

Aus dem Zentrum für klinische Tiermedizin  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Ralf S. Mueller

***In-vivo*-Effektivität eines Chlorhexidin und  
Tris-EDTA enthaltenden Ohrreinigers, Daten  
zur Resistenzlage bei caniner *Otitis externa*  
isolierter Bakterien sowie der Vergleich  
zytologischer Schnellfärbeverfahren**

Inaugural-Disseration  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

von  
Cosima Bouassiba  
aus Krefeld

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Mueller
Korreferent/en:	Priv.-Doz. Dr. Monika Rinder

Tag der Promotion: 20. Juli 2013

**Meinen Kindern:**

**Raduan und Ramón**

## Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>IV</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>V</b>
<b>I EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
1. ANATOMIE DES OHRES/TROMMELFELLS	3
1.1 AURIS EXTERNA	3
1.2 AURIS MEDIA	7
1.3 AURIS INTERNA	8
2. ERKRANKUNGEN DER OHRMUSCHEL OHNE OTITIS EXTERNA	11
3. DIE OTITIS EXTERNA	12
3.1 ÄTIOLOGIE DER OTITIS EXTERNA	14
3.1.1 Prädisponierende Faktoren	14
3.1.2 Perpetuierende Faktoren	15
3.1.2.1 Otitis media	15
3.1.2.2 Mikrobielle Faktoren	16
3.1.2.2.1 Kokken	17
3.1.2.2.2 Stäbchen	20
3.1.2.2.3 Hefen	22
3.1.3 Primärursachen	23
3.1.3.1 Fremdkörper	23
3.1.3.2 Ektoparasiten	24
3.1.3.3 Allergien/Überempfindlichkeitsreaktionen	28
3.1.3.4 Keratinisierungsstörungen/Endokrinopathien	30
3.1.3.5 Autoimmunopathien	31
3.1.3.6 Neoplasien und andere Gewebeumfangsvermehrungen im äußeren Gehörgang	32
3.2 DIAGNOSTIK DER OTITIS EXTERNA	33
3.2.1 Anamnese	33
3.2.2 Klinik der Otitis externa	34
3.2.3 Otoskopie	36
3.2.4 Zytologie	38
3.2.4.1 Schnellfärbeverfahren	43
3.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen	45
3.2.6 Bildgebende Verfahren	47
4. MANAGEMENT UND THERAPIE DER OTITIS EXTERNA	47
4.1 KONSERVATIVE THERAPIE	48
4.1.1 Lokale Therapie	48
4.1.1.1 Spülung/Ohrreiniger	48
4.1.1.2 Medikamentöse lokale Therapie	51
4.1.2 Systemische Therapie	55
4.2 CHIRURGISCHE THERAPIE	56
<b>III KUMULATIVER TEIL DER DISSERTATION</b>	<b>59</b>



<b>KAPITEL I: BOUASSIBA C, OSTHOLD W, MUELLER RS. VERGLEICH VON VIER ZYTOLOGISCHEN FÄRBEVERFAHREN FÜR OHRABSTRICHE BEIM HUND. ....</b>	<b>59</b>
<b>KAPITEL II: BOUASSIBA C, OSTHOLD W, MUELLER RS. AKTUELLE RESISTENZLAGE DER BEI DER CANINEN <i>OTITIS EXTERNA</i> ISOLIERTEN BAKTERIEN IN NORDRHEIN-WESTFALEN, DEUTSCHLAND (2009-2010) .....</b>	<b>59</b>
<b>KAPITEL III: BOUASSIBA C, OSTHOLD W, MUELLER RS. <i>IN-VIVO</i>-WIRKSAMKEIT EINES CHLORHEXIDIN UND TRIS-EDTA ENTHALTENDEN OHRREINIGERS - EINE RANDOMISIERTE, PLAZEBOKONTROLLIERTE DOPPELBLINDSTUDIE. ....</b>	<b>59</b>
<b>KAPITEL I: VERGLEICH VON VIER ZYTOLOGISCHEN FÄRBEVERFAHREN FÜR OHRABSTRICHE BEIM HUND .....</b>	<b>60</b>
<i>TIERÄRZTL PRAX 2013; 41(K): 7-15</i> ZUSAMMENFASSUNG .....	60
SUMMARY .....	62
EINLEITUNG .....	63
MATERIAL UND METHODEN .....	64
ERGEBNISSE .....	68
DISKUSSION.....	70
LITERATURVERZEICHNIS.....	74
ABBILDUNGSVERZEICHNIS/TABELLEN .....	77
<b>KAPITEL II: AKTUELLE RESISTENZLAGE DER BEI DER CANINEN <i>OTITIS EXTERNA</i> ISOLIERTEN BAKTERIEN IN NORDRHEIN-WESTFALEN, DEUTSCHLAND (2009-2010) .</b>	<b>88</b>
<i>PRAKT TIERARZT 2013; 94: 486-496</i> .....	88
ZUSAMMENFASSUNG .....	89
SUMMARY .....	90
EINLEITUNG .....	91
MATERIAL UND METHODEN .....	92
ERGEBNISSE .....	94
DISKUSSION.....	96
LITERATURVERZEICHNIS.....	104
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	109
<b>KAPITEL III: <i>IN-VIVO</i>-WIRKSAMKEIT EINES CHLORHEXIDIN UND TRISEDTA ENTHALTENDEN OHRREINIGERS-EINE RANDOMISIERTE, PLAZEBOKONTROLLIERTE DOPPELBLINDSTUDIE .....</b>	<b>111</b>
ZUSAMMENFASSUNG .....	112
SUMMARY .....	113
EINLEITUNG .....	114
MATERIAL UND METHODEN .....	115
ERGEBNISSE .....	120
DISKUSSION.....	124
TABELLEN .....	130
LITERATURVERZEICHNIS.....	135
 <b><u>V DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>140</u></b>
 1. VERGLEICH VON VIER ZYTOLOGISCHEN FÄRBEVERFAHREN FÜR OHRABSTRICHE BEIM HUND.....	141
2. AKTUELLE RESISTENZLAGE DER BEI DER CANINEN <i>OTITIS EXTERNA</i> ISOLIERTEN BAKTERIEN IN NORDRHEIN-WESTFALEN, DEUTSCHLAND (2009/2010) .....	146
3. <i>IN-VIVO</i> -WIRKSAMKEIT EINES CHLORHEXIDIN UND TRIS-EDTA ENTHALTENDEN OHRREINIGERS.....	153
4. SCHLUSSFOLGERUNG .....	158
 <b><u>V ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>160</u></b>

<b><u>VI</u></b>	<b><u>SUMMARY.....</u></b>	<b><u>162</u></b>
<b><u>VII</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>164</u></b>
<b><u>VIII</u></b>	<b><u>ANHANG .....</u></b>	<b><u>189</u></b>
	<b>1. TABELLEN .....</b>	<b>189</b>
	<b>2. ABBILDUNGEN .....</b>	<b>203</b>
<b><u>IX</u></b>	<b><u>EIN HERZLICHES DANKESCHÖN.....</u></b>	<b><u>214</u></b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	<i>Arteria</i>
alfa	Alfavet Otitis Schnellfärbeset
ASIT	allergenspezifische Immuntherapie
BERA	Brainstem-evoked response audiometry
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzenimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzenimeter
CT	Computertomographie
DDT	disc diffusion test
Diff	Diff-Quik <sup>®</sup>
Diffac	Diff-Quik <sup>®</sup> mit Aceton-Vorabtauchverfahren
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Gl.	<i>Glandula</i>
gram	Gram-color-Färbeset <sup>®</sup>
HPF	high power field
ID	individuelle Studiennummer/Identifikation
Ig	Immunglobulin
IKT	Intrakutantest
KbE	Koloniebildende Einheiten
kDa	kilo Dalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
Lc.	<i>Lymphozentrum</i>
M.	<i>Musculus</i>
M.a.e.	<i>Meatus acusticus externus</i>
mg	Milligramm
MIC	Minimal inhibitorische Konzentration
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MPV	mutant prevention concentration
MRT	Magnetresonanztomographie

MSW	mutant selection window
mV	Millivolt
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
<i>N.</i>	<i>Nervus</i>
<i>OE</i>	<i>Otitis externa</i>
<i>OM</i>	<i>Otitis media</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
sp.	Spezies
spp.	Spezies
subsp.	Subspezies
TM	Tympanic membrane; Trommelfell
<i>V.</i>	<i>Vena</i>

## I Einleitung

Die canine *Otitis externa* ist einer der häufigsten Vorstellungsgründe in der tierärztlichen Praxis; die Prävalenz liegt bei fünf bis 20 Prozent (AUGUST, 1988). Die Entzündung des äußeren Gehörganges ist eine multifaktorielle Erkrankung (MCKEEVER & TORRES, 1997). Eine Differenzierung in Primärursachen, häufig Allergien, Ektoparasiten oder Fremdkörper, prädisponierende Faktoren, beispielsweise Gehörgangstenosen, und perpetuierende Faktoren, vorwiegend Mikroorganismen, hat sich etabliert (AUGUST, 1988; ANGUS, 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Bakterien spielen hier eine wichtige Rolle (AUGUST, 1988; HARIHARAN et al., 2006). Staphylokokken, vor allem *Staphylococcus pseudintermedius*, und Hefen, vorwiegend *Malassezia* spp., gehören in geringer Zahl zur normalen Gehörgangsflora. *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli* und andere gram-negative Stäbchen werden hauptsächlich bei chronischen Otitiden isoliert (KISS et al., 1997a; AOKI-KOMORI et al., 2007). Aufgrund schwieriger Resistenzlage ist die *Pseudomonas aeruginosa*-Otitis häufig therapieresistent. Die Erkennung von Stäbchen ist somit besonders wichtig (YOSHIDA et al., 2002; TATER et al., 2003; ANGUS, 2004). Die Diagnostik umfasst neben klinischer Untersuchung und Otoskopie die Zytologie des Exsudates zur Detektion von Mikroorganismen und Entzündungszellen (ANGUS, 2004; ROSSER, 2004). Sie ermöglicht die Differenzierung einer Infektion von bakterieller Überbesiedelung (ANGUS, 2004; MORRIS 2004, OSTHOLD et al., 2005), ist preiswert, einfach und dient einem schnellen Therapiebeginn wie auch der Therapiekontrolle (ANGUS, 2004; OSTHOLD & WAGNER, 2009). Routinemäßig kommt eine Schnellfärbung vom Romanowsky-Typ wie Diff-Quik® oder Hemacolor® analog zu Blutausstrichen zum Einsatz (BAKER & LUMSDEN, 2000) teils auch die Gramfärbung (OSTHOLD et al., 2005; MENDELSON et al., 2006). Eine Arbeitserleichterung kann ein einphasiges Färbesystem sein. Hitze-fixation oder Vorabtauchen in Aceton sind Optionen zur Qualitätsoptimierung (OSTHOLD et al., 2005; GRIFFIN et al., 2007; OSTHOLD & WAGNER, 2009). Eine semiquantitative Beurteilung ist möglich (GINEL et al., 2002; BUDACH & MUELLER, 2012). Das zytologische Bild kann in Relation gesetzt werden zur bakteriologischen Untersuchung mit Antibiotogramm (ANGUS, 2004;

MENDELSON et al., 2006). Eine *Otitis externa* wird mit Gehörgangsräumungen sowie topischer antibakterieller/antimykotischer Medikation, teils mit steroidal Antiphlogistika (lokal und/oder systemisch) angegangen. Eine sorgfältige Gehörgangsräumung/-spülung ist bei exsudatreichen Ohren essentiell (KOWALSKI, 1988; NUTALL & COLE, 2004). Steigende Resistenzbildung und eventuelle gegenseitige Übertragung resistenter Keime oder von Resistenzgenen bei Haustier und Menschen bedingen die Suche nach Alternativen oder synergistischen Ergänzungen zu Antibiotika (GUARDABASSI et al., 2004). Ohrreiner enthalten meist Komponenten wie Adstringentien, Zeruminolytika, Surfactants oder auch Antiseptika wie Chlorhexidin und Tris-EDTA (NUTALL & COLE, 2004; GUARDABASSI et al., 2008). Chlorhexidin schädigt die Membran gram-positiver wie gram-negativer Bakterien. Der Chelatbildner Tris-EDTA konkurriert kompetitiv mit den Mikroorganismen um Calcium- und Magnesiumionen und stört so die mikrobielle Zellwandsynthese (GOLDSCHMIDT & WYSS, 1967; VAARA, 1992). Chlorhexidin und Tris-EDTA zeigen Synergismus, einerseits an vorselektierten Bakterienisolationen (HARPER & EPIS, 1987) andererseits bei diversen von caniner *Otitis externa* isolierten Keimen (GUARDABASSI et al., 2009). Placebokontrollierte *in-vivo*-Studien, die solche Wirkungen bestätigen, fehlen in der Literatur.

Die Ziele dieser Studie waren, vier verschiedene differenzierend färbende Verfahren für Ohrabstriche einschließlich Gram<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> mit/ohne Aceton und eine Otitis-Schnellfärbung bei semiquantitativer Beurteilung zu vergleichen, die Resistenzlage der bei der caninen *Otitis externa* isolierten Keime zu erfassen sowie in einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie die *in-vivo*-Wirksamkeit eines Chlorhexidin/Tris-EDTA enthaltenden, kommerziellen Ohrreiners in Kombination mit topischem Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol im Hinblick auf die zytologisch verifizierbare Reduktion der mikrobiellen Besiedelung zu ermitteln.

## II Literaturübersicht

### 1. Anatomie des Ohres/Trommelfells

Das Ohr dient der akustischen Orientierung und Regulation der Lage im Raum durch Verarbeitung der eingehenden Schallwellen sowie der Kommunikation mittels Mimik (NICKEL et al., 1992c; COLE, 2010). Es geht embryologisch aus den ersten zwei Kiemenbögen mit Anteilen aus allen drei Keimblättern hervor. Das ektodermale Labyrinthbläschen bildet das Innenohr mit Bogengängen und Schnecke und den *Nervus (N.) vestibulocochlearis*; die knöcherne Umgebung entstammt dem Kopfmesenchym. Das Mittelohr ist mesenchymal. Die erste Schlundtasche wird zur *Tuba auditiva*. Die Auskleidung ist entodermal; Hammer und Amboß entstammen dem ersten, der Steigbügel dem zweiten Kiemenbogen. Das äußere Ohr hat mesenchymale und ektodermale Anteile. Das Trommelfell (*tympanic membrane*, TM) entsteht aus allen drei Keimblättern: dem ektodermalen Epithel, der mesenchymalen Zwischenschicht und der entodermalen Innenschicht (SCHNORR, 1989).

Makroskopisch-anatomisch wird das Ohr in folgende drei Abschnitte eingeteilt:

1. äußeres Ohr (*Auris externa*, Abb. 1) mit Trommelfell (TM, Abb. 2)
2. Mittelohr (*Auris media*, Abb. 3)
3. Innenohr (*Auris interna*) (NICKEL et al., 1992c)

#### 1.1 *Auris externa*

Die Ohrmuschel (*Aurikel*, *Pinna*) und der äußere Gehörgang, *Meatus acusticus externa* (*M.a.e.*) bilden das äußere Ohr (NICKEL et al., 1992a). Obgleich die Zuchtauswahl Extreme (kurzes/langes Stehohr, Fledermausohr, Kippohr, Rosenohr, Hängeohr) provoziert, sind Anatomie und Funktion im Wesentlichen vergleichbar (NICKEL et al., 1992c). Die Ohrmuschel weist eine caudomediale konvexe Seite, *Dorsum auriculae*, mit lockerer bindegewebiger Verbindung zum Knorpel und eine rostralaterale konkave Seite, *Scapha*, mit festansitzender Haut auf (HARVEY et al., 2001). Die Ohrmuschelbegrenzung, *Helix*, gliedert sich in

einen rostromedialen und einen caudolateralen Anteil mit Verbindung am *Apex auriculae*. Kaudal befindet sich die Henri'sche Tasche (GOTTHELF, 2005). Gegenüberliegend sind *Tragus* und zweiteiliger *Antitragus*, zwischen welchen die *Incisura intertragica* liegt (NICKEL et al., 1992c).

Unter der Kopf-, Nacken- und Halshaut befinden sich dorsal Anteile der *Fascia temporalis superficialis* und ventral die *Fascia parotidomasseterica*; darunter liegen das *Platysma* und der *Muskulus (M.) spinster colli profundus* (NICKEL et al., 1992a). Insgesamt befinden sich 19 verschiedene Muskeln am Ohr, welche die unabhängige Bewegung des einzelnen Ohres ermöglichen (MARIGNAC, 2005). Die Muskeln der Ohrmuschel sind im Bereich des Schildchenknorpels, *Scutulum*, der *M. scutularis*, darunter die Heber, Niederzieher, Auswärtszieher, Einwärtszieher und Dreher. (NICKEL et al., 1992a). Der *Cartilago auricula* bildet mit dem *Cartilago anularis* die elastische Knorpelgrundlage, *Concha auricula*, für die *Aurikel* und den äußeren Gehörgang. Dieser verläuft zunächst cranioventral und biegt dann im 70° Winkel nahezu horizontal nach medial ab. Am *Porus acusticus externus* mündet er in den *M.a.e. osseus*, welcher mit der Insertion des TM endet (NICKEL et al., 1992c). Bänder ermöglichen eine aktive Bewegung der Ohrmuschel (MARIGNAC, 2005).

Die motorische Innervation erfolgt über den *N. facialis* als VII. Gehirnnerv, caudal des *Porus acusticus externus* aus dem *Foramen stylomastoideum* kommend und unter der *Glandula (Gl.) parotis* verlaufend; sensorisch über Anteile des *N. trigeminus*, des *N. vagus* sowie des zweiten Cervikalnerven (NICKEL et al., 1992c). Die Blutversorgung ist über die *Arteria (A.) temporalis superficialis*, der *A. carotis externa* entspringend, und vor allem die in unmittelbarer Nähe zum vertikalen *M.a.e.* verlaufende *A. auricularis caudalis* mit ihren longitudinal über die Dorsalfläche der Ohrmuschel verlaufenden Aufzweigungen gesichert (COLE, 2010). Über den Rand der Helix sowie über Poren in der *Scapha* erfolgt die Versorgung der konkaven Seite (GOTTHELF, 2005). Der venöse Abfluss erfolgt analog über die *Vena (V.) temporalis superficialis* und *V. auricularis caudalis* in die *V. maxillaris*. Das *Lymphozentrum (Lc.) parotideum* sichert über den *Truncus jugularis* den Lymphabfluss (NICKEL et al., 1992b).

Mikroskopisch-anatomisch entspricht die Auskleidung als mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel mit Adnexen, dünner Dermis und Subcutis der



äußeren Haut (LIEBICH, 1993; GOTTHELF, 2005). Es sind nur wenige Haarfollikel in Richtung TM vorhanden; bei für *Otitis externa* (OE) prädisponierten Rassen in höherer Dichte (STOUT-GRAHAM et al., 1990; GOTTHELF, 2005). Vor dem TM sind ventral einige feine Haare (STOUT-GRAHAM et al., 1990). Der Reinhaltung dient die epitheliale Migration in Richtung *Concha auricula* (HARVEY et al., 2001). Die Anzahl der Talgdrüsen und apokrinen Schweißdrüsen (Ceruminaldrüsen) variiert rassespezifisch, das Verhältnis von Ceruminaldrüsen zu Talgdrüsen nimmt nach distal hin ab (STOUT-GRAHAM et al., 1990; HARVEY et al., 2001). Prädisponierte Rassen haben mehr Ceruminaldrüsen und hyperkeratotisches Epithel (STOUT-GRAHAM et al., 1990; ANGUS et al., 2002; GOTTHELF, 2005); die Talgdrüsen sind für die Prädisposition belanglos (STOUT-GRAHAM et al., 1990). Langhaarrassen haben mehr Drüsen als Kurzhaarrassen (FERNANDO, 1966). Ceruminaldrüsen bestehen aus kubischen bis prismatischen Zellen mit knospenartigen apikalen Fortsätzen, basophilen Pigmentgranula im Zytoplasma und rundem Kern. Die oberflächlich gelegenen Talgdrüsen (einfache alveoläre holokrine Drüsen) bestehen aus großen, blasigen, lipidgefüllten, von Basalzellen umgebenen Zellen (LIEBICH, 1993). Die Steuerung erfolgt hormonell. Testosteron bedingt Hypertrophie, Cortisol und Östrogen Involution (KOCH & PETERS, 1991). Das Ohrsekret, Cerumen, besteht aus abgeschilferten Epithel und Drüsensekret der Talg- und Ceruminaldrüsen (Neutrallipide, Cholesterin und seine Ester, Squalen, Wachse veresterte Fettsäuren). Es erfüllt Barriere-, Reinigungs- und lokale Schutzfunktionen durch Immunglobuline (Ig) und antimikrobielle Peptide, Interleukine und Lysozym (HARVEY et al., 2001; GOTTHELF, 2005). Talgdrüsen sezernieren dickflüssigere Neutrallipide, Ceruminaldrüsen dünnflüssigere Phospholipide und saure Mukopolysaccharide (ANGUS, 2005). Der Lipidgehalt liegt bei 50 Prozent, sinkt bei OE auf 25 Prozent und kann so die erhöhte Feuchtigkeit bei OE bedingen (GRONO, 1970 b; HAYES et al., 1987). Der pH-Wert im Ohr gesunder Hunde liegt bei 6,1 - 6,2 und ändert sich bei akuter OE in den sauren Bereich (pH 5,7). Bei *Pseudomonas*-Infektion wurde allerdings eine Veränderung auf etwa 6,85 festgestellt (GRONO, 1970 a). Der *M.a.e.* verengt sich nach proximal und ist körperrgewichtabhängig fünf bis zehn Zentimeter (cm), im Mittel 5,3 cm, lang (HUANG et al., 2009) bei einem Durchmesser von vier bis fünf Millimeter (mm) direkt am TM (GOTTHELF, 2005; HUANG et al., 2009). Bei einigen Rassen wie

Shar-Pei, Bulldogge, Bullterrier und Cocker Spaniel ist er enger (NUTALL & COLE, 2004). Das Volumen beträgt rasseabhängig 1,98 Kubikzentimeter ( $\text{cm}^3$ ) bis 9,61  $\text{cm}^3$  (bei 1,15 - 20 Kilogramm Körpergewicht, kgKGW), was einer Oberfläche von zwölf bis 38,5 Quadratzentimeter ( $\text{cm}^2$ ) entspricht (WEFSTAEDT et al., 2011). Rassen mit stark behaarten Hängeohren (beispielsweise Cocker Spaniel) sind laut HAYES und Mitarbeitern (1987) für *OE* prädisponiert, ebenso Hunde mit vermehrter Feuchtigkeit im Gehörgang (HAYES et al., 1987). Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von YOSHIDA und Mitarbeitern (2002), in der keine Unterschiede in Gehörgangtemperatur und -feuchtigkeit bei gesunden und an *OE* erkrankten Hunden festgestellt wurden (YOSHIDA et al., 2002). Die Temperatur im Gehörgang ist weniger bedeutsam; sie ist bei kleineren, älteren, stärker behaarten Hunden geschlecht- und ohrformunabhängig niedriger (HUANG & HUANG, 1999). Die relative Feuchte im Gehörgang gesunder Hunde liegt bei 80,4 (+/- 2,3) Prozent, die Temperatur bei 38,2 - 38,4°C (GRONO, 1970a). Im gesunden Gehörgang findet man vorwiegend gram-positive Kokken (*Staphylococcus pseudintermedius*, koagulase-negative Staphylokokken, Mikrokokken), Hefen (Malassezien) und nur selten gram-negative Stäbchen (*Pseudomonas*, *Proteus* und andere) (YOSHIDA et al., 2002; AOKI-KOMORI et al., 2007; LYSKOVA et al., 2007). In zehn Prozent der Ohren sind keine Keime nachweisbar (HARVEY et al., 2001; AOKI-KOMORI et al., 2007). Bei Chronizität findet man häufiger gram-negative Stäbchen (DICKSON & LOVE, 1983; KOWALSKI, 1988).

Das TM (Abb. 2) bildet die Grenze zum Mittelohr und ist eine im 45° Winkel schräg gestellte längsovale semitransparente Membran. Sie leitet die Schwingungen auf die Gehörknöchelchen (NICKEL et al., 1992c). Dorsal liegt die weiß-violette, gut kapillarisierte *Pars flaccida*; ventral die größere *Pars tensa*. Sie ist glänzend durchscheinend, fester gespannt, weniger kapillarisiert und von feinen Striae durchzogen (LIEBICH, 1993). Das von medial am *Stratum proprium* inserierende *Manubrium malleoli* (Hammer) scheint durch und bewirkt eine leichte Wölbung (COLE et al., 2007). Von dieser Stelle, dem Trommelfellnabel (*Umbo membranae tympani*), beginnt die beim Hund vorwiegend radiär verlaufende epitheliale Migration (GOTTHELF, 2005; TABACCA et al., 2011). Sie wird über die Blutversorgung kontrolliert (MAKINO & AMATSU, 1986). Minderdurchblutung verzögert die epitheliale Migration und kann Cholesteatome

provozieren (WHITE-WEITHERS, 2005). Bei der epithelialen Migration beim Menschen wandern etwa 2/3 der Trommelfelloberfläche nach caudodorsal und 1/3 radiär vom Zentrum zum Limbus, die Migration beträgt etwa 0,07 mm/Tag. Narben stören nicht; Perforationen werden umgangen; eine Einwanderung in das Mittelohr bei rupturiertem TM findet nicht statt (FRANZ, 1966). Ein rupturiertes TM ist bei Vaskularisation und Ventilation nach drei Wochen bis vier Monate geheilt. Bei chronischen pathologischen Vorgängen jedoch kann hyperkeratotisches Epithel in das Mittelohr einwachsen. Ceruminolithen können einer fehlerhaften epithelialen Migration folgen (GOTTHELF, 2005). Das TM ist aus einem gehörgangseitigen *Stratum cutaneum* mit epithelialer Migration, einem mittleren *Stratum proprium* mit radiären und zirkulären kollagenen und elastischen Fasern, Nerven und Blutgefäßen und einem bullaseitigen *Stratum mucosa* mit respiratorischem Epithel dreischichtig aufgebaut (LIEBICH, 1993; ANGUS, 2005). Das TM wird zur Peripherie, dem *Anulus fibrocartilagineus*, hin dicker (NUTALL & COLE, 2004). *Pars tensa* und *Pars flaccida* und deren Gehalt an Kollagen Typ II, III und IV (KNUTSSON, 2010), Elastin, Mastzellen und Makrophagen variieren tierartspezifisch. Ein diesbezüglicher Zusammenhang mit Cholesteatomen ist nicht bekannt (CHOLE & KODAMA, 1989; COLE et al., 2007). Die beim Hund teils vorgewölbte *Pars flaccida* zeigt im Vergleich zur nicht vorgewölbten *Pars flaccida* keine Strukturunterschiede; der gesteigerte Mittelohrdruck scheint für die Vorwölbung verantwortlich (COLE et al., 2007). Eine Ausnahme ist die primäre sekretorische *Otitis media (OM)* des Cavalier King Charles Spaniel, bei der Mucus das Mittelohr füllt und das TM vorwölbt (STERN-SERTHOLTZ et al., 2003). Das TM hat keine Haarfollikel oder Drüsen (LIEBICH, 1993).

## 1.2 *Auris media*

Die Aufgabe des Mittelohres ist die Weiterleitung der Schwingungen vom TM zum Innenohr (ZENNER, 1994). Makroskopisch-anatomisch umfasst es die medial des TM liegende Paukenhöhle (*Cavum tympani*) mit den Gehörknöchelchen (*Ossicula audita*) dorsal im *Recessus epitympanicus* sowie ventral die *Bulla tympanica* und die *Tuba auditiva*. Dazwischen liegt das *Mesotympanicum*. Medial folgt das Innenohr. Knöcherne Grundlage bildet

hauptsächlich die *Pars tympanica* der Felsenbeinpyramide (*Os temporale*). Die Gehörknöchelchen, Hammer (*Malleus*), Amboß (*Incus*), Linsenbeinchen (*Os lenticulare*) und Steigbügel (*Stapes*) sind die flexible Verbindung zum *Fenestra vestibuli* des Innenohrs (NICKEL et al., 1992a). Der *M. tensor tympani*, vom *N. trigeminus* innerviert, und der *M. stapedius*, vom *N. facialis* innerviert, vermindern bei Kontraktion die Schwingungen und bedingen so den protektiven Reflex des TM (GOTTHELF, 2005). Kontraktionen des *M. tensor tympani* festigen das TM, des *M. stapedius* reduzieren bei überlautem Reiz die Bewegungen des Steigbügels (COLE, 2010). An die dorsale *Bulla tympanica* im Bereich des *Promontoriums* schließt sich das runde Fenster, *Fenestra rotunda*, als Verbindung zur dorsomedial liegenden *Cochlea* an (ZENNER, 1994). Mikroskopisch-anatomisch besteht die Auskleidung aus einschichtigem, sekretorischem Epithel, welches die ventrale Paukenhöhle, die Gehörknöchelchen, die Fenster zum Innenohr und als *Stratum mucosa* das Trommelfell überzieht (LIEBICH, 1993). In der Paukenhöhle herrscht aufgrund Gasresorption seitens dieses Epithels ein geringer Unterdruck (BLUESTONE & DOYLE, 1988). Die *Tuba auditiva* ist mit mehrschichtigem Flimmerepithel mit Becherzellen und Drüsen ausgekleidet (LIEBICH, 1993). Ihre Aufgaben sind Luftdruckregulation im Mittelohr und Sekretabfluss. Sie besteht aus knöchernen und knorpeligen Anteilen. Eine Öffnung der knorpeligen Anteile erfolgt bei geöffnetem Fang aktiv über den *M. tensor veli palatini*. Dysfunktion bedingt steigenden Mittelohrdruck und provoziert eine OM (BLUESTONE & DOYLE, 1988).

Die Innervation der Mittelohrmukosa erfolgt über den *N. tympanicus* des *N. glossopharyngeus*; die Blutversorgung über die *A. stylomastoidea*, einen Ast der *A. auricularis caudalis* (NICKEL et al., 1992b).

Nahe des *Recessus epitympanicus* liegt der halboffene *Canalis facialis* mit dem *N. facialis*, unter anderem das Auge und mit der *Chorda tympani* die Speicheldrüsen und Geschmackszellen versorgend, und direkt dorsal der *Bulla tympanica* der *Canalis caroticus* mit sympathischen postganglionären Fasern des Auges. Der *N. tympanicus* und der *N. petrosus* für die Speicheldrüsen verlaufen gemeinsam in der Mucosa der *Bulla tympanica* (NICKEL et al., 1992c).

### 1.3 *Auris interna*

Das Innenohr ist das Gehör- und Gleichgewichtsorgan (KUMAR & ROMAN-AUERHAHN, 2005). Es besteht aus dem knöchernen *Labyrinth* der Felsenbeinpyramide (*Pars petrosa* des *Os temporale*) und dem häutigen *Labyrinth* mit Rezeptoren für Gleichgewichts- und Gehörsinn. Beide Teile stehen über die Perilymphe miteinander und mit dem Subarachnoidalraum des Gehirns in Verbindung (NICKEL et al., 1992c). Das knöcherne *Labyrinth* ist in den Vorhof, *Vestibulum* mit *Utriculus* und *Sacculus*, mit caudodorsal anschließenden knöchernen Bogengängen des Gleichgewichtsorgans, *Canales semicirculares*, und die *Cochlea* des Gehörorgans unterteilt (NICKEL et al., 1992c). *Fenestra rotunda* und das vom Steigbügel flexibel verschlossene *Fenestra vestibuli* sind die Verbindungen zum Mittelohr (LIEBICH, 1993). Das häutige *Labyrinth* ist die innere epitheliale Auskleidung, in Vorhof, Bogengängen und Schnecke mit spezifischen Rezeptorzellen für die Sinnesfunktionen (ZENNER, 1994; HARVEY et al., 2001).

Die *Cochlea* besteht aus drei übereinander liegenden in drei Windungen aufgerollten Kanälen oder *Scalen* (LIEBICH, 1993). *Scala vestibuli* und *Scala tympani* sind mit einer der Extrazellulärflüssigkeit entsprechenden Perilymphe gefüllt und stehen am *Helikotrema* miteinander in Verbindung. Die *Scala media* beinhaltet intrazellulärer Flüssigkeit entsprechende Endolymphe mit hoher Kaliumionenkonzentration. Ionenpumpen halten das endocochleäre Potential von +85 milliVolt (mV) zwischen Endolymphe und Perilymphe aufrecht (ZENNER, 1994). Membranen trennen die Räume; die Basilarmembran enthält das Corti-Organ, mit Stütz-, Stereo- und Kinozilien besetzte und von gallertiger Tektorialmembran überdeckte Rezeptorzellen (LIEBICH, 1993). Das Ruhepotential der Haarzellen liegt zwischen -40 und -70 mV; die Potentialdifferenz ist 125 – 155 mV (ZENNER, 1994). Ein Reiz bewirkt die Bewegung der Perilymphe hinter dem *Fenestra ovale*; von dort geht er als Wanderwelle über das *Helikotrema* bis zum *Fenestra rotunda*. Die Verdrängung der Perilymphe bedingt über Membranschwingungen eine Ablenkung der Stereozilien, was zu einer Depolarisation durch KaliumEinstrom führt. Das Amplitudenmaximum der Wanderwelle ist vom eingehenden Schall abhängig, es werden nur bestimmte Areale der *Cochlea* gereizt (Ortsprinzip der Wanderwelle). Die Depolarisation bedingt die Ausschüttung von Transmittern in den synaptischen Spalt am unteren Ende der Haarzellen an die Dendriten der bipolaren

Nervenzellen des *Ganglion spirale*, deren Axone den *N.cochlearis* bilden (ZENNER, 1994).

Das *Labyrinth* mit *Utriculus*, *Sacculus* und den in allen drei Ebenen senkrecht aufeinander stehenden Bogengängen ist ebenfalls mit Perilymphe gefüllt. An der Basis der Bogengänge (Bogengangsorgane) und in *Utriculus* und *Sacculus* (Makulaorgane) befinden sich die mit der Endolymphe in Verbindung stehenden Rezeptorzellen, von gallertiger Membran abgedeckt; in den Makulaorganen zusätzlich mit Calciumcarbonatkristallen versehen (LIEBICH, 1993). Analog zur *Cochlea* bedingt die eingehende Schwingung über Bewegung der Perilymphe eine Depolarisation der Haarzellen und die Transmitterausschüttung, jedoch über die Zwischenstufe des Calciumeintrittes. Der Reiz wird über Fasern des *N. vestibularis* weitergeleitet. Die Makulaorgane registrieren Translationsbeschleunigungen, die Bogengangsorgane Drehbeschleunigungen (HENN, 1994).

Von medial erreichen das Innenohr über den *Meatus acusticus internus* der VIII Gehirnnerv, *N. vestibulocochlearis*, der sich in den *N. vestibularis* und den *N. cochlearis* aufteilt, und Teile des VII Gehirnnerven, *N. facialis* (NICKEL et al., 1992c). Die Sinneswahrnehmungen werden über die *Medulla oblongata* und die zentralen Vestibularis- und Hörbahnen in den Zentren der Gleichgewichtsregulation im Hirnstamm, Kleinhirn und Rückenmark und in der Hörspäre der Großhirnrinde verarbeitet (NICKEL et al., 1992c). Mit dem *N. vestibulocochlearis* gelangt die *A. labyrinthi* durch den *Meatus acusticus internus* in den Vorhof, wo sie sich in Äste für Schnecke und Bogengänge teilt. Der venöse Abfluss erfolgt analog (NICKEL et al., 1992b).

Cochleäre Fehlfunktionen bedingen Schwerhörigkeit bis hin zum Hörverlust, diagnostisch über Audiometrie (BERA, brainstem electrical response audiometry) festzustellen (AXLUND, 2005; TER HAAR, 2006). Potentiell ototoxische Substanzen wie Aminoglycoside, Schleifendiuretika oder Polypeptide schädigen konzentrationsabhängig Haarzellen (DE GROOT et al., 1990; PICKRELL et al., 1993). Chlorhexidingluconat ist in Verbindung mit Cetrimide, einer quarternären Ammoniumverbindung, beim Meerschweinchen ototoxisch (GALLE & VAN HAAGEN, 1886). Unabhängig davon sind einige Rassen für pigment-assoziierte kongenitale Taubheit prädisponiert, wie Dalmatiner, Englische Setter, Englischer Cocker Spaniel und andere Hunde mit Merle-Faktor und/oder blauen Augen

(HARVEY et al., 2001; STRAIN, 2004). Cochleäre Fehlfunktionen sind abzugrenzen von *OM*- oder *OE*-bedingter konduktiver Schwerhörigkeit (Schallwellenweiterleitungsstörung) (STRAIN, 2004; TER HAAR, 2006). Dieses periphere Vestibulärsyndrom muss vom zentralen differenziert werden (COOK, 2004; AXLUND, 2005). Vestibuläre Fehlfunktionen bedingen Kopfschiefhaltung, Manegenbewegung, Facialisparesie, Horner Syndrom, Nystagmus und Strabismus.

## **2. Erkrankungen der Ohrmuschel ohne *Otitis externa***

Mit Ausnahme von Traumata, Abszessen, Granulomen und einigen Neoplasien/Umfangsvermehrungen sind Dermatosen selten auf das Ohr beschränkt (MANSON & GRIFFIN, 1995; HARVEY et al., 2001; MARIGNAC, 2005). Dies sind vor allem Othämatome, umweltbedingte Dermatosen (Erfrierungen und Solardermatitis/Aktinische Keratose), Arthropodenbisse, canine leproide Granulome, Vaskulitis, Kontaktdermatitis nach topischer Medikation, Ohrbrandseborrhoe, kongenitale Hypotrichose, Alopecia areata, hereditäre lupoide Dermatose des Deutsch-Kurzhaar-Pointers und die psoriasiform-lichenoide Dermatitis des Springer Spaniels (MATOUSEK, 2004; MARIGNAC, 2005). Auch die seltene aurikuläre Chondritis zählt dazu (GRIFFIN & TRIMMER, 2007), ebenso züchterisch gewollte Veränderungen wie die Knickohren der Scottish fold Katzen, die mit anderen Missbildungen verbundenen übergroßen Ohren der Manxkatzen oder die Synotie/Aplasie/Atresie mit partiellem oder vollständigem Fehlen verschiedener Gehörganganteile als ungewollte Missbildung (KOCH & PETERS, 1991; KÄHLER et al., 2001).

Auf die Ohren beschränkte Immunopathien sind die proliferative thrombovaskuläre Nekrose und die Kälteagglutininkrankheit (MARIGNAC, 2005; NETT-METTLER, 2010a). Allergien, Autoimmunopathien, Infektionen mit Bakterien oder Pilzen, Endokrinopathien, juvenile Zellulitis, Dermatomyositis, Keratinisierungsdefekte und viele der Ektoparasitosen beziehen das Ohr nur mit ein (ANGARANO, 1988; KOCH & PETERS, 1991; MANSON & GRIFFIN, 1995; MATOUSEK, 2004).

### 3. Die *Otitis externa*

Dermatologische Probleme gehören mit etwa 20 Prozent zu den häufigsten Erkrankungen (SCOTT & PARADIS, 1990; PUNDIR, 2007). Allergien als Primärursache der *OE* sind analog zur Humanmedizin mit steigender Tendenz häufig (LUND et al., 1999; HILLIER & GRIFFIN, 2001). Die *OE* ist mit 2,50 - 3,85 Prozent bei dermatologischen Erkrankungen vertreten (SCOTT & PARADIS, 1990; PUNDIR, 2007). Die Prävalenz der *OE* liegt beim Hund bei fünf bis 20 Prozent (AUGUST, 1988; LUND et al., 1999; PUNDIR, 2007). Die *OE* ist ein Symptom einer unterliegenden Ursache. Eine Aufarbeitung der Primärursachen sollte spätestens bei Chronizität und Rekurrenz erfolgen (ROSSER, 1988; THOMAS, 2006). Rassedispositionen für die *OE* speziell sind etwa beim Cocker Spaniel und Labrador Retriever mit ihren ceruminösen Reaktionsmustern der äußeren Gehörgänge (ANGUS et al., 2002) oder dem Shar-Pei mit seinen engen Gehörgängen beschrieben sowie für mögliche Primärkrankheiten wie Endokrinopathien beim Zwergpudel, Dobermann und Gordon Setter, Allergien beim Boxer, Retriever und Deutschen Schäferhund oder die primäre Seborrhoe des Cocker Spaniels (LOGAS, 1999).

Die *OE*, definiert als eine Entzündung des Gehörgangepithels (HAYES et al., 1987; HARVEY et al., 2001), ist die häufigste Erkrankung des äußeren Gehörganges (AUGUST, 1988; ROSSER, 1988).

Unabhängig von der Primärursache geht die akute *OE* initial mit Rötung und Schwellung einher. Wegen des Ohrknorpels ist eine Schwellung nur Richtung Lumen möglich, was sukzessive zu Verengung und Schmerz durch Nervenreizung führt. Vasodilatation, vermehrte Wärme und Ödem entsprechend jeder Entzündungsreaktion folgen (LOGAS, 1999). Bakterien- und/oder Hefepilzinfektionen aufgrund verminderter Abwehrfunktion komplizieren die *OE* (RYCROFT & SABEN, 1977; CHICKERING, 1988; ANGUS, 2005; OLIVEIRA et al., 2008). Eine erhöhte Proliferation des Epithels ist in der Regel mit einer Hyperplasie der Drüsen und Haarfollikel assoziiert (LOGAS, 1999; HUANG et al., 2009). Im äußeren Gehörgang sammelt sich vermehrt fettiges Cerumen. Polymorphkernige Zellen infiltrieren, gefolgt von Lymphozyten und Mastzellen (ROTH, 1988). Später dilatieren die Ceruminaldrüsen und Haarfollikel (VAN DER GAAG, 1986; LOGAS, 1999). Die Anzahl der Drüsen und Haarfollikel



bleibt gleich (HUANG et al., 2009). Epitheldicke und Grad der Keratinisierung sind proportional zur Schwere der Erkrankung (STOUT-GRAHAM et al., 1990). Entzündliche Polypen und Neoplasien können ein solches Geschehen ebenfalls auslösen (VAN DER GAAG, 1986; ROTH, 1988). Die apokrinen Drüsen werden angeregt. Die Feuchtigkeit im Gehörgang steigt (GOTTHELF, 2005), vor allem, wenn Endokrinopathie oder Seborrhoe zugrunde liegen (ROTH, 1988). Bakterien und Hefen (ROSSER, 1988), Dilatation der Blutgefäße mit vermehrter Permeabilität, Verminderung der epidermalen Barrierefunktion und Veränderungen des Cerumens halten das Geschehen aufrecht (ANGUS, 2005). Ist die Primärursache eine Parasitose können eosinophile Granulozyten einwandern. Bei Allergien sind eventuell viele Plasmazellen, eosinophile Granulozyten und Lymphozyten vorhanden (ROTH, 1988). Gram-negative Organismen wie *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. und *Escherichia coli* können sich etablieren (RYCROFT & SABEN, 1977; YOSHIDA et al., 2002). Bakterielle Exotoxine und Proteasen der neutrophilen Granulozyten bedingen schmerzhaftes purulent-ulzerative Otitiden (COLE, 2004; ANGUS, 2005). Anaerobier werden nicht nachgewiesen (OLIVEIRA et al., 2008). Bei Chronizität verengt sich der Gehörgang zusehends (ANGUS, 2005). Histopathologisch ist nun auch Hyperkeratose vorhanden (VAN DER GAAG, 1986; ANGUS, 2005). Die anfänglich hyperplastischen Talgdrüsen degenerieren. Die Ceruminaldrüsen entzünden sich und führen zu Hyperplasie und Dilatation, was kopfsteinpflasterartig aussieht (ANGUS, 2005). Es kommt zu einer *Adenitis*. Auch die apokrinen Drüsen degenerieren. Eingewanderte Makrophagen initiieren aufgrund ihres Lipofuscins und des Keratins (ROTH, 1988) eine pyogranulomatöse Entzündung. Makrophagencytokine und –wachstumsfaktoren sind beteiligt (ANGUS, 2005). Fibrosierung, Kalzifizierung und Ossifikation einer terminalen *OE* sind irreversibel (COLE, 2004). Vollständige Stenose ist möglich. Eine chirurgische Intervention ist dann unumgänglich (ANGUS, 2005). Eine *OE* kann durch Füllung des in die *Bulla tympanica* gewölbten TM mit Keratin bei gestörter epithelialer Migration zu *OM* oder zu Cholesteatomen führen (LOGAS, 1999). Die Pathomechanismen der chronischen *OE* sind für den Cocker Spaniel rassespezifisch. Im Gegensatz zu anderen Rassen mit vorwiegend fibröser Reaktion zeigt der Cocker Spaniel deutlicher ausgeprägte Hyperplasie und Dilatation der ohnehin schon vermehrt vorhandenen apokrinen Drüsen, was

häufig eine chirurgische Intervention bei chronischer Problematik indiziert. Bei dieser Rasse ist eine frühe Behandlung mit Antiphlogistika zur Vermeidung einer chronischen *OE* wichtig (ANGUS et al., 2002).

### **3.1 Ätiologie der *Otitis externa***

Nur die Primärursachen sind in der Lage, eine *OE* auszulösen. Prädisponierende Faktoren begünstigen eine *OE*; perpetuierende Faktoren halten eine *OE* aufrecht. Die Therapie der *OE* muss alle Faktoren berücksichtigen, um Misserfolg, Rezidiv und Chronizität zu vermeiden (AUGUST, 1988; ROSSER, 1988).

#### **3.1.1 Prädisponierende Faktoren**

Begünstigende Faktoren erhöhen das Risiko einer *OE*. Die Anatomie eines Hundehohres bedingt ein feuchtes Mikroklima. Sind Gehörgänge rassebedingt eng oder stark behaart oder ist der Gehörgang aufgrund von Hängeohren schlechter belüftet kann eine Disposition für *OE* vorliegen. Shar-Pei, Airedale Terrier oder Cocker Spaniel sind Beispiele (LOGAS, 1999; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Kongenitale Atresie/Stenose oder erworbene Stenosen wie Polypen (VAN DER GAAG, 1986; MANSON & GRIFFIN, 1995; LOGAS, 1999; HOUSE, 2001) oder Wucherungen der Talgdrüsen sind prädisponierend (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Die Anzahl apokriner Drüsen im proximalen äußeren Gehörgang ist proportional zum Risiko der *OE* (STOUT-GRAHAM et al., 1990). Auch Rassen ohne lokale Disposition können durch Rasseprädispositionen für Primärkrankheiten ein erhöhtes Risiko haben, beispielsweise Deutsche Schäferhunde, Boxer, Labrador Retriever, Zwergpudel, Dobermann, Gordon Setter oder West Highland White Terrier (SCOTT & PARADIS, 1990; PUNDIR, 2007). Studien fanden keine Geschlechtsprädisposition (HUANG & HUANG, 1999; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Exogene Faktoren wie Umgebungstemperatur und -feuchtigkeit oder Mazeration nach Schwimmen beeinflussen das Mikroklima negativ. Verminderte lokale Abwehr erleichtert die Besiedelung von Kommensalen oder Infektion mit Pathogenen. Die Therapie

enger Gehörgänge ist chirurgisch. Schwimmen wird vermieden oder es wird nach dem Schwimmen ein Ohrreiniger mit trocknender Wirkung (beispielsweise Isopropylalkohol) verwendet. Zupfen von Haaren ist ein exogener iatrogener Faktor. Mikroläsionen leisten einer bakteriellen Infektion Vorschub. Makroläsionen entstehen bei Traumata wie Bissverletzungen oder unsachgemäßem Reinigen mit Wattestäbchen. Trommelfellrupturen sind möglich (GOTTHELF, 2005). Neben mechanischen Irritationen kann die Verwendung ungeeigneter, individuell unverträglicher oder generell reizender Präparate irritieren. Übermäßiges Reinigen führt zu Mazeration. Zytologisch besteht der weißliche Detritus aus Keratinozyten und Korneozyten ohne Hefen- oder Bakterienbeteiligung (ROSYCHUK, 1994). Die Therapie ist Vermeidung dieser Irritationen.

### **3.1.2 Perpetuierende Faktoren**

Perpetuierenden Faktoren verzögern die Heilung; allein können sie eine *OE* nicht auslösen (ROSSER, 2004). *OM* und deren mögliche Komplikation, das Cholesteatom, progressive pathologische Prozesse wie epidermale Hyperplasie/-keratose, Veränderungen der epithelialen Migration mit Anschoppung von Cerumen, Talg, Detritus und Mikroorganismen und Veränderungen des Trommelfelles sind perpetuierende Faktoren (LITTLE et al., 1991; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Bakterielle Infektionen und Mykosen sind neben Reizungen durch Kontakt die wichtigsten perpetuierenden Faktoren; sie werden auch als sekundäre Ursachen bezeichnet (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

#### **3.1.2.1 Otitis media**

Eine *OM* ist eine Entzündung des Mittelohres und bedeutsam bei chronischen/rezidivierenden Otitiden. Eine bakterielle Infektion des Mittelohres erfolgt beim Hund im Gegensatz zur Katze selten hämatogen oder über die Eustachische Röhre, sondern meistens absteigend in Folge einer *OE*. Eine Mittelohrmykose folgt einer Mykose des äußeren Gehörganges (GOTTHELF, 2005). Eine Rassedisposition besteht aufgrund pharyngealer Anatomie bei

Brachycephalen und aufgrund primär sekretorischer *OM* für den Cavalier King Charles Spaniel (STERN-SERTHOLZ et al., 2003; CORFIELD et al., 2008; HAYES et al., 2010). Das Trommelfell kann intakt bleiben, ist in den meisten Fällen jedoch rupturiert, insbesondere bei chronischer *OE*. Klinische Zeichen einer *OM* sind neben Kopfseitenvorzugshaltung und Ohrschütteln auch Manegenbewegung und Ausfälle des *N. facialis*/Horner Syndrom. Ein rupturiertes TM weist auf Trauma, Fremdkörper, gewebliche Zubildungen oder chronische *OE* hin. Die *Pars tensa* kann auch nur trüb und vorgewölbt sein. Bei *OM* kann das TM intakt sein (COLE et al., 1998). Beim Cholesteatom zeigt sich neben Befunden einer *OE* auch Kopfseitenvorzugshaltung, Schmerzen beim Fangöffnen, Ataxie sowie einseitige Facialisparese (HARDIE et al., 2008). Die *OM* wird über bildgebende Verfahren wie Röntgen der *Bullae tympanicae* oder Magnetresonanztomographie (MRT)/Computertomographie (CT) diagnostiziert. Bei Verdacht wird ein intaktes TM per Myringotomie inzidiert, eine Tupferprobe aus dem Mittelohr genommen und dieses anschließend gespült (GOTTHELF, 2005). Die Keimbelastung des Mittelohres divergiert von der des äußeren Gehörganges, obgleich auch hier vorwiegend *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas* spp. und Hefen isoliert werden (COLE et al., 1998). Die *OM* wird mit Mittelohrspülungen, topischer Medikation mit wenig ototoxischen Substanzen und systemischer Antibiotika- oder Antimykotikagabe angegangen (ROSYCHUK, 1994; GOTTHELF, 2005). Aufgrund gut durchbluteter Mukosa der *Bulla tympanica* gelangen die Wirkstoffe hämatogen zum Wirkort (MORRIS, 2004). Fortgeschrittene Prozesse mit irreversiblen Gewebeveränderungen und Cholesteatome werden chirurgisch angegangen (HARDIE et al., 2008). Wird eine bakterielle *OM* nicht adäquat therapiert, kann über eine *Otitis interna* otogen eine intrakranielle Infektion entstehen (STURGES et al., 2006).

### **3.1.2.2 Mikrobielle Faktoren**

Mikrobielle Überwucherung mit Opportunisten oder Sekundärinfektion mit fakultativen oder obligaten Pathogenen stellen die häufigsten perpetuierenden Faktoren dar (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Bakterien lassen sich in Kokken und Stäbchen sowie gram-positive und gram-negative Keime unterscheiden (GREENE, 2006). Mykosen sind in der Regel durch Hefen bedingt

(SARIDOMICHELAKIS, 2007). Staphylokokken, vor allem *Staphylococcus pseudintermedius*, und Hefen, vorwiegend *Malassezia* spp., finden sich häufig in geringer Zahl auch im gesunden Gehörgang (CHICKERING, 1988, GOTTHELF, 2005). Die bakterielle Besiedelung nimmt zum Trommelfell hin ab, die Besiedelung mit Hefen steigt (AOKI-KOMORI et al., 2007). *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli* und andere gram-negative Stäbchen sind bei chronischen Otitiden und nur selten aus dem gesunden Gehörgang zu isolieren (KISS et al., 1997a; AOKI-KOMORI et al., 2007). Anaerobier werden bei einer OE nicht nachgewiesen (AOKI-KOMORI et al., 2007). Monoinfektionen (*Staphylococcus* spp. und *Pseudomonas* spp.) und Mischinfektionen (*Streptococcus* spp. und *Proteus* spp.) kommen vor (KOWALSKI, 1988; BORNAND, 1992). Die häufigste Kombination sind *Malassezia* spp. und *Staphylococcus pseudintermedius* gefolgt von *Pseudomonas aeruginosa* (BORNAND, 1992).

#### 3.1.2.2.1 Kokken

Kokken im Gehörgang sind meist gram-positiv. Staphylokokken und Streptokokken werden auch aus gesunden Ohren isoliert (GINEL et al., 2002).

Staphylococcaceae:

Staphylokokken sind fakultativ anaerobe, fakultativ pathogene Bewohner der Säugetier- und Vogelhaut und -schleimhaut. Auf intakter Haut gesunder Tiere bedingen Staphylokokken keine Krankheit; subklinische Träger transienter oder residenter Staphylokokken sind möglich. Hautläsionen oder Abwehrschwäche ermöglichen Infektion mit leukozytärer Invasion und Abszedierung. Bakterielle Toxine und Enzyme steigern die Virulenz. Therapeutisch werden Staphylokokkentoxine zur Immunmodulation oder Tumorthherapie eingesetzt. Koagulase-positive Staphylokokken wie *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius* und *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* bilden Koagulase. Diese ist nicht toxisch, koagulase-positive Staphylokokken sind allerdings generell pathogener als koagulase-negative. Von *Staphylococcus pseudintermedius* stammendes Protein A verstärkt über Typ IV-Allergie Entzündungsreaktionen. Enterotoxin C induziert Adhärenzfaktoren. Eine staphylokokkenassoziierte Endokarditis mit Herzklappenläsionen ist bekannt. Es

gibt chromosomale und plasmidgebundene Resistenzen und Virulenzfaktoren. Beim Hund ist *Staphylococcus pseudintermedius* häufig. Die Besiedelung beginnt peripartal vom maternalen Geburtskanal auf periorale, perinasale und abdominale Areale der Welpen. Adulte Hunde beherbergen resident oder transient Staphylococcaceae auf der Haut, in Haarbälgen, den mukokutanen Übergängen, interdigital und im äußeren Gehörgang. Die Mukosa ist das Reservoir für kutane Besiedelung. Koagulase-negativ sind *Staphylococcus sciuri* und *Staphylococcus epidermidis*, Kommensalen caniner Haut, sowie *Staphylococcus schleiferi subsp. schleiferi* (GREENE, 2006).

Pyogene Infektionen der Haut, Augen, Ohren, des Respirations- oder Urogenitaltrakts und des Bewegungsapparats sind möglich. Staphylokokkenotitiden, bis zu 40 Prozent der OE (DICKSON & LOVE, 1983; GOTTHELF, 2005), haben häufig hellbraun-gelbliches, bei Hefepilzbeteiligung eher bräunliches Exsudat (AUGUST, 1986). Mikroskopisch sind Staphylokokken gram-positive, runde, 0,8 bis 1,2 Mikrometer (µm) große Bakterien, welche im Ausstrich solitär, zu zweit oder viert zusammen liegen (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). Phagozytose durch neutrophile Granulozyten beweist die Infektion (CHICKERING, 1988). Zur bakteriologischen Untersuchung wird ein steriler Tupfer durch einen sterilen Otoskopkonus aus dem horizontalen Anteil des äußeren Gehörganges genommen (GRIFFIN, 2009a). Die Bebrütung erfolgt aerob auf nicht selektivem Agar. Bei rezidivierenden tiefen Pyodermien werden im Serum hohe Level Antistaphylokokken IgG, bei atopieassoziiert Pyodermie IgE nachgewiesen (GREENE, 2006).

Empfohlene Antibiotika gegen Staphylokokken umfassen Clavulansäure potenzierte Penicilline, Cephalosporine, Fluorochinolone und teils Aminoglycoside; Fluorochinolone jedoch mit steigenden Resistenzen (GREENE, 2006). Methicillinresistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und methicillinresistenter *Staphylococcus intermedius* (MRSI) sind Keime mit problematischer Resistenzlage. Es besteht nach MORRIS und Mitarbeitern (2010) kein direkter Zusammenhang zwischen einer Belastung mit MRSA, MRSI oder MRSS (Methicillinresistenter *Staphylococcus schleiferi*) bei veterinärdermatologischem Personal und deren Tieren (MORRIS et al., 2010).

Streptococcaceae und Enterococcaceae:

Streptokokken und Enterokokken sind Lactobacillales und gram-positive, fakultativ anaerobe Keime, teils Kommensalen der oronasalen Mukosa, der Haut, des Gastrointestinal- oder Genitaltraktes, teils spezifische Pathogene. Die auf unterschiedlichen Zellwandantigenen basierende Lancefield-Klassifizierung hat sich etabliert (GREENE, 2006). Die Lancefield-Gruppen A, B, C, E, G, L und M zeigen  $\beta$ -Hämolyse und sind in der Lage, Erythrozyten zu lysieren, während die Lancefield-Gruppe D, vor allem Enterokokken,  $\alpha$ -Hämolyse ohne Erythrozytenlyse oder gar keine Hämolyse zeigt (GREENE, 2006). Streptokokken der Lancefield-Gruppen M und E besiedeln die Haut und Schleimhaut asymptomatisch. *Streptococcus canis* der Lancefield-Gruppe G, fakultativ pathogener Opportunist, kann bei Hunden verschiedene pyogenen Entzündungen, unter anderem OM, bis hin zum toxischen Schock oder nekrotisierender Facziitis, sowie unspezifische Infektionen von Urogenitaltrakt, Wunden, Gesäuge und Haut, hier insbesondere OE, hervorgerufen.  $\alpha$ -hämolisierende Streptokokken gehören zur physiologischen Flora des caninen äußeren Gehörganges. Vor allem Streptokokken der Lancefield-Gruppe A (*Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*) können aufgrund ihres asymptomatischen Vorkommens bei Tieren für den Menschen eine ständige Reinfektion bedingen (Greene, 2006).

Das normale Habitat der Enterokokken beim Hund (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecium*) ist der Gastrointestinaltrakt. Sie werden auch kontrolliert als Probiotika (beispielsweise Bactisel HK<sup>®</sup>, Selectavet, Holzolling, D) gegen enteropathogene Keime eingesetzt. Enterokokken sind weniger virulent als Streptokokken, können jedoch aufgrund ihrer Resistenz gegen viele Wirkstoffe nach antimikrobieller Therapie persistieren. Nosokomialinfektionen mit vancomycinresistenten Enterokokken sind möglich. Das als Wachstumsförderer bei lebensmittelliefernden Tieren eingesetzte Avoparcin, dem Vancomycin verwandt, verstärkt die Problematik der Resistenzbildung (GREENE, 2006).

Bei einer OE sind Streptokokken und Enterokokken selten zu isolieren (DICKSON & LOVE, 1983), eher bei OM (ANGUS, 2004). Das Exsudat ist hellbraun bis gelblich. Phagozytose ist selten. Mikroskopisch sind sie nicht zu unterscheiden. Sie sind rund, gram-positiv, mit 0,5 bis 1,0  $\mu\text{m}$  kleiner als Staphylokokken und liegen einzeln oder kettenförmig zusammen. Der

bakteriologische Nachweis erfolgt nach steriler Entnahme analog zum Staphylokokkennachweis bei aerober Bebrütung auf nicht selektivem Agar. Zur Therapie der Streptokokkeninfektion werden Penicillin G, Erythromycin, Chloramphenicol oder Cephalexin, bei Enterokokkeninfektion Penicillin, Ampicillin und Aminoglycoside empfohlen. Entgegen Antibiotogrammen ist Trimethoprim-Sulfonamid gegen Enterokokken *in-vivo* nicht wirksam; Enterokokken umgehen *in-vivo* die Folsäuresynthese (GREENE, 2006).

Corynebakterien, gram-positive, keulenförmig-kokkoide Bakterien, werden aus gesunden Gehörgängen isoliert. Sie gehören zur normalen Mikroflora des Hundes und sind nur selten an Otitiden (HENNEVELD et al. 2010) und milden Erkrankungen der oberen Atemwege beteiligt (GREENE, 2006; AALBÆK et al., 2010).

#### **3.1.2.2.2 Stäbchen**

Aus dem äußeren Gehörgang isolierte Stäbchen sind meist gram-negativ. Ihre Zellwand enthält mehr Lipopolysaccharide als die gram-positiver Bakterien und Spirochäten. Diese Lipopolysaccharide beinhalten in die Membran eingelagertes Lipid A und membranfernes O-Antigen. Diese Strukturen bedingen die spezifischen Farbeigenschaften, Virulenzfaktoren und Resistenzeigenschaften. Gram-negative Stäbchen sind *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli* und *Pasteurella* spp.. *Pseudomonas* spp. und *Acinetobacter* spp. gehören zur Familie der Pseudomonales; *Proteus* spp. und *Escherichia coli* zu den Enterobacteriaceae; *Pasteurella* spp. zu den Pasteurellales. Pseudomonaden sind ubiquitäre, feuchteliebende Bakterien (GREENE, 2006). Der häufigste Vertreter bei OE ist *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp. sind ubiquitäre, stäbchenförmige, in den Ruhephasen der Zellvermehrung rundliche Bakterien, die ähnlich *Pseudomonas aeruginosa* schwerwiegende Nosokomialinfektionen (*Acinetobacter baumannii*) je nach betroffenem Organsystem bei teils problematischer Resistenzlage provozieren (SHANTI & SEKAR, 2009). Enterobakterien sind fakultativ anaerobe natürliche Bewohner des Gastrointestinaltraktes von Säugetieren. Die Klassifizierung basiert auf O-, H- und K-Antigenen, wobei O-Antigene die Serogruppe, H-Antigene den Serotyp



und K-Antigene die Kapsel bestimmen. *Pasteurella* spp. bedingen Wundinfektionen, Infektionen der Mundhöhle und Abszesse (GREENE, 2006).

Gram-negative Stäbchen können von den oberen Atemwegen und dem Urogenitaltrakt gesunder Individuen isoliert werden, bedingen jedoch Sepsis, Nosokomialinfektionen und Opportunisteninfektionen bei immunsupprimierten Patienten. Verschiedene Virulenzfaktoren wie Adhäsine, Toxine/Zytotoxine, Phagozytoseprotektion, Eisenacquire mittels Siderophoren führen zu schwerwiegenden, teils letalen Infektionen von Haut (inklusive schwerer, chronischer/rezidivierender, ulzerativer *OE*) und innerer Organe des Atem-, Gastrointestinal- oder Urogenitaltraktes, des zentralen Nervensystems oder des Knochens. Patienten mit lokaler oder generalisierter Abwehrschwäche, langandauernder Antibiotika- oder Chemotherapie und Läsionen von Haut oder Schleimhaut sind gefährdet (GREENE, 2006; SHANTI & SEKAR, 2009).

Aus dem gesunden Gehörgang werden gram-negative Stäbchen extrem selten isoliert (DICKSON & LOVE, 1983; YOSHIDA et al, 2002; TATER et al., 2003; GREENE, 2006; GRIFFIN, 2009a). Massiver hellgelb-grünlicher Ausfluss mit putridem Geruch und schmerzhaft Ulzerationen durch pseudomonale Proteasen fallen auf (GOTTHELF, 2005). Bei zytologisch nachweisbaren Stäbchen ist eine gram-negative Infektion wahrscheinlich. Stäbchen sind länglich-oval und bis zu 1,5 µm lang. Neutrophile Granulozyten und Phagozytose zeigen die Purulenz der *OE* an. Der kulturelle Nachweis folgt nach steriler Entnahme von Gehörgangabstrichen auf nicht selektivem Agar unter aeroben Bedingungen (GREENE, 2006). Resistenzmechanismen sind inaktivierende Enzyme wie  $\beta$ -Lactamasen/Methalo- $\beta$ -Lactamasen (Penicilline und Cephalosporine) und Aminoglycoside-modifizierende Enzyme, plasmid/chromosomal vermittelte Membrancarrier (Fluorochinolone, Penicilline, Cephalosporine, Aminoglycoside), Modifikation der äußeren Zellmembran (Polymixine, Fluorochinolone), Modifikationen an Bindungsstellen wie Modifikationen an PBP (Penicillin binding protein) sowie Mutationen in *gyrA* und *parC* Genen mit gesteigerter Aktivität der Membrancarrier über Quinolonresistenz-bestimmende Gene (QRDR) (Fluorochinolone) und plasmidgebundene Methylation der Aminoglycoside-Bindungsregion. Plasmidgebundene Resistenz verbreitet sich horizontal schnell, chromosomale Resistenzmechanismen benötigen mehrere Generationen (TEJEDOR et al., 2003; ANGUS, 2004; SHANTI & SEKAR, 2009;

ZAVASCKI et al., 2010). Die Kombination verschiedener Resistenzmechanismen oder die besondere Effektivität eines Resistenzmechanismus in einem Isolat ist möglich (ANGUS, 2004; ZAVASCKI et al., 2010). In der Humanmedizin gelten multiresistente *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* als Problemkeime (SHANTI & SEKAR, 2009). Gegen *Acinetobacter baumannii* ist Tigecyclin eine Option (RICE, 2006). Immer soll ein Antibiogramm eingeleitet werden, dennoch kann sofort die Therapie mit Clavulansäure-potenzierten Penicillinen, Aminoglycosiden oder Fluorochinolonen begonnen werden. Autogene Vakzinen können individuell aus Tupfermaterial hergestellt und oral verabreicht werden (GREENE, 2006).

Im Gegensatz zu den anderen gram-negativen Stäbchen ist die Resistenzlage üblicher Antibiotika gegen Pasteurellen gut (GREENE, 2006).

*Bacillus cereus*, ein gram-positives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes Bakterium, gehört zur normalen Mikroflora des caninen äußeren Gehörganges (GREENE, 2006).

### 3.1.2.2.3 Hefen

Hefen gehören zu den einzelligen Sprosspilzen (*Ascosporidae*). Malassezien sind lipophile Pilze. Sie vermehren sich asexuell über Sprossung. Sie sind auf gesunder Haut und Schleimhaut von Säugetieren und Vögeln zu finden. Hunde werden perioral, interdigital, perianal, im äußeren Gehörgang und in intertriginösen Arealen meist von *Malassezia pachydermatis* besiedelt. Bei Malasseziendermatitis wie auch bei Malassezienotitis steigt die Zahl signifikant an (ANGUS, 2004). Im äußeren Gehörgang sind sie bei klinisch gesunden Tieren bei bis zu 49 Prozent, bei OE bei bis zu 83 Prozent vorhanden (BORNAND, 1992; CRESPO et al., 2002). *Malassezia pachydermatis* kann als einzige von sieben *Malassezia* spp. ohne Lipidsupplementierung gezüchtet werden (GREENE, 2006). Seltener werden *Candida* spp. bei OE gefunden; im gesunden Gehörgang sind keine *Candida* spp.. Eine Mischinfektion von Malassezien und *Candida* kann vorkommen. Klinisch fällt bei einer Hefepilzotitis oft der käsig-muffige Geruch eines schmierig graubraunen Sekrets auf, bei Koinfektion mit Bakterien auch dunkelbraun, mit *Candida* gelbbraun (GOTTHELF, 2005). Malassezien sind 2 x 4 µm bis 6 x 7 µm große erdnussförmige Gebilde mit unipolarer Sprossung.

*Candida* sind etwas kleiner und häufig rundlich. Die Kapsel ergibt in der Färbung einen ungefärbten Rand (CHICKERING, 1988). Hefen in Kombination mit neutrophilen Granulozyten ohne Bakterien können auf eine *OM* hinweisen. Der kulturelle Nachweis ist auf speziellem Agar (Sabouraud) mit Antibiotikazusatz möglich. Serologisch weisen hohe IgG Titer auf eine Infektion, hohe IgE Titer auf Malassezienhypersensitivität. Die Therapie der Hefeinfektion ist topisch oder systemisch möglich (GOTTHELF, 2005).

### 3.1.3 Primärursachen

Nur Primärursachen lösen eine *OE* aus. Fremdkörper, Parasiten, Allergien/Überempfindlichkeitsreaktionen, primäre Keratinisierungsstörungen und Endokrinopathien, Talgdrüsenhyperplasie, Autoimmunopathien und Neoplasien sind Primärursachen (AUGUST, 1988; PATERSON, 2002; ROSSER, 2004; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Seltener sind Viruserkrankungen (Staupe, Parvovirose) und idiopathische Ursachen wie *juvenile Zellulitis*, *sterile eosinophile Follikulitis* der Ohrmuschel oder die *proliferative eosinophile OE* (LOGAS, 1999; NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Die Primärursachen müssen diagnostiziert und therapiert werden. Dabei ist die Compliance der Besitzer bei teilweise lebenslanger Therapie von entscheidender Bedeutung. Eine frühzeitige umfassende Besitzerinformation und Schulungen vermitteln dem Besitzer Verständnis und Wissen um die Erkrankung seines Tieres (LINEK, 2011).

#### 3.1.3.1 Fremdkörper

Manche Fremdkörper wie Grannen dringen von außen in den Gehörgang ein (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007), andere gelangen iatrogen hinein, etwa Medikamentenreste. Im Gehörgang verbliebene und verklumpte Haare oder Cerumen sind möglich (LOGAS, 1999), seltener Sand, Dreck sowie tote Insekten (ROSSER, 2004). Klinisch ist eine akute, äußerst schmerzhaft, unilaterale, selten bilaterale *OE* manifest (AUGUST, 1988; ROSSER, 2004). Initial ist eine *OE erythematosa* vorhanden, welche bei Fremdkörpern wie Grannen schnell purulent

wird. In den äußeren Gehörgang gelangte Grannen können aufgrund ihrer Widerhaken nur schwer vom Hund selber wieder aus dem Ohr entfernt werden. Grannen sind selten bilateral vorhanden. Dennoch werden beide Ohren daraufhin untersucht. Arbeits- und Jagdhunde sind prädisponiert (HARVEY et al., 2001). Medikamentenreste oder verklumpte Haare sind als Resultat vorangegangener *OE*-Therapieversuche meist bilateral. Zeruminolithen als Folge einer *OE ceruminosa* aufgrund anderer Primärfaktoren sind meist bilateral. Sie sind „sekundäre Fremdkörper“ (AUGUST, 1988) und bedingen protrahierten Verlauf und späte Purulenz. Die ätiologische Diagnose „Fremdkörper“ wird mittels Otoskopie gestellt. Bei Schwellung und purulentem Exsudat kann ein Fremdkörper übersehen werden. Die Entfernung erfolgt unter Allgemeinanästhesie, um Traumatisierung durch Abwehrbewegungen zu vermeiden (COLE, 2004). Direkt vor dem TM sitzende Fremdkörper sind besonders schmerzhaft. Gelangen sie durch das TM ins Mittelohr, resultiert eine *OM* (AUGUST, 1986). Bei Zeruminolithen können im Vorfeld Gehörgangspülungen mit Zeruminolytika nötig sein (COLE, 2004).

### 3.1.3.2 Ektoparasiten

Die häufigsten Auslöser einer *OE parasitosa* sind Ohrmilben (*Otodectes cynotis*) und Haarbalmgelen ( *Demodex canis*, *Demodex cornei*, *Demodex injai*) (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007), ferner Grabmilben (*Sarcoptes scabiei variatio canis* und *Notoedres cati*), Raubmilben (*Cheyletiella* spp.) und Herbstgrasmilben (*Neotrombicula autumnalis*) (ROSSER, 2004; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Seltener kommen im europäischen Raum Zecken (*Rhipicephalus sanguineus*, braune Hundezecke; *Dermacentor reticulatus*, Auwaldzecke; *Ixodes ricinus*, Holzbock) im äußeren Gehörgang vor (HARVEY et al., 2001).

*Otodectes cynotis*, ein obligater Parasit aus der Familie der Psoroptidae, verursacht beim Hund fünf bis zehn Prozent der Otitiden (AUGUST, 1988; GRIFFIN, 1993). *Otodectes cynotis* ist hochkontagiös und wenig wirtsspezifisch (ANGUS, 2005; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Es ist mäßiger Juckreiz und Erythem mit schwarzbraun krümeligem, kaffeesatzartigem Exsudat vorhanden. Schon durch einzelne Ohrmilben hervorgerufene Überempfindlichkeitsreaktionen

Typ I und III gegen Parasitenantigene erschweren durch Schwellung und Exsudat die Detektion der Ohrmilben (AUGUST, 1988; GRIFFIN, 1993; ROSSER, 2004; ANGUS, 2005; GOTTHELF, 2005). Neben asymptomatischer Infestation kommen Ohrmilben auch ektopisch in der Umgebung der Ohren, Pfoten oder Flanken vor (HARVEY et al., 2001). Ein aktiver Übergang ist über Liegeplätze und direkten Kontakt möglich (GOTTHELF, 2005). Meist stellen sich komplizierend Bakterien- oder Hefeinfektionen ein (AUGUST, 1988). Ohrmilben sind weiße, frei bewegliche, 0,3 x 0,4 mm große Milben, die mittels Otoskopie vermutet und per Nativausstrich diagnostiziert werden (HARVEY et al., 2001). Der Entwicklungszyklus vom Ei über Larve, Protonymphen zur Deutonymphen dauert zwei bis drei Wochen. An weibliche Deutonymphen haften sich männliche Adulte zur Kopulation an. Die weiblichen Adulten legen dann Eier (HARVEY et al., 2001; GOTTHELF, 2005). *Otodectes cynotis* leben von Lymphe und Blut; sie verursachen mit ihren Mundwerkzeugen Epithelschäden (GOTTHELF, 2005). Eine Invasion ins Mittelohr mit bakteriell komplizierter OM ist möglich. Es besteht das Risiko der Zoonose (GOTTHELF, 2005). Eventuelle Kreuzreaktionen mit Hausstaubmilben haben Bedeutung für den diagnostischen Wert eines Intrakutantestes (IKT) (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Ohrmilben werden mit Selamectin (Stronghold®), Fipronil (Frontline®, Effipro®) oder Moxidectin/Imidacloprid (Advocate®) bei allen Kontakttieren angegangen.

*Demodex canis* verursacht selten eine OE ohne weitere dermatologische Symptome (AUGUST, 1988; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Neben der Beteiligung der Ohren bei generalisierter *Demodikose* kann eine lokalisierte Demodexotitis vorkommen (HARVEY et al., 2001). Eine OE *ceruminosa* ist dann typisch (ROSYSCHUK, 1994; HARVEY et al., 2001). Haarbalgmilben sind obligate Parasiten der Haarfollikel mit 30-tägigem Entwicklungszyklus. In geringer Anzahl kommen sie als Kommensalen vor. Direkt postnatal werden die Welpen beim Saugakt infiziert. Erste klinische Zeichen der juvenilen lokalisierten *Demodikose*, Alopezie und geringer Juckreiz, finden sich meist an Kopf und Vorderbeinen. Eine Suppression der T-Zell-Immunität wurde festgestellt, eventuell als Folge der *Demodikose*. Bei einer generalisierten *Demodikose* adulter Tiere liegt eine Grunderkrankung vor, ohne deren Diagnose die Therapie der *Demodikose* schwierig ist. Sonderformen sind die *Pododemodikose* und die *Ohrdemodikose*. Bakterielle Sekundärinfektionen komplizieren das klinische Bild

mit Pusteln, Furunkeln und hämorrhagischen Bullae (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Das Cerumen ist cremig und dunkelbraun (ROSYCHUK, 1994). Die mikroskopische Untersuchung des Cerumens zeigt meist viele Milben. An anderen Körperstellen findet man in tiefen Hautgeschabseln und manchmal über Trichoskopie die Milben (OSTHOLD et al., 2005, ROSYCHUK, 1994). Bei prädisponierten Rassen wie Shar-Pei und englischer Bulldogge kann eine Biopsie nötig sein (HARVEY et al., 2001; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Die juvenile lokalisierte *Demodikose* heilt bei 90 Prozent selbst aus, zehn Prozent entwickeln sich zur generalisierten *Demodikose*. Zur Therapie sind Moxidectin/Imidacloprid (Advocate®) als Spot-on und Amitraz (Ectodex®) zur Badebehandlung zugelassen, letzteres darf jedoch bei Chihuahuas nicht angewendet werden (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Milbemycinoxim (Interceptor®) ist in Europa zugelassen und soll auch für Hunde mit MDR1-1Δ-Gendefekt (ABCB1-1 Δ) sicher sein (MUELLER et al., 2012). Homozygote ABCB1-1Δ-Mutationsträger zeigten jedoch Ataxie (BARBET et al., 2009). Ivermectin kann nach Umwidmung verabreicht werden, ist allerdings nicht für diese Indikation zugelassen. Eine Blutuntersuchung auf ABCB1-1Δ -Gendefekt und eine Untersuchung auf Herzwürmer (je nach Anamnese) kann sinnvoll sein, eine graduelle Erhöhung der Dosis ist in jedem Fall zu empfehlen (MUELLER & BETTENAY, 1999). Eine lokale Behandlung der *Ohrdemodikose* mit zwei ml 5%igem Amitraz in 20 ml Paraffinöl wird empfohlen, ist aber nicht zugelassen (HARVEY et al., 2001). Parallel wird eine bakterielle Sekundärinfektion antibiotisch angegangen; Primärerkrankungen müssen therapiert werden; Glukokortikoide und Immunsuppressiva sind kontraindiziert (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Die weiteren Milben verursachen keine *OE*, können jedoch über Infestation in der periaurales Region Juckreiz und folglich Kratzen hervorrufen (AUGUST, 1988; ROSSER, 2004). *Sarcoptes scabiei* ist ein obligater, stationärer Parasit mit dreiwöchigem Entwicklungszyklus. Die Weibchen legen Eier in selbstgegrabene Tunnel. Die Milben leben von Keratin und Gewebeflüssigkeit (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). *Sarcoptes*-Räude ist eine extrem stark juckende, hochkontagiöse Parasitose, die sich selten auf die Ohren/Ohrränder beschränkt. Häufig betroffen sind die unteren Extremitäten (Ellbogen- und Tarsalgelenke) und das ventrale Abdomen. Initial sind erythematöse Papeln, selbstinduzierte

Alopezie, an den Ohrrändern Schuppen und Hyperkeratose. Der aurikulopedale Reflex ist hinweisend. Bei Verdacht werden mehrere größere Hautgeschabsel angefertigt. Manchmal sind nur *Sarcoptes*-Eier zu finden, oder aber das Hautgeschabsel scheint negativ. Zytologisch sind eosinophile Granulozyten hinweisend. Im Zweifelsfall ist eine diagnostische Therapie anzuraten. Da es bei *Sarcoptes*-Räude zu einer Immunantwort kommt, können Antikörpertiter nachgewiesen werden, welche zur Diagnose aber nicht zur Therapiekontrolle dienen. Zugelassene Therapeutika sind etwa Selamectin (Stronghold®) und Moxidectin/Imidacloprid (Advocate®). Waschungen können mit Amitraz 0,05%ig (Aludex®) vorgenommen werden. Zu Beginn der Therapie kann sich der Juckreiz durch abgestorbene Milben verstärken. Alle Kontakttiere werden mit behandelt. Bei Menschen ist die *Sarcoptes*-Räude aufgrund *Sarcoptes scabiei var. canis* mit Therapie des Hundes selbstlimitierend (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Die *Notoedres*-Räude (*Notoedres cati*) ähnelt der *Sarcoptes*-Räude und betrifft vorwiegend Katzen (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Raub- und Herbstgrasmilben rufen normalerweise keine isolierte OE hervor, gehören aber zu den Parasitosen, die auch die Ohrmuschel und den äußeren Gehörgang betreffen können (ROSSER, 2004).

*Cheyletiella yasguri*, *Cheyletiella blakei* und *Cheyletiella parasitovorax* sind wenig wirtsspezifische, obligate Parasiten auf der Haut, die von Gewebeflüssigkeit leben und Juckreiz bedingen können. Ihr Entwicklungszyklus dauert etwa einen Monat. Die Weibchen können bis zu zehn Tagen ohne Wirt überleben. Cheyletiellen sind große Milben (400µm), die als weiße Schuppen auffallen und über die Trichoskopie diagnostiziert werden (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Zur Therapie eignen sich etwa Selamectin (Stronghold®), Fipronil (Frontline®), Moxidectin/Imidacloprid (Advocate®) oder Imidacloprid/Permethrin (Advantix®).

Bei der Herbstgrasmilbe *Neotrombicula autumnalis* ist die gelbrote, sechsbeinige Larve der Parasit. Adulte leben von pflanzlichem Material. Bei befallenen Tieren bestehen interdigital und am Kopf Juckreiz und Krusten, gelegentlich auch an der Ohrmuschelbasis, im äußeren Gehörgang oder der Henri'schen Tasche. Die Diagnose erfolgt über Trichoskopie oder Hautgeschabsel, die Therapie zielt auf Juckreizstillung mittels Glukokortikoiden lokal (Dermacool®, Cortavance®) oder in Ausnahmefällen kurzfristig systemisch. Eine Behandlung der Umgebung ist

nicht praktikabel. Die Milben sind ein saisonales Problem im Spätsommer und Herbst (HARVEY et al., 2001).

### 3.1.3.3 Allergien/Überempfindlichkeitsreaktionen

Allergien und Überempfindlichkeitsreaktionen sind die häufigsten Primärursachen einer *OE* (HARVEY et al., 2001; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Bei bis zu 75 Prozent der *OE* wurde Atopie als Primärursache festgestellt (PATERSON, 2003). Prädisponierte Rassen sind Terrier, Dalmatiner, Shar-Pei, Lhasa Apso, Boxer, Labrador Retriever, Golden Retriever, English Setter und Irish Setter (NOLI & SCARAMPELLA, 2005) außerdem Deutsche Schäferhunde und West Highland White Terrier (ZUR et al., 2002a). Die Symptome beginnen meist im ersten bis dritten Lebensjahr (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Bis zu 60 Prozent der Atopiker entwickeln eine *OE* (ZUR et al., 2002a). Häufig mit *OE* einhergehende Allergien sind Atopie, Futtermittelallergie und Kontaktallergie/Arzneimittelallergie bei lokaler Medikation. Allergien gegen Pollen sind saisonal; Hausstaub/Futtermilben-, Schimmelpilz- oder Futtermittelallergien sind eher asaisonal (GOTTHELF, 2005). Insbesondere der chronischen oder rezidivierenden *OE* liegt häufig eine Atopie oder Futtermittelallergie zugrunde (ROSSER, 2004).

Atopische Hunde haben eine angeborene Veranlagung auf Umweltallergene mit der Bildung von spezifischem IgE nach Sensibilisierung der T-Lymphozyten und Stimulierung der B-Lymphozyten zu reagieren (HARVEY et al., 2001; GOTTHELF, 2005; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Zudem sind bei Atopikern Veränderungen im Lipidhaushalt und der epidermalen Schutzfunktion vorhanden (SARIDOMICHELAKIS, 2010). Eine *OE erythematosa* im vertikalen Teil des äußeren Gehörganges bei minimaler Beteiligung des horizontalen Teils ist bei vielen Hunden vorhanden (HARVEY et al., 2001). Teils scheint die *Pars flaccida* des TM prominent oder vorgewölbt. Ödematös geschwollenes Gewebe der dorsalen Wand des horizontalen Gehörganges nahe des TM kann ein erster Hinweis auf Hypersensitivität sein (ROSYCHUK & LUTTGEN, 2000). Atopische Dalmatiner haben ein erhöhtes Risiko eine *OE* zu entwickeln (ZUR et al., 2002a). Umweltbedingte Atopie ist eine klinische Ausschlussdiagnose (SARIDOMICHELAKIS, 2010). Differentialdiagnosen sind futtermittelinduzierte



atopische Dermatitis, Sarcoptrieräude, Insektenstichallergie, Kontaktallergie, Flohspeichelallergie, bakterielle Follikulitis und Malasseziendermatitis (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Eine Kombination der Atopie mit futtermittelinduzierter atopischer Dermatitis und Flohspeichelallergie kommt vor (ZUR et al., 2002a). Der Identifizierung der auslösenden Allergene mittels IKT folgt die allergenspezifische Immuntherapie (ASIT). Eine Allergenvermeidung ist selten möglich (HARVEY et al., 2001). Der therapeutische Erfolg (Remission oder Besserung) der ASIT liegt bei über 70 Prozent, bei multiplen Allergenen (>21) ist nach ZUR und Mitarbeitern (2002) die Behandlung weniger wirksam und der Erfolg verzögert. Die Allergietestung erfolgte in dieser Studie über IKT oder serologisch (ELISA/ Enzyme-linked Immunosorbent Assay), wobei kein Unterschied im Therapieerfolg vorhanden war. Ohrenbeteiligung oder massive Symptome reduzieren den Erfolg (ZUR et al., 2002b). Die Kontrolle erfolgt über eine symptomatische Therapie mit möglichst niedrig dosierten Glukokortikoiden, Cyclosporin A, Antihistaminika, essentiellen Fettsäuren mit einem omega 6/3 Verhältnis von vier bis fünf zu eins oral und lokal als Spot-on Präparate, Phosphodiesterase-Hemmer/Immunmodulatoren, chinesische Kräuter (OLIVRY et al, 2010) und auch die psychische Komponente des Juckreizes ist zu bedenken. Finanziell anspruchsvoll ist der Behandlungsansatz mit rekombinantem alpha-Interferon (BEALE, 2007c). Zum Abspülen der Antigene und zur lokalen Therapie eignen sich hautberuhigende und feuchtigkeitsspendende Shampoos (GOTTHELF, 2005; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Die OE wird mit Ohrreinigern und Lokaltheraeutika kontrolliert (GOTTHELF, 2005). Nur die Therapie/Kontrolle der Atopie führt langfristig zu einer Verbesserung der Situation im äußeren Gehörgang. (HARVEY et al., 2001). Allergien gegen verschiedene Allergene (Milben, Pollen, Futtermittel, Schimmelpilze) scheinen sich zu addieren (ZUR et al., 2002b; GOTTHELF, 2005). Die Juckreizschwelle ist individuell und von verschiedenen inneren und äußeren Faktoren abhängig (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Seltener als die umweltbedingte Atopie kommt die futtermittelinduzierte atopische Dermatitis vor (HARVEY et al., 2001). Reaktionen auf Futtermittel können allergischer Art in der Regel gegen Futtereiweiße über 18 - 36 kiloDalton (kDa) sein (Typ I, III, IV- Allergie) oder nicht immunbedingt als Intoleranz auftreten (BLOOM, 2005; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Oft beginnen die

Symptome im ersten Lebensjahr. Juckreiz ist regelmäßig vorhanden. Die Diagnose wird über eine Ausschlussdiät über sechs bis zwölf Wochen und gegebenenfalls anschließend beweisende Provokation gestellt (NETT-METTLER, 2010b). IKT und serologische Untersuchungen sind nicht zuverlässig, deren Sensitivität und Spezifität sind nicht zufriedenstellend (BLOOM, 2005; NETT-METTLER, 2010b). Die häufigsten Allergene sind Rind, Hühnchen, Ei, Schwein, Lamm, Weizen, Milch, Soja, Mais, Reis (BEALE, 2007a; NETT-METTLER, 2010b). Für die Ausschlussdiät werden für das Tier neue Protein- und Kohlenhydratquellen gewählt. Es bieten sich Pferd, Lachs, Wachtel, Strauß, Rentier mit Kartoffel oder Tapioka an. Alternativ kann eine kommerzielle für die Eliminationsdiät zugelassene Diät mit hydrolysierten oder für den Patienten neuen Proteinen gefüttert werden (BLOOM, 2005; NOLI & SCARAMPELLA, 2005; NETT-METTLER, 2010b). Hydrolysierte Diäten eignen sich nur, wenn das Mutterprotein noch nicht verfüttert wurde (NETT-METTLER, 2010b). Eine bestehende Pyodermie sollte im Vorfeld behandelt sein. Die Therapie der futtermittelinduzierten atopischen Dermatitis besteht in Allergenvermeidung (NOLI & SCARAMPELLA, 2005); eine beim Hund leicht durchführbare Option. Die Compliance der Besitzer ist limitierender Faktor.

Die allergische Kontaktdermatitis ist selten. Jede Kontaktstelle am Körper kann betroffen sein. Am Ohr sind die konkave Seite der Ohrmuscheln und der vertikale Teil des äußeren Gehörganges vorwiegend betroffen. Auslöser für die immunologisch bedingte Reaktion (Typ IV) ist häufig eine Lokalmedikation von Otologika mit Propylenglykol oder Neomycin (HARVEY et al., 2001; NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Die Vermutung einer Kontaktallergie am Ohr besteht, wenn sich der Zustand trotz adäquater Therapie nach anfänglicher Besserung wieder verschlechtert (HARVEY et al., 2001). Die Therapie besteht in Allergenvermeidung. Ist das nicht möglich, können Glukokortikoide eingesetzt werden (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

#### **3.1.3.4 Keratinisierungsstörungen/Endokrinopathien**

Primäre oder sekundär durch Endokrinopathien hervorgerufene Keratinisierungsstörungen sind selten Ursache eine *OE* (SARIDOMICHELAKIS, 2007); sie bedingen jedoch ein verändertes, fettreicheres Cerumen. Bakterien und

Hefen vermehren sich leichter (AUGUST, 1988; MORIELLO & MASON, 1995). Meist sind weitere Symptome vorhanden (GOTTHELF, 2005). Primäre Keratinisierungsdefekte sind *Sebadenitis* oder *idiopathische Seborrhoe* (AUGUST, 1988; ROSSER, 2004). Die *Hypothyreose* (Schilddrüsenunterfunktion) ist die häufigste mit *OE* assoziierte Endokrinopathie, außerdem kommen *Hyperadrenokortizismus* (Nebennierenrindenüberfunktion) und Sexualhormonimbilanzen vor (ZUR et al., 2002b; PATERSON, 2003; GOTTHELF, 2005). Nutritive Faktoren wie Mangel an essentiellen Fettsäuren, Vitamin-A-responsive Dermatoze und Zink-reaktive Dermatoze sind möglich (WHITE-WEITHERS, 2005). Die Folge ist eine *OE ceruminosa*; klinisch ist eine Unterscheidung nicht möglich (ROSSER, 2004). Das Cerumen ist gelblich-fettig. Es kann mit purulentem Exsudat verwechselt werden (AUGUST, 1988). Zytologisch sind wenige Entzündungszellen, jedoch oft Hefen, Bakterien und Keratinozyten vorhanden (AUGUST, 1988; GOTTHELF, 2005; WHITE-WEITHERS, 2005).

### 3.1.3.5 Autoimmunopathien

Immunopathien sind Autoimmunopathien (spezifische Immunantwort auf endogene Antigene) und sekundäre immunvermittelte Erkrankungen (spezifische Immunantwort auf exogene Allergene) (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Autoimmunopathien betreffen nicht nur das Ohr, sondern den Gesamtorganismus. *Pemphigus foliaceus*, *Pemphigus erythematosis*, systemischer und diskoider *Lupus erythematosis*, kutane *Vaskulitis*, *bullöses Pemphigoid* und Schleimhautpemphigoid stehen im Vordergrund (ROSSER, 2004). Autoantikörpern gegen verschiedene körpereigene Strukturen werden gebildet (HILL, 2010). Sie sind alle sehr selten; *Pemphigus foliaceus* kommt gelegentlich als Primärursache der *OE* vor (PATERSON, 2002; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Bei *Pemphigus foliaceus* richten sich die Autoantikörper gegen Desmosomen. Deren Verlust führt zu Akantholyse (HILL, 2010). Klinisch zeigen sich an den Innenflächen der Ohren, dem Gesicht, den Krallenpfalzen, den Ballen und dem Rumpf Pusteln und honigfarbenen Krusten (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Moderater Juckreiz ist häufig. Zytologisch sind in Pustelmaterial Akantholyten und nicht degenerierte neutrophile oder eosinophile Granulozyten

bei minimaler bakterieller Besiedlung typisch (CHICKERING, 1988; HARVEY et al., 2001; HILL, 2010). Mehrere Biopsien folgen. Der lokalisierte *Pemphigus foliaceus* ist der *Pemphigus erythematosus*; er bleibt auf das Gesicht beschränkt. Systemischer *Lupus erythematosus* ist eine schwere systemische Erkrankung. Autoantikörper gegen Nukleoproteine werden gebildet. Diskoider *Lupus erythematosus* ist die mildere kutane Variante des systemischen *Lupus erythematosus*. Das *bullöse Pemphigoid* betrifft neben den Ohrmuscheln Abdomen, Achseln und mukokutane Übergänge (NOLI & SCARAMPELLA, 2005).

Immunopathien werden mit Immunsuppressiva lebenslang behandelt. Orale Glukokortikoide werden zunächst auch als Schock-Immunprotokoll hochdosiert gestartet; die Erhaltungsdosis richtet sich bei sukzessiver Reduktion nach klinischem Ansprechen und Nebenwirkungen. Azathioprin kann beim Hund ergänzend eingesetzt werden. Ein engmaschiges Monitoring wird empfohlen. Alternativen, eventuell als Monotherapien, sind Tetrazykline und Nicotinamid, Cyclosporin A und Tacrolimus, Pentoxifyllin, humane intravenöse Immunglobuline (OLIVRY et al., 2003; ROSENKRANTZ, 2004). Goldsalze, Vitamin-E-Substitution und bei milden Fällen lediglich lokale Glukokortikoide oder Tacrolimus werden vorgeschlagen (HILL, 2010).

### **3.1.3.6 Neoplasien und andere Gewebeumfangsvermehrungen im äußeren Gehörgang**

Gewebeumfangsvermehrung bedingen Veränderungen des Mikroklimas, was zur Entwicklung einer *OE* führen kann (ANGUS, 2005). So sind Neoplasien des äußeren Gehörganges häufig bakteriell überlagert, was deren Entwicklung fördert und die Diagnose erschwert (ROGERS, 1988). Neoplasien sind seltene Primärursachen (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007), allerdings gelten chronische *OE* und Ceruminaldrüsenhyperplasie zu den Risikofaktoren eines Malignoms (ANGUS, 2005; ROGERS, 1988). Ceruminaldrüsenadenome sind im Gegensatz zur Katze beim Hund häufiger als Ceruminaldrüsenkarzinome. Neben Ceruminaldrüsentumoren sind Plattenepithelkarzinome vertreten. Sie sind häufiger bei Katzen, selten beim Hund und betreffen häufiger die Ohrmuscheln. Beide Tumoren wachsen invasiv, mit blutenden Ulzerationen und metastasieren

(ROGERS, 1988; HARVEY et al., 2001). Bilaterale Neoplasien sind sehr selten (ZUR, 2005). Über Feinnadelaspirate, Abklatsch oder differenzierend gefärbte Geschabsel wird der Verdacht geäußert, die Diagnose wird nach Biopsie gestellt. Die Therapie ist chirurgisch. Eine sehr frühe radikalchirurgische Intervention kann kurativ sein (FAN & LORIMIER, 2004; ANGUS, 2005; ZUR, 2005). Bestrahlung oder Chemotherapie folgen (ROGERS, 1988).

Benigne Tumoren (40 Prozent der Tumoren) sind Papillome, Talgdrüsenadenome, Basaliome, Histiozytome, Ceruminaldrüsenadenome (FAN & LORIMIER, 2004). Ceruminaldrüsenadenome treten als multiple, gestielte Wucherungen auf (HARVEY et al., 2001).

Nicht neoplastisch sind entzündliche Polypen, Zysten der Ceruminaldrüsen oder noduläre Talgdrüsenhyperplasie (ROGERS, 1988). Vereinzelt wurden multiple Follikelzysten und ein Fibrom mit knöcherner Metaplasie vorgestellt (GATINEAU et al., 2010, PARK et al., 2010).

Polypen oder Granulome kommen vor (HARVEY et al., 2001). Sehr selten sind eosinophile Granulome und Pilzgranulome (POULET et al., 1991; HARVEY et al., 2001)

## **3.2 Diagnostik der *Otitis externa***

### **3.2.1 Anamnese**

Primärursachen rufen selten ausschließlich eine *OE* hervor; eine vollständige dermatologische Anamnese wird aufgenommen (MANSON & GRIFFIN, 1995). Während bei einer akuten, offensichtlich fremdkörperbedingten *OE* der Vorbericht kurz ist, wird bei Chronizität oder Rekurrenz ein ausführlicher Vorbericht erhoben (ROSSER, 1988). Eine dermatologische Untersuchung mit gründlicher Untersuchung der Ohren folgt, da nur so die Primärursachen der *OE* diagnostiziert werden, die richtigen weiterführenden Diagnostika eingesetzt und die perpetuierenden und prädisponierenden Faktoren erkannt werden (ROSSER, 1988). Rasse, Alter bei Krankheitsbeginn, Juckreiz, Allgemeinbefinden/Tränke- und Futteraufnahme sowie Ausscheidungen, wiederkehrenden Infektionen,

Kontakte mit anderen Tieren, Saisonalität und Sexualzyklus/Sexualverhalten werden erfragt.

Spezielle Fragen sind:

1. Ist der Patient Schwimmer? Mazeration bedingt Veränderungen im Mikroklima des Gehörganges (HAYES et al., 1987).
2. Sind die Ohrenprobleme ein- oder beidseitig? Unilaterale *OE* ist verdächtig für Fremdkörper oder Neoplasien, bilaterale *OE* für systemische Erkrankungen wie atopische Dermatitis, Futtermittelüberempfindlichkeit oder Endokrinopathien. Die Aussagen des Besitzers zu dieser Frage werden durch Untersuchung bestätigt oder widerlegt (COLE, 2004).
3. Ist der Patient mit topischen Medikamenten/Reinigern vorbehandelt? Irritationen, Entzündungen, allergische oder immunologische Kontaktdermatitis sind möglich (ROSSER, 1988).
4. Wie war der Therapieerfolg bei rezidivierenden oder chronischen Otitiden? War die *OE* ganz abgeheilt (Rezidiv erst einige Zeit nach Therapieende) oder nur klinisch in Remission, obwohl die Infektion weiterbestand (Rezidiv innerhalb von zwei Wochen)? Ist eine Saisonalität zu beobachten? War die *OE* wirklich ganz abgeheilt oder nur besser oder war gar kein Therapieerfolg zu verzeichnen?
5. Wie schnell ist die *OE* entstanden? Langsam entwickeln sich atopische Dermatitis oder Gehörgangsneoplasien, schnell Fremdkörperotitiden (MUELLER, 2003).
6. Wurden bei dem Patienten die Haare aus dem Gehörgang gezupft? Wurden anschließend Puder eingebracht? (GRIFFIN, 1993).
7. Ist der Patient kopfscheu, zeigt er Kopfschiefhaltung, Ataxie oder ein Horner Syndrom, Schmerzen bei der Futteraufnahme? Dann kann eine *OM* und /oder eine *Otitis interna* vermutet werden (GRIFFIN, 1993).

### **3.2.2 Klinik der *Otitis externa***

Die *OE* wird eingeteilt in akute oder chronische, reaktive oder infektiöse und uni- oder bilaterale *OE*. Eine Klassifizierung basierend auf den Primärfaktoren, den pathologischen Veränderungen und der mikrobiellen Sekundärinfektion hat sich etabliert. Dabei wird auf Primärfaktoren, welche in der Lage sind, eine *OE* zu

induzieren, auf prädisponierende Faktoren, welche eine *OE* begünstigen, und auf perpetuierende Faktoren, welche eine bestehende *OE* aufrecht erhalten, eingegangen (AUGUST, 1988; ROSSER, 1988; GRIFFIN, 1993).

Erste klinische Anzeichen einer *OE* sind Kopfschütteln, Kratzen der Ohrregion sowie Selbsttraumatisierung mit Alopezie und Exkoriationen (AUGUST, 1988). Paraaurale Abszesse können *OM* bedeuten (LANE & WATKINS, 1986). Eine unilaterale *OE* ist häufiger durch Fremdkörper bedingt, kann aber auch auf eine Futtermittelreaktion hinweisen. Bilaterale Otitiden haben eher systemische Ursachen wie Allergien oder Endokrinopathien (ROSSER, 1988). Bei bakterieller, mykotischer oder parasitärer Infektion entwickelt sich Exsudat (AUGUST, 1988). Mit zunehmender Dauer und Fortschreiten der Erkrankung verstärken sich die Symptome bis hin zu konduktiver oder cochleärer Taubheit einerseits durch Gehörgangstenose aufgrund massiver Fibrosierung des hyperplastischen Weichgewebes im Rahmen der chronischen Otitis, andererseits durch Mittel- und Innenohrschädigung bei aufsteigender Infektion (ROSSER, 1988) oder durch ototoxische Substanzen in den Otologika (PICKRELL et al., 1993).

Eine deskriptive Einteilung ist

- *OE erythematosa* (Abb.4)
- *OE ceruminosa* (Abb.5)
- *OE purulenta* (Abb.6)
- *OE proliferativa* (Abb.7) (OSTHOLD & WAGNER, 2008)

Ferner werden *OE erythematosa et ceruminosa* und *OE purulenta et proliferativa* unterschieden (CARLOTTI, 1997) beziehungsweise *OE erythemoceruminosa* und *OE suppurativa* (CARLOTTI, 1991) als Zusammenfassung kombinierter Symptome.

Die *OE erythematosa* zeigt klinisch als erste Stufe der *OE* unabhängig von der Primärursache Rötung (ROTH, 1988). Die *OE erythematosa* ist besonders für Allergien im Initialstadium typisch. Die *OE ceruminosa* umfasst die Phase der Ohrschmalzdrüsenhyperplasie mit vermehrter Produktion von Cerumen ohne Epithelentzündung, wie sie bei Endokrinopathien und primären Keratinisierungsdefekten vorkommt (GRIFFIN, 1993; WHITE-WEITHERS, 2005). Eine *OE purulenta* ist gekennzeichnet durch eitrigen, meist mikrobiell (oft gram-negative Stäbchen) bedingten Detritus, mit neutrophiler Reaktion. Das

Terminalstadium ist eine *OE proliferativa* mit fibröser, kalzifizierender oder ossifizierender partiellen oder vollständigen Gehörgangobstruktionen (ROTH, 1988).

Physiologischer Ohrenschmalz ist leicht gelblich und geruchlos (KOCH & PETERS, 1991; PUNDIR, 2007). Kaffeesatzartiges rotbraun-schwarzes Cerumen weist auf Ohrmilben hin (CHICKERING, 1988; ROTH, 1988). Braun-schwarz und weich ist das Cerumen bei Überbesiedelung mit Hefen, vor allem *Malassezia* spp.. *Candida* spp. kann einen gelblich Ausfluss provozieren. Ein blassgelb-schmieriger, teils grünlicher übelriechender Ausfluss deutet auf eine gram-negative Infektion hin. Gram-positive Keime verursachen braunes feuchtschmieriges Cerumen (CHICKERING, 1988; KOCH & PETERS, 1991; PATERSON, 2006). Einem gelblich, ölig, schmutzig trockenen Cerumen mit ranzig süßlichem Geruch kann eine seborrhoische *OE* aufgrund einer Endokrinopathie oder eines primären Keratinisierungsdefektes zugrunde liegen (CHICKERING, 1988; KOCH & PETERS, 1991). Pilzinfektionen bedingen graues Cerumen mit käsig muffigem Geruch (KOCH & PETERS, 1991).

Eine Diagnose wird nicht alleine aufgrund der klinischen Untersuchung und der Beurteilung des Cerumens gestellt. Immer müssen weitere diagnostische Schritte unternommen werden (ROTH, 1988).

### 3.2.3 Otoskopie

Die Otoskopie ist die häufigste endoskopische Untersuchung beim Kleintier (KRAFT, 1993). Der Adspektion der Ohrmuschel folgt die Gehörganguntersuchung mittels Otoskop. Der makroskopische Zustand des äußeren Gehörganges, Exsudat und die Integrität des TM werden beurteilt; entzündliche oder neoplastische Schwellungen und Fremdkörper offensichtlich (COLE, 2004). Diffuse Schwellung deutet auf initiales Ödem; kopfsteinpflasterartige Struktur auf Chronizität. Atopien beginnen im vertikalen Gehörgang. Gegebenenfalls ist zur Otoskopie eine Sedation nötig, eventuell reicht die Anwendung eines Lokalanästhetikums (LOGAS, 1999). Eine Allgemeinanästhesie ist wegen zu erwartender Schmerzen bei manchen Patienten sinnvoll (ROTH, 1988). Bei entzündlich hochgradig geschwollenen Gehörgängen können Glukokortikoiden über einige Tage (GRIFFIN, 1993) bis Wochen nötig



sein bevor eine erfolgreiche Untersuchung durchgeführt werden kann (NUTTALL & COLE, 2004). Bei der Otoskopie geht man unter visueller Kontrolle nahezu senkrecht in den äußeren Gehörgang ein ohne das Epithel mit dem Konus zu berühren. Dann kippt man auf Höhe des Gehörgangswinkels unter mildem lateral gerichteten Zug an der Ohrmuschel waagrecht ab (COLE, 2004). Der proximale Teil des äußeren Gehörganges und das TM sind bei Patienten ohne Ansammlung von Detritus oder Cerumen einzusehen (KRAFT, 1993). Rötung, Blutungen, Exsudat, Ulzera, Verengungen, Schwellungen, Umfangsvermehrungen werden erfasst (LOGAS, 1999; ANGUS & CAMPBELL, 2001; COLE, 2004). Atresie oder Fremdkörper können entdeckt werden (KÄHLER et al., 2001; SCHMIDT et al., 2007). Das Cerumen wird nach Menge, Farbe, Konsistenz sowie olfaktorisch beurteilt (KOCH & PETERS, 1991). Das Ergebnis der Otoskopie zusammen mit der Anamnese und der klinischen Untersuchung gibt die Richtung der weiteren Diagnostik vor. Eine *OE erythematosa* rückt die Allergiediagnostik in den Vordergrund, eine *OE ceruminosa* Endokrinopathien oder Keratinisierungsdefekte (ROTH, 1988). Eine *OE purulenta* indiziert eine sterile Tupferprobe zur Erkennung einer die Primärursache überdeckenden Infektion.

Bei massivem Exsudat/Detritus wird das Ohr unter Sedation gespült. Als Orientierung dienen Cerumen und einige Haare ventral am TM. Ist dieses nicht einsehbar, werden potentiell ototoxische Präparate vermieden (GOTTHELF, 2004). Verbackener Ohrenschmalz wird mit Zeruminolytika aufgeweicht (COLE, 2004). Aufsteigende Luftbläschen bei der Ohrspülung sind ein Hinweis auf einen Trommelfelldefekt. Fluorescein in der Spüllösung eignet sich zur Überprüfung der Trommelfellintegrität. Bei rupturiertem TM wird an der Nase oder im Rachenbereich Fluorescein mittels UV-Lampe sichtbar (GOTTHELF, 2005). Sind nach der Otoskopie Zweifel empfiehlt sich eine Tympanometrie (LITTLE & LANE, 1989). Bei Trommelfellveränderungen kann ein *OM* vorliegen, auch bei intaktem TM. Dann folgt eine Myringotomie, eine Inzision des TM, im caudoventralen Teil der *Pars tensa* des TM mit Liquornadel oder Harnkatheter und steriler Probennahme aus dem Mittelohr (COLE et al., 1998; GOTTHELF, 2005).

Neben Handotoskopen haben sich Videotoskope mit Arbeitsgängen für Spülen und Probennahme bei besserer Visualisierung etabliert (ANGUS & CAMPBELL, 2001; COLE, 2004). Archivierung und Besprechung der Befunde mit dem

Besitzer unabhängig vom Untersuchungszeitpunkt sind weitere die Compliance erhöhende Vorteile (GRIFFIN, 2010b). Ohrspülungen sind effektiver bei gleichzeitig minimaler Verletzungsgefahr (ANGUS & CAMPBELL, 2001). Die Sichtverhältnisse der Videootoskope mit Spülung und Absaugung sind den Standartotoskopen überlegen (COLE, 2004). Sehr effektives Reinigen ist mit Bürstchen möglich. Mittels Fremdkörperfasszange werden Fremdkörper entfernt (KRAFT, 1993; ANGUS & CAMPBELL, 2001).

Otoskopaufsätze sind desinfizierbar und werden möglichst nach jeder Benutzung gewechselt (NEWTON et al., 2006), um Nosokomialinfektionen etwa mit *Flavobacterium breve*, *Pseudomonas* spp. und *Staphylococcus* spp. zu vermeiden (KIRBY et al., 2010). Siebzigprozentiger Alkohol reicht nicht; eine 20minütige Desinfektion mit Cetylceide G oder 2%igem Chlorhexidingluconat scheint wirksam (NEWTON et al., 2006; KIRBY et al., 2010). Die Befunde der Otoskopie werden schriftlich, photographisch oder elektronisch archiviert (GRIFFIN, 1993).

Nach der Otoskopie folgt die Zytologie (CHICKERING, 1988; KRAFT, 1993).

### **3.2.4 Zytologie**

Die Zytologie ist eine einfache, schnelle und kostengünstige Methode, um sofort Informationen über die Natur der *OE* und den Therapieverlauf zu erhalten (ANGUS, 2005). Die Probenentnahme durch einen sauberen Otoskopkonus erfolgt vor jeder weiteren Intervention (CHICKERING, 1988; KRAFT 1993). Mit der Zytologie werden Parasitosen, Mikroorganismen (ANGUS, 2005) und Entzündungszellen/Gewebezubildungen erfasst. Eine Differenzierung in *OE* ohne Keimbesiedlung, *OE* mit bakterieller Infektion, *OE* mit Hefeinfektion und *OE* mit Hefen- und Bakterieninfektion dient der individuellen Therapie (OSTHOLD & WAGNER, 2009). Zur Identifikation von Hefen ist die Zytologie unverzichtbar (COLE, 2008). Eine Korrelation zwischen der Natur des Ohrausflusses und spezifischen Organismen wird vermutet (ROTH, 1988; KOCH & PETERS, 1991; PATERSON, 2006) ist aber nicht verlässlich (COLE, 2008). Nur mittels Zytologie kann mikrobielle Überbesiedelung von durch Phagozytose charakterisierter Infektion differenziert und die Relevanz der Mikroorganismen für das Krankheitsgeschehen beurteilt werden (ANGUS, 2005). Die

Therapiedauer wird mit Hilfe der Zytologie geklärt; die Wahl des Antibiotikums erfolgt nach Antibiogramm (ANGUS, 2004). Eine Studie ergibt eine 68%ige Übereinstimmung zytologischer und bakteriologischer Befunde (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). In einer weiteren Studie werden bei gesunden Hunden zytologisch bei 43 Prozent, in der bakteriologischen Untersuchung jedoch nur bei 25 Prozent Kokken nachgewiesen (TATER et al., 2003). Die größtmögliche Übereinstimmung erreicht man durch Tupfen des sterilen Tupfers auf einen Objektträger vor dem Verbringen in das Transportmedium. So erhält man genau das zytologische Bild der zur bakteriologischen Untersuchung eingesandten Probe (GRIFFIN, 2009a). Werden mehrere Proben eines Ohres genommen fallen keine signifikanten Unterschiede bei Kokken und Stäbchen aber moderate Differenzen bei den Hefen auf (LEHNER et al., 2010). Die Beurteilung erfolgt semiquantitativ (BUDACH & MÜLLER, 2012).

Verwendet werden unsterile, eventuell angefeuchtete Watteträger (GRIFFIN, 2009a). Der Ohrtupfer wird am Gehörgangswinkel genommen (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004; ANGUS, 2005). Bei eventueller Bakterienbeteiligung wird die Probe aus dem horizontalen Gehörgang genommen, da die physiologische bakterielle Besiedelung Richtung TM sinkt und eine Diagnose der bakteriellen Überbesiedelung vom Ort der Probennahme abhängig ist (AOKI-KOMORI et al., 2007). Für den proximalen Gehörgang oder das Mittelohr kann eine abgeschnittene angefeuchtete Ernährungssonde durch den Otoskopkonus geschoben und unter Sicht Material gewonnen werden (GRIFFIN, 2009b). Eine exfoliative Zytologie ist bei Gewebezubildungen indiziert (ANGUS, 2005). Aus jedem Ohr wird separat ein Abstrich entnommen, auch beim augenscheinlich gesunden äußeren Gehörgang (ANGUS, 2004). Nach Lufttrocknung wird das Präparat hitzefixiert um ein Auswaschen von Details zu vermeiden (HARVEY et al., 2001; COLE, 2008). Für die Untersuchung auf Malassezien bei *OE ceruminosa* wurde allerdings kein signifikanter Unterschied zwischen hitzefixierten und nicht-hitzefixierten gefärbten Präparaten festgestellt (TOMA et al., 2006; GRIFFIN et al., 2007). Ein zusätzliches Fixieren mit 100%igem Aceton wird bei sehr hohem Fettgehalt des Cerumens beschrieben (OSTHOLD & WAGNER, 2009).

Der Nativausstrich dient der Detektion von Parasiten. Dieser wird mit Mineralöl in niedriger Vergrößerung (x40) betrachtet und ist zuverlässig (ANGUS, 2005).

Eine hohe Parasitenbelastung kann durch das Otoskop, insbesondere bei Videootoskopie, erkannt werden. Bei Hypersensitivität ist die Detektion einzelner Parasiten schwierig (GRIFFIN, 2009b). *Otodectes cynotis* (Abb. 8) hat einen psoroptiformen Körper mit acht über den Körperperrand reichenden Beinen und kurzen ungegliederten Pedikeln (ANGUS, 2005). Weibliche adulte Milben sind 280 bis 450 µm groß, die männlichen Adulten sind etwas kleiner (ANGUS, 2004). Weitere Parasiten im Gehörgang sind *Demodex* spp., eine eher walzenförmige im Haarfollikel lebende Milbe mit acht stummeligen Beinen, *Sarcoptes scabiei variatio canis* und *Notoedres cati*, Räude milben, deren acht Beine nicht über den Körper hinausragen, sowie *Neotrombicula autumnalis*, Herbstgrasmilben, deren sechsbeinige Nymphe auf dem Wirt parasitiert und aufgrund ihrer Größe und orangenen Farbe mit bloßem Auge erkennbar ist (ANGUS, 2005).

Für die Zytologie ist eine Färbung nötig. Zytologische Abstriche werden auf Vorhandensein, Anzahl und Charakteristika von Hefen, Bakterien und Entzündungszellen untersucht (ANGUS, 2004). Nach Trocknung wird der Objektträger mikroskopiert. Zunächst wird bei geringer Vergrößerung (x40) entsprechend einem Blutaussstrich mäanderförmig nach repräsentativen Stellen durchgemustert (CHICKERING, 1988). Diese geben durch intensivere Färbung Hinweise auf die Anwesenheit von Entzündungszellen, Zellkernen, Zellkernresten oder Protein. Aufgrund der Dreidimensionalität eines Ohrtupferausstriches muss immer neu fokussiert werden (GRIFFIN, 2009a). Zellen (Leukozyten, Erythrozyten, Korneozyten, neoplastische Zellen) und Hefen erkennt man bei mittlerer Vergrößerung (x100)(ANGUS, 2005; CHICKERING, 1988). Bakterien werden mit starker Vergrößerung (x1000, HPF; high power field, Ölimmersion) nach Stäbchen und Kokken differenziert, ebenso Zellstrukturen, Phagozytose oder Tumorzellen (CHICKERING, 1988; ANGUS, 2005). Es werden zehn Areale im HPF angeschaut, gezählt und gemittelt (ANGUS, 2005). (Abb. 9; 10)

Aufgrund des hohen Lipidgehaltes färbt sich normales Cerumen wenig an. Bei einer OE ändert sich die Zusammensetzung, die Anfärbbarkeit ist besser (CHICKERING, 1988). Korneozyten und Mikroorganismen lassen sich neben Oberflächendebris aber auch im gesunden Cerumen anfärben (CHICKERING, 1988; GRIFFIN, 2009a). Lipide und Oberflächendebris erscheinen als klare kleine Blasen (GRIFFIN, 2009a). Korneozyten stellen sich als blass gefärbte, basophile, flächige oder aufgerollte scherbenartige Strukturen ohne Zellkern dar. Der

Zellkern der Keratinozyten ist violett bis bläulich und rund. Teils beinhalten Korneo- und Keratinozyten Melaningranula, winzige, gelb-braune bis schwarze, runde oder ovale Strukturen. Eine Verwechslung mit Bakterien wird über Fokussieren vermieden (ANGUS, 2005). Färbepräzipitate sind blauschwarz erscheinende Artefakten; eine Verwechslung mit Bakterien ist möglich. Präzipitate sind im Gegensatz zu Kokken jedoch unterschiedlich große unregelmäßige Klumpen (COLE, 2008). Kokken sind rund und etwa 0,3 bis 1,2 µm groß, Stäbchen länglich-oval und bis zu 1,5 µm. Staphylokokken liegen in Paaren oder Tetraden, die kleineren Streptokokken und Enterokokken in kurzen Strängen (ANGUS, 2005). Fäkalkokken kommen häufig paarweise vor (KOWALSKI, 1988). Corynebakterien sind große, plumpe, perlen- oder keulenartige Stäbchen (KOWALSKI, 1988). Etwas kleiner sind *Pseudomonas* spp. und *Proteus* spp. oder *Escherichia coli* (ANGUS, 2005). Aufgrund ihrer Größe nicht detektiert werden Mykoplasmen, Rickettsien und einige Spirochäten (GRIFFIN, 2009a). Hefen färben sich basophil an; sie können frei, in Klumpen oder auf Korneo- und Keratinozyten angehaftet vorkommen (CHICKERING, 1988). Das Genus *Malassezia* enthält acht Spezies. Sieben sind lipidabhängig; *Malassezia pachydermatis* ist lipidunabhängig. Eine variable Anfärbbarkeit und Morphologie lässt Hefen unterschiedlich aussehen (ANGUS, 2005). *Malassezia* spp. zeigen eine durch unipolares Sprossen bedingte Erdnuss- oder Schneemannform maximal von der Größe eines caninen Erythrozyten (7 µm). (Abb. 11). *Candida* spp. sind kleinere, dünnwandige, rundovale, schwach gefärbte Gebilde mit kapselbedingt ungefärbtem Hof (ANGUS, 2005) (Abb.12). Finden sich Hefen in einem Abstrich aus der *Bulla tympanica*, ist dies immer ein pathologischer Befund. Artefakte sind Fasern des Watteträgers, Haare, Pollen und Makrokonidien (GRIFFIN, 2009a). Eine geringe Anzahl Mikroorganismen kommen auch im gesunden Gehörgang vor (ANGUS, 2005). Im vertikalen Gehörgang finden TATER und Mitarbeiter (2003) Hefen bei 96 Prozent der Fälle, Kokken bei 42 Prozent und unabhängig von der Ohrform keine Stäbchen. (TATER et al., 2003). Eine andere Studie ergibt bei 30 Prozent Malassezien (GIRÃO et al., 2006). Eine in Indien durchgeführte Studie zeigt neben Korneozyten und Hefen in gesunden Gehörgängen und bei OE gram-positive und/oder gram-negative Mikroorganismen. Auch in gesunden Gehörgängen sind Leukozyten vorhanden (PUNDIR, 2007). Dies steht im Gegensatz zu anderen

Studien, in denen jede Anwesenheit von Leukozyten als pathologisch erachtet wird (ANGUS, 2005; GRIFFIN, 2009a). GINEL und Mitarbeiter (2002) finden bei 400-facher Vergrößerung maximal acht Hefen und 30 Bakterien, ausschließlich Kokken, im gesunden Gehörgang. Insgesamt werden pro Gesichtsfeld mehr als 25 Bakterien und mehr als fünf Hefen als pathologisch, weniger als fünf Bakterien und weniger als zwei Hefen als normal angesehen. Dazwischen liegt eine Intermediärzone (GINEL et al., 2002). Nach GRIFFIN (2009) sind im HPF mehr als fünf Kokken, ein Stäbchen, drei Hefen sowie Entzündungszellen im horizontalen Gehörgang pathologisch (BEALE, 2007b; GRIFFIN, 2009a). REME und Mitarbeiter (2006) finden bis zu fünf Hefen im gesunden vertikalen Gehörgang (REME et al., 2006). Immunologische und mikroklimatische Gegebenheiten beeinflussen die Zytologie; sie wird im Kontext der klinischen Befunde interpretiert.

Bei einer *OE* werden häufiger Mikroorganismen isoliert (DICKSON & LOVE, 1983, GINEL et al., 2002; GRIFFIN, 2009a).

Entzündungszellen sind meist neutrophile Granulozyten. Phagozytose oder toxische Degeneration signalisieren eine aktive Infektion (CHICKERING, 1988; OSTHOLD & WAGNER, 2009). Neutrophile Granulozyten haben einen segmentierten Kern und ein blasses, leicht granuliertes Zytoplasma. Eosinophile Granulozyten haben rot angefärbte Granula, basophile Granulozyten blaue Granula (GRIFFIN, 2010a). Manchmal sind nur die Granula mit DNA-Strängen rupturierter Granulozyten zu sehen, besonders bei eosinophilen Granulozyten (GRIFFIN, 2009a). Eosinophile Granulozyten weisen auf Hypersensitivität/Allergie und Parasitosen hin (GRIFFIN, 2009a; OSTHOLD & WAGNER, 2009). Sechszehn Prozent der akuten *OE* und 82 Prozent der chronischen *OE* gehen mit einer *OM* einher. Bei neutrophilen Granulozyten wird eine *OM* vermutet und weiterführende Diagnostik eingeleitet (ANGUS, 2004). Makrophagen sind mononukleäre Zellen und weisen auf Chronizität oder tiefe Läsionen hin (CHICKERING, 1988; MENDELSON et al., 2006), ebenso Riesenzellen (OSTHOLD & WAGNER, 2009). Makrophagen sind große, runde, blau gefärbte Zellen mit nierenförmigem, dunklem Kern und phagozytiertem Material in Vakuolen. Das können Fremdkörperanteile, Melanosomen, Mikroorganismen, Erythrozyten, degenerierte Entzündungszellen oder Kerndebris sein (GRIFFIN, 2009a). Bei Riesenzellen werden *Demodikose*, Keratin und

andere Fremdkörper, Leishmanien oder Mykosen vermutet (MENDELSON et al., 2006; OSTHOLD & WAGNER, 2009). Erythrozyten kommen bei Blutung oder Ulzeration vor (CHICKERING, 1988). Proteinerhöhung ist ein Initialzeichen der Entzündung (OSTHOLD & WAGNER, 2009). Kernhaltige Keratinozyten weisen auf Parakeratose, etwa bei Keratinisierungsstörungen und Infektion, Erosion oder Probenentnahme unterhalb des *Stratum corneum* hin (GRIFFIN, 2009a; OSTHOLD & WAGNER, 2009). Auch im gesunden Gehörgang können einige kernhaltige Keratinozyten vorhanden sein (TATER et al., 2003). Abgerundete Keratinozyten, akantholytische Zellen, lassen eine Immunopathie, hier Pemphiguskomplex, vermuten (GRIFFIN, 2009a), insbesondere mit neutrophilen Granulozyten ohne Infektion/bakterielle Überbesiedelung (MENDELSON et al., 2006). Bei Stäbchen, vor allem *Pseudomonas* spp., ohne neutrophile Granulozyten wird nach einer eventuellen Immunsuppression gesucht. Direkte Hinweise auf Neoplasien findet man selten zytologisch. Lagen epithelialer Zellen geben Anlass, weiterführende Diagnostik nach epithelialen Tumoren einzuleiten (ANGUS, 2005). Drüsenzellen weisen auf Ceruminaldrüsentumoren hin (CHICKERING, 1988). Rundzellen können Lymphome, Histiozytome, Plasmazytome sein. Spindelzellen sind bei Gehörgangsfibrose oder Fibrosarkomen vorhanden. Mastzellen lassen sich schnell erkennen und deuten auf ein Mastozytom hin. Bei respiratorischem Epithel sind wahrscheinlich nasopharyngeale Polypen durch das Mittelohr und das TM in den äußeren Gehörgang vorgedrungen (ANGUS, 2005). Bei Verdacht auf eine gewebliche Entartung oder Immunopathien werden Biopsien entnommen (ROGERS, 1988; SARIDOMEICHELAKIS, 2008).

#### **3.2.4.1 Schnellfärbeverfahren**

Für die Zytologie benötigt man ein qualitativ hochwertiges binokulares Mikroskop (GRIFFIN, 2009a), Wattetupfer, Objektträger und Färbelösungen, wie sie in der Praxis standardmäßig vorhanden sind. Folgende Färbungen sind verfügbar:

- Hämatologische Färbungen nach Romanowsky: modifizierte Wright- Färbung, Giemsa<sup>®</sup>, May-Grünwald-Giemsa (Pappenheim<sup>®</sup>),
- Schnellfärbungen vom Romanowsky-Typ: unter anderem Diff-Quik<sup>®</sup>,

### Hemacolor<sup>®</sup>

- Vitalfärbungen: Neues-Methylenblau, Brillantkresylblau
- Tri- und polychromatische Färbungen: Papanicolaou-Färbung, Haematoxylin/Eosin-Färbung (HE) (MISCHKE, 2005)

Diff-Quik<sup>®</sup>, Hemacolor<sup>®</sup> oder Neues-Methylenblau sind gängige Färbungen bei der Bewertung zytologischer Präparate aus Gehörgängen (TESKE & SLAPPENDEL, 1997; ANGUS, 2004; MISCHKE, 2005; GRIFFIN, 2009a).

Färbungen vom Romanowsky-Typ benötigen Lufttrocknung vor der Färbung (TESKE & SLAPPENDEL, 1997; MISCHKE, 2005). Luftgetrocknete Präparate können vor der Färbung gelagert werden. Es ist keine Fixierung mit Spray, Alkohol oder Formalin erlaubt (TESKE & SLAPPENDEL, 1997). Die optimale Einwirkzeit hängt von Probendicke und dem Alter der Färbelösung ab. Je höher der Zell- und Proteingehalt ist, desto länger ist die Einwirkzeit (MISCHKE, 2005). Die Färbelösungen sind zum einen alkalisch (Azur; Methylenblau) und zum anderen sauer (Eosin). Basische Zellelemente wie Proteine (Hämoglobin der Erythrozyten) und lysosomale Enzyme werden mit dem sauren Farbstoff rot-orange gefärbt. Saure Zellbestandteile wie Nukleinsäure im Zellkern werden blau-violett gefärbt. (MISCHKE, 2005; TVEDTEN & COWELL, 2006). Die Färbung ist permanent, die Präparate können über Jahre lichtgeschützt aufbewahrt werden. Färbungen vom Romanowsky-Typ stellen Zytoplasma und darin enthaltene Strukturen sehr gut dar; auch Malignitätskriterien in der Tumordiagnostik sind gut zu erkennen. Der Vorteil der Schnelfärbungen vom Romanowsky-Typ ist, dass Ergebnisse schon nach wenigen Minuten vorliegen (MISCHKE, 2005). Weit verbreitet ist Diff-Quik<sup>®</sup>. Wie die konventionelle Romanowskyfärbung erlaubt es bei etwas geringerer Kerndetailerkennbarkeit eine bessere Differenzierung zytoplasmatischer Strukturen und Mikroorganismen (TESKE & SLAPPENDEL, 1997; GRIFFIN, 2009a; OSTHOLD & WAGNER, 2009) als Neues-Methylenblau. Hemacolor<sup>®</sup> ist mit Diff-Quik<sup>®</sup> vergleichbar. Wird ein Mastozytom vermutet, sollte bei Schnelfärbungen länger fixiert und gefärbt werden, da sich die Mastzellgranula bei manchen Hunden besser darstellen (MISCHKE, 2005). Neues-Methylenblau ist eine monochrome Färbung mit Darstellung in unterschiedlichen Blautönen. Sie eignet sich zur Darstellung von Details im Zellkern, Gewebefragmenten und Pilzen (TVEDTEN & COWELL, 2006). Mikroorganismen färben sich bei den vorgenannten Färbungen blau an. Eine



Differenzierung gelingt nur anhand Größe und Form (COLE, 2008). Die Gramfärbung hingegen wird zur Differenzierung der Bakterien in „gram-positiv“ und „gram-negativ“ angewendet. Die Wahl des Antibiotikums richtet sich gegebenenfalls danach. Gram-positive Bakterien färben sich blau, gram-negative Bakterien rot (TVEDTEN & COWELL, 2006). In der Regel sind im Gehörgang gefundene Kokken gram-positiv (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp.) und Stäbchen gram-negativ (*Pseudomonas* spp., *Proteus* spp.). Lediglich Corynebakterium, und einige weniger häufige Mikroorganismen wie *Actinomyces* und *Nocardia* spp., gram-positive Stäbchen, folgen nicht dieser Regel (ANGUS, 2005).

TOMA und Mitarbeiter (2006) schlagen den alleinigen Gebrauch der blauen Gegenfärbung einer Schnellfärbung vom Romanowsky-Typ vor. Hier wurden hitzefixierte und nicht-hitzefixierte Präparate sowie die Färbung vom Romanowsky-Typ mit einer alleinigen Gegenfärbung verglichen (TOMA et al., 2006). Färbelösungen werden je nach Nutzungsintensität zeitnah regelmäßig gewechselt. Die Färbung von Abstrichen der Analdrüsen oder von Kotasstrichen in derselben Färbelösung ist wegen der Gefahr bakterieller Kontamination zu vermeiden (MENDELSON et al., 2006).

### 3.2.5 Mikrobiologische Untersuchungen

Bakteriologische Untersuchungen mit Antibiotogramm separat für jedes Ohr sind bei rezidivierenden OE, OM-Verdacht und zytologischem Nachweis von Stäbchen indiziert (KOWALSKI, 1988; GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004), eventuell auch eine mykologische Untersuchung (GIRÃO et al. 2006). Empirische Therapien fördern die Selektion auf resistente *Pseudomonas* spp. (BELL, 2003; HILL, 2009b).

In einer Studie stimmen Zytologie und Kultur in 68 Prozent der Fälle überein. Vom selben Entnahmeort werden in 20 Prozent verschiedene Bakterienspezies isoliert und in 20 Prozent ergibt dieselbe Bakterienspezies ein unterschiedliches Antibiotogramm (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004).

Zu 90 Prozent liegt eine unterschiedliche Keimbelastung zwischen äußerem Gehörgang und *Bulla tympanica* vor, übereinstimmend jedoch meist *Staphylococcus pseudintermedius*, Hefen und *Pseudomonas* spp.. Die

Resistenzlage in Exsudat und Gewebe des vertikalen Gehörganges übereinstimmend isolierter Keime ist vergleichbar. Die Untersuchung des Exsudates ist ausreichend (COLE et al., 2005).

Sind Gewebetherapeutikaspiegel bei einer OM wichtig, wird eine repräsentative Gewebeprobe der *Bulla tympanica* entnommen (COLE et al., 2008). Der Resistenztest wird mit der Kirby-Bauer-Methode als Agardiffusionstest (DDT) oder über die Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) als MIC<sub>50</sub> und MIC<sub>90</sub>, alternativ vereinfacht im Mikrodilutionsverfahren durchgeführt (MCKAY et al., 2007; SCHWARZ et al., 2010). Der DDT eignet sich zur qualitativen Diagnose, die MIC der Dosisfindung (COLOMBINI et al., 2000). Die Festlegung von MPC ("mutant prevention concentration") oberhalb der MIC wurde zur Vermeidung der Persistenz resistenter Keime trotz anfänglich klinischem Erfolg angeregt (BLONDEAU, 2010). Ergebnisse des nationalen Resistenzmonitoringprogrammes BftGermVet von Keimen, die bei der caninen OE isoliert wurden, werden unter GERMAP 2008 veröffentlicht (GERMAP 2008). In absteigender Häufigkeit werden *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp. und *Proteus* spp., ferner *Mikrokokkus* spp.,  $\beta$ -hämolysierende Streptokokken, *Pasteurella* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. und *Acinetobacter* spp. bei caninen Otitiden identifiziert (BLUE & WOOLEY, 1977; CHICKERING, 1988; MARTIN BARRASA et al., 2000; MORRIS, 2004; HARIHARAN et al., 2006; LYSKOVA et al., 2007; ALVES et al., 2009; PENNA et al., 2010). Hefen werden regelmäßig gefunden (GIRÃO et al., 2006), ebenso bakterielle und mykotische Mischbesiedelung (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004).

Die Resistenzlage der Kokken ist gut. Penicilline, Cefalosporine, Fluorochinolone und Aminoglykoside sind bei *Staphylococcus* spp. wirksam (KISS et al., 1997b; PETERSEN et al., 2002; TEJEDOR & MARTIN BARRASA, 2002; GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004; ZAMANKHAN et al., 2010). Oxacillin gilt wie Methicillin als Indikator für Resistenz gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (VANNI et al., 2009). Staphylokokken und Streptokokken haben eine nur geringgradig unterschiedliche Resistenzlage. Polypeptidantibiotika wirken bei Kokken schlecht (KOWALSKI, 1988; GERMAP, 2008) und bei Stäbchen gut (TEJEDOR & MARTIN BARRASA, 2002). Die Resistenzlage gram-negativer Stäbchen, vor

allein die von *Pseudomonas aeruginosa*, ist schlecht. GERMAP 2008 berichtet für *Pseudomonas aeruginosa* eine Resistenz von über 50 Prozent für Gentamicin, über 70 Prozent für Enrofloxacin, sowie nahezu 100%iger Resistenzen bei allen anderen von 14 getesteten Wirkstoffen (GERMAP2008).

Der häufige Nachweis einer *Pseudomonas aeruginosa*-Monoinfektion (KOWALSKI, 1988) kann in der Natur des Keimes bedingt sein. *Pseudomonas aeruginosa* ist in der Lage andere Keime zu verdrängen.

### **3.2.6 Bildgebende Verfahren**

Bildgebende Verfahren sind Röntgen, CT und MRT. Besonders in der Diagnostik von Mittel- und Innenohrveränderungen, aber auch des äußeren Ohres ergänzen sich diese Verfahren. Immer ist eine Vollnarkose nötig. Ein Röntgenstatus der Ohren umfasst als „Bulla-Serie“ fünf Aufnahmen: eine laterolateral, zwei schräg im 20°Winkel, eine durch den geöffneten Fang und eine ventrodorsal oder dorsoventral. Gesunde äußere Gehörgänge sind als luftgefüllte Strukturen mit glatten Innenwänden sichtbar (SOLANO, 2005). Eine Positiv-Kontrast-Kanalographie auf Jodbasis wird bei indifferentem TM-Befund durchgeführt (TROWER et al., 1998). Das Ausmaß chronisch veränderter oder stenotischer Gehörgänge wird sichtbar (TROWER et al., 1998; EOM et al., 2000). Die korrekte Lagerung des Patienten ist zur Vermeidung falsch-negativer Befunde wichtig. CT und MRT ergänzen die Röntgendiagnostik (BISCHOFF & KNELLER, 2004). Verdickungen, Fibrosierung, Kalzifizierung des äußeren Gehörganges und Flüssigkeitsfüllungen der *Bulla tympanica* werden beim CT entdeckt. Über Kontrastmittelgabe werden Entzündung und Neoplasie abgegrenzt. Sind *Bulla tympanica* oder Innenohr interessant, sind CT und MRT als ergänzende Diagnostika nötig. Ein MRT ist noch besser in der Lage, Weichteil- und Innenohrveränderungen zu entdecken (SOLANO, 2005).

## **4. Management und Therapie der *Otitis externa***

Ziele des *OE*-Managements sind Therapie der Folgen der Primärerkrankung, Säuberung und Trocknung des Gehörganges, Reduktion der Entzündung und

Sekundärinfektion. Verschiedene Reinigungs- und Spültechniken und topische Therapien werden eingesetzt, seltener die systemische Therapie. Otoskopische und zytologische Kontrolle erfolgen bis zum Ende der Therapie alle 14 Tage (ROSYCHUK, 1994).

#### **4.1 Konservative Therapie**

Die konservative Therapie kann topisch oder systemisch erfolgen. Die topische Therapie gliedert sich in Gehörgangsreinigung-/spülung, vom Besitzer zuhause oder ambulant in der Praxis durchgeführt, und medikamentelle Therapie mit diversen Otologika. Eine erfolgreiche Therapie basiert auf vier Grundprinzipien:

1. Diagnose und adäquate Therapie der prädisponierenden und perpetuierenden Faktoren und Primärursachen,
2. Identifikation mikrobieller Besiedelung/Infektion oder von Fremdkörpern,
3. Gründliches Reinigen des gesamten äußeren Gehörganges von Exsudat, Debris und Cerumen,
4. Detaillierte Besitzeraufklärung zu ambulanten Pflege- und Therapiemaßnahmen (MCKEEVER, 1993; HILL, 2008; LINEK, 2011).

##### **4.1.1 Lokale Therapie**

###### **4.1.1.1 Spülung/Ohrreiniger**

Der gesunde Gehörgang wird wegen der Gefahr der Mazeration nicht gereinigt. Exzessiver Haarwuchs im Gehörgang kann depiliert werden, entsprechende Cremes können allerdings die Haut irritieren (NUTALL & COLE, 2004).

Die Gehörgangsreinigung beseitigt Exsudat, Detritus und Fremdmaterial, der äußere Gehörgang wird besser eingesehen (HARVEY et al., 2001; NUTALL & COLE, 2004). Falsche Reiniger können kontraproduktiv sein und die Entzündung verschlimmern (BELL, 2003). Massiver Detritus führt zu Hörverlust bis hin zu (meist nicht vollständiger) konduktiver Taubheit bei erhaltener Mittel- und Innenohrfunktion. Eine Gehörgangsreinigung verbessert das Hörvermögen; eine Beeinträchtigung des Hörvermögens durch Ohrreinigung kommt nicht vor,

solange das Trommelfell intakt ist (EGER & LINDSAY, 1997). Je nach Trommelfellintegrität werden Reinigungslösung und Medikation gewählt (HARVEY et al., 2001). Wattestäbchen werden wegen eventueller mechanischer Irritation des Epithels oder Kompression von Cerumen auf das TM vermieden (CHESTER, 1988). Flüssiges Cerumen wird über eine Einmalspritze abgesaugt (HARVEY et al., 2001). Dickes, fettiges Cerumen wird mit Zeruminolytika vorbehandelt (CHