre dies beispielsweise die Entstehung einer eitrig-nekrotisierenden Keratitis aus einer infizierten Hornhautverletzung.

Da eine bakterielle Sekundärinfektion eine kosten- und zeitintensive Therapie erfordern kann, sollte bei Verdacht auf eine mikrobielle Verunreinigung nach Möglichkeit immer eine bakteriologische Kultur inklusive Antibiogramm angefertigt werden (Giuliano 2017), so dass eine zielgerichtete und damit auch effektive antibiotische Therapie erfolgen kann. Auch die Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV) verlangt in § 12c bei jeder Umwidmung eines Antibiotikums, sowie bei Anwendung von Fluorchinolonen oder Cephalosporinen der 3. & 4. Generation ein Antibiogramm (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2018).

In vielen Fällen ist es jedoch nicht möglich, vor Therapiebeginn auf das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung zu warten, da dieses Untersuchungsverfahren zeitaufwendig ist und i.d.R. 3–4 Werktagen dauert. In dieser Zeit kann sich eine bakterielle Infektion ohne Antibiotikaaanwendung weiter

ausbreiten und den weiteren Krankheitsverlauf verschlimmern. Das Risiko für das Auftreten von Komplikationen, wie beispielsweise der Verlust der Sehfähigkeit, erhöht sich damit erheblich (Gemensky-Metzler et al. 2005). Daher wird empfohlen, bei bakterieller Beteiligung initial ein lokal anwendbares Breitspektrumantibiotikum einzusetzen (Brooks 2010, Giuliano 2017) und es ggf. bei Therapieversagen nach dem Ergebnis von kultureller Untersuchung und Antibiogramm zu wechseln (Sauer et al. 2003).

Die Auswahl der aktuell für das Pferd zugelassenen antibiotischen Augenpräparate ist gering. Lediglich zwei antibiotische Wirkstoffe in drei Präparaten sind momentan verfügbar. Fünf weitere Präparate sind für die Anwendung bei anderen Tierarten zugelassen (*Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig* 2021). Als Folge dieses Therapienotstandes wird häufig auf humanmedizinische Augenpräparate zurückgegriffen – doch ist das immer notwendig?

Die vorliegende Studie soll zeigen, welche Bakterien bei entzündlichen Erkrankungen des Auges vorkommen und wie ihre Resistenzspektren aussehen.

Material und Methoden

Im Jahr 2018 wurden 844 Augentupfer von Pferden bakteriologisch untersucht, die im Rahmen der Routinediagnostik von in Deutschland praktizierenden Tierärzten an ein veterinärmedizinisches Untersuchungslabor (akkreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005) geschickt worden sind. Die Tupfer stammten von 785 verschiedenen Pferden.

Die Abstriche für die aerobe bakteriologische Erregeranzucht wurden i.d.R. in regulärem Transportmedium (Amies Medium mit Kohlezusatz oder Stuart Medium) versendet.

Der Versand der Abstriche erfolgte entweder auf dem Postweg (Dauer i.d.R. 1–2 Werktagen) oder per Kurier (Eintreffen des Untersuchungsmaterials i.d.R. am nächsten Tag).

Die Tupfer wurden in drei Fraktionen auf Columbia Agar mit Zusatz von defibriniertem Schafblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Oxoid GmbH, Wesel) und Endo-Agar (BD) ausgestrichen. Anschließend wurden sie für die Anreicherung in CaSo-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon: Herstellung sowie Qualitätskontrolle nach Herstellerangaben inhouse, BD) verbracht. Die Nährböden wurden aerob bei 36 °C bebrütet. Nach 18–24 h wurden sie auf bakterielles Wachstum überprüft. Waren zu diesem Zeitpunkt keine Bakterienkolonien angewachsen, wurden die Platten für weitere 24 h bebrütet und anschließend erneut kontrolliert.

3. Eigene Untersuchungen

Das beimpfte Anreicherungsmedium wurde für 18–24 h bei 36 °C bebrütet. Anschließend wurde das Medium auf Columbia Agar (BD/Oxoid) und Endo-Agar (BD) ausgestrichen und die Nährböden bei 36 °C bebrütet. Auch diese Platten wurden nach 18–24 h abgelesen.

Die Identifizierung der Bakterien erfolgte neben der Beurteilung der Kulturmorphologie und biochemischen Methoden ergänzend mittels MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry; MALDI Biotyper, Bruker Daltonik GmbH, Bremen; Datenbanken: MALDI Biotyper Reference Library MBT 7311 MSP Library und Reference Library MBT 7854 MSP Library). Zur Detektion von methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) wurde Brilliance MRSA 2 Agar (Oxoid) verwendet.

Die Resistenzbestimmung der Bakterien wurde unter Zuhilfenahme des MERLIN-Micronaut System®s (MERLIN Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika mbH, Bornheim-Hersel, Deutschland) zur photometrischen Auswertung und Precision XS® Pipettierer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, U.S.) im Mikrodilutionsverfahren nach den Standards des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) von Reinkulturen als Breakpoint-Verfahren durchgeführt (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015). Als Medium wurde Müller-Hinton-Bouillon (BD/Oxoid), bzw. Wilkins-Chalgren-Bouillon (für Streptokokken), verwendet. Da die Augentupfer im Rahmen der Routinediagnostik untersucht worden sind, wurde kein Antibiogramm erstellt, wenn dies vom einsendenden Tierarzt auf dem Untersuchungsauftrag aktiv abgewählt wurde. Wurde die gleiche Keimspezies bei demselben Pferd sowohl im rechten als auch im linken Auge nachgewiesen, erfolgte die Resistenztestung nur einmalig. Wenn verfügbar, wurden tierartspezifische Grenzwerte des Supplements Vet01 (3. Edition) des CLSI verwendet – so für den Wirkstoff Gentamicin für *Pseudomonas aeruginosa* und Enterobacteriaceae. Bei Fehlen von tierartspezifischen Grenzwerten wurde auf humanmedizinische Grenzwerte (Vet01-S03; Supplement M100, 28. Edition, human) zurückgegriffen (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2018). War keinerlei Grenzwert vorhanden, wurde sich an Grenzwerten anderer Antibiotika, bzw. Bakterienfamilien orientiert.

Bakterielles Wachstum aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen

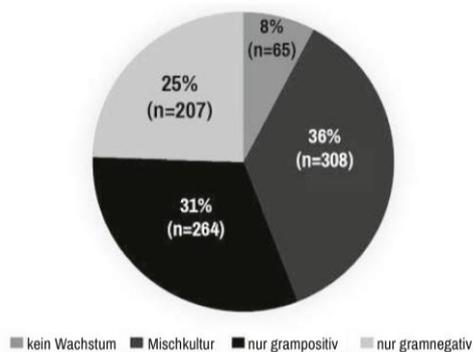


Abb.1 Einordnung des aeroben Bakterienwachstums aus Tupferproben erkrankter Pferdeaugen (n=844) anhand des Gram-Verhaltens | Classification of the aerobic bacterial growth of diseased equine eyes (n=844) based on the results of Gram stain

Zu den 785 beprobten Pferden wurden Fragebögen an die einsendenden Tierarztpraxen per E-Mail oder Telefax versandt. Hierbei wurden neben Angaben zum Signalement des entsprechenden Pferdes, wie Rasse, Alter, Geschlecht, v.a. Informationen zu klinischem Befund, Therapie vor Probenentnahme, Art der Pferdehaltung, Impfstatus und eventuell erfolgten Klinikaufenthalten abgefragt.

Statistische Auswertung

Es erfolgte eine deskriptive Auswertung des aeroben Keimspektrums und der Sensitivität isolierter Bakterien gegenüber ausgewählten Antibiotika. Zum Vergleich des Keimwachstums zwischen den Jahreszeiten wurde der Chi-Quadrat Test durchgeführt. Verwendet wurde hierfür das Programm Microsoft® Excel® in der Version 2102.

Ergebnisse

Patienten

Es wurden 844 Augentupfer von 785 verschiedenen Pferden untersucht. Zu 240 Pferden lagen Informationen aus den verschickten Fragebögen vor. Neben den Angaben der betreuenden Tierärzte in den Fragebögen wurden auch die Informationen auf den Untersuchungsaufträgen herangezogen.

303 der untersuchten Pferde waren männlich, 309 weiblich, bei 173 Tieren wurde das Geschlecht nicht angegeben.

Das jüngste Tier der Studie war zum Zeitpunkt der Probenentnahme 10 Tage, das älteste Tier 45 Jahre alt. Insgesamt waren 11 Tiere unter einem Jahr, 12 Tiere über 30 Jahre alt. Von 316 Pferden war das Alter unbekannt.

Es war ein breites Rassespektrum vertreten, wobei die größte Gruppe von den Warmblütern gebildet wurde: 296 Warmblüter, 153 Kleinpferde und Ponys, 29 Vollblüter und 5 Kaltblüter. Bei 18 Pferden gehörten die Elterntiere verschiedenen Rassen an. Zu 284 Pferden lagen keine Informationen bezüglich der Rasse vor.

Keimspektrum

8% der Augentupfer (n = 65/844) waren bakteriologisch negativ. Bei 92% (n = 779/844) der Abstriche zeigte sich ein bakterielles Wachstum. Hier konnten pro Tupfer 1–6 Bakterienspezies isoliert werden. Insgesamt gab es 1510 Bakterienisolate.

Bei 36% der Proben (n = 308/844) wurde eine Mischkultur grampositiver und gramnegativer Keime nachgewiesen. In 31% der Fälle (n = 264/844) waren die detektierten Keime ausschließlich grampositiv, bei 25% (n = 207/844) ausschließlich gramnegativ (Abb. 1).

Die detektierten Bakterien stammten aus 25 verschiedenen Familien. Die größte Gruppe wurde von den Enterobacteriaceae gebildet, gefolgt von Staphylococcaceae und Bacillaceae. Weiterhin kamen Streptococcaceae, Moraxellaceae und

3. Eigene Untersuchungen

Pseudomonadaceae häufig vor (Abb. 2). Insgesamt waren 55 % (n = 832) der Bakterien grampositiv, 45 % (n = 678) der Isolate gramnegativ.

Die meisten grampositiven Isolate gehörten zu den Gattungen *Staphylococcus* (n = 270/832), *Bacillus* (n = 260/832) und *Streptococcus* (n = 167/832). Bei den gramnegativen Keimen waren die Gattungen *Pantoea* (n = 267/678), *Pseudomonas* (n = 137/678) und *Acinetobacter* (n = 101/678) am stärksten vertreten (Tab.1).

Je nach Jahreszeit ist eine unterschiedliche Anzahl von Tupfern für die bakteriologische Untersuchung eingeschickt worden: Frühling n = 140, Sommer n = 241, Herbst n = 329, Winter n = 134.

Im saisonalen Vergleich der Art des Keimwachstums – eingeteilt in: kein Wachstum, ausschließlich gramnegativ, ausschließlich grampositiv und sowohl grampositives als auch gramnegatives Wachstum – gab es signifikante Unterschiede (Chi-Quadrat (9, n = 844)=22,97, p-Wert = 0,0063) (Abb. 3).

Tab.1 Zugehörigkeit aerober Bakterienisolate (n=1510) aus 844 Abstrichen erkrankter Pferdeaugen zu ihren Gattungen - die vorkommenden Bakteriengattungen wurden nach Anzahl ihrer Isolate absteigend sortiert. | *Affiliation of the aerobic bacterial isolates (n=1510) from 844 swabs of diseased equine eyes to their genera - the occurring genera were sorted by the number of isolates in a descending order.*

Gramnegative Gattungen	Anzahl Isolate (n=678)	Grampositive Gattungen	Anzahl Isolate (n=832)
<i>Pantoea</i>	267	<i>Staphylococcus</i>	270
<i>Pseudomonas</i>	137	<i>Bacillus</i>	260
<i>Acinetobacter</i>	101	<i>Streptococcus</i>	167
<i>Escherichia</i>	42	<i>Enterococcus</i>	41
<i>Moraxella</i>	39	<i>Pseudarthrobacter</i>	21
<i>Serratia</i>	15	<i>Aerococcus</i>	17
<i>Enterobacter</i>	13	<i>Corynebacterium</i>	10
<i>Actinobacillus</i>	12	<i>Glutamicibacter</i>	6
<i>Leclercia</i>	9	<i>Paenarthrobacter</i>	6
<i>Kosakonia</i>	4	<i>Paenibacillus</i>	6
<i>Stenotrophomonas</i>	4	<i>Arthrobacter</i>	4
<i>Advenella</i>	3	<i>Micrococcus</i>	4
<i>Myroides</i>	3	<i>Rothia</i>	4
<i>Pasteurella</i>	3	<i>Lactococcus</i>	3
<i>Rahnella</i>	3	<i>Weissella</i>	3
<i>Bordetella</i>	2	<i>Rhodococcus</i>	2
<i>Chryseobacterium</i>	2	<i>Exiguobacterium</i>	1
<i>Erwinia</i>	2	<i>Lactobacillus</i>	1
<i>Klebsiella</i>	2	<i>Leuconostoc</i>	1
<i>Massilia</i>	2	<i>Lysinibacillus</i>	1
<i>Neisseria</i>	2	<i>Macrococcus</i>	1
<i>Achromobacter</i>	1	<i>Marinilactibacillus</i>	1
<i>Aeromonas</i>	1	<i>Pseudoglutamicibacter</i>	1
<i>Alcaligenes</i>	1	<i>Solibacillus</i>	1
<i>Citrobacter</i>	1		
<i>Hämophilus</i>	1		
<i>Morganella</i>	1		
<i>Proteus</i>	1		
<i>Providencia</i>	1		
<i>Psychrobacter</i>	1		
<i>Raoultella</i>	1		
<i>Sphingobacterium</i>	1		

3. Eigene Untersuchungen

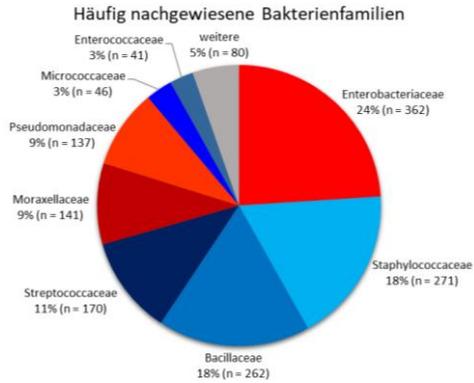


Abb. 2 Zugehörigkeit aerober Bakterienisolate (n=1510) aus 844 Abstrichen erkrankter Pferdeaugen zu ihren Familien: Die Grafik zeigt die am häufigsten nachgewiesenen Bakterien-familien. 95% der Keime stammten aus 8 verschiedenen Familien. | Affiliation of the aerobic bacterial isolates (n=1510) from 844 swabs of diseased equine eyes to their families: The chart shows the most frequently identified bacterial families. 95% of the bacteria derived from 8 different families.

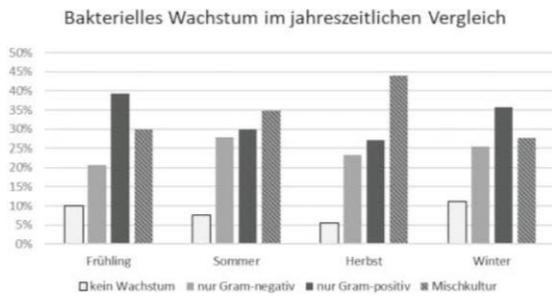


Abb. 3 Jahreszeitliche Unterschiede des bakteriellen Wachstums bei Abstrichen erkrankter Pferdeaugen in % der pro Jahreszeit eingesandten Tupfer (Frühling n=140, Sommer n=241, Herbst n=329, Winter n=134) | Seasonal differences in bacterial growth of diseased equine eyes in % of the number of sent swabs per season (spring n=140, summer n=241, autumn n=329, winter n=134)

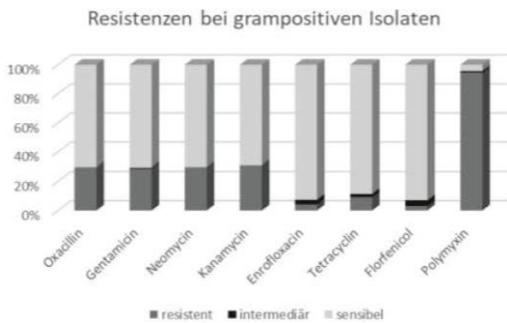


Abb. 4 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei grampositiven Isolaten (n=767) aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen. Anteil sensibler Isolate: Florfenicol 93% (n=713); Enrofloxacin 92,6% (n=710); Tetracyclin 88,5% (n=679); Gentamicin 70,5% (n=541); Oxacillin 70,4% (n=540); Neomycin 70,1% (n=538); Kanamycin 68,8% (n=528); Polymyxin 4,3% (n=33) | Percentage in vitro effectiveness of antibiotics against Gram-positive isolates (n=767) from swabs of diseased equine eyes. Portion of sensitive isolates: florfenicol 93% (n=713); enrofloxacin 92.6% (n=710); tetracycline 88.5% (n=679); gentamicin 70.5% (n=541); oxacillin 70.4% (n=540); neomycin 70.1% (n=538); kanamycin 68.8% (n=528); polymyxin 4.3% (n=33)

Ergebnisse des Resistenztests

Von 1421 Bakterienisolaten wurden Antibiotogramme erstellt. Folgende Antibiotika standen im Testpanel des Labors zur Verfügung und sind gleichzeitig als Wirkstoffe in aktuell verfügbaren Augenpräparaten enthalten: Oxacillin (stellvertretend für Cloxacillin (Clinical & Laboratory Standards Institute, 2015)), Gentamicin, Neomycin, Kanamycin, Enrofloxacin (stellvertretend für Ofloxacin (Feßler et al. 2017)), Tetracyclin, Florfenicol (stellvertretend für Chloramphenicol (Werckenthin 2005)) und Polymyxin.

Das Resistenzverhalten grampositiver (Abb. 4) und -negativer Bakterien (Abb. 5) lässt sich den beigefügten Grafiken entnehmen.

Zusätzlich wurde das Ergebnis der Resistenztestung ausgewählter Bakterienfamilien, bzw. -spezies separat ausgewertet. Dies sind: *Staphylococcus aureus*, β -hämolyisierende Streptokokken sowie die Familien der Moraxellaceae, Pseudomonadaceae und Enterobacteriaceae.

Staphylococcus aureus

Bei 28% (n = 9/32) der Isolate von *Staphylococcus aureus* lag eine Methicillin-Resistenz vor. Die meisten Isolate waren mit 71,9% gegenüber Neomycin (n = 23/32) und Florfenicol (n = 23/32) sensibel, gefolgt von Kanamycin mit 68,8% (n = 22/32). Bei Oxacillin, Gentamicin und Enrofloxacin waren jeweils 65,6% (n = 21/32) der Isolate sensibel. Tetracyclin erwies sich mit 53,1% (n = 17/32) in vitro als weniger wirksam. Alle Isolate waren resistent gegenüber Polymyxin (Abb. 6).

β -hämolyisierende Streptokokken

Die Gruppe der β -hämolyisierenden Streptokokken umfasste *Streptococcus canis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, sowie die in den Befunden als β -hämolyisierende Streptokokken bezeichneten Isolate. Die meisten Isolate verhielten sich sensibel gegenüber Oxacillin und Enrofloxacin mit 98,6% (n = 71/72). Mit 97,2% (n = 70/72) folgte Florfenicol. 93,1% (n = 67/72) waren sensibel gegenüber Tetracyclin. Bei den Aminoglykosiden wurden im Antibiotogramm deutlich weniger Isolate als sensibel getestet: 5,6% (n = 4/72) bei Kanamycin, 4,2% (n = 3/72) bei Neomycin und 2,8% (n = 2/72) bei Gentamicin. Keines der Isolate war sensibel gegenüber Polymyxin (Abb. 7).

Moraxellaceae

Die Familie der Moraxellaceae umfasste die Gattungen *Acinetobacter* und *Moraxella*. 97,1% (n = 134/138) der Isolate waren sensibel gegenüber Neomycin. Bei Kanamycin und Enrofloxacin waren es 95,7% (n = 132/138), bei Gentamicin 94,9% (n = 131/138), bei Tetracyclin 86,2% (n = 119/138), bei Florfenicol 78,3% (n = 108/138) und bei Polymyxin 65,2% (n = 90/138). Die wenigsten Isolate waren im Antibiotogramm mit 23,2% (n = 32/138) gegenüber Oxacillin sensibel (Abb. 8).

Pseudomonadaceae

Die größte In vitro-Wirksamkeit in der Familie der Pseudomonaden zeigte Gentamicin mit 92,6% (n = 125/135), gefolgt von

3. Eigene Untersuchungen

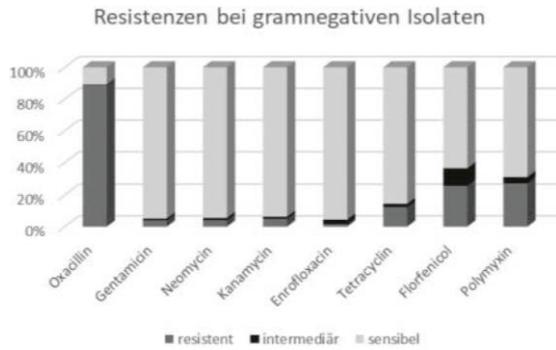


Abb. 5 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei gramnegativen Isolat (n=654) aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen. Anteil sensibler Isolate: Enrofloxacin 95,6% (n=625); Gentamicin 94,8% (n=620); Neomycin 94,5% (n=618); Kanamycin 93,7% (n=613); Tetracyclin 85,6% (n=560); Polymyxin 69,1% (n=452); Florfenicol 63,6% (n=416); Oxacillin 10,9% (n=71) | Percentage in vitro effectiveness of antibiotics against Gram-negative isolates (n=654) from swabs of diseased equine eyes. Portion of sensitive isolates: enrofloxacin: 95.6% (n=625); gentamicin 94.8% (n=620); neomycin 94.5% (n=618); kanamycin 93.7% (n=613); tetracycline 85.6% (n=560); polymyxin 69.1% (n=452); florfenicol 63.6% (n=416); oxacillin 10.9% (n=71)

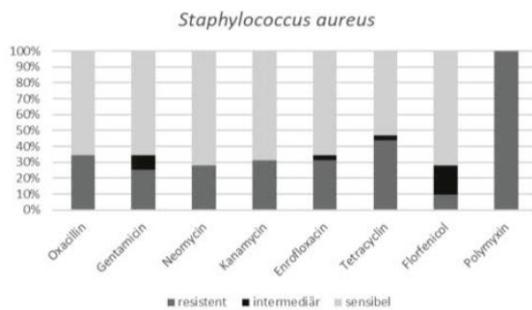


Abb. 6 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei Isolat von Staphylococcus aureus (n=32) aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen | Percentage in vitro effectiveness of selected antibiotics against isolates of Staphylococcus aureus (n=32) from swabs of diseased equine eyes

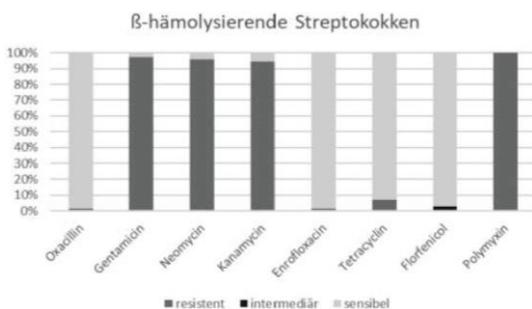


Abb. 7 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei Isolat β-hämolisierender Streptokokken (n=72) aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen | Percentage in vitro effectiveness of selected antibiotics against isolates of β-hemolytic streptococci (n=72) from swabs of diseased equine eyes

Enrofloxacin mit 90,4% (n = 122/135). Eine ähnliche Resistenzlage zeigte sich bei Neomycin mit 88,9% (n = 120/135) und Kanamycin mit 85,9% (n = 116/135). 78,5% (n = 106/135) der Isolate waren sensibel gegenüber Tetracyclin – 63,0% (n = 85/135) gegenüber Polymyxin. Florfenicol hat mit 28,9% (n = 39/135) eine deutlich geringere In vitro-Wirksamkeit. Die meisten Resistenzen gab es bei Oxacillin. Hier waren lediglich 3,7% (n = 5/135) der Isolate sensibel (Abb. 9).

Enterobacteriaceae

Folgende Gattungen der Familie der Enterobacteriaceae waren in der Auswertung der Antibiogramme enthalten: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kosakonia*, *Leclercia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Providencia*, *Rahnella*, *Raoultella* und *Serratia*. Gegenüber den Aminoglykosiden zeigte sich in vitro eine hohe Sensitivität: Neomycin 97,7% (n = 338/346), Kanamycin 97,4% (n = 337/346), Gentamicin 96,5% (n = 334/346) – so auch bei Enrofloxacin 97,1 % (n = 336/346) als Vertreter der Fluorchinolone. 87,9% (n = 304/346) der Isolate waren sensibel gegenüber Tetracyclin. Bei Polymyxin waren es 75,1% (n = 260/346) und bei Florfenicol 70,2% (n = 243/346). Die geringste In vitro-Wirksamkeit zeigte sich bei Oxacillin mit 2,6% (n = 9/346) sensibler Isolate (Abb. 10).

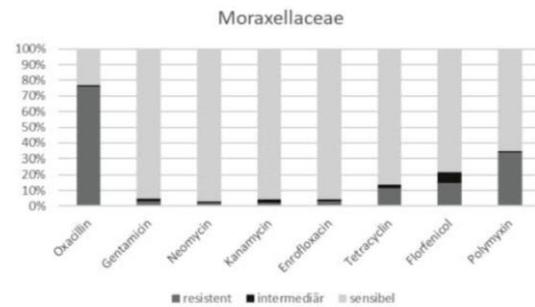


Abb. 8 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei Isolat der Familie der Moraxellaceae (n=138) aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen | Percentage in vitro effectiveness of selected antibiotics against isolates of the family of Moraxellaceae (n=138) from swabs of diseased equine eyes

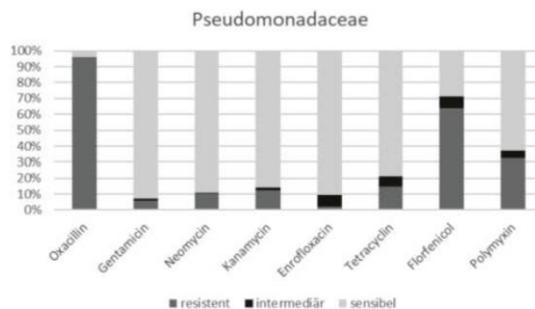


Abb. 9 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei Isolat der Familie der Pseudomonadaceae (n=135) aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen. | Percentage in vitro effectiveness of selected antibiotics against isolates of the family of pseudomonadaceae (n=135) from swabs of diseased equine eyes

3. Eigene Untersuchungen

Diskussion

Keimspektrum

92 % (n = 779/844) der untersuchten Proben waren bakteriologisch positiv. Diese Zahl deckt sich mit einer Studie aus den Vereinigten Staaten (Gemensky-Metzler et al. 2005). Bei einer Studie aus Australien lag der Anteil der positiven Proben höher (Hampson et al. 2018), bei einer Studie aus Polen niedriger (Zak et al. 2018). Deutlich weniger positive Proben lagen bei einer Studie aus dem Vereinigten Königreich vor (Johns et al. 2011). Im Gegensatz zu den vorgenannten Studien, bei denen gesunde Tiere untersucht worden sind, wurden bei der vorliegenden Arbeit Tupfer von Pferden mit Augenerkrankungen ausgewertet, die aus dem Einsendematerial eines Diagnostiklabors stammten. Da sich auch auf der Oberfläche des gesunden Pferdeauges Bakterien und Pilze befinden (Andrew et al. 2003), würde man stets eine positive Bakterienkultur erwarten. Methodische Gründe für ausbleibendes bakterielles Wachstum könnten u.a. Abstrichentnahmen unter/nach Antibiotikatherapie oder aus stark eitrigen Prozessen, verlängerte Zeitspannen bis zum Eintreffen im Labor und Lagerung/Transport bei ungünstigen Außentemperaturen sein – so gibt es bei der Betrachtung der Jahreszeiten im Winter die meisten bakteriologisch negativen Ergebnisse.

In den Studien, die sich mit der bakteriellen Mikroflora des gesunden Pferdeauges beschäftigt haben, war die Mehrzahl der Isolate grampositiv (Andrew et al. 2003, Araghi-Sooreh et al. 2014, Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011, Moore et al. 1988, Zak et al. 2018). Auch in dieser Arbeit war dies mit 55% grampositiver Isolate der Fall – trotz Betrachtung erkrankter Augen. In den vorhergehenden Studien konnten neben der Gattung *Staphylococcus*, die in jeder der vorgenannten Studien häufig vorkam, auch die Gattungen *Corynebacterium* (Andrew et al. 2003, Cattabiani et al. 1976, Hampson et al. 2018, Moore et al. 1988), *Bacillus* (Andrew et al. 2003, Araghi-Sooreh et al. 2014, Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Moore et al. 1988), *Micrococcus* (Cattabiani et al. 1976, Johns et al. 2011), *Streptomyces* (Gemensky-Metzler et al. 2005, Moore et al. 1988) und *Streptococcus* (Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005) häufig isoliert werden. Größten-

teils deckt sich dies mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie. Die Gattung mit den meisten Isolaten war auch hier die Gattung *Staphylococcus*. Weiterhin wurden vielfach Keime der Gattungen *Bacillus* und *Streptococcus* isoliert. *Corynebakterien* und *Streptomyces* kamen vor, jedoch nur mit wenigen Isolaten. Lediglich die Gattung *Streptomyces* konnte gar nicht nachgewiesen werden. Gramnegative Mikroorganismen konnten ebenfalls aus Tupfern gesunder Pferdeaugen angezüchtet werden, wenn auch seltener. Diese gehörten vor allem zu den Gattungen *Moraxella* (Andrew et al. 2003, Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Moore et al. 1988, Zak et al. 2018), *Acinetobacter* (Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Johns et al. 2011, Moore et al. 1988) und *Neisseria* (Cattabiani et al. 1976, Moore et al. 1988).

Lagen Keratitiden vor, gehörten die isolierten Bakterien am häufigsten zu den grampositiven Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* (Keller und Hendrix 2005, Moore et al. 1995, Mustikka et al. 2020, Sauer et al. 2003), sowie zu den gramnegativen Gattungen *Pseudomonas* (Keller und Hendrix 2005, Moore et al. 1995, Moore et al. 1983, Sauer et al. 2003) und *Acinetobacter* (Moore et al. 1995, Moore et al. 1983) und zur Familie der Enterobacteriaceae (Moore et al. 1995, Moore et al. 1983).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie passen dazu. Die meisten Isolate gehörten zur Familie der Enterobacteriaceae (siehe Abb. 2). Am häufigsten sind die Gattungen *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* und *Acinetobacter* vertreten (Tabelle 1).

Die Identifizierung der Keime beruhte in dieser Studie ausschließlich auf dem Resultat kultureller Untersuchungstechniken unter aeroben Bedingungen. Somit konnten längst nicht alle im Untersuchungsmaterial vorhandenen Bakterien detektiert werden, sondern lediglich ein kleiner Teil davon. So lassen sich etwa nur 1–10% der vorhandenen Bakterien kulturell erfassen (Amann et al. 1995). Dass sich das Mikrobiom des Pferdeauges tatsächlich aus wesentlich mehr Keimen zusammensetzt als kulturell nachweisbar, zeigen Studien, in denen Next-Generation Sequencing angewandt worden ist (LaFrentz et al. 2020, Scott et al. 2019).

Im Gegensatz zu einer Studie aus Florida (Andrew et al. 2003), bei der sich die okuläre Keimflora augengesunder Pferde zwischen den Jahreszeiten nicht signifikant unterschied, gab es im jahreszeitlichen Vergleich der Art des Keimwachstums in der vorliegenden Studie Unterschiede. So konnten im Herbst die meisten Mischkulturen aus grampositiven und gramnegativen Erregern nachgewiesen werden, während der Anteil der Kulturen mit ausbleibendem Wachstum hier gleichzeitig am geringsten war. Im Winter war der Anteil der negativen Kulturen erwartungsgemäß am größten. Im Vergleich zu Florida sind die saisonalen Unterschiede in Mitteleuropa deutlicher. Zudem wurden in der vorliegenden Studie Tupfer von Pferden mit Augenerkrankungen ausgewertet. Wollte man den Einfluss der Jahreszeiten gezielt untersuchen, müsste man hierzu ähnlich zur Studie aus Florida, augengesunde Pferde untersuchen und dieselben Tiere im Jahresverlauf beproben, um andere Einflussfaktoren zu minimieren. Die Anzahl der pro Jahreszeit eingesandten Tupfer für die bakteriologische Untersuchung lässt die Vermutung zu, dass die meisten entzündlichen Augenerkrankungen beim Pferd

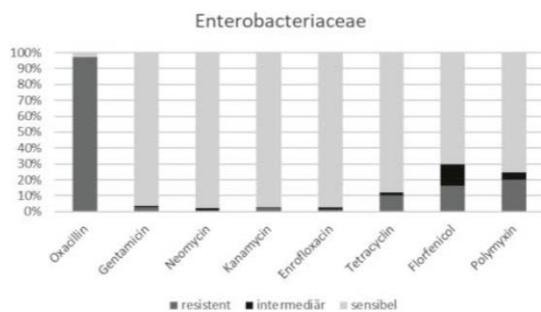


Abb. 10 Prozentuale In-vitro-Wirksamkeit einiger Antibiotika bei Isolat

3. Eigene Untersuchungen

unter mitteleuropäischen Bedingungen (Kühlgemäßigte Zone) im Herbst, gefolgt vom Sommer auftreten. Auch bei einer Studie aus Finnland (kaltgemäßigte Zone) fanden sich die meisten Fälle infektiöser Keratitiden im Sommer und Herbst (Mustikka et al. 2020). Erklären lässt sich dies auch mit dem jahreszeitlich unterschiedlichen Auftreten bestimmter Vektoren, wie beispielsweise Fliegen oder Staub. Diese spielen im Winter eine geringere Rolle als im Sommer (Gemensky-Metzler et al. 2005).

Resistenzen

Derzeit sind in Deutschland für das Pferd drei antibiotische Präparate zur Anwendung am Auge zugelassen: Cepemycin® (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH) und Ophthocycline® (Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH) mit dem Wirkstoff Chlortetracyclinhydrochlorid und Vetoscon® (Zoetis Deutschland GmbH) mit Cloxacillin-Benzathin als Wirkstoff. Weitere Antibiotika, die in Augenpräparaten enthalten und für andere Tierarten zugelassen sind: Chloramphenicol, Neomycin, Fusidinsäure und Gentamicin (Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig 2021).

Eine Übersicht über die aktuell in Deutschland verfügbaren Augenpräparate für die Anwendung am Tier bietet Tabelle 2. Weiterhin kommen auch häufig humanmedizinische Präparate zum Einsatz, die beispielsweise folgende Wirkstoffe enthalten: Kanamycin, Tobramycin, Ofloxacin, Polymyxin B, Grammidin, Bacitracin.

Im Unterschied zu anderen Studien, bei denen der Agardiffusionstest angewandt worden ist (Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011, Keller und Hendrix 2005, Sauer et al. 2003), wurde in der vorliegenden Studie die Resistenztestung im Mikrodilutionsverfahren durchgeführt. Zur besseren Übersicht wurden Grafiken zur Resistenzlage grampositiver (Abb. 4) und gramnegativer Keime (Abb. 5) erstellt, so dass sich Unterschiede klar erkennen lassen. Allerdings sind in diesen Auswertungen sämtliche Keime erfasst, für die ein Antibiogramm erstellt worden ist – auch diejenigen, die auf der Augenoberfläche im Allgemeinen als weniger pathogen gelten. So kommt beispielsweise *Bacillus* spp. in vielen Studien regelmäßig auf der Augenoberfläche gesunder Pferde vor (Andrew et al. 2003, Gemensky-Metzler et al. 2005, Moore et al. 1988). Auch *Lactococcus* spp. wird i.d.R. nicht als pathogen eingestuft. Trotzdem kann das Wissen um das unterschiedliche Resistenzverhalten grampositiver und -negativer Keime hilfreich sein, wenn ein Antibiotikum zur Erstbehandlung nach Gramfärbung ausgewählt werden soll (Matthews 2009).

Vergleicht man die Resistenzlage der detektierten grampositiven und -negativen Keime dieser Arbeit mit dem Ergebnis der Resistenztestung einer australischen Studie (Hampson et al. 2018), in der gesunde Pferdeaugen beprobt worden sind, gibt es nur geringe Unterschiede zwischen der getesteten In vitro-Wirksamkeit gegenüber den Antibiotika, die in beiden Studien getestet worden sind. Dies waren: Chloramphenicol, Cloxacillin, Gentamicin, Neomycin, Ofloxacin und Tetracyclin. So waren in beiden Studien > 90% der grampositiven Keime gegenüber Chloramphenicol (Florfenicol) und Ofloxacin (Enrofloxacin) sensibel. Unterschiede ergaben sich bei den Aminoglykosiden. Während bei Hampson et al. die Wirksamkeit von Neomycin auch über 90% lag und bei Gentamicin gegenüber den grampositiven Bazillen und Coccobazillen ebenso, waren es in der vorliegenden Studie nur > 70% der Isolate, die sensibel waren. Im Resistenzvergleich der gramnegativen Isolate waren in beiden Studien Gentamicin, Neomycin und Ofloxacin (Enrofloxacin) hochwirksam – Tetracyclin hingegen nur in der australischen Studie.

Klinisch relevanter sind die Auswertungen der Antibiogramme, die bestimmte Keimspezies oder -familien separat abbilden, die bekanntermaßen an infektiösen Krankheitsgeschehen des Auges beteiligt sein können. Für die vorliegende Studie wurden daher folgende Keime ausgewählt: β -hämolyisierende Streptokokken, *Staphylococcus aureus*, Pseudomonadaceae, Moraxellaceae und Enterobacteriaceae.

Zur Therapie β -hämolyisierender Streptokokken sind nach dem In vitro-Ergebnis der vorliegenden Studie Cloxacillin, Ofloxacin, Chloramphenicol und Tetracyclin geeignet. Aufgrund der intrinsischen Resistenzen sind Aminoglykoside (Krause et al. 2016) und Polymyxin hingegen nicht erfolgversprechend. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit einer Arbeit, die u.a. das Resistenzverhalten von *Streptococcus equi* untersucht hat (Brooks et al. 2000) – wenn auch nicht alle getesteten Wirkstoffe beider Studien übereinstimmen. Einzig bei Enrofloxacin gab es Differenzen. So waren in der vorliegenden Studie alle Isolate bis auf eines sensibel, in der vorgenannten Studie hingegen verhielten sich die meisten Isolate intermediär. Eine Studie aus Finnland untersuchte ebenfalls die antimikrobielle Sensitivität von *Strep. equi subsp. zooepidemicus*. Hier waren nur < 60% der Isolate empfindlich gegenüber Tetracyclin, aber gegenüber Gentamicin 100% (Mustikka et al. 2020). Allerdings war die Zahl der getesteten Isolate nur sehr gering.

Von Oxacillin als Leitanthibiotikum der Isoxazolyl-Penicilline kann das Resistenzverhalten von Cloxacillin abgeleitet werden (Clinical & Laboratory Standards Institute 2015). Zurzeit gibt es für

antibiotischer Wirkstoff	Präparate	zugelassen für
Chlortetracyclinhydrochlorid	Cepemycin®, Ophthocycline®	Pferd, Hund, Katze (Cepemycin® + Rind)
Cloxacillin-Benzathin	Vetoscon®	Pferd, Rind, Schaf, Hund, Katze
Chloramphenicol	Cefenicol®, Cefenidex®	Hund, Katze
Neomycinsulfat	Dermamycin Augencreme®	Hund, Katze
Fusidinsäure	Isathal®	Hund
Gentamicin	Soligental®	Hund, Katze

Tab. 2 Antibiotische Wirkstoffe, die in Augenpräparaten lokal zum Einsatz kommen und für die Anwendung am Tier in Deutschland zugelassen sind (Vetidata, Stand: 03/2021) | Antibiotic agents that are used locally in eye preparations being approved for animals in Germany (Vetidata, current state: 03/2021)

3. Eigene Untersuchungen

das Pferd ein zugelassenes Präparat für die Anwendung am Auge mit Cloxacillin als Wirkstoff. Die In vitro-Wirksamkeit unterscheidet sich teilweise stark zwischen den Bakterienfamilien. Das Wirkspektrum von Cloxacillin sind grampositive Keime.

Bei 28% der Isolate von *Staphylococcus aureus* lag eine Methicillin/Oxacillin-Resistenz vor. Dieser Anteil passt zu einer Studie aus Italien, die die Keimflora der Konjunktiva augengesunder Esel untersucht hat. Hier waren 26,9% aller Staphylokokken-Isolate Methicillin/Oxacillin-resistent (Foti et al. 2013).

Aminoglykoside werden häufig zur topischen Therapie des Auges eingesetzt. Für Hund und Katze ist ein lokal anzuwendendes Präparat mit Gentamicin als Wirkstoff zugelassen. Gentamicin war hochwirksam (>90%) bei gramnegativen Isolaten, bei grampositiven Isolaten war die In vitro-Wirksamkeit geringer. Ähnlich verhielt es sich mit Neomycin und Kanamycin. Da Streptokokken eine natürliche Resistenz gegenüber Aminoglykosiden besitzen (Krause et al. 2016), lag hier der Anteil empfindlicher Isolate bei unter 6%.

Enrofloxacin zeigte sich als Leitantibiotikum der Fluorchinolone sowohl bei den grampositiven als auch bei den gramnegativen Isolaten als hochwirksam. Das Resistenzverhalten anderer Fluorchinolone kann von Enrofloxacin abgeleitet werden (Feßler et al. 2017). Momentan ist kein für Tiere zugelassenes Augenpräparat verfügbar, das ein Fluorchinolon enthält. Hier müssen ggf. Humanpräparate, beispielsweise mit Ofloxacin als Wirkstoff, umgewidmet werden. Ofloxacin steht auf der Positivliste für Equiden, d.h. es darf auch bei Schlachtequiden eingesetzt werden, sofern die Anwendung im Equidenpass dokumentiert und eine Wartezeit von mindestens 6 Monaten eingehalten wird (Europäische Kommission 2013).

88,5% der getesteten grampositiven Isolate waren Tetracyclin gegenüber sensibel. Bei den gramnegativen Keimen waren es 85,6%. Hochwirksam war Tetracyclin bei Streptokokken. Momentan sind zwei Präparate für die Anwendung am Pferdeauge zugelassen.

Florfenicol war hochwirksam bei den grampositiven Erregern, während nur 63,6% der gramnegativen Keime sensibel waren. Bei den Pseudomonaden waren weniger als 30% der Isolate empfindlich. Aktuell gibt es zwei Präparate, die für die Anwendung bei Hund und Katze zugelassen sind und Chloramphenicol als Antibiotikum enthalten. Bei Schlachtequiden darf Chloramphenicol nicht angewandt werden. Bei der Anwendung ist zu beachten, dass beim Menschen durch Kontakt mit Chloramphenicol eine aplastische Anämie ausgelöst werden kann. Daher sollte Hautkontakt unbedingt vermieden werden (Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig, 2021). Florfenicol und Chloramphenicol gehören beide zur Gruppe der Phenicole. Sie weisen aber Unterschiede in ihrer chemischen Struktur auf, weshalb sie nicht 1:1 voneinander abgeleitet werden können. Liegt eine Resistenz der Bakterien gegen Florfenicol vor, sind diese allerdings auch resistent gegenüber Chloramphenicol, daher funktioniert in diesem Fall die Ableitung. Andersherum ließe eine Resistenz gegenüber Chloramphenicol aber nicht zwangsläufig auf eine Resistenz gegenüber Florfenicol schließen (Werckenthin et al. 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den beiden Wirkstoffen Cloxacillin und Tetracyclin, von denen es für das Pferd zugelassene Augenpräparate gibt, Tetracyclin das breitere Wirkspektrum besitzt. Aus diesem Grund eignet es sich – in Fällen, in denen nicht auf das Ergebnis der Bakteriologie inklusive Resistenztests gewartet werden kann – für eine Erstversorgung eher. Cloxacillin hat ein grampositives Wirkspektrum. Auf der nächsten Stufe der Umwidnungskaskade stehen Präparate, die für andere Tierarten zugelassen sind. Dies sind Gentamicin, Neomycin, Chloramphenicol und Fusidinsäure. Beide Aminoglykoside zeigten – abgesehen von β -hämolyzierenden Streptokokken und *Staphylococcus aureus* – eine gute In vitro-Wirksamkeit. Gegenüber Florfenicol verhielten sich, stellvertretend für Chloramphenicol, mehr grampositive Keime sensibel als gramnegative. Fusidinsäure wurde in der vorliegenden Studie nicht getestet. Bekannt ist jedoch, dass gramnegative Bakterien über eine natürliche Resistenz gegenüber diesem Wirkstoff verfügen. Umgekehrt verhält es sich mit Polymyxin, für das kein tiermedizinisches Augenpräparat verfügbar ist – hier gehören grampositive Keime nicht zum Wirkspektrum. Enrofloxacin war, ausgenommen *Staphylococcus aureus*, in vitro hochwirksam. Auch gibt es derzeit kein zugelassenes Tierarzneimittel für die Anwendung am Auge mit Enrofloxacin als Antibiotikum. Hier muss – wenn notwendig – nach Umwidmung auf humanmedizinische Präparate, z.B. mit Ofloxacin als Wirkstoff, zurückgegriffen werden.

Die Auswertung zeigt, dass Keimidentifizierung und anschließende Anfertigung von Antibioogrammen für eine effektive Antibiotikatherapie notwendig sind, da sich die Resistenzlagen zwischen den Bakterienfamilien teilweise stark unterscheiden. Beispielsweise sind die sonst häufig hochwirksamen Aminoglykoside aufgrund natürlicher Resistenzen bei Streptokokken unwirksam. Ein weiteres Beispiel stellt Cloxacillin dar, dessen Einsatz sich bei Vorliegen von gramnegativen Keimen aufgrund der Resistenzlage nicht empfiehlt. Einschränkend muss allerdings angemerkt werden, dass die angewandten Grenzwerte für die Bewertung der Resistenzlage der Antibiotika für die systemische Anwendung gedacht sind. Es gibt derzeit keine Grenzwerte für die topische Anwendung. Es ist daher unklar, inwieweit die Ergebnisse auf die lokale Anwendung am Auge tatsächlich übertragbar sind. Das Heranziehen der aktuell verfügbaren systemischen Grenzwerte ist aber momentan die einzige Möglichkeit, Aussagen über das Resistenzverhalten treffen zu können. Bleibt zu hoffen, dass zukünftig auch auf Grenzwerte für topische Anwendungen zurückgegriffen werden kann.

Auch aus rechtlicher Sicht ist die Erstellung eines Antibioogramms nach anerkannten Verfahren erforderlich. Dies setzt eine Isolierung des bakteriellen Erregers in Reinkultur voraus. Da es für die Tierart Pferd lediglich drei zugelassene Präparate für die lokale Anwendung am Auge gibt, ergeben sich häufig Umwidmungen. Hierbei besteht eine Antibiogrammpflicht. Laut TÄHAV erfordern die Umwidmung eines Antibiotikums, sowie die Anwendung von Cephalosporinen der 3. und 4. Generation oder von Fluorchinolonen einen Resistenztest (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2018). Unabhängig von den rechtlichen Rahmenbedingungen sollte eine antibakterielle Therapie sich stets auch an den „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“ orientieren. Weiterhin gilt zu bedenken, dass die topische Anwendung antibiotischer Augen-

3. Eigene Untersuchungen

präparate prädisponierend für Pilzinfektionen sein kann (Andrew et al. 1998) – ein weiterer Grund, verantwortungsvoll und effizient mit ihnen umzugehen.

Interessenkonflikt

Die Autoren Heusinger und Schieder sind Mitarbeiter, die Autorin Müller Geschäftsführerin von LABOKLIN.

Literatur

- Amann R. I., Ludwig W., Schleifer K.-H. (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143–169.
- Andrew S. E., Brooks D. E., Smith P. J., Gelatt K. N., Chmielewski N. T., Whittaker C. J. (1998) Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987–1996). *Equine Vet. J.* 30, 109–116
- Andrew S. E., Nguyen A., Jones G. L., Brooks D. E. (2003) Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Vet. Ophthalmol.* 6, 45–50
- Araghi-Sooreh A., Navidi M., Razi M. (2014) Conjunctival Bacterial and Fungal Isolates in Clinically Healthy Working Horses in Iran. *Kafkas Univ. Vet. Fakult. Dergisi* 20, 625–627; DOI 10.9775/kvfd.2013.10649
- Brooks D. E. (2010) Equine conjunctival diseases: A commentary. *Equine Vet. Educ.* 22, 382–386; DOI doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00097.x
- Brooks D. E., Andrew S. E., Biros D. J., Denis H. M., Cutler T. J., Strubbe D. T., Gelatt K. N. (2000) Ulcerative keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in 11 horses. *Vet. Ophthalmol.* 3, 121–125; DOI 10.1046/j.1463-5224.2000.00120.x
- Brooks D. E., Matthews A., Clode A. B. (2017) Diseases of the cornea. In B. C. Gilger (Hrsg.), *Equine Ophthalmology* .3 Aufl.), Wiley Blackwell, Oxford. 252–368
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2018). Verordnung über Tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV) §12c Antibiotigrammpflicht Abs. 1. Verfügbar unter https://www.gesetze-im-internet.de/t_hav/BUNR021150975.html
- Cattabiani F., Cabassi E., Allodi C., Gianelli F. (1976) Bacterial flora of the conjunctival sac of the horse. *Ann. Sclavo.* 18, 91–119
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2015) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals (3 Aufl. Bd. Supplement Vet01S). Wayne, PA: CLSI
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2018) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 (28 Aufl.), Wayne, PA: CLSI
- Europäische Kommission (2013) Verordnung (EU) Nr. 122/2013. Abgerufen am 26.03.2021, 2021. Verfügbar unter <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX%3A32013R0122>
- Feßler A. T., Böttner A., Fehr M. (2017) Mikrotiterlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis. Aktualisierung der Layouts des DVG-Arbeitskreises „Antibiotikaresistenz“. *Deutsches Tierärzteblatt* 65, 472–481
- Foti M., Fisichella V., Giacobello C. (2013) Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the microbial flora from the conjunctiva of healthy donkeys from Sicily (Italy). *Vet. Ophthalmol.* 16, 89–92; DOI 10.1111/j.1463-5224.2012.01028.x
- Gemensky-Metzler A. J., Wilkie D. A., Kowalski J. J., Schmall L. M., Willis A. M., Yamagata M. (2005) Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am. J. Vet. Res.* 66, 800–811
- Giuliano E. A. (2017) Diseases of the adnexa and nasolacrimal system. In B. C. Gilger (Hrsg.), *Equine Ophthalmology* (3 Aufl.). Wiley Blackwell, Oxford, 197–251
- Hampson E., Gibson J. S., Barot M., Shapter F. M., Greer R. M. (2018) Identification of bacteria and fungi sampled from the conjunctival surface of normal horses in South-East Queensland, Australia. *Vet. Ophthalmol.* 22(3), 265–275; DOI 10.1111/vop.12587
- Johns I. C., Baxter K., Booler H., Hicks C., Menzies-Gow N. (2011) Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Vet. Ophthalmol.* 14, 195–199; DOI 10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x
- Keller R. L., Hendrix D. V. (2005) Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993–2004). *Equine Vet. J.* 37, 207–211; DOI 10.2746/0425164054530731
- Krause K. M., Serio A. W., Kane T. R., Connolly L. E. (2016) Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(6), 1–18; DOI 10.1101/cshperspect.a027029
- LaFrenz S., Abarca E., Mohammed H. H., Cuming R., Arias C. R. (2020) Characterization of the normal equine conjunctival bacterial community using culture-independent methods. *Vet. Ophthalmol.* 23, 480–488; DOI 10.1111/vop.12743
- Matthews A. G. (2009) Ophthalmic antimicrobial therapy in the horse. *Equine Vet. Educ.* 21, 271–280; DOI 10.2746/09577308.x334266
- McClellan K. A. (1997) Mucosal defense of the outer eye. *Survey Ophthalmol.* 42, 233–246; DOI [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(97\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(97)00090-8)
- Moore C. P., Collins B. K., Fales W. H. (1995) Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses: 63 cases (1986–1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 928–933
- Moore C. P., Fales W. H., Whittington P., Bauer L. (1983) Bacterial and fungal isolates from Equidae with ulcerative keratitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 600–603
- Moore C. P., Heller N., Majors L. J., Whitley R. D., Burgess E. C., Weber J. (1988) Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *Am. J. Vet. Res.* 49, 773–777
- Mustikka M. P., Grönthal T. S. C., Pietilä E. M. (2020) Equine infectious keratitis in Finland: Associated microbial isolates and susceptibility profiles. *Vet. Ophthalmol.* 23, 148–159; DOI 10.1111/vop.12701
- Sauer P., Andrew S. E., Lassaline M., Gelatt K. N., Denis H. M. (2003) Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991–2000): 65 horses. *Vet. Ophthalmol.* 6, 309–313; DOI 10.1111/j.1463-5224.2003.00312.x
- Scott E. M., Arnold C., Dowell S., Suchodolski J. S. (2019) Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PLoS One* 14, e0214877; DOI 10.1371/journal.pone.0214877
- Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig (2021) VETIDATA. Abgerufen am 23.03.2021. Verfügbar unter <https://www.vetidata.de/public/search/praeparat.php?parms=113,74,65,74,139,131,74,70,74,50,131,117,113,130,115,120,50,75,131,74,65,74,50,65,50,75,14>
- Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig (2021) VETIDATA. https://www.vetidata.de/public/details/wirkstoff_details.php?parms=113,74,65,74,139,131,74,67,74,50,123,117,137,50,75,131,74,67,74,50,71,64,67,50,75,141
- Werckenthin C., Böttner A., Hafez H., Hartmann K. (2005) Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die Empfindlichkeitsprüfung. *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* 118, 471–480
- Zak A., Siwinska N., Slowikowska M., Borowicz H., Ploneczka-Janeczko K., Chorbinski P., Niedzwiedz A. (2018) Conjunctival aerobic bacterial flora in healthy Silesian foals and adult horses in Poland. *MC Vet. Res.* 14, 261; DOI 10.1186/s12917-018-1598-6

3. Eigene Untersuchungen

3.1.2 Schieder A-K, Müller E, Heusinger A, Eule J C (2023): Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 39(1), 12-23; DOI 10.21836/PEM20230102

Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes

A.-K. Schieder et al.

Pferdeheilkunde – Equine Medicine 39 (2023) 1 (Januar/Februar) 12–23

DOI 10.21836/PEM20230102

Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes

Ann-Kathrin Schieder¹, Elisabeth Müller¹, Anton Heusinger¹ und Johanna C. Eule²

¹ LABOKLIN GmbH & Co. KG, Bad Kissingen

² Klinik für kleine Haustiere, Ophthalmologie, Freie Universität Berlin

Zusammenfassung: Gramnegative Keime können sowohl aus gesunden als auch aus erkrankten Pferdeaugen isoliert werden. Ziel der Studie war, die bei Pferden mit infektiösen Augenerkrankungen am häufigsten nachgewiesenen gramnegativen Gattungen hinsichtlich einer möglichen Beteiligung am Infektionsgeschehen näher zu betrachten. Dabei wurden Faktoren untersucht, die zu einem vermehrten Auftreten gramnegativer Keime führen könnten. Zudem wurden die Resistenzlagen gramnegativer Keime ohne und nach lokaler antibiotischer Vorbehandlung verglichen. Es wurden 844 Tupfer von Pferdeaugen bakteriologisch untersucht, die im Jahr 2018 im Rahmen der Routinediagnostik in einem veterinärmedizinischen Diagnostiklabor eingegangen sind. Für die Identifizierung der gramnegativen Bakterien wurden die Beurteilung der Kulturmorphologie, biochemische Methoden und die Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung – Flugzeitanalyse Massenspektrometrie (MALDI-TOF) herangezogen. Die Resistenzbestimmung erfolgte im Mikrodilutionsverfahren nach der „Breakpoint“-Methode. Weiterhin gingen Informationen aus Fragebögen in die Auswertung ein. Das gramnegative Keimspektrum setzt sich im Wesentlichen aus drei Familien zusammen: Enterobacteriaceae (53%, n = 359), Moraxellaceae (21%, n = 141) und Pseudomonadaceae (20%, n = 137). Am häufigsten wurden Spezies folgender Gattungen isoliert: *Pantoea* (n = 267), *Pseudomonas* (n = 137), *Acinetobacter* (n = 101), *Escherichia* (n = 42) und *Moraxella* (n = 39). Weder das Alter der beprobten Pferde noch lokale antibiotische Vorbehandlung hatten einen signifikanten Einfluss auf die Nachweisfähigkeit gramnegativer Keime. Ebenso kam es nicht zu einem vermehrten Auftreten gramnegativer Bakterien, wenn die Hornhaut vom Krankheitsprozess betroffen war. *Moraxella bovoculi* konnte am häufigsten im Herbst nachgewiesen werden. Die Resistenzlage der gramnegativen Keime, die aus Tupfern von antibiotisch lokal vorbehandelten Pferdeaugen nachgewiesen werden konnten, unterschieden sich nur gering von den Keimen aus unbehandelten Augen. Hohes oder niedriges Alter, Hornhautbeteiligung und lokale antibiotische Vorbehandlung ließen nicht auf ein vermehrtes Vorkommen gramnegativer Keime schließen. Unterschiede ergaben sich in der In vitro-Wirksamkeit der getesteten Antibiotika, wobei antibiotische Vorbehandlungen keinen großen Einfluss auf die Resistenzlage hatten. Die klinische Bedeutung der in der bakteriologischen Untersuchung nachgewiesenen gramnegativen Keime muss individuell beurteilt werden.

Schlüsselwörter: Pferd, Auge, Mikrobiologie, Konjunktiva, Cornea

The role of Gram-negative bacteria in equine ocular infectious diseases

Gram-negative bacteria can be isolated from both healthy and diseased equine eyes. Bacteria in the families Pseudomonadaceae and Enterobacteriaceae in particular have been associated with corneal infections in the literature. In a previous study, we were able to show that 61% of all swabs submitted to the laboratory for routine diagnostics contained Gram-negative bacteria, 25% contained only Gram-negative while 36% contained both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The aim of the present study was therefore to take a closer look at the Gram-negative genera most frequently detected in horses with infectious eye diseases with regard to a possible involvement in the infection process, as well as to investigate factors that might lead to an increased occurrence of Gram-negative bacteria. In addition, the resistance levels of Gram-negative bacteria without and after local antibiotic pretreatment were compared. Bacteriological examinations were performed on 844 swabs from equine eyes that were received as part of routine diagnostics in a veterinary diagnostic laboratory in the year 2018. Assessment of culture morphology, biochemical methods and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight analysis mass spectrometry (MALDI-TOF), were used to identify Gram-negative bacteria. Resistance determination was performed by microdilution method using the breakpoint method. Furthermore, information from questionnaires was included in the evaluation. The Gram-negative bacterial spectrum was predominantly composed of bacteria from three families: Enterobacteriaceae (53% n = 359), Moraxellaceae (21% n = 141) and Pseudomonadaceae (20% n = 137). Significantly fewer isolates (2% n=16) were identified as belonging to the fourth most common family, the Pasteurellaceae. Additional isolates were identified from the following families: Alcaligenaceae, Xenomonadaceae, Myroidaceae, Oxalobacteraceae, Flavobacteriaceae, Neisseriaceae, Aeromonadaceae and Sphingobacteriaceae. However these accounted for only 3% (n = 22) of the isolates obtained. Species of the following genera were isolated most frequently: *Pantoea* (n = 267), *Pseudomonas* (n = 137), *Acinetobacter* (n = 101), *Escherichia* (n = 42) and *Moraxella* (n = 39). Most common species were, in descending order: *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas koreensis*, *Acinetobacter lwoffii*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Moraxella bovoculi*, *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter johnsonii*. The other species were detected in less than 10 of the samples. The age of the sampled horses and local antibiotic pretreatment had no significant influence on the frequency of detection of Gram-negative bacteria. Similarly, there was no increased incidence of Gram-negative bacteria when the cornea was affected by the disease process. However, in animals with pre-reported corneal involvement, absence of bacterial growth was significantly more common and mixed cultures of Gram-positive and Gram-negative bacteria were significantly less frequent. *Moraxella bovoculi* was most frequently detected in the autumn. The resistance status of the Gram-negative bacteria isolated from swabs of equine eyes that had been previously treated with local antibiotics differed only slightly from the isolates from untreated eyes. Increases in resistance to the antibiotics used were not observed. In conclusion age, corneal involvement and local antibiotic pretreatment did not influence the detection rate of Gram-negative germs. The clinical significance of the Gram-negative bacteria detected in the aerobic bacteriological examination must be assessed individually for each patient. Differences were found in the in vitro efficacy of the antibiotic agents tested. The resistance situation of the Gram-negative bacteria does not seem to be significantly influenced by previous topical antibiotic therapy. Further studies are needed here.

Keywords: horse, eye, microbiology, conjunctiva, cornea

3. Eigene Untersuchungen

Zitation: Schieder A.-K., Müller E., Heusinger A., Eule J. C. (2023) Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 39, 12–23; DOI 10.21836/PEM20230102

Korrespondenz: Ann-Kathrin Schieder, LABOKLIN GmbH&Co.KG, Steubenstraße 4, 97688 Bad Kissinger; schieder@laboklin.com

Eingereicht: 20. Oktober 2022 | **Angenommen:** 17. November 2022

Einleitung

Auf der Schleimhautoberfläche von Pferdeaugen existiert eine Mikroflora, die von Bakterien und Pilzen gebildet wird (Andrew et al. 2003). Das aerobe Keimspektrum der Augenoberfläche von augengesunden Pferden und Pferden mit Augenerkrankungen ist in verschiedenen Ländern untersucht worden: Die Bakterienflora gesunder Augen ist überwiegend aus grampositiven Keimen zusammengesetzt, wobei auch gramnegative Keime in geringerer Anzahl vorkommen können (Andrew et al. 2003, Araghi-Sooreh et al. 2014, Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011, Moore et al. 1988, Zak et al. 2018).

Gramnegative Bakterien sind somit einerseits Bestandteil der okularen Mikroflora bei augengesunden Pferden (Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011) – andererseits werden sie aber auch häufig bei infektiösen Augenerkrankungen isoliert (Moore et al. 1995, Moore et al. 1983). Vor allem Pseudomonaden und Enterobakterien werden mit infizierten Hornhautläsionen in Verbindung gebracht (Gemensky-Metzler et al. 2005, McLaughlin et al. 1983, Moore et al. 1983, Sweeney und Irby 1996).

In unserer vorangegangenen Studie konnten wir zeigen, dass bei 61% aller untersuchten Tupfer, die im Rahmen der Routinediagnostik des Labors eingesendet worden waren, gramnegative Keime vorkamen – davon bei 25% ausschließlich gramnegative und bei 36% zusammen mit grampositiven Erregern (Schieder et al. 2021).

Im Folgenden soll daher das Vorkommen gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes genauer betrachtet werden. Das gramnegative Keimspektrum und vielfach diskutierte Einflussfaktoren auf das Keimwachstum, wie antibiotische Vorbehandlung, Hornhautbeteiligung, Alter des Tieres und Jahreszeit werden untersucht. Weiterhin wird der Frage nachgegangen, ob lokale Antibiotikatherapien des Auges zu einem Anstieg von resistenten Keimen führen können.

Material und Methoden

Untersuchungsgang und -material entsprechen einer vorausgegangenen Veröffentlichung, die sich mit dem aeroben Keimspektrum erkrankter Pferdeaugen und seiner Resistenzlage beschäftigt (Schieder et al. 2021).

Es wurden 844 Augentupfer von 785 verschiedenen Pferden bakteriologisch untersucht. Die Proben entstammten der Routinediagnostik eines veterinärmedizinischen Untersuchungslabors (akkreditiert nach DIN EN ISO/IEC 17025:2005) aus dem Jahr 2018. Einsender waren in Deutschland praktizierende Tierärzte. Der Versand der Abstri-

che für die aerobe bakteriologische Erregeranzucht erfolgte in regulärem Transportmedium (Aimes Medium mit Kohlezusatz oder Stuart Medium) entweder auf dem Postweg (Dauer i.d.R. 1–2 Werktage) oder über einen Kurier (Dauer i.d.R. 1 Tag). Am Tag des Probeneingangs wurden Columbia Agar mit Zusatz von defibriniertem Schafblut (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Oxoid GmbH, Wesel) und Endo-Agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) mit den Tupfern im 3-Ösen Ausstrich beimpft. Danach wurden die Tupfer für die Anreicherung in CaSo-Bouillon (Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon: Herstellung sowie Qualitätskontrolle nach Herstellerangaben inhouse, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) verbracht. Die Nährböden wurden aerob 18–24 h bei 36 ± 1 °C bebrütet. Im Anschluss an die Bebrütungszeit wurde das bakterielle Wachstum auf den Platten beurteilt. Waren zu diesem Zeitpunkt (noch) keine Bakterienkolonien angewachsen, wurden die Nährböden für weitere 24 h bei 36 ± 1 °C bebrütet und anschließend erneut beurteilt. Das beimpfte Anreicherungsmedium wurde nach 18–24 h Bebrütung bei 36 ± 1 °C auf Columbia Agar (BD/Oxoid) und Endo-Agar (BD) ausgestrichen. Auch diese Nährböden wurden bei 36 ± 1 °C bebrütet und nach 18–24 h abgelesen.

Die Identifizierung der gramnegativen Bakterien erfolgte anhand der Beurteilung der Kulturmorphologie, biochemischen Methoden und mittels MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight; MALDI Biotyper, Bruker Daltonik GmbH, Bremen; Datenbanken: MALDI Biotyper Reference Library MBT 7311 MSP Library und Reference Library MBT 7854 MSP Library).

Die Resistenzbestimmung wurde von Reinkulturen im Mikrodilutionsverfahren nach der Breakpoint-Methode gemäß den Standards des CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*, 2015) durchgeführt. Hierzu kamen das MERLIN-Micronaut System® (MERLIN Gesellschaft für mikrobiologische Diagnostika mbh, Bornheim-Hersel, Deutschland) zur photometrischen Auswertung und der Precision XS® Pipettierer (BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, U.S.) zum Einsatz. War die Erstellung eines Antibiotogramms vom einsendenden Tierarzt nicht gewünscht, wurde keine Resistenztestung durchgeführt. Wurde bei demselben Pferd beidseits die gleiche Keimspezies nachgewiesen, erfolgte die Resistenztestung nur einmalig. Waren tierartsspezifische Grenzwerte des Supplements V01 (3. Edition) des CLSI verfügbar, fanden diese Anwendung – hier für den Wirkstoff Gentamicin für *Pseudomonas aeruginosa* und die Familie der Enterobacteriaceae. Fehlten tierartsspezifische Breakpoints, wurde auf humanmedizinische Grenzwerte (Vet01 S03; Supplement M100, 28. Edition, human) zurückgegriffen (*Clinical & Laboratory Standards Institute*, 2018). War keinerlei Grenzwert vorhanden, wurden Grenzwerte anderer Antibiotika der gleichen Gruppe, bzw. anderer Bakterienfamilien herangezogen.

Um klinische Daten zu den beprobten Pferden zu erhalten, wurden Fragebögen an die einsendenden Tierarztpraxen per

3. Eigene Untersuchungen

E-Mail oder Telefax geschickt. Hierbei wurden neben Angaben zum Signalement des entsprechenden Pferdes vor allem auch Informationen zu klinischem Befund und Therapie vor Probenentnahme abgefragt.

Statistische Auswertung

Es erfolgte eine deskriptive Auswertung des aeroben Keimspektrums mit Fokus auf die gramnegativen Keime. Zum Vergleich des Keimwachstums ohne und nach antibiotischer Vorbehandlung und der Altersgruppen sowie für die Gegenüberstellung des Ergebnisses der bakteriologischen Untersuchung ohne und bei Hornhautbeteiligung wurde der Chi-Quadrat Test angewandt. Dies geschah mit dem Programm Microsoft® Excel® in der Version 2102.

Ergebnisse

Patienten

Es gingen 844 Augentupfer von 785 Pferden verschiedener Rassen – 296 Warmblüter, 153 Kleinpferde und Ponys, 29 Vollblüter und 5 Kaltblüter, 18 Pferde mit Elterntieren verschiedener Rassen und 284 Pferde unbekannter Rasse in die Auswertung ein. Das Geschlechterverhältnis war relativ ausgeglichen mit 309 weiblichen und 303 männlichen Tieren. Von 173 Pferden war das Geschlecht unbekannt. Die Altersspanne der Pferde reichte von 10 Tagen bis zu 45 Jahren. Zu 240 Pferden lagen neben den Angaben des einsendenden Tierarztes auf dem Untersuchungsantrag zusätzliche Informationen aus beantworteten Fragebögen vor.

Gramnegatives Keimspektrum

94% aller gramnegativen Bakterien (n = 637 von 678), die aus den Tupfern erkrankter Pferdeaugen (n = 844) isoliert werden konnten, entstammten drei Familien. Dabei dominierte die Familie der Enterobacteriaceae, der über die Hälfte aller gramnegativen Bakterien angehörten (n = 359). Die zweitgrößte Familie wurde von den Moraxellaceae gebildet

Zusammensetzung des gramnegativen Keimspektrums

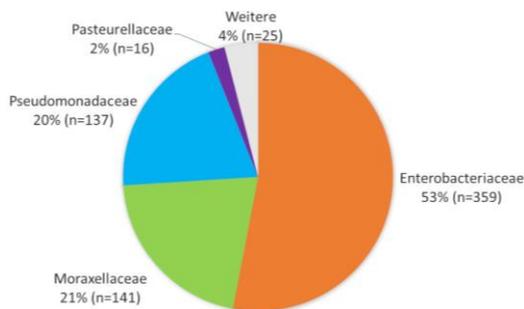


Abb. 1 Zugehörigkeit der aus Tupferproben erkrankter Pferdeaugen (n = 844) isolierten gramnegativen Keime (n = 678) zu ihren Familien. | Affiliation of the Gram-negative bacteria isolated from swab samples of diseased equine eyes (n = 678) to their families.

(n = 141), gefolgt von den Pseudomonadaceae (n = 137). Der viertgrößten Familie der Pasteurellaceae gehörten mit 2% deutlich weniger Isolate an (n = 16). Weiterhin kamen Vertreter folgender Familien vor: Alcaligenaceae, Xanthomonadaceae, Morganellaceae, Myroidaceae, Oxalobacteraceae, Flavobacteriaceae, Neisseriaceae, Aeromonadaceae und Sphingobacteriaceae. Ihr Anteil machte aber insgesamt lediglich 4% (n = 25) aus (Abb. 1).

Aus der Familie der Enterobacteriaceae waren folgende Gattungen häufig vertreten: Pantoea (n = 267), Escherichia (n = 42), Serratia (n = 15) und Enterobacter (n = 13). Die Gattung Pseudomonas war mit 137 Isolaten die zweitgrößte Gattung. Die Gattungen Acinetobacter (n = 101), Moraxella (n = 39) und Psychrobacter (n = 1) repräsentierten die Familie der Moraxellaceae. Actinobacillus stellte mit 12 isolierten Keimen die größte Gattung aus der Familie der Pasteurellaceae. Aus allen weiteren vorkommenden Gattungen konnten jeweils weniger als 10 Keime isoliert werden (Tab. 1).

Mögliche Einflussfaktoren auf das Keimwachstum

Antibiotische Vorbehandlung

Zu 262 Abstrichen lagen Informationen bezüglich einer antibiotischen Vorbehandlung vor. Davon wurde bei 2 Abstrichen systemisch vorbehandelt, daher sind sie nicht in die folgende

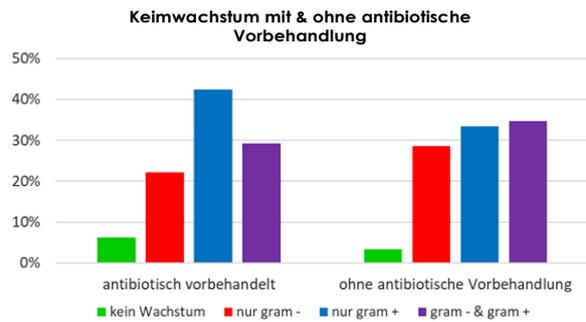


Abb. 2 Vergleich des Keimwachstums von Tupfern erkrankter Pferdeaugen, die nach erfolgter Antibiotikatherapie (n = 113) und zwischen Tupfern, die ohne vorausgegangene Antibiotikaapplikation (n = 147) entnommen worden sind. Nach antibiotischer Vorbehandlung zeigte sich bei 6,2% (n = 7) kein, bei 22,1% (n = 25) ausschließlich gramnegatives, bei 42,5% (n = 48) ausschließlich grampositives und bei 29,2% (n = 33) grampositives und -negatives Wachstum. Bei den Proben ohne Vorbehandlung wuchsen bei 3,4% (n = 5) keine Bakterien an. Bei 28,6% (n = 42) zeigte sich nur gramnegatives, bei 33,3% (n = 49) nur grampositives Wachstum. Eine Mischkultur aus grampositiven und gramnegativen Keimen konnte aus 34,7% (n = 51) der Tupfer isoliert werden. | Comparison of the bacterial growth of swabs from diseased equine eyes taken after antibiotic therapy (n = 113) and between swabs taken without previous antibiotic application (n = 147). After antibiotic pretreatment, 6,2% (n = 7) showed no growth, 22,1% (n = 25) showed exclusively Gram-negative growth, 42,5% (n = 48) showed exclusively Gram-positive growth, and 29,2% (n = 33) showed both Gram-positive and Gram-negative growth. In the samples without pretreatment, no bacteria grew in 3,4% (n = 5). Only Gram-negative growth was found in 28,6% (n = 42) and only Gram-positive growth in 33,3% (n = 49). A mixed culture of Gram-positive and Gram-negative bacteria could be isolated from 34,7% (n = 51) of the swabs.

3. Eigene Untersuchungen

Auswertung eingegangen. 113 Tupfer sind nach lokaler Vorbehandlung, 147 ohne vorausgegangene lokale Antibiotikatherapie, entnommen worden. Zwischen beiden Gruppen gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Anteils grampositiver, bzw. -negativer Keime (Chi-Quadrat (3, n = 260) = 4,14; p-Wert = 0,24686; $\alpha = 0,05$) (Abb. 2).

Hornhautbeteiligung

Zu 288 Abstrichen wurden von den einsendenden Tierarztpraxen eindeutige Angaben gemacht, ob die Cornea in den Krankheitsprozess involviert war. Bei 146 beprobten Augen war die Hornhaut beteiligt, bei 142 Tupfern nicht. Bei Tieren, bei denen vorberichtlich eine Hornhautbeteiligung vorlag, konnte signifikant häufig kein Keimwachstum nachgewiesen werden (p-Wert = 0,00119) und ein gleichzeitiger Nachweis von grampositiven und gramnegativen Keimen lag signifikant seltener vor (p-Wert = 0,00590) (Chi-Quadrat (3, n = 288) $\alpha = 0,05$) (Abb. 3).

Alter

Bei 504 der untersuchten Pferde war das Alter zum Zeitpunkt der Probenahme bekannt. 61 Pferde waren ≤ 4 Jahre alt und 120 Pferde ≥ 21 Jahre. Die größte Gruppe wurde von der Altersgruppe 5–20 Jahre (n = 323) gebildet. Die meisten Mischkulturen gab es in der Altersgruppe ≤ 4 Jahre mit 47,5% (n = 29),

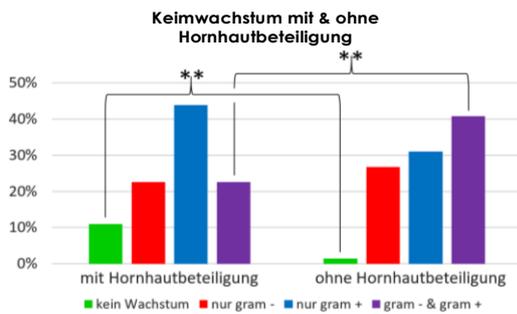


Abb. 3 Vergleich des bakteriellen Wachstums von Abstrichen erkrankter Pferdeaugen mit (n = 146) und ohne Hornhautbeteiligung (n = 142). Das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung war bei 11,0% (n = 16) der Tupfer von Augen mit Hornhautbeteiligung negativ. Ausschließlich gramnegative Keime konnten hier bei 22,6% (n = 33), ausschließlich grampositive bei 43,8% (n = 64) angezüchtet werden. Mischkulturen kamen bei 22,6% (n = 33) vor. Nur bei zwei Abstrichen (1,4%) von erkrankten Augen ohne Hornhautbeteiligung blieb ein bakterielles Wachstum aus. Weiterhin ließen sich bei 26,8% (n = 44) nur gramnegative und bei 31,0% (n = 44) nur grampositive Keime nachweisen. Bei 40,8% (n = 38) wuchsen Keime beider Gruppen. | Comparison of bacterial growth of swabs from diseased equine eyes with (n = 146) and without corneal involvement (n = 142). The result of the bacteriological examination was negative in 11,0% (n = 16) of the swabs from eyes with corneal involvement. Exclusively Gram-negative bacteria could be cultured in 22,6% (n = 33), exclusively Gram-positive in 43,8% (n = 64). Mixed cultures occurred in 22,6% (n = 33). Bacterial growth was absent in only two swabs (1,4%) from diseased eyes without corneal involvement. Furthermore, in 26,8% (n = 44) only Gram-negative and in 31,0% (n = 44) only Gram-positive bacteria could be detected. Bacteria from both groups grew in 40,8% (n = 38).

gefolgt von der Altersgruppe 5–20 Jahre mit 36,2% (n = 117). Bei den Tieren ab 21 Jahren ließen sich bei 32,5% (n = 39) Mischkulturen aus grampositiven und -negativen Keimen nachweisen. Bei den jungen Pferden war der Anteil der negativen

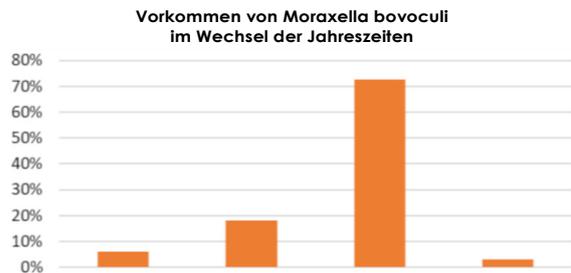


Abb. 4 73% (n = 24) aller aus erkrankten Pferdeaugen angezüchteten *Moraxella bovoculi* stammten aus Tupfern, die im Herbst entnommen worden sind. 18% (n = 6) waren es im Sommer – im Frühling nur 6% (n = 2) und im Winter nur noch 3% (n = 1). | 73% (n = 24) of all *Moraxella bovoculi* isolates cultured from diseased equine eyes came from swabs taken in the autumn. 18% (n = 6) of the swabs were taken in summer, in spring only 6% (n = 2) and in winter only 3% (n = 1).



Abb. 5 Gefüllte Säulen: In-vitro Wirksamkeit einiger Antibiotika bei antibiotisch vorbehandelten Isolaten der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae und Moraxellaceae (n = 73) in absoluten Zahlen. Anteil sensibler Isolate: Oxacillin 8,2% (n = 6); Gentamicin 97,3% (n = 71); Neomycin 95,9% (n = 70); Kanamycin 95,9% (n = 70); Enrofloxacin 94,5% (n = 69); Tetracyclin 87,7% (n = 64); Florfenicol 60,3% (n = 44); Polymyxin B 75,3% (n = 55). Gemusterte Säulen: In-vitro Wirksamkeit einiger Antibiotika bei nicht-vorbehandelten Isolaten der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae und Moraxellaceae (n = 104) in absoluten Zahlen. Anteil sensibler Isolate: Oxacillin 10,6% (n = 11); Gentamicin 97,1% (n = 101); Neomycin 97,1% (n = 101); Kanamycin 96,2% (n = 100); Enrofloxacin 100% (n = 104); Tetracyclin 86,5% (n = 90); Florfenicol 63,5% (n = 66); Polymyxin B 64,4% (n = 67). | Filled columns: In vitro efficacy of some antibiotics in antibiotic-pretreated isolates of the families Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Moraxellaceae (n = 73). Percentage of sensitive isolates: oxacillin 8,2% (n = 6); gentamicin 97,3% (n = 71); neomycin 95,9% (n = 70); kanamycin 95,9% (n = 70); enrofloxacin 94,5% (n = 69); tetracycline 87,7% (n = 64); florfenicol 60,3% (n = 44); polymyxin B 75,3% (n = 55). Patterned columns: In vitro efficacy of some antibiotics in non-pretreated isolates of the families Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Moraxellaceae (n = 104). Percentage of sensitive isolates: oxacillin 10,6% (n = 11); gentamicin 97,1% (n = 101); neomycin 97,1% (n = 101); kanamycin 96,2% (n = 100); enrofloxacin 100% (n = 104); tetracycline 86,5% (n = 90); florfenicol 63,5% (n = 66); polymyxin B 64,4% (n = 67).

3. Eigene Untersuchungen

Kulturen mit 3,3% (n = 2) am geringsten. Bei den älteren Pferden lag der Anteil mit 5,5% (n = 7) schon etwas höher. Bei den Tieren mittleren Alters kam es bei 8,4% (n = 27) zu ausbleibendem Wachstum. Geringe Unterschiede gab es im Vergleich der grampositiven Reinkulturen mit 27,9% (n = 17) bei den jungen, 32,8% (n = 106) bei den mittelalten und 33,3% (n = 40) bei den alten Pferden. Der Anteil der gramnegativen Reinkulturen nahm mit aufsteigendem Alter leicht zu: Von 21,3% (n = 13), über 22,6% (n = 73) bis 28,3% (n = 34). Es zeigte sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat (6, n = 504) = 6,61; p-Wert = 0,6779; α = 0,05).

Vorkommen von *Moraxella bovoculi* im jahreszeitlichen Verlauf

Die Monate wurden wie folgt den entsprechenden Jahreszeiten zugeordnet: März, April, Mai: Frühling; Juni, Juli, August: Sommer; September, Oktober, November: Herbst; Dezember, Januar, Februar: Winter. *Moraxella bovoculi* konnte in der vorliegenden Arbeit vorwiegend aus den Tupfern angezüchtet werden, die im Herbst eingesandt worden waren (Abb. 4)

Resistenzlage der gramnegativen Keime ohne und mit lokaler antibiotischer Vorbehandlung

Bei 104 Keimen der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae und Moraxellaceae waren die entsprechenden Pferdeaugen, aus denen sie isoliert werden konnten, vor Abstrichentnahme nicht antibiotisch vorbehandelt (Abb. 5, gemusterte Säulen). Bei 73 Keimen der vorgenannten Familien war eine lokale antibiotische Vorbehandlung der entsprechenden Pferdeaugen von den behandelnden Tierärzten angegeben worden (Abb. 5, gefüllte Säulen).

Von 66 Keimen war der verwendete Wirkstoff bekannt (Tab. 2).

Diskussion

Pantoea

Die Gattung *Pantoea* kam mit Abstand am häufigsten vor (Tab. 1). Ihr auffallend häufiger Nachweis unterscheidet die vorliegende Arbeit von vorausgegangenen Veröffentlichungen. *Pantoea* spp. blieben in einer Reihe von Studien zur okularen Mikroflora des Pferdes ungenannt oder konnten zwar isoliert werden, aber deutlich seltener (Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011, Keller und Hendrix 2005, Sauer et al. 2003). Einer der möglichen Gründe für eine ausbleibende Erwähnung ist die Taxonomie: Erst seit 1989 gibt es die eigenständige Gattung *Pantoea*. Davor gehörte *Pantoea* agglomerans anderen Gattungen an, zuletzt als *Enterobacter agglomerans* der Gattung *Enterobacter* (Schoch et al. 2020). Demzufolge wurde dieser Keim vor 1989 anderen Gattungen zugeordnet, teilweise auch noch in Studien danach.

Im Vergleich der Kulturbedingungen unterschied sich lediglich das verwendete Selektivmedium für gramnegative Keime. In der vorliegenden Studie kam Endo-Agar zum Einsatz, in den anderen Studien MacConkey-Agar. Beide Medien enthalten Hemmstoffe für grampositive Keime – Natriumsulfid und Fuch-

sin bei Endo-Agar, Gallelsalze und Kristallviolett bei MacConkey-Agar – sowie Farbindikatoren für einen Lactoseabbau: Fuchsin, bzw. Neutralrot. Größere Unterschiede zeigten sich zwischen den Identifizierungsverfahren. In den meisten Studien, mit Ausnahme einer Studie aus Finnland (Mustikka et al. 2020), wurden mikrobiologische und biochemische Standardmethoden angewandt. In der vorliegenden Arbeit stand zusätzlich auch der MALDI-TOF zur Verfügung. Allerdings sind *Pantoea* spp. bereits morphologisch sehr gut zu erkennen, so dass Unterschiede in der Nachweishäufigkeit kaum mit der Identifizierungsmethode zufriedenstellend erklärbar sein dürften.

Weiterhin unterschied sich das Patientengut. Während diese Studie Augenabstriche von Pferden aus verschiedenen Regionen Deutschlands ausgewertet hat, die zu unterschiedlichen Jahreszeiten entnommen worden waren, stammten die vorausgegangenen Studien aus Ländern mit anderen klimatischen Bedingungen.

Pantoea spp. sind ubiquitär in der Natur verbreitet. Sie kommen sowohl auf der Pflanzenoberfläche als auch als Endophyten in Pflanzen vor. Außerdem sind sie in Wasser, Boden und Staub zu finden, sowie im Körper einiger Arthropoden und verschiedener Wirbeltiere (Walterson und Stavrinides, 2015). In der Humanmedizin gilt *Pantoea agglomerans* nicht als obligat pathogen, sondern vielmehr als Erreger opportunistischer Infektionen – meist nach Verletzungen durch Pflanzenmaterial oder assoziiert mit einem Krankenhausaufenthalt (Dutkiewicz et al. 2016). Darüber hinaus sind beim Menschen auch Fälle von Endophthalmitiden beschrieben (Sudhakar et al. 2014, Venincasa et al. 2015). Beim Pferd wird *Pantoea agglomerans* mit Plazentitis und Abort in Verbindung gebracht (Henker et al. 2020, Hong et al. 1993).

Aufgrund von Ernährungsweise und Haltung ist es nicht verwunderlich, dass *Pantoea agglomerans* häufig auf der Augenoberfläche von Pferden gefunden wird. So kommen Pferde unabhängig von der Haltungsförm ständig mit diesem Keim in Kontakt – sei es beim Grasens auf der Weide oder bei Aufstallung vor allem über die Heuaufnahme, bzw. den Heustaub. Auch könnten Insekten eine Rolle spielen. Da beim Menschen infektiöse Augenerkrankungen durch *Pantoea agglomerans* beschrieben worden sind, ist es nicht auszuschließen, dass dieser Keim auch beim Pferd nach Vorschädigung okulärer Strukturen klinisch relevant werden könnte.

Pseudomonas

Pseudomonaden sind weltweit ubiquitär in der Natur verbreitet. So findet man sie in Boden, Wasser und organischem Material. Bei Tier und Mensch gelten sie als opportunistische Krankheitserreger (Songer und Post 2005). Beim Pferd werden *Pseudomonas* spp. einerseits mit infektiösen Augenerkrankungen assoziiert (McLaughlin et al. 1983, Moore et al. 1983, Sweeney und Irby 1996), andererseits aber auch regelmäßig aus gesunden Pferdeaugen isoliert (Andrew et al. 2003, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Johns et al., 2011). *Pseudomonas aeruginosa* gilt hingegen als einer der virulentesten Infektionserreger des Pferdeauges (Keller und Hendrix 2005, Sauer et al. 2003) und konnte häufig bei equiner ulzerativer Keratitis nachgewiesen werden (Keller und Hendrix 2005, Moore

3. Eigene Untersuchungen

Tab.1 Vorkommende Spezies der gramnegativen Bakterien, die aus Tupfern erkrankter Pferdeaugen isoliert worden sind, geordnet nach ihren Gattungen und Familien. | *Occuring species of Gram-negative bacteria isolated from swabs of diseased equine eyes, classified by their genera and families.*

Familie	Gattung	Spezies	Anzahl Isolate	
Enterobacteriaceae (n=359)	Pantoea	Pantoea agglomerans	256	
		Pantoea sp.	6	
		Pantoea ananatis	5	
	Escherichia	Escherichia coli	35	
		Escherichia coli mucoid	4	
		Escherichia coli hämolysierend	2	
		Escherichia vulneris	1	
	Serratia	Serratia rubidaea	5	
		Serratia marcescens	4	
		Serratia liquefaciens	2	
		Serratia plymuthica	2	
		Serratia fronticola	1	
		Serratia ureilytica	1	
	Enterobacter	Enterobacter cloacae	7	
		Enterobacter sp.	4	
		Enterobacter asburiae	1	
		Enterobacter ludwigii	1	
	Leclercia	Leclercia adecarboxylata	9	
	Kosakonia	Kosakonia cowanii	4	
	Rahnella	Rahnella aquatilis	3	
Erwinia	Erwinia persicina	1		
	Erwinia sp.	1		
Klebsiella	Klebsiella oxytoca	1		
	Klebsiella pneumoniae	1		
Citrobacter	Citrobacter freundii	1		
Raoultella	Raoultella ornithinolytica	1		
Moraxellaceae (n=141)	Acinetobacter	Acinetobacter lwoffii	36	
		Acinetobacter sp.	34	
		Acinetobacter johnsonii	10	
		Acinetobacter schindleri	5	
		Acinetobacter pittii	4	
		Acinetobacter radioresistens	4	
		Acinetobacter calcoaceticus	3	
		Acinetobacter baumannii	1	
		Acinetobacter beijerinckii	1	
		Acinetobacter dispersus	1	
		Acinetobacter guillouiae	1	
		Acinetobacter urisingii	1	
	Moraxella	Moraxella bovoculi	33	
		Moraxella sp.	3	
		Moraxella subsp. moraxella osloensis	2	
		Moraxella (Branhamella) ovis	1	
	Psychrobacter	Psychrobacter sp.	1	
	Pseudomonadaceae (n=137)	Pseudomonas	Pseudomonas koreensis	38
			Pseudomonas sp.	19
Pseudomonas putida			9	
Pseudomonas aeruginosa			7	
Pseudomonas chlororaphis			6	
Pseudomonas fluorescens			6	
Pseudomonas fulva			6	

3. Eigene Untersuchungen

Familie	Gattung	Spezies	Anzahl Isolate
Pseudomonadaceae (n=137)	Pseudomonas	<i>Pseudomonas graminis</i>	6
		<i>Pseudomonas kilonensis</i>	4
		<i>Pseudomonas libanensis</i>	3
		<i>Pseudomonas synxantha</i>	3
		<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	3
		<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	2
		<i>Pseudomonas congelans</i>	2
		<i>Pseudomonas corrugata</i>	2
		<i>Pseudomonas fragi</i>	2
		<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	2
		<i>Pseudomonas oryziphila</i>	2
		<i>Pseudomonas viridiflava</i>	2
		<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	1
		<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	1
		<i>Pseudomonas cichorii</i>	1
		<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	1
		<i>Pseudomonas gessardii</i>	1
		<i>Pseudomonas jessenii</i>	1
		<i>Pseudomonas mendocina</i>	1
		<i>Pseudomonas poae</i>	1
		<i>Pseudomonas proteolytica</i>	1
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	1		
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	1		
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	1		
<i>Pseudomonas xanthomarina</i>	1		
Pasteurellaceae (n=16)	Actinobacillus	<i>Actinobacillus</i> sp.	5
		<i>Actinobacillus equuli</i>	3
		<i>Actinobacillus ureae</i>	2
		<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	1
		<i>Actinobacillus rossii</i>	1
	Pasteurella	<i>Pasteurella multocida</i>	2
	<i>Pasteurella</i> sp.	1	
Hämophilus	<i>Hämophilus parainfluenza</i>	1	
Alcaligenaceae (n=7)	Advenella	<i>Advenella kashmirensis</i>	2
		<i>Advenella incenata</i>	1
	Bordetella	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1
		<i>Bordetella petrii</i>	1
	Achromobacter	<i>Achromobacter spanius</i>	1
Alcaligenes	<i>Alcaligenes</i> sp.	1	
Xanthomonadaceae (n=4)	Stenotrophomonas	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	3
		<i>Stenotrophomonas</i> sp.	1
Morganellaceae (n=3)	Morganella	<i>Morganella morganii</i>	1
	Proteus	<i>Proteus mirabilis</i>	1
	Providencia	<i>Providencia alcalifaciens</i>	1
Myroidaceae (n=3)	Myroides	<i>Myroides odoratimimus</i>	3
Flavobacteriaceae (n=2)	Chryseobacterium	<i>Chryseobacterium gleum</i>	1
		<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>	1
Neisseriaceae (n=2)	Neisseria	<i>Neisseria</i> sp.	2
Oxalobacteraceae (n=2)	Massilia	<i>Massilia</i> sp.	1
		<i>Massilia timonae</i>	1
Aeromonadaceae (n=1)	Aeromonas	<i>Aeromonas veronii</i>	1
Sphingobacteriaceae (n=1)	Sphingobacterium	<i>Sphingobacterium multivorum</i>	1

3. Eigene Untersuchungen

et al. 1983, Sauer et al. 2003). In einer Studie aus Polen erfolgte jedoch auch ein Nachweis aus einem gesunden Pferdeauge (Zak et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte *Pseudomonas aeruginosa* aus sieben Augentupfern isoliert werden. Leider lagen zu den erkrankten Pferden keine genauen klinischen Informationen vor. *Pseudomonas aeruginosa* verfügt über viele Pathogenitätsfaktoren, die Augeninfektionen begünstigen. Durch Fimbrien kann er sich an oberflächliche Defekte des Hornhautepithels anheften, die Epithelzellen penetrieren und durch die Zellen hindurch zum Stroma gelangen. Es werden Exotoxine, Endotoxine und Proteasen produziert, die Corneazellen und Stroma stark beschädigen. Die Aktivierung cornealer Proteasen führt weiterhin zur Kollagenolyse des Stromas. Letztlich kann dies zum Totalverlust des Stromagewebes und zur Perforation der Kornea, führen (Brooks et al. 2017). Daher erfordert jeder Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa* aus erkrankten Pferdeaugen eine schnelle und effiziente Therapie.

Acinetobacter

Acinetobacter spp. sind in der Natur weit verbreitet. Sie besitzen eine hohe Tenazität. So kommen sie im Boden, Oberflächengewässern, in Trink- und Abwasser vor. Bei Mensch und Tier gehören sie zur physiologischen Haut- und Schleimhautflora (Robert Koch-Institut 2020). Ein Vorkommen von *Acinetobacter* auf der Pferdehaut wird auf eine Umgebungs-kontamination zurückgeführt (Zubrod et al. 2004). In der Humanmedizin spielen *Acinetobacter* spp. als Erreger nosokomialer Infektionen eine Rolle und besitzen hierbei eine ausgeprägte Fähigkeit zur Resistenzbildung (Robert Koch-Institut, 2020). *Acinetobacter baumannii* scheint sich auch in der Veterinärmedizin als nosokomialer Erreger etabliert zu haben – beim Pferd im Zusammenhang mit Thrombophlebitis, Infek-

tionen des tiefen Respirationstrakts und Fohlensepsis (van der Kolk et al. 2019). In der vorausgegangenen Arbeit zu dieser Studie bestand lediglich eine ausgeprägte Resistenz innerhalb der Familie der Moraxellaceae gegenüber Oxacillin (Schieder et al. 2021), was auf das grampositive Wirkspektrum des Antibiotikums zurückzuführen ist.

In dieser Studie war die Gattung *Acinetobacter* die dritthäufigste Gattung innerhalb der gramnegativen Keime. In einer Studie aus dem Vereinigten Königreich, die die Mikroflora augengesunder Pferde untersucht hat, war *Acinetobacter* sp. sogar die am häufigsten isolierte Bakterienspezies. (Johns et al. 2011). Auch in anderen Veröffentlichungen zur normalen okularen Mikroflora wurden *Acinetobacter* spp. isoliert (Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018). Ebenso ließen sich auch Vertreter der Gattung *Acinetobacter* aus erkrankten Pferdeaugen isolieren (Keller und Hendrix 2005, Moore et al. 1995, Moore et al. 1983).

Escherichia

Escherichia coli (*E. coli*) konnte sowohl aus gesunden (Andrew et al. 2003, Araghi-Sooreh et al. 2014, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011) als auch aus erkrankten Pferdeaugen (Keller und Hendrix 2005, Moore et al. 1995, Sauer et al. 2003) isoliert werden. *E. coli* gehört beim Menschen und warmblütigen Tieren zur normalen Darmflora. Durch Fäkalien gelangt *E. coli* in die Umwelt (Heesemann 2001). Zwar konnte *E. coli* aus erkrankten Augen isoliert werden – es sind der Autorin aber keine Veröffentlichungen bekannt, bei der eine Augeninfektion beim Pferd eindeutig auf *E. coli* zurückgeführt werden konnte. Da es für *E. coli* kein natürliches Habitat gibt, könnte man die These aufstellen, dass *E. coli* in Haltungsformen, in denen die Pferde mehr Kontakt zu ihrem Kot haben (z.B. Boxenhaltung) häufiger in Augenabstrichen zu finden sei als beispielsweise bei Pferden aus großzügiger Weidehaltung. Diese These bleibt zu prüfen.

Moraxella

Auch Vertreter der Gattung *Moraxella* konnten aus gesunden Pferdeaugen (Andrew et al. 2003, Cattabiani et al. 1976, Gemensky-Metzler et al. 2005, Hampson et al. 2018, Johns et al. 2011, Zak et al. 2018) und aus erkrankten Augen (Hughes und Pugh Jr. 1970, Huntington et al. 1987, Liu et al. 2014, Mustikka et al. 2020, Sauer et al. 2003, Seeger et al. 2021) kulturell nachgewiesen werden. Hierbei fällt auf, dass *Moraxella* spp. in gesunden Pferdeaugen häufiger vorkommen – in erkrankten Augen nur vereinzelt. So gehörten in der vorliegenden Arbeit nur 5,75% der gramnegativen Isolate der Gattung *Moraxella* an. In einer Studie aus Ohio (Gemensky-Metzler et al. 2005) und einer Studie aus Polen (Zak et al. 2018), die beide die Mikroflora gesunder Pferdeaugen untersucht haben, stellte *Moraxella* hingegen sogar die häufigste Gattung der nachgewiesenen gramnegativen Bakterien.

Moraxellen kommen auf der Haut, mukösen Membranen und der Konjunktiva von Säugetieren vor – in den meisten Fällen als harmlose Kommensalen (Songer und Post 2005). Da *Moraxella* spp. auch nur selten aus Augen mit ulzerativer Keratitis

Tab. 2 Absoluter und prozentualer Anteil sensibler Keimisolate aus antibiotisch vorbehandelten Pferdeaugen gegenüber den angewandten Antibiotika. | *Absolute and percentage share of sensitive bacterial isolates from antibiotic-pretreated equine eyes versus the antibiotics applied.*

Zur Vorbehandlung verwendeter antibiotischer Wirkstoff	Anzahl der mit dem Wirkstoff vorbehandelten Keime	Anzahl sensibler Isolate gegenüber dem Wirkstoff
Chloramphenicol (Florfenicol)**	7	4
Cloxacillin (Oxacillin)**	5	1
Gentamicin	19	19
Gentamicin + Tetracyclin	2	1/1
Neomycin	9	9
Neomycin + Polymyxin B + teilweise mit Gramicidin in Kombination	14	14/7/*
Ofloxacin (Enrofloxacin)**	2	2
Tetracyclin	8	8

* Das Resistenzverhalten gegenüber Gramicidin wurde nicht getestet

** Die gekennzeichneten Antibiotika sind stellvertretend für die vorgenannten Wirkstoffe getestet worden.

Resistenzentwicklungen gegenüber den eingesetzten Antibiotika waren nicht zu beobachten.

3. Eigene Untersuchungen

isoliert werden konnten, wurde vermutet, dass Moraxellen Bestandteil der nichtpathogenen equinen Flora seien (Gemensky-Metzler et al. 2005).

Erreger der infektiösen Bovinen Keratokonjunktivitis (IBK), auch bekannt als Pinkeye ist *Moraxella bovis*. Da *M. bovoculi* über ähnliche Pathogenitätsfaktoren verfügt und in Verbindung mit IBK in Abwesenheit von *M. bovis* bei Rindern isoliert werden konnte (Loy und Brodersen 2014), könnte auch *M. bovoculi* bei der Pathogenese der IBK beteiligt sein. Neuere Veröffentlichungen gehen davon aus, dass neben *M. bovis* auch andere Pathogene, darunter *M. bovoculi*, IBK hervorrufen können (Zheng et al. 2019).

Zwei ältere Veröffentlichungen beschrieben die Isolation von *Moraxella* spp., die serologisch und biochemisch *M. bovis* ähnelten, aus an Konjunktivitis erkrankten Pferdeaugen (Hughes und Pugh Jr. 1970, Huntington et al. 1987). Eine Studie aus Brasilien stellte zwei Fälle equiner Keratokonjunktivitis vor, bei denen *M. bovoculi*, bzw. eine nicht näher identifizierbare Moraxelle als Erreger identifiziert werden konnten. Beide Pferde kamen aus schlechten Haltungsbedingungen (Seeger et al. 2021). In einer weiteren Studie wurde *Moraxella bovoculi* als Erreger infektiöser Keratokonjunktivitis bei neun Rennpferden eines Zuchtbetriebs in China gefunden (Liu et al. 2014). In der vorliegenden Arbeit wurden aus insgesamt 844 Augentupfern 39 Moraxellen isoliert, 33 Isolate davon konnten als *Moraxella bovoculi* identifiziert werden. Zu neun der betroffenen Pferde lagen genauere klinische Informationen vor: zwei Pferde waren an Keratokonjunktivitis erkrankt, sieben an Konjunktivitis ohne Hornhautbeteiligung, von denen ein Krankheitsverlauf als rezidivierend und einer als chronisch beschrieben worden ist. In einem Fall waren im gleichen Bestand des beprobten Pferdes gleichzeitig mehrere Tiere von eitrigem Ausfluss betroffen. Auffällig war, dass *Moraxella bovoculi* überwiegend aus Tupfern isoliert werden konnte, die im Herbst entnommen worden waren (Abb. 4). Dies deckt sich trotz unterschiedlicher klimatischer Bedingungen mit einer Studie aus Florida, die im Oktober, verglichen mit den Probenahmen zu anderen Jahreszeiten, die höchste Prävalenz von *Moraxella* spp. feststellte (Andrew et al. 2003).

Auswirkungen antibiotischer Vorbehandlung auf das Keimwachstum

Es wird vermutet, dass topische Anwendungen antibiotischer Präparate am Auge zu einem Shift der überwiegend grampositiven Mikroflora hin zu gramnegativen Bakterien und Pilzen führen, vor allem bei chronischem Gebrauch (Gemensky-Metzler et al. 2005). So konnten gramnegative Isolate in behandelten ulzerierten Augen mit größerer Häufigkeit nachgewiesen werden als in unbehandelten (Moore et al. 1995). In einer Studie, in der Neomycin, Polymyxin und Bacitracin gesunden Pferden lokal appliziert worden sind, zeigte sich eine Woche nach der Anwendung eine vorübergehende Reduktion der grampositiven Keime (Gemensky-Metzler et al. 2005). Keine signifikanten Unterschiede zwischen dem kulturell nachweisbaren Keimspektrum antibiotisch vorbehandelter und nicht vorbehandelter Pferdeaugen gab es hingegen in der vorliegenden Studie, wenn man die Keimnachweise in die Gruppen der Grampositiven und der Gramnegativen zusammenfasst. So lag der Anteil der gramnegativen Reinkulturen bei den unbehandelten Augen so-

gar etwas höher (Abb. 2). Hierzu ist allerdings kritisch anzumerken, dass in diese Auswertung nur die Untersuchungsergebnisse von Pferden eingegangen sind, zu denen Informationen bezüglich einer vorausgegangenen topischen Antibiotikatherapie vor der Abstrichentnahme vorlagen. Die Therapiedauer und der Abstand zur Probenahme waren aber oftmals nicht bekannt. Weiterhin wurde der Effekt antibiotischer Therapie auf die okulare Mikroflora in einer Studie untersucht, in der Next Generation Sequencing angewendet worden ist. Hier zeigte sich, dass die okulare Mikroflora auch unter Therapie weitgehend stabil blieb (Scott et al. 2019), was im Einklang mit der vorliegenden Studie ist.

Vorkommen gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen mit Hornhautbeteiligung

In einigen Studien, die das bakterielle Wachstum bei infektiöser Keratitis ausgewertet haben, wurden gramnegative Keime vermehrt isoliert (Moore et al. 1995, Moore et al. 1983). Vor allem *Pseudomonas* spp. und einige coliforme Keime werden mit Hornhautulzera in Verbindung gebracht (Gemensky-Metzler et al. 2005, McLaughlin et al. 1983, Moore et al. 1983). Auch in der vorliegenden Studie gab es signifikante Unterschiede im bakteriellen Wachstum zwischen Tupferproben, die von erkrankten Augen mit und ohne Hornhautbeteiligung entnommen worden waren. Allerdings waren hier nur die Unterschiede zwischen den negativen Kulturen und der Mischkultur signifikant: War die Hornhaut in den Erkrankungsprozess involviert, ließen sich weniger Mischkulturen nachweisen. Außerdem blieb bakterielles Wachstum häufiger aus (Abb. 3). Dass vermehrt gramnegative Bakterien bei Keratitiden nachgewiesen werden, ließ sich nicht bestätigen. Der Anteil gramnegativer Reinkulturen war sogar etwas niedriger als bei der Gruppe ohne Hornhautbeteiligung (Abb. 3).

Einfluss des Pferdealters auf das Keimwachstum

Der Einflussfaktor Alter wurde bereits in Studien zur okularen Mikroflora des Pferdeauges untersucht. Hierbei kam es zu widersprüchlichen Ergebnissen. In einer Studie konnten bei jüngeren Pferden vermehrt gramnegative Bakterien und Pilze nachgewiesen werden (Andrew et al. 2003). In einer anderen Arbeit waren die Pferde, aus deren Augenabstrichen gramnegative Keime angezüchtet werden konnten, signifikant älter (Johns et al. 2011). In der vorliegenden Arbeit war bei den jungen Pferden lediglich der Anteil der Mischkulturen im Vergleich mit den anderen Altersgruppen etwas größer, die Unterschiede waren aber nicht signifikant. Dies deckt sich mit Studien aus Polen (Zak et al. 2018) und Australien (Hampson et al. 2018). Zu beachten ist allerdings, dass die hier zitierten Studien Untersuchungen augengesunder Pferde umfassten, während die aktuelle Studie Pferde mit infektiösen Augenerkrankungen ausgewertet hat.

Resistenzlage nicht vorbehandelter versus Resistenzlage antibiotisch lokal vorbehandelter Keime

Die Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren gering. Bei den meisten untersuchten Wirkstoffen kam es nach lo-

3. Eigene Untersuchungen

kaler antibiotischer Vorbehandlung zu einem leichten Abfall des Anteils sensibler Isolate – so bei Oxacillin, Neomycin, Kanamycin, Enrofloxacin und Florfenicol. Hingegen kam es bei Gentamicin, Tetracyclin und Polymyxin sogar zu einem Anstieg der als sensibel getesteten Isolate (Abb. 5).

Nach Wissen der Autorin gibt es bislang noch keine Studie, die die Resistenzlage okularer Bakterien beim Pferd vor und nach topischer Antibiotikatherapie vergleicht. In der Humanmedizin wird empfohlen, bei akuten, milden bis moderaten Konjunktividen auf topische Antibiotika bei gutem Heilungsverlauf zu verzichten, da das Risiko der Selektion resistenter Bakterienstämme bestände (Aramã 2020). Andererseits aber wird die Wahrscheinlichkeit, durch lokale Antibiotikaanwendung resistente Bakterien zu selektieren als gering eingeschätzt. So erreichte man bei korrekter Anwendung topischer Augenpräparate hohe lokale Wirkstoffspiegel (Aramã 2020). Unterdosierungen, Langzeittherapien und wiederholte lokale Behandlungen könnten jedoch ein Auftreten resistenter Bakterienstämme verursachen (Aramã 2020, Miller 2017, Sandmeyer et al. 2017). Zunächst schwierig nachzuvollziehen war die Beobachtung der vorliegenden Studie, dass bei einigen Antibiotika nach Vorbehandlung weniger Resistenzen auftraten. Zur genaueren Analyse wurde in einem weiteren Schritt geschaut, wie sich die Keime gegenüber den einzelnen Wirkstoffen verhalten, mit denen sie auch vorbehandelt worden waren (Tab. 2). Hierbei zeigte sich, dass nach Therapie mit einem Polymyxin B enthaltendem Kombinationspräparat nur noch die Hälfte der Isolate sensibel gegenüber Polymyxin B war. Somit muss das Ergebnis aus Abb. 5 auch unter Berücksichtigung der zu Grunde liegenden kleinen Untersuchungszahlen relativiert werden. Nur 14 Pferdeaugen waren mit Polymyxin B vorbehandelt, 52 mit Antibiotika anderer Wirkstoffklassen. Daher war es nicht zu erwarten, dass es in der Gesamtbetrachtung aller Keime zu einem Anstieg der Resistenzen gegenüber Polymyxin B kommen würde. Bei Gentamicin und Tetracyclin war die Abnahme der Resistenzen nach antibiotischer Vorbehandlung nur marginal.

Zu beachten ist, dass die vorliegende Studie lediglich einen Anhaltspunkt liefern kann, ob lokale Antibiotikatherapien des Auges Resistenzen induzieren. So war beispielsweise die Resistenzlage vor Behandlung nicht bekannt. Wollte man diese Fragestellung genauer untersuchen, müsste man dieselben Pferdeaugen vor und nach topischer Antibiotikatherapie beproben (innerhalb eines definierten und einheitlichen Zeitrahmens) und müsste neben dem Keimspektrum die Antibiogramme vergleichen.

Auch wenn sich die klinische Relevanz der häufig nachgewiesenen Bakteriengattungen *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia* und *Moraxella* nicht pauschal festlegen lässt und für jeden Patienten individuell beurteilt werden muss, spricht der häufige Nachweis gramnegativer Keime aus Abstrichen erkrankter Pferdeaugen (Schieder et al. 2021) für eine wichtige Rolle.

In der Praxis kann dies die Wahl des Antibiotikums beeinflussen. Momentan sind in Deutschland nur drei Präparate für die lokale Anwendung am Pferdeauge zugelassen, die entweder Tetracyclin oder Cloxacillin enthalten (Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig 2022). Da Cloxacillin ein

grampositives Wirkspektrum besitzt, scheint Tetracyclin im Hinblick auf die gramnegativen Keime für die Erstbehandlung ohne bakteriologisches Untersuchungsergebnis geeigneter zu sein.

Aufgrund der wenigen zugelassenen antibiotischen Augenpräparate ergeben sich beim Pferd häufig Umwidmungen, die, gemäß Verordnung über Tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV), eine Antibiogrammpflicht nach sich ziehen (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2018). So wird in der Praxis beispielsweise häufig auf Aminoglykoside zurückgegriffen, die sich gegenüber gramnegativen Keimen auch hochwirksam zeigten. Das Resistenzspektrum der Familien Enterobacteriaceae, Moraxellaceae und Pseudomonadaceae sind der vorangegangenen Studie zu entnehmen (Schieder et al. 2021).

Bei Schlachtequiden sind weitere rechtliche Vorgaben, wie etwa die Dauer der Wartezeit, zu beachten. Chloramphenicol gehört gemäß VO (EU) Nr. 37/2010, Tabelle 2 zu den verbotenen Stoffen und darf somit bei Pferden, die zur Schlachtung bestimmt sind, nicht angewendet werden.

Ob die lokale Antibiotikatherapie des Auges zu einem Anstieg von Resistenzen führt, konnte mit der vorliegenden Arbeit weder bestätigt noch widerlegt werden. Hier bedarf es weiterer Studien.

Interessenkonflikt

Die Autoren Heusinger und Schieder sind Mitarbeiter, die Autorin Müller Geschäftsführerin von LABOKLIN.

Literatur

- Andrew S. E., Nguyen A., Jones G. L., Brooks D. E. (2003) Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Vet. Ophthalmol.* 6, 45–50.
- Araghi-Sooreh A., Navidi M., Razi M. (2014) Conjunctival bacterial and fungal isolates in clinically healthy working horses in Iran. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi* 20, 625–627; DOI 10.9775/kvfd.2013.10649
- Aramã V. (2020) Topical antibiotic therapy in eye infections – myths and certainties in the era of bacterial resistance to antibiotics. *Rom. J. Ophthalmol.* 64, 245–260
- Brooks D. E., Matthews A., Clode A. B. (2017) Diseases of the cornea. In B. C. Gilger (Hrsg.), *Equine Ophthalmology* (3. Aufl., S. 252–368). Oxford: Wiley Blackwell.
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2018). Verordnung über Tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV) §12c Antibiogrammpflicht Abs. 1. Verfügbar unter https://www.gesetze-im-internet.de/t_hav/BJNR021150975.html
- Cattabiani F., Cabassi E., Allodi C., Gianelli F. (1976) Bacterial flora of the conjunctival sac of the horse. *Ann Sclavo* 18, 91–119
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2015) Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals (3. Aufl. Bd. Supplement Vet01S). Wayne, PA: CLSI
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2018) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100 (28. Aufl.). Wayne, PA: CLSI
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Kinga Lemieszek M., Golec M., Milanowski J. (2016) *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Ann. Agricult. Environm. Med.* 23, 197–205; DOI 10.5604/12321966.1203878

3. Eigene Untersuchungen

- Gemensky-Metzler A. J., Wilkie D. A., Kowalski J. J., Schmall L. M., Willis A. M., Yamagata M. (2005) Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am. J. Vet. Res.* 66, 800–811
- Hampson E., Gibson J. S., Barot M., Shapter F. M., Greer R. M. (2018) Identification of bacteria and fungi sampled from the conjunctival surface of normal horses in South-East Queensland, Australia. *Vet. Ophthalmol.* 22, 265–275; DOI 10.1111/vop.12587
- Heesemann J. (2001) Die Familie der Enterobacteriaceae Medizinische Mikrobiologie (8 Aufl., S. 303–304). München: Urban & Fischer
- Henker L. C., Lorenzett M. P., Keller A., Siqueira F. M., Driemeier D., Pavarini S. P. (2020) Fibrinonecrotic placentitis and abortion associated with *Pantoea agglomerans* infection in a mare. *J. Equine. Vet. Sci.* 92, 103–156; DOI 10.1016/j.jevs.2020.103156
- Hong C. B., Donahue J. M., Giles R. C. Jr., Petrites-Murphy M. B., Poona-chia K. B., Roberts A. W., Smith B. J., Tramontin R. R., Tuttle P. A., Swerczek T. W. (1993) Etiology and pathology of equine placentitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 56–63; DOI 10.1177/104063879300500113
- Hughes D. E., Pugh G. W. Jr. (1970) Isolation and description of a *Moraxella* from horses with conjunctivitis. *Am. J. Vet. Res.* 31, 457–462
- Huntington P. J., Coloe P. J., Bryden J. D., Macdonald F. (1987) Isolation of a *Moraxella* sp from horses with conjunctivitis. *Aust. Vet. J.* 64, 118–119; DOI 10.1111/j.1751-0813.1987.tb09647.x
- Johns I. C., Baxter K., Booter H., Hicks C., Menzies-Gow N. (2011) Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Vet. Ophthalmol.* 14, 195–199, DOI 10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x
- Keller R. L., Hendrix D. V. (2005) Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993–2004). *Equine. Vet. J.* 37 (207–211); DOI 10.2746/0425164054530731
- Liu H., Yan J., Wang Y., Yan Q., Zhao L., Yan R., He H. (2014) Isolation of *Moraxella bovoculi* from racehorses with keratoconjunctivitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 585–587; DOI 10.1177/1040638714535601
- Loy J. D., Brodersen B. W. (2014) *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 761–768; DOI 10.1177/1040638714551403
- McLaughlin S. A., Brightman A. H., Helper L. C., Manning J. P., Tomes J. E. (1983) Pathogenic bacteria and fungi associated with extraocular disease in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 241–242
- Miller D. (2017) Update on the epidemiology and antibiotic resistance of ocular infections. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* 24, 30–42; DOI 10.4103/meajo.MEAJO_276_16
- Moore C. P., Collins B. K., Fales W. H. (1995) Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses: 63 cases (1986–1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 928–933
- Moore C. P., Fales W. H., Whittington P., Bauer L. (1983) Bacterial and fungal isolates from Equidae with ulcerative keratitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 600–603
- Moore C. P., Heller N., Majors L. J., Whitley R. D., Burgess E. C., Weber J. (1988) Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *Am. J. Vet. Res.* 49, 773–777
- Mustikka M. P., Grönthal T. S. C., Pietilä E. M. (2020) Equine infectious keratitis in Finland: Associated microbial isolates and susceptibility profiles. *Vet. Ophthalmol.* 23, 148–159; DOI 10.1111/vop.12701
- Robert Koch-Institut (2020) *Acinetobacter*spp. Abgerufen am 19.12.2021, 2021. Verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/ThemenAZ/A/Info_Acinetobacter.html
- Sandmeyer L. S., Bauer B. S., Mohaghegh Poor S. M., Feng C. X., Chirino-Trejo M. (2017) Alterations in conjunctival bacteria and antimicrobial susceptibility during topical administration of ofloxacin after cataract surgery in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 78, 207–214; DOI 10.2460/ajvr.78.2.207
- Sauer P., Andrew S. E., Lassaline M., Gelatt K. N., Denis H. M. (2003) Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991–2000): 65 horses. *Vet. Ophthalmol.* 6, 309–313; DOI 10.1111/j.1463-5224.2003.00312.x
- Schieder A.-K., Müller E., Heusinger A., Eule J. C. (2021). Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – Geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 37, 292–301; DOI 10.21836/PEM20210311
- Schoch C., Ciuffo S., Domrachev M., Hotton C. L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., McVeigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J. P., Sum L., Turner S., Karsch-Mizrachi I. (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). Abgerufen am 08.12.2021, 2021. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=549>
- Scott E. M., Arnold C., Dowell S., Suchodolski J. S. (2019) Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PLoS One* 14, e0214877; DOI 10.1371/journal.pone.0214877
- Seeger M. G., Corrêa L. F. D., Clothier K. A., Loy J. D., Cargnelutti J. F. (2021) Isolation of *Moraxella* spp. from horses with conjunctivitis in Southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 52, 1643–1648; DOI 10.1007/s42770-021-00507-1
- Songer J. G., Post K. W. (2005) The genera *Moraxella* and *Neisseria*. *Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease.* Elsevier Saunders, 169–173
- Songer J. G., Post K. W. (2005) The genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in: *Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease.* Elsevier Saunders, 154–162
- Sudhakar A., Majji A. B., Chhablani J., Manderwad G. (2014) *Pantoea agglomerans* endophthalmitis: clinical features and outcomes. *Retina* 34, 1702–1706; DOI 10.1097/iae.000000000000127
- Sweeney C. R., Irby N. L. (1996) Topical treatment of *Pseudomonas* sp-infected corneal ulcers in horses: 70 cases (1977–1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 954–957
- van der Kolk J. H., Endimiani A., Graubner C., Gerber V., Perreten V. (2019) *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16, 59–71; DOI 10.1016/j.jgar.2018.08.011
- Venincasa V. D., Kuriyan A. E., Flynn H. W. Jr., Sridhar J., Miller D. (2015) Endophthalmitis caused by *Pantoea agglomerans*: clinical features, antibiotic sensitivities, and outcomes. *Clin. Ophthalmol.* 9, 1203–1207; DOI 10.2147/oph.S80748
- Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig (2022). VETIDATA. Abgerufen am 27.11.2022. Verfügbar unter <https://vetidata.de/public/search/paeparat.php?params=113,74,65,74,139,131,74,70,74,50,131,117,113,130,115,120,50,75,131,74,65,74,50,65,50,75,141>
- Walterson A. M., Stavrínides J. (2015) *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 968–984; DOI 10.1093/femsre/fuv027
- Zak A., Siwinska N., Slowikowska M., Borowicz H., Ploneczka-Janeczko K., Chorbinski P., Niedzwiedz A. (2018) Conjunctival aerobic bacterial flora in healthy Silesian foals and adult horses in Poland. *BMC Vet. Res.* 14, 261; DOI 10.1186/s12917-018-1598-6
- Zheng W., Porter E., Noll L., Stoy C., Lu N., Wang Y., Liu X., Purvis T., Peddireddi L., Lubbers B., Hanzlíček G., Henningson J., Liu Z., Bai J. (2019) A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of five bovine pinkeye pathogens. *J. Microbiol. Methods.* 160, 87–92; DOI 10.1016/j.mimet.2019.03.024
- Zubrod C. J., Farnsworth K. D., Oaks J. L. (2004) Evaluation of arthrocentesis site bacterial flora before and after 4 methods of preparation in horses with and without evidence of skin contamination. *Vet. Surg.* 33, 525–530; DOI 10.1111/j.1532-950X.2004.04074.x

3. Eigene Untersuchungen

3.2 Eigenanteilbeschreibung

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
A.-K. Schieder	Erstautorin	Sammlung und Auswertung der Daten Mitwirkung bei Konzipierung beteiligt an Laboruntersuchungen Literaturrecherche Schreiben der Publikationen
Prof. Dr. J. C. Eule	Co-Autorin	Leiterin und fachliche Beraterin Mitwirkung bei Konzipierung Mitwirkung an den Publikationen
Dr. E. Müller	Co-Autorin	Mitwirkung Erstellung Manuskripte der Publikationen
Dr. A. Heusinger	Co-Autor	beteiligt an Laboruntersuchungen

4. Diskussion

4.1 Studiendesign

Es gibt einige Veröffentlichungen, die sich mit der bakteriellen Mikroflora auf der Augenoberfläche des Pferdes beschäftigt haben. Nicht zu vergessen ist an dieser Stelle, dass sowohl auf der gesunden als auch auf der erkrankten Augenoberfläche des Pferdes, nicht nur Bakterien, sondern auch Pilze vorkommen. Die Keratomykose ist beim Pferd eine häufige Augenerkrankung. Da sich die vorliegende Arbeit aber ausschließlich mit dem bakteriellen Keimspektrum beschäftigt, wird im Folgenden nicht weiter auf Pilze eingegangen.

Unterscheiden lassen sich die Studien, die Bakterien augengesunder Pferde untersucht haben von den Arbeiten, die nur Pferde mit definierten Augenerkrankungen betrachten. Studien zu Bakterien auf der gesunden Augenoberfläche des Pferdes gibt es aus den USA (Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988), aus Polen (Zak et al. 2018), dem Vereinigten Königreich (Johns et al. 2011), Australien (Hampson et al. 2018), Italien (Cattabiani et al. 1976) und dem Iran (Araghi-Sooreh et al. 2014). In diesen Studien wurden Pferdepopulationen in Größen von 37 bis 100 Tieren, die zumeist unter ähnlichen Bedingungen untergebracht waren, einbezogen. Studien, die sich mit dem bakteriellen Keimspektrum von Augen mit Keratitis beschäftigten, liegen aus den USA (Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Moore et al. 1995; Moore et al. 1983) und Finnland (Mustikka et al. 2020) vor. Eine weitere Studie untersuchte die bakterielle Beteiligung bei extraokularen Erkrankungen (McLaughlin et al. 1983).

Bei der vorliegenden Arbeit wurden 844 Augentupfer von 785 verschiedenen Pferden ausgewertet, die im Rahmen der Routinediagnostik von in Deutschland praktizierenden Tierärzten an ein veterinärmedizinisches Diagnostiklabor geschickt worden sind.

Untersuchungszeitraum war das Jahr 2018. Es sind der Autorin keine weiteren Studien aus Deutschland bekannt, die das bakterielle Keimspektrum der Augenoberfläche des Pferdes untersucht haben. Die klimatischen Bedingungen der anderen Länder, aus denen Studien vorliegen, unterscheiden sich deutlich vom deutschen kühlgemäßigten Klima. Vergleichbar wäre lediglich eine Studie aus Polen (Übergang zwischen der gemäßigten und der kontinentalen Klimazone), die sich allerdings mit den Mikrobiota gesunder Pferdeaugen beschäftigt hat (Zak et al. 2018). Auch gibt es bislang keine Studie mit einer ähnlich hohen Probenanzahl.

4.2 Keimspektrum

8% der Augentupfer waren bakteriologisch negativ, bei 36% wurde eine Mischkultur grampositiver und -negativer Keime nachgewiesen. In 31% der Fälle waren die detektierten Keime ausschließlich grampositiv, bei 25% ausschließlich gramnegativ. Da sich auch auf der Oberfläche gesunder Pferdeaugen Bakterien und Pilze befinden, würde man stets positive Bakterienkulturen erwarten. Mögliche Gründe für ein ausbleibendes bakterielles Wachstum:

- Abstrichentnahmen unter / nach Antibiotikatherapie
- Tupferprobenentnahme aus stark eitrigen Prozessen
- lange/r Lagerung / Transport bis zum Eintreffen im Labor, bzw. bei ungünstigen Temperaturen
- vorhandene Bakterien sind nicht kulturell unter Standardbedingungen kultivierbar
- Verdrängung der Bakterien durch Pilze

Insgesamt konnten 1510 Bakterien isoliert werden, davon waren 55% der Isolate grampositiv und 45% gramnegativ. 95% aller Keime konnten acht Familien zugeordnet werden. Diese waren (nach Häufigkeit absteigend sortiert): Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae, Bacillaceae, Streptococcaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Micrococcaceae und Enterococcaceae. Die meisten grampositiven Bakterien gehörten zu den Gattungen *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pseudarthrobacter*, *Aerococcus* und *Corynebacterium*. Bei den gramnegativen Keimen waren die Gattungen *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Moraxella*, *Serratia*, *Enterobacter* und *Actinobacillus* am häufigsten vertreten. Die Familie der Enterobacteriaceae zählte in der ersten Veröffentlichung 362 Isolate, in der zweiten nur 359. Dieser Unterschied ist in der Zuordnung der Gattungen begründet. In der ersten Veröffentlichung wurden die Gattungen *Morganella*, *Proteus* und *Providencia* den Enterobacteriaceae zugeordnet, in der zweiten Studie der Familie der Morganellaceae. Taxonomisch korrekt ist die zweite Zuordnung (Schoch und et.al. 2020a).

In den Studien, die sich mit den Mikrobiota gesunder Pferdeaugen beschäftigt haben, war die Mehrzahl der Isolate grampositiv. Die Gattung *Staphylococcus* kam dabei in jeder der oben aufgeführten Studien vor. Dies deckt sich mit der vorliegenden Studie, obwohl hier erkrankte Augen untersucht worden sind. In der vorliegenden Arbeit war *Staphylococcus* die Gattung mit den meisten Isolaten. Weiterhin kamen in den vorhergehenden Studien auch die Gattungen *Corynebacterium* (Hampson et al. 2018; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976), *Bacillus* (Hampson et al. 2018; Araghi-Sooreh et al. 2014; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976), *Micrococcus* (Johns et al. 2011; Cattabiani et al. 1976), *Streptomyces* (Gemensky-Metzler et al. 2005; Moore et al. 1988) und *Streptococcus* (Gemensky-Metzler et al. 2005; Cattabiani et

4. Diskussion

al. 1976) häufig vor. Die Gattungen *Bacillus* (n=260) und *Streptococcus* (n=167) sind auch in dieser Arbeit stark vertreten. Auch Corynebakterien (n=10) und Mikrokokken (n=4) kamen vor, allerdings mit deutlich weniger Isolaten. Die Gattung *Streptomyces* konnte nicht nachgewiesen werden.

Gramnegative Mikroorganismen konnten in den genannten Studien deutlich seltener angezüchtet werden als in der vorliegenden Arbeit. Sie gehörten vor allem zu den Gattungen *Moraxella* (Zak et al. 2018; Gemensky-Metzler et al. 2005; Andrew et al. 2003; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976), *Acinetobacter* (Johns et al. 2011; Gemensky-Metzler et al. 2005; Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976) und *Neisseria* (Moore et al. 1988; Cattabiani et al. 1976).

Lagen Keratitiden vor, gehörten die detektierten Bakterien am häufigsten zu den grampositiven Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* (Mustikka et al. 2020; Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Moore et al. 1995), sowie zu den gramnegativen Gattungen *Pseudomonas* (Keller und Hendrix 2005; Sauer et al. 2003; Moore et al. 1995; Moore et al. 1983) und *Acinetobacter* (Moore et al. 1995; Moore et al. 1983) sowie zur Familie der Enterobacteriaceae (Moore et al. 1995; Moore et al. 1983). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie passen dazu. Die Gattungen mit den meisten Isolaten waren (in absteigender Reihenfolge): *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* und *Acinetobacter*.

Zusätzlich wurde das Keimwachstum zwischen Tupferproben von erkrankten Pferdeaugen mit und von Abstrichen ohne Hornhautbeteiligung verglichen. Hier gab es signifikante Unterschiede bezüglich des Anteils der negativen Kulturen und der Mischkulturen. War die Hornhaut vom Krankheitsprozess betroffen, kamen weniger Mischkulturen vor und das bakterielle Wachstum blieb häufiger aus. Den Rückgang der Mischkulturen könnte man damit erklären, dass sich bei Infektionen das Artenreichtum zugunsten möglicher Pathogene reduziert haben könnte. Die Vermutung, dass bei Keratitiden vermehrt gramnegative Keime nachgewiesen werden, ließ sich nicht bestätigen.

Im Vergleich mit anderen Veröffentlichungen fällt auf, dass in der vorliegenden Studie das Keimspektrum groß war. Dies ist zum einen mit der höheren Anzahl der untersuchten Proben zu erklären, zum anderen kann dies auch mit der verwendeten Methodik zur Identifizierung der Bakterien zusammenhängen. Während sich mit Ausnahme einer Studie aus Finnland (Mustikka et al. 2020) die vorausgehenden Veröffentlichungen zur Identifizierung mikrobiologischer Standardmethoden bedienten, teilweise ohne diese näher zu benennen, erfolgte hier die Identifizierung neben der Beurteilung von Kulturmorphologie und biochemischen Methoden, ergänzend mittels MALDI-TOF, wodurch eine präzise Bestimmung auf Speziesebene ermöglicht wurde.

4. Diskussion

Trotzdem muss einschränkend gesagt werden, dass auch mit dem MALDI-TOF nur die Keimspezies identifiziert werden können, die auch in der verwendeten Datenbank hinterlegt sind. So gab es auch einige Isolate in dieser Studie, die nur auf Gattungsebene zugeordnet werden konnten. Die Datenbank wird in regelmäßigen Abständen aktualisiert, wobei Umbenennungen berücksichtigt und neue Spezies eingepflegt werden. Daher ist es möglich, dass vielleicht einige von diesen Keimen, die im Jahr 2018 nur auf Gattungsebene bestimmt werden konnten, inzwischen einer Spezies zugeordnet werden könnten.

Das identifizierte Keimspektrum beruhte in dieser Studie ausschließlich auf dem Resultat kultureller Untersuchungstechniken unter aeroben Bedingungen. Daher konnten nicht alle im Untersuchungsmaterial vorhandenen Bakterien erfasst werden, sondern lediglich ein kleiner Teil davon. So lassen sich nur etwa 1-10% der tatsächlich vorhandenen Bakterien kulturell anzüchten (Amann et al. 1995). Wie Studien, die Next-Generation Sequencing anwandten, beweisen, setzt sich das Mikrobiom des Pferdeauges aus wesentlich mehr Keimen zusammen als kulturell erfassbar (LaFrentz et al. 2020; Scott et al. 2019). Diese Untersuchungstechnik, die auf der PCR beruht, hat den Vorteil der schnelleren Diagnostik, da man nicht von Wachstumsgeschwindigkeiten der Bakterien abhängig ist. Weiterhin erhält man mit dieser Methodik weitaus umfassendere Untersuchungsergebnisse. Inwiefern diese Fülle an Informationen für den praktischen Tierarzt hilfreich sein kann, bleibt abzuwarten. Ein großer Nachteil der Methodik ergibt sich allerdings daraus, dass kein Antibiogramm angefertigt werden kann.

4.3 Einordnung ausgewählter gramnegativer Gattungen

Die erste Veröffentlichung dieser Studie unterschied sich von anderen durch vermehrtes Auftreten gramnegativer Keime, weshalb das gramnegative Keimspektrum in einer zweiten Publikation genauer untersucht wurde.

Die Kulturbedingungen der vorliegenden Arbeit waren ähnlich zu den meisten der vorhergehenden Studien, mit geringen Unterschieden: Es wurde als Selektivmedium für gramnegative Keime anstelle von Endo-Agar MacConkey-Agar verwendet und es wurde zusätzlich ein Anreicherungsverfahren durchgeführt. Größer war der Unterschied in der Keimidentifizierung. Sie erfolgte neben den üblichen Standardmethoden mittels MALDI-TOF, was zu einer höheren Präzision der Erregerbestimmung führte.

Die meisten gramnegativen Isolate gehörten den Gattungen *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia* und *Moraxella* an. Besonders auffällig war hierbei die deutliche Dominanz der Gattung *Pantoea*. In einigen vorausgehenden Studien wurde die Gattung gar nicht genannt, in anderen deutlich seltener. Ein möglicher Grund könnte in der Taxonomie

4. Diskussion

liegen. Die Gattung *Pantoea* gibt es erst seit 1989. Zuvor und teilweise auch später noch, wurde dieser Keim anderen Gattungen zugeordnet, zuletzt der Gattung *Enterobacter* (Schoch und et.al. 2020b). Da *Pantoea* spp. morphologisch gut zu erkennen sind, lässt sich das gehäufte Vorkommen nicht durch die Verwendung des MALDI-TOF erklären. Allerdings stammen die vorausgegangenen Studien aus Ländern mit anderen klimatischen Bedingungen. Da *Pantoea* spp. ubiquitär in der Natur verbreitet, und in Wasser, Erdboden, Staub und Pflanzenmaterial anzutreffen sind sowie auch im Körper von Arthropoden (Walterson und Stavrinos 2015), erstaunt der häufige Nachweis auf der equinen Augenoberfläche nicht - kommen Pferde aufgrund ihrer Lebensweise ständig mit Pflanzenmaterial in Kontakt. Da in der Humanmedizin Fälle von Endophthalmitiden beschrieben sind (Venincasa et al. 2015; Sudhalkar et al. 2014), wäre auch eine Beteiligung bei entzündlichen Augenerkrankungen des Pferdes denkbar. Auch die Gattungen *Pseudomonas* und *Acinetobacter* sind in der Natur weit verbreitet und können sowohl aus gesunden als auch erkrankten Pferdeaugen isoliert werden. Insbesondere *Psd. aeruginosa*, kann durch seine Ausstattung an Pathogenitätsfaktoren am Auge schwere Schäden verursachen (Brooks und Plummer 2022). *E. coli* gehört bei allen warmblütigen Tieren und dem Menschen zum Darmmikrobiom und gelangt durch Fäkalien in die Umwelt (Heesemann 2001). Sein Nachweis auf der Augenoberfläche ist daher auf eine Kontamination zurückzuführen. Auch gelang der Nachweis der Gattungen *Escherichia* und *Moraxella* aus gesunden und erkrankten Pferdeaugen. In der vorliegenden Studie konnten 39 Moraxellen angezüchtet werden, von denen 33 Isolate als *M. bovoculi* identifiziert werden konnten. Zu neun der Patienten lagen genauere klinische Informationen vor: Zwei Pferde waren an Keratokonjunktivitis erkrankt, sieben an Konjunktivitis ohne Hornhautbeteiligung. In einem Fall waren gleichzeitig mehrere Pferde aus dem Bestand des beprobten Pferdes von eitrigem Augenausfluss betroffen. Dies passt zu einer Studie aus China, bei der *M. bovoculi* als Erreger infektiöser Keratokonjunktivitis bei neun Rennpferden eines Zuchtbetriebs gefunden werden konnte (Liu et al. 2014). Zwei Fälle equiner Keratokonjunktivitis traten in Brasilien auf, bei denen *M. bovoculi*, bzw. eine nicht näher identifizierbare Moraxelle als Erreger identifiziert werden konnten (Seeger et al. 2021).

4.4 Einflussfaktoren auf das Keimwachstum

4.4.1 Jahreszeit

Betrachtet man die Art des Keimwachstums im jahreszeitlichen Vergleich, gab es in der vorliegenden Studie Unterschiede. Die meisten Mischkulturen aus grampositiven und -negativen Bakterien konnten im Herbst nachgewiesen werden. Der Anteil der negativen Kulturen war im Winter am größten. Im Gegensatz dazu gab es in einer Studie aus Florida keine signifikanten Unterschiede zwischen den Jahreszeiten (Andrew et al. 2003). Beide Studien lassen sich nur bedingt vergleichen. Florida besteht aus zwei Klimazonen: subtropisch und tropisch. Deutschland liegt in der kühlgemäßigten Klimazone und die saisonalen Unterschiede sind in Mitteleuropa deutlicher. Außerdem untersuchte die vorliegende Studie Tupfer von erkrankten Pferdeaugen, für die Studie aus Florida wurden gesunde Pferde beprobt. Da in dieser Studie Abstriche von unterschiedlichen Pferden ausgewertet wurden, die sich in Rasse, Alter, Haltungsbedingungen, Diagnose, etc. unterschieden, gab es zu viele Einflussfaktoren, um den Einfluss der Jahreszeiten auf das Keimwachstum stichhaltig beurteilen zu können. Wollte man gezielt testen, welche Auswirkungen das Wetter auf das Keimwachstum hat, müsste das Studiendesign angepasst werden. So müsste man hierfür, ähnlich zur Studie aus Florida, augengesunde Pferde aus einer Population untersuchen und dieselben Tiere im Jahresverlauf mehrfach beproben. Was diese Studie dennoch leisten kann, ist, die Nachweishäufigkeit bestimmter Bakterienspezies im Jahresverlauf zu beobachten. Hierbei zeigte sich, dass *Moraxella bovoculi* mit Abstand am häufigsten im Herbst isoliert werden konnte. Diese Beobachtung deckt sich trotz unterschiedlicher klimatischer Bedingungen mit der vorgenannten Studie, die im Oktober die höchste Prävalenz von *Moraxella* spp. feststellte (Andrew et al. 2003).

4.4.2 Pferdealter

Zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen zwei Studien bei der Untersuchung des Einflussfaktors Alter. In einer Studie konnten bei jüngeren Pferden vermehrt gramnegative Bakterien und Pilze nachgewiesen werden (Andrew et al. 2003). In einer anderen Arbeit waren die Pferde, aus deren Abstrichen gramnegative Keime angezüchtet werden konnten, signifikant älter (Johns et al. 2011). In der vorliegenden Studie zeigte sich zwischen den Altersgruppen (≤ 4 , 5-20 und >20) kein signifikanter Unterschied im Keimwachstum, was im Einklang mit Studien aus Polen (Zak et al. 2018) und Australien (Hampson et al. 2018) ist. Auch hier ist wieder zu beachten, dass in der vorliegenden Studie Abstriche von erkrankten Pferdeaugen ausgewertet worden sind. Die vorgenannten Studien untersuchten gesunde Pferde. Zusätzlich ergaben sich durch die Berücksichtigung des heterogenen Patientenguts

4. Diskussion

viele weitere Einflussfaktoren, die eine gesonderte Betrachtung des Faktors Alter erschweren.

4.4.3 Antibiotische Vorbehandlung

Eine Hypothese ist, dass die lokale Anwendung antibiotischer Präparate am Auge zu einem Shift der zunächst überwiegend grampositiven Mikrobiota zu gramnegativen Bakterien und Pilzen führe, insbesondere nach längerem Gebrauch.

In einer Studie wurden augengesunde Pferde in vier Gruppen eingeteilt, denen unterschiedliche Präparate dreimal täglich lokal appliziert worden. Pro Pferd wurde immer nur ein Auge behandelt, das zweite diente als unbehandelte Kontrollgruppe. Gruppe 1 erhielt Neomycin-Bacitracin-Polymyxin, Gruppe 2 Prednisolon und Gentamicin und Gruppe 3 Neomycin-Polymyxin und Dexamethason. Gruppe 4 diente als behandelte Kontrollgruppe und erhielt künstliche Tränen. In der ersten Woche zeigte sich in allen Gruppen eine Abnahme grampositiver und -negativer Keime. In der zweiten Woche nahm das Wachstum der grampositiven Keime wieder zu, während die Menge an gramnegativen Keimen weiter abnahm. Die gramnegativen Bakterien erreichten erst nach Beendigung der Applikationen wieder die Menge vor der Behandlung. Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (Gemensky-Metzler et al. 2005). Der Rückgang der Bakterienpopulation in der behandelten Kontrollgruppe wurde durch die mechanische Spülung, der Auslösung des Tränenreflexes und der möglichen antimikrobiellen Wirkung des Konservierungsmittels in den künstlichen Tränen erklärt. Da auch die unbehandelten Augen einen Rückgang der Bakterienpopulation zeigten, könnten auch Veränderungen in der Umwelt oder des Wirtes eine Rolle gespielt haben. (Gemensky-Metzler et al. 2005)

In der vorliegenden Studie gibt es im Keimwachstum mit und ohne antibiotische Vorbehandlung keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Anteils grampositiver und -negativer Keime. So lag der Anteil der gramnegativen Reinkulturen bei den unbehandelten Augen sogar etwas höher, was insofern zur vorgenannten Studie passen könnte, dass die gramnegativen Keime erst nach Beendigung der antibiotischen Therapie wieder das Ausgangslevel erreichten. Auch der höhere Anteil der grampositiven Keime nach/unter Antibiotikatherapie könnte die schnellere Repopulation der grampositiven Keime bestätigen. Zu beachten ist hier allerdings, dass in diese Auswertung nur die Untersuchungsergebnisse von Pferden eingehen konnten, zu denen Informationen bezüglich einer antibiotischen Vorbehandlung vorlagen. Therapiedauer, zeitlicher Abstand zur Probenahme, etc. waren aber oftmals nicht bekannt. In einer weiteren Studie, die den Effekt antibiotischer Therapie auf die okularen Mikrobiota mittels Next-Generation Sequencing untersuchte, blieb das Mikrobiom auch unter Therapie weitgehend stabil (Scott et al. 2019).

4.5 Antibiotikatherapie

4.5.1 Methodik der Resistenztestung

In der vorliegenden Studie wurde die Resistenzbestimmung im Mikrodilutionsverfahren durchgeführt. Im Rahmen der anderen Veröffentlichungen wurde hingegen entweder die Agardiffusion angewandt oder es fand sich keine Angabe zur verwendeten Methodik. Die Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) sieht die Dilutionsmethode als Methode der Wahl. Vorteil ist die Erfassung von quantitativen Daten in Form von MHK-Werten, die aussagekräftiger sind als eine grobe Einteilung in qualitative Kategorien und sich besser vergleichen lassen. Durch die gute Standardisierbarkeit ist sie weniger fehleranfällig. Nachteil ist die geringere Flexibilität bei der Auswahl der antibiotischen Wirkstoffe, da die Layouts der Mikrotiterplatten vorgegeben sind. So ist eine zusätzliche Testung weiterer Wirkstoffe nicht möglich. (Valentin-Weigand 2011) Getestet wurden folgende Antibiotika: Oxacillin, Gentamicin, Neomycin, Kanamycin, Enrofloxacin, Tetracyclin, Florfenicol und Polymyxin. Die Auswahl basierte einerseits darauf, welche Wirkstoffe in verfügbaren Augenpräparaten für die lokale Anwendung enthalten sind, waren andererseits aber auch vom Layout der Mikrotiterplatten abhängig. Daher sind die getesteten Antibiotika nicht vollständig, sondern es fehlen einige Wirkstoffe, die auch häufig Anwendung finden, wie etwa Fusidinsäure oder Bacitracin.

Bei der Bewertung der Antibiogramme ist zu berücksichtigen, dass sich die angewandten Grenzwerte auf die systemische Anwendung beziehen, da es derzeit (noch) keine Breakpoints für die topische Applikation gibt (Clinical & Laboratory Standards Institute 2020). Inwieweit sich die Beurteilungen in sensibel, intermediär und resistent möglicherweise verschieben würden, ist unklar. Die Verwendung der systemischen Grenzwerte entspricht jedoch dem derzeitigen wissenschaftlichen Stand. Es ist wünschenswert, dass zukünftig auch Breakpoints für die topische Anwendung zur Verfügung stehen. Eine weitere Einschränkung ergibt sich daraus, dass die Wirkung mehrerer kombinierter antimikrobieller Wirkstoffe nicht getestet werden kann - eine Ausnahme ist die Kombination von Trimethoprim mit einem Sulfonamid (Clinical & Laboratory Standards Institute 2020). Damit werden etwa synergistische Effekte nicht erfasst. Gerade in ophthalmologischen Präparaten sind aber häufig mehrere Wirkstoffe kombiniert, beispielsweise in Polyspectran® Polymyxin-B-sulfat, Neomycinsulfat und Gramacidin.

4. Diskussion

4.5.2 Anwendung ausgewählter antibiotischer Wirkstoffe

Vetoscon® (Zoetis Deutschland GmbH) mit Wirkstoff Cloxacillin ist eine für Pferde in Deutschland zugelassene Augensalbe. Stellvertretend wurde in der vorliegenden Studie das Resistenzverhalten von Oxacillin als Leitantibiotikum der Isoxazolyl-Penicilline getestet und kann abgeleitet werden (Clinical & Laboratory Standards Institute 2020). Wirkspektrum von Cloxacillin sind grampositive Keime. Allerdings lag bei 28% der *Staphylococcus aureus* Isolate eine Methicillin/Oxacillin-Resistenz vor. Für eine initiale Antibiotikatherapie ohne vorausgegangene Erregerbestimmung scheint Cloxacillin daher nicht geeignet zu sein. Zwei ebenfalls für das Pferd zugelassene Präparate mit dem Wirkstoff Chlortetracyclinhydrochlorid sind derzeit im deutschen Handel: Cepemycin® (CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH) und Ophthocycline® (Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH). Über 88% aller grampositiven und über 85% aller gramnegativen Isolate waren empfindlich gegenüber Tetracyclin. Damit ist es aufgrund des breiteren Wirkspektrums für eine Erstversorgung geeigneter.

Durch die geringe Auswahl zugelassener Präparate kommt der Praktiker bei der Behandlung bakterieller Augeninfektionen häufig in die Situation des Therapienotstandes, der dadurch gekennzeichnet ist, dass für Tierart und Anwendungsgebiet kein zugelassenes Tierarzneimittel zur Verfügung steht, die notwendige arzneiliche Versorgung des Tieres ernstlich gefährdet ist und eine Gefährdung der Gesundheit von Mensch und Tier (bei Umwidmung) nicht zu befürchten ist. Liegt ein Therapienotstand vor, darf entsprechend der Umwidmungskaskade umgewidmet werden. Zu beachten ist, dass die erste Veröffentlichung zu dieser Studie im Jahr 2021 erschienen ist, sich die Umwidmungskaskade aber ab dem 28.01.2022 geändert hat. Daher sind die Angaben diesbezüglich dort teilweise nicht mehr aktuell.

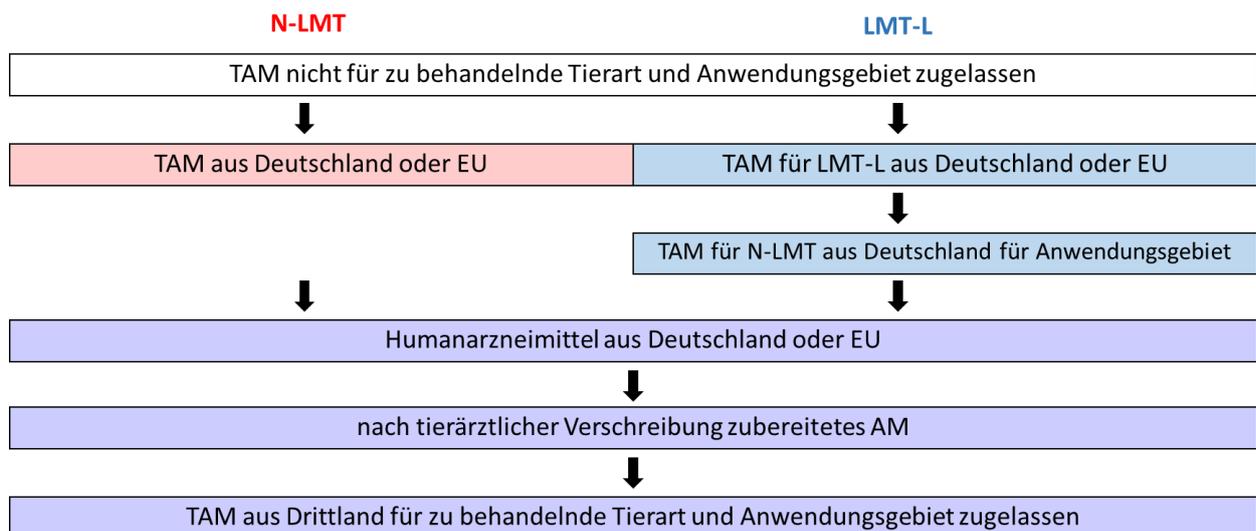


Abb.2 Umwidmungskaskade ab 28.01.2022 nach ©Emmerich, VETIDATA, modifiziert von Schieder

4. Diskussion

Bevor humanmedizinische Präparate Anwendung finden dürfen, muss gemäß Umwidnungskaskade zunächst auf Tierarzneimittel aus Deutschland oder der EU zurückgegriffen werden. Eine am 24.05.2022 aktualisierte Liste der verfügbaren Ophthalmika für Tiere in der EU/EWR ist bei VETIDATA einzusehen (Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig 2023).

Zwei Augenpräparate, die Chloramphenicol enthalten, sind für Hund und Katze in Deutschland zugelassen, Cefenicol® (CP-Pharma) und Cefenidex® (CP-Pharma). In der vorliegenden Studie wurde das Resistenzverhalten von Chloramphenicol von Florfenicol abgeleitet. Beide gehören zur Gruppe der Phenicole, weisen jedoch Unterschiede in ihrer chemischen Struktur auf. Liegt eine Resistenz der Isolate gegen Florfenicol vor, besteht diese auch immer gegen Chloramphenicol. Andersherum müssen Resistenzen gegenüber Chloramphenicol aber nicht unbedingt auch gegenüber Florfenicol bestehen. (Werckenthin et al. 2005) Während Florfenicol hochwirksam gegen grampositive Bakterien war, zeigten sich nur <64% der gramnegativen Bakterien sensibel. Bei den Pseudomonaden waren sogar nur unter 30% empfindlich. Ein weiterer Nachteil von Chloramphenicol besteht in seiner Gefährlichkeit für den Anwender. Durch Hautkontakt kann beim Menschen eine aplastische Anämie hervorgerufen werden. Bei Schlachtequiden darf Chloramphenicol gemäß Tabelle 2 der VO (EU) 37/2010 nicht angewendet werden, da es hier als verbotener Stoff aufgeführt wird.

Daneben sind für Hund und Katze auch Augenpräparate mit Aminoglycosiden im deutschen Handel: Dermamycin Augencreme® (WDT – Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, almapharm GmbH u. Co. KG) mit Neomycinsulfat sowie Ophtogent® (CP-Pharma) und Soligental® (Virbac Tierarzneimittel GmbH, CP-Pharma) mit Gentamicinsulfat als enthaltene Antibiotika. Gentamicin zeigte sich hochwirksam gegenüber gramnegativen Isolaten. Neomycin und Kanamycin waren ähnlich wirksam, bei den Pseudomonaden allerdings besaß Gentamicin im Vergleich mit den anderen Aminoglycosiden die beste In-vitro-Wirksamkeit. Streptokokken besitzen eine natürliche Resistenz gegenüber Aminoglycosiden (Krause et al. 2016). Bei Schlachtequiden gelten im Therapienotstand zusätzlich gesonderte Regelungen: Angewendet werden dürfen Stoffe aus Tabelle 1 VO (EU) Nr. 37/2010 (Rückstandshöchstmengenverordnung). Hier berechnet sich die Wartezeit bei Umwidnung durch Multiplikation der längsten genannten Wartezeit in der Fachinformation mit dem Faktor 1,5. Bei einer anderen taxonomischen Familie beträgt sie mindestens einen Tag. Ist keine Wartezeit angegeben sind 28 Tage für essbares Gewebe und 7 Tage für Milch einzuhalten. Diese Regelungen betreffen u.a. Neomycin und Gentamicin.

4. Diskussion

Isathal® (Dechra) mit Fusidinsäure ist in Deutschland für den Hund zugelassen, konnte in dieser Studie aber leider nicht getestet werden, da Fusidinsäure nicht auf dem Layout der verwendeten Mikrotiterplatten enthalten war. Gramnegative Keime besitzen intrinsische Resistenzen gegenüber Fusidinsäure (Clinical & Laboratory Standards Institute 2020). Zwar ist in Deutschland derzeit kein Augenpräparat für die Anwendung bei Tieren zugelassen, das Polymyxin B enthält, doch sind in der EU/EWR Präparate verfügbar, die Polymyxin B in Kombination mit anderen antibiotischen Wirkstoffen enthalten. Polymyxin B allein besitzt ein gramnegatives Wirkspektrum (Clinical & Laboratory Standards Institute 2020).

Im deutschen Handel sind Humanpräparate mit Ofloxacin als Wirkstoff erhältlich. Da es aber in EU/EWR ein Präparat gibt, das für Pferde zugelassen ist, muss dieses laut Umwidnungskaskade bevorzugt verwendet werden. In dieser Studie wurde anstelle von Ofloxacin das Resistenzverhalten gegenüber Enrofloxacin geprüft. Enrofloxacin ist Leitantibiotikum der Fluorchinolone. Die Resistenzen anderer Wirkstoffe dieser Gruppe können von Enrofloxacin abgeleitet werden (Feßler et al. 2017). Enrofloxacin verhielt sich gegenüber grampositiven und -negativen Isolaten hochwirksam.

Ofloxacin und Polymyxin B stehen beide auf der Positivliste für Equiden, Anhang VO (EU) Nr. 122/2013. D.h., sie dürfen auch bei Schlachteequiden angewendet werden, wenn sechs Monate Wartezeit eingehalten werden und die Anwendung im Equidenpass dokumentiert wird.

4.5.3 Antibiogrammpflicht

Die Untersuchungen haben gezeigt, dass Keimidentifizierung mit Resistenztestung für eine effektive Antibiotikatherapie notwendig ist. Das Resistenzverhalten zwischen den Familien unterscheidet sich stark.

Eine Antibiogrammpflicht besteht beim Pferd laut Tierärztlicher Hausapothekenverordnung (TÄHAV) §12c bei Umwidmung eines Antibiotikums, sowie bei Einsatz von Fluorchinolonen und Cephalosporinen der 3./4. Generation. Ausnahmen hiervon sind:

- die Tiergesundheit ist durch die Probenahme gefährdet
- der Erreger ist in zellfreien Medien nicht kultivierbar, z.B. Chlamydien, Mycoplasmen u.a.
- es ist keine geeignete Methode zur Bestimmung der Empfindlichkeit des Erregers verfügbar

Trifft eine Ausnahme zu, ist der Praktiker in der Nachweispflicht, warum kein Antibiogramm erstellt werden konnte. (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2018)

4.6 Fazit und Ausblick

Die Kenntnis über das vorhandene Keimspektrum und seiner Resistenzlage ist für eine gezielte antibiotische Therapie essentiell.

Die Methodik der vorliegenden Studie basierte auf dem aktuellen Wissensstand unter Verwendung empfohlener Verfahren und moderner Technik. Es wurde eine hohe Fallzahl Proben untersucht - allerdings fehlten trotz Aussendung von Fragebögen an die behandelnden Tierärzte zu der Mehrheit der untersuchten Pferde wertvolle Informationen zur Klinik. Das Vorkommen der betrachteten gramnegativen Keime ließ sich zwar einordnen, die Pathogenität jedoch nicht abschließend beurteilen. Untersucht wurden auch einige Einflussfaktoren auf das Keimwachstum. Hierbei waren Tendenzen sichtbar, allerdings sind die Ergebnisse aufgrund des heterogenen Patientenguts mit Vorsicht zu interpretieren. Im Vergleich mit anderen Studien wurden sehr viele Antibiogramme ausgewertet, was eine verlässlichere Beurteilung des Resistenzverhaltens zulässt als bei Untersuchung weniger Bakterien. Eine Einschränkung ergibt sich durch fehlende Breakpoints für die topische Anwendung, was sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht verhindern ließ.

Erfolgreich wäre bei Studien dieser Art eine Zusammenarbeit von praktischen Tierärzten und Untersuchungseinrichtungen, um durch die Kombination von moderner Methodik und der genauen Kenntnis über die Klinik das größtmögliche Outcome zu erzielen. Wünschenswert ist auch die Entwicklung weiterer Breakpoints durch die CLSI. Um die klinische Relevanz der detektierten gramnegativen Bakterien noch besser einschätzen zu können, bedarf es weiterer Studien. Hier könnten Fallberichte hilfreich sein.

5. Zusammenfassung

Ann-Kathrin Schieder

„Das aerobe Bakterienspektrum der erkrankten Pferdeaugenoberfläche und seine Resistenzlage“

Im Jahr 2018 wurden 844 Augenabstriche von 785 verschiedenen Pferden bakteriologisch untersucht. Die Keimidentifizierung erfolgte neben Beurteilung der Kulturmorphologie und biochemischen Methoden mittels MALDI-TOF. Die Resistenztestung wurde im Mikrodilutionsverfahren nach den Standards des CLSI als Breakpoint-Methode durchgeführt. 8% (n=65/844) aller Augentupfer waren bakteriologisch negativ. Bei 31% (n=264/844) zeigte sich nur grampositives, bei 25% (n=207/844) ausschließlich gramnegatives Wachstum. Mischkulturen grampositiver und -negativer Keimspezies zeigten sich bei 36% (n=308/844) der Proben. Unterschiede in der Art des Keimwachstums ergaben sich im jahreszeitlichen Vergleich. Insgesamt konnten 1510 Bakterien isoliert werden. Die meisten Isolate gehörten zu den Familien der Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae und Bacillaceae. Weiterhin kamen die Familien Streptococcaceae, Moraxellaceae und Pseudomonadaceae häufig vor. Größte Gattungen waren (in absteigender Reihenfolge): *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* und *Acinetobacter*. Das gramnegative Keimspektrum setzt sich größtenteils aus den drei Familien Enterobacteriaceae (n=359/678), Moraxellaceae (n=141/678) und Pseudomonadaceae (n=137/678) zusammen. Weder das Alter der beprobten Pferde noch lokale antibiotische Vorbehandlung hatten einen signifikanten Einfluss auf die Nachweishäufigkeit gramnegativer Keimspezies. Auch konnten bei Schädigung der Hornhaut nicht vermehrt gramnegative Bakterien isoliert werden. *Moraxella bovoculi* war innerhalb der Jahresverläufe im Herbst am häufigsten vertreten. Die klinische Relevanz der nachgewiesenen gramnegativen Bakteriengattungen muss individuell beurteilt werden.

Von 1421 Bakterienisolaten wurden Antibiotogramme angefertigt. Getestet wurden die antibiotischen Wirkstoffe Oxacillin, Gentamicin, Neomycin, Kanamycin, Enrofloxacin, Tetracyclin, Florfenicol und Polymyxin. Gegenüber den gramnegativen Isolat (n=654) zeigte sich Enrofloxacin in vitro als am wirksamsten (n= 625/654), gefolgt von Gentamicin (n=620/654) und Neomycin (n=618/654). Die meisten Isolate der grampositiven Keime waren in vitro sensibel gegenüber Florfenicol (n=713/767), Enrofloxacin (n=710/767) und Tetracyclin (n=679/767). Lokale antibiotische Vorbehandlungen hatten keinen besonderen Einfluss auf die Resistenzlage.

5. Zusammenfassung

Das große aerobe Keimspektrum der Augenoberfläche des Pferdes und die Unterschiede in der Resistenzlage machen eine bakteriologische Untersuchung mit anschließender Antibiogrammerstellung notwendig.

6. Summary

Ann-Kathrin Schieder

„The aerobic bacterial spectrum of the diseased equine ocular surface and its resistance pattern“

In 2018, 844 swabs from the ocular surface of 785 different horses were cultured for aerobic bacteria. Bacterial isolates were identified based on their culture morphology, biochemical methods, and MALDI-TOF. Antibiotic susceptibility testing was performed by microdilution using the breakpoint method according to the CLSI standards.

In 8% (n=65/844) of all eye swabs no bacterial growth was observed. 31% (n = 264/844) showed only Gram-positive, 25% (n=207/844) only Gram-negative growth. Mixed cultures of Gram-positive and -negative bacterial species were found in 36% (n=308/844) of the samples. In the seasonal comparison differences in the type of bacterial growth were found. A total of 1510 bacteria were isolated. Most of the isolates belonged to the families Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae and Bacillaceae. Furthermore, the families Streptococcaceae, Moraxellaceae and Pseudomonadaceae occurred frequently. Largest genera were (in descending order): *Pantoea*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. The Gram-negative bacterial spectrum was mainly composed of three families: Enterobacteriaceae (n=359/678), Moraxellaceae (n=141/678) and Pseudomonadaceae (n=137/678). Neither the age of the sampled horses nor local antibiotic pre-treatment had a significant influence on the frequency of detected Gram-negative bacteria. Also, there was no increase of Gram-negative bacteria in eyes with damaged cornea. Over the year *Moraxella bovoculi* occurred most frequently in autumn. The clinical relevance of the detected Gram-negative bacterial genera must be assessed individually.

Antibiograms were performed from 1421 bacterial isolates. The antibiotic agents oxacillin, gentamicin, neomycin, kanamycin, enrofloxacin, tetracycline, florfenicol and polymyxin were tested. Against Gram-negative isolates (n=654), enrofloxacin was found to be most effective in vitro (n=625/654), followed by gentamicin (n=620/654) and neomycin (n=618/654). Most isolates of Gram-positive bacteria were in vitro sensitive to florfenicol (n=713/767), enrofloxacin (n=710/767) and tetracycline (n=679/767). Local antibiotic pre-treatment had no particular influence on the resistance pattern. In conclusion the large aerobic bacterial spectrum of the equine ocular surface and the differences in its antibiotic susceptibility underline the necessity of a bacteriological examination with an subsequent antibiogram.

7. Literaturverzeichnis

- Amann R I, Ludwig W und Schleifer K-H (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59(1), 143-169
- Andrew S E, Brooks D E, Smith P J, Gelatt K N, Chmielewski N T und Whittaker C J (1998): Equine ulcerative keratomycosis: visual outcome and ocular survival in 39 cases (1987-1996). *Equine Vet J*, 30(2), 109-116
- Andrew S E, Nguyen A, Jones G L und Brooks D E (2003): Seasonal effects on the aerobic bacterial and fungal conjunctival flora of normal thoroughbred brood mares in Florida. *Vet Ophthalmol*, 6(1), 45-50
- Araghi-Sooreh A, Navidi M und Razi M (2014): Conjunctival Bacterial and Fungal Isolates in Clinically Healthy Working Horses in Iran. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20(4), 625-627
DOI: 10.9775/kvfd.2013.10649
- Aramă V (2020): Topical antibiotic therapy in eye infections - myths and certainties in the era of bacterial resistance to antibiotics. *Rom J Ophthalmol*, 64(3), 245-260
- Brooks D E, Andrew S E, Biros D J, Denis H M, Cutler T J, Strubbe D T und Gelatt K N (2000): Ulcerative keratitis caused by beta-hemolytic *Streptococcus equi* in 11 horses. *Vet Ophthalmol*, 3(2-3), 121-125. DOI: 10.1046/j.1463-5224.2000.00120.x
- Brooks D E (2010): Equine conjunctival diseases: A commentary. *Equine vet. Educ*, 22(8), 382-386. DOI: doi:10.1111/j.2042-3292.2010.00097.x
- Brooks D E und Plummer C E (2022): Diseases of the Equine Cornea. In: B C Gilger (Hrsg.), *Equine Ophthalmology* (4. Aufl., S. 253-440). Oxford: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-119-78225-4
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2018). Verordnung über Tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV) §12c Antibiotigrammpflicht Abs. 1. Abgerufen am 25.03.2023. Verfügbar unter https://www.gesetze-im-internet.de/t_hav/BJNR021150975.html
- Cattabiani F, Cabassi E, Allodi C und Gianelli F (1976): Bacterial flora of the conjunctival sac of the horse. *Ann Sclavo*, 18(1), 91-119
- Clinical & Laboratory Standards Institute (2020): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility. Tests for Bacteria Isolated From Animals (5. Aufl. Bd. Supplement Vet01S). Wayne, PA: CLSI
- Dutkiewicz J, Mackiewicz B, Kinga Lemieszek M, Golec M und Milanowski J (2016): *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part III. Deleterious effects: infections of humans, animals and plants. *Ann Agric Environ Med*, 23(2), 197-205. DOI: 10.5604/12321966.1203878
- Eule J C und Schmidt V (2017a): Krankheiten der Bindehaut (Konjunktiva). In: W Brehm, H Gehlen, B Ohnesorge und A Wehrend (Hrsg.), *Handbuch Pferdepraxis* (4. Aufl., S. 788-792). Stuttgart: Enke Verlag. ISBN 978-3-13-219621-6
- Eule J C und Schmidt V (2017b): Krankheiten der Hornhaut. In: W Brehm, H Gehlen, B Ohnesorge und A. Wehrend (Hrsg.), *Handbuch Pferdepraxis* (4. Aufl., S. 792-799). Stuttgart: Enke Verlag. ISBN 978-3-13-219621-6
- Feßler A T, Böttner A und Fehr M (2017): Mikrotiterlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis. Aktualisierung der Layouts des DVG-Arbeitskreises "Antibiotikaresistenz". *Deutsches Tierärzteblatt*, 65(4), 472-481

7. Literaturverzeichnis

- Gemensky-Metzler A J, Wilkie D A, Kowalski J J, Schmall L M, Willis A M und Yamagata M (2005): Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am J Vet Res*, 66(5), 800-811
- Hampson E, Gibson J S, Barot M, Shapter F M und Greer R M (2018): Identification of bacteria and fungi sampled from the conjunctival surface of normal horses in South-East Queensland, Australia. *Vet Ophthalmol*, 22(3), 265-275. DOI: 10.1111/vop.12587
- Heesemann J (2001): Die Familie der Enterobacteriaceae In: Medizinische Mikrobiologie (8. Aufl., S. 303-304). München: Urban & Fischer. ISBN 3-437-41640-5
- Henker L C, Lorenzett M P, Keller A, Siqueira F M, Driemeier D und Pavarini S P (2020): Fibrinonecrotic placentitis and abortion associated with *Pantoea agglomerans* infection in a mare. *J Equine Vet Sci*, 92, 103-156. DOI: 10.1016/j.jevs.2020.103156
- Hong C B, Donahue J M, Giles R C, Jr., Petrites-Murphy M B, Poonacha K B, Roberts A W, Smith B J, Tramontin R R, Tuttle P A und Swerczek T W (1993): Etiology and pathology of equine placentitis. *J Vet Diagn Invest*, 5(1), 56-63. DOI: 10.1177/104063879300500113
- Hughes D E und Pugh G W, Jr (1970): Isolation and description of a *Moraxella* from horses with conjunctivitis. *Am J Vet Res*, 31(3), 457-462
- Huntington P J, Coloe P J, Bryden J D und Macdonald F (1987): Isolation of a *Moraxella* sp from horses with conjunctivitis. *Aust Vet J*, 64(4), 118-119. DOI: 10.1111/j.1750813.1987.tb09647.x
- Johns I C, Baxter K, Booler H, Hicks C und Menzies-Gow N (2011): Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Vet Ophthalmol*, 14(3), 195-199. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x
- Keller R L und Hendrix D V (2005): Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993--2004). *Equine Vet J*, 37(3), 207-211. DOI: 10.2746/0425164054530731
- Krause K M, Serio A W, Kane T R und Connolly L E (2016): Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(6), 1-18. DOI: 10.1101/cshperspect.a027029
- Kuroda T, Kinoshita Y, Niwa H, Mizobe F, Ueno T, Kuwano A, Hatazoe T und Hobo S (2015): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ulcerative keratitis in a Thoroughbred racehorse. *J Equine Sci*, 26(3), 95-98. DOI: 10.1294/jes.26.95
- LaFrentz S, Abarca E, Mohammed H H, Cuming R und Arias C R (2020): Characterization of the normal equine conjunctival bacterial community using culture-independent methods. *Vet Ophthalmol*, 23(3), 480-488. DOI: 10.1111/vop.12743
- Liebich H G (2010): Sehorgan (Organum visus). In: H G Liebich (Hrsg.), Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis (5. Aufl., S. 376-377). Stuttgart: Schattauer. ISBN: 978-3-7945-2692-5
- Liu H, Yan J, Wang Y, Yan Q, Zhao L, Yan R und He H (2014): Isolation of *Moraxella bovoculi* from racehorses with keratoconjunctivitis. *J Vet Diagn Invest*, 26(4), 585-587. DOI: 10.1177/1040638714535601
- Loy J D und Brodersen B W (2014): *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *J Vet Diagn Invest*, 26(6), 761-768. DOI: 10.1177/1040638714551403
- Matthews A G (1994): The aetiopathogenesis of infectious keratitis in the horse. *Equine Vet J*, 26(6), 432-433. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04044.x>

7. Literaturverzeichnis

- Matthews A G (2009): Ophthalmic antimicrobial therapy in the horse. *Equine Vet Educ*, 21(5), 271-280. DOI: 10.2746/095777308x334266
- McClellan K A (1997): Mucosal defense of the outer eye. *Surv Ophthalmol*, 42(3), 233-246. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0039-6257\(97\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0039-6257(97)00090-8)
- McLaughlin S A, Brightman A H, Helper L C, Manning J P und Tomes J E (1983): Pathogenic bacteria and fungi associated with extraocular disease in the horse. *J Am Vet Med Assoc*, 182(3), 241-242
- Miller D (2017): Update on the Epidemiology and Antibiotic Resistance of Ocular Infections. *Middle East Afr J Ophthalmol*, 24(1), 30-42. DOI: 10.4103/meajo.MEAJO_276_16
- Moore C P, Fales W H, Whittington P und Bauer L (1983): Bacterial and fungal isolates from Equidae with ulcerative keratitis. *J Am Vet Med Assoc*, 182(6), 600-603
- Moore C P, Heller N, Majors L J, Whitley R D, Burgess E C und Weber J (1988): Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *Am J Vet Res*, 49(6), 773-777.
- Moore C P, Collins B K und Fales W H (1995): Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses: 63 cases (1986-1994). *J Am Vet Med Assoc*, 207(7), 928-933.
- Mustikka M P, Grönthal T S C und Pietilä E M (2020): Equine infectious keratitis in Finland: Associated microbial isolates and susceptibility profiles. *Vet Ophthalmol*, 23(1), 148-159. DOI: 10.1111/vop.12701
- Robert Koch-Institut (2020). *Acinetobacter* spp. Abgerufen am 19.12.2021. Verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/ThemenAZ/A/Info_Acinetobacter.html
- Rosa M, Cardozo L M, da Silva Pereira J, Brooks D E, Martins A L, Florido P S und Stussi J S (2003): Fungal flora of normal eyes of healthy horses from the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Ophthalmol*, 6(1), 51-55
- Samuelson D A, Andresen T L und Gwin R M (1984): Conjunctival fungal flora in horses, cattle, dogs, and cats. *J Am Vet Med Assoc*, 184(10), 1240-1242.
- Sandmeyer L S, Bauer B S, Mohaghegh Poor S M, Feng C X und Chirino-Trejo M (2017): Alterations in conjunctival bacteria and antimicrobial susceptibility during topical administration of ofloxacin after cataract surgery in dogs. *Am J Vet Res*, 78(2), 207-214. DOI: 10.2460/ajvr.78.2.207
- Sansom J, Featherstone H und Barnett K C (2005): Keratomycosis in six horses in the United Kingdom. *Vet Rec*, 156(1), 13-17
- Sauer P, Andrew S E, Lassaline M, Gelatt K N und Denis H M (2003): Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991-2000): 65 horses. *Vet Ophthalmol*, 6(4), 309-313. DOI: 10.1111/j.1463-5224.2003.00312.x
- Schoch C et al. (2020a). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). Abgerufen am 25.03.2023, 2023. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=1903414&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>
- Schoch C L et al. (2020b). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database. Abgerufen am 26.03.2023, 2023. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=549&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

7. Literaturverzeichnis

- Schwarzkopf A (2016): Resistenzdefinitionen, Resistenzmechanismen, Resistenzbestimmung In: Multiresistente Erreger im Gesundheitswesen. Hygienemaßnahmen in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen (2. Aufl., S. 9-15). Wiesbaden: mhp-Verlag. ISBN 978-3-88681-133-5
- Scott E M, Arnold C, Dowell S und Suchodolski J S (2019): Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PloS one*, 14(4), e0214877. DOI: 10.1371/journal.pone.0214877
- Seeger M G, Corrêa L F D, Clothier K A, Loy J D und Cargnelutti J F (2021): Isolation of *Moraxella spp.* from horses with conjunctivitis in Southern Brazil. *Braz J Microbiol*, 52(3), 1643-1648. DOI: 10.1007/s42770-021-00507-1
- Smith S M und Giuliano E A (2017): Diseases of the Nasolacrimal System and Ocular Adnexa. In: B C Gilger (Hrsg.), *Equine Ophthalmology* (4. Aufl., S. 187-252). Oxford: Wiley Blackwell. ISBN 978-1-119-78225-4
- Songer J G und Post K W (2005a): The genera *Moraxella* and *Neisseria* In: *Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease* (S. 169-173): Elsevier Saunders ISBN-13: 978-0-7216-8717-9
- Songer J G und Post K W (2005b): The genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* In: *Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease* (S. 154-162): Elsevier Saunders ISBN-13: 978-0-7216-8717-9
- Sudhalkar A, Majji A B, Chhablani J und Manderwad G (2014): *Pantoea agglomerans* endophthalmitis: clinical features and outcomes. *Retina*, 34(8), 1702-1706. DOI: 10.1097/iae.0000000000000127
- Sweeney C R und Irby N L (1996): Topical treatment of *Pseudomonas sp.*-infected corneal ulcers in horses: 70 cases (1977-1994). *J Am Vet Med Assoc*, 209(5), 954-957
- Tolar E und Hendrix D V H (2005): *Equine Infectious Keratitis: Diagnosis and Treatment*. *VetFolio*, 27(5)
- Valentin-Weigand P (2011): Antimikrobielle Wirkstoffe. In: H-J Selbitz, U Truyen und P Valentin-Weigand (Hrsg.), *Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. (9. Aufl., S. 125-129). Stuttgart: Enke Verlag. ISBN 978-3-8304-1080-5
- van der Kolk J H, Endimiani A, Graubner C, Gerber V und Perreten V (2019): *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist*, 16, 59-71. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.08.011
- Venincasa V D, Kuriyan A E, Flynn H W, Jr., Sridhar J und Miller D (2015): Endophthalmitis caused by *Pantoea agglomerans*: clinical features, antibiotic sensitivities, and outcomes. *Clin Ophthalmol*, 9, 1203-1207. DOI: 10.2147/ophth.S80748
- Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig (2023). VETIDATA. Abgerufen am 03.03.2023, 2023. Verfügbar unter <https://vetidata.de/public/aktuelles/meldungen.php?params=113,74,65,74,139,131,74,67,74,50,123,117,137,50,75,131,74,67,74,50,65,70,68,50,75,141>
- Walterson A M und Stavrinides J (2015): *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Rev*, 39(6), 968-984. DOI: 10.1093/femsre/fuv027
- Werckenthin C, Böttner A, Hafez H und Hartmann K (2005): Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die Empfindlichkeitsprüfung. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 118, 471-480

7. Literaturverzeichnis

- Zak A, Siwinska N, Slowikowska M, Borowicz H, Ploneczka-Janeczko K, Chorbinski P und Niedzwiedz A (2018): Conjunctival aerobic bacterial flora in healthy Silesian foals and adult horses in Poland. *BMC Vet Res*, 14(1), 261. DOI: 10.1186/s12917-018-1598-6
- Zheng W, Porter E, Noll L, Stoy C, Lu N, Wang Y, Liu X, Purvis T, Peddireddi L, Lubbers B, Hanzlicek G, Henningson J, Liu Z und Bai J (2019): A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of five bovine pinkeye pathogens. *J Microbiol Methods*, 160, 87-92. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.03.024
- Zubrod C J, Farnsworth K D und Oaks J L (2004): Evaluation of arthrocentesis site bacterial flora before and after 4 methods of preparation in horses with and without evidence of skin contamination. *Vet Surg*, 33(5), 525-530. DOI: 10.1111/j.1532-950X.2004.04074.x

8. Publikationsverzeichnis

Schieder A-K, Müller E, Heusinger A, Eule J C (2021): Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – Geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 37(3), 292–301, DOI 10.21836/ PEM20210311

Schieder A-K, Müller E, Heusinger A, Eule J C (2023). Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 39(1), 12-23, DOI 10.21836/PEM20230102

Schieder A-K, Müller E, J C Eule (2020). The aerobic bacterial spectrum in horses with ocular diseases, Poster DVG-Vet-Congress 2020

9. Danksagung

Frau Prof. Dr. Eule danke ich für die Möglichkeit der Dissertation, ihre fachliche Beratung und Ihre wegweisenden Tipps, die mich aus mancher gedanklichen Sackgasse geführt haben.

Frau Dr. Müller hat den Kontakt zu Frau Prof. Dr. Eule hergestellt und mir damit die Möglichkeit der Dissertation eröffnet. Sie stand mir insbesondere, wenn es zeitlich mal knapp wurde – nicht nur fachlich, sondern vor allem auch als Motivatorin in schwierigen Zeiten zur Seite. Dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

Frau PD Dr. Rachel Marschang danke ich für die Unterstützung bei den englischsprachigen Zusammenfassungen beider Artikel.

Bei Herrn Dr. Heusinger bedanke ich mich für seine offene Bürotür, bzw. sein offenes Ohr für die kleinen Probleme im Laboralltag, sowie für die Flexibilität in der Arbeitsplanung, wenn ich mal ganz spontan Urlaub brauchte, um an der Dissertation weiterarbeiten zu können.

Frau Dr. Bismarck danke ich für das Lesen so mancher Entwürfe und für die Hilfe aus dem Statistikdschungel.

Ein großes Dankeschön geht auch an alle Mitarbeiter/innen der mikrobiologischen Abteilung von Laboklin, insbesondere an die „Grün-Ableser“, die Mitarbeiter vom „Anti-Platz“ und die „MALDI-Experten“.

Und nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken:

Opa Egon, der wahrscheinlich als einziger immer daran geglaubt hat, dass ich tatsächlich mal Tierärztin werde, meinen Eltern, die mir immer den Freiraum gegeben haben, das zu tun, was mir am Herzen liegt und vor allem meinem Mann, der mir, wann immer möglich, nicht nur Zeit freischaufelte, indem er Kinder, Haushalt und Tiere jonglierte, sondern mich auch bei diversen Computerproblemen unterstützt hat, wenn meine Nerven blank lagen.

Ich bin beruflich wie privat sehr glücklich darüber, von solch tollen Menschen umgeben zu sein, vielen Dank dafür.

10a) Finanzierungsquellen

Die ausgewerteten Proben entstammten der Routinediagnostik von Laboklin GmbH & Co. KG. Es wurden daher nur die Untersuchungen durchgeführt, die auch von den Einsendern angefordert waren. Zusätzliche Kosten entstanden Laboklin GmbH & Co. KG hierdurch nicht. Alle Zusatzleistungen, die in Zusammenhang mit der Dissertation stehen, wurden von der Autorin in ihrer Freizeit erbracht.

10b) Erklärung zu Interessenskonflikten

Ich, Ann-Kathrin Schieder, bin bei dem veterinärmedizinischen Diagnostiklabor LABOKLIN GmbH & Co. KG als Tierärztin in der mikrobiologischen Abteilung angestellt. Ein Interessenskonflikt ergibt sich hieraus nicht.

11. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Hammelburg, den 26.03.2023

Ann-Kathrin Schieder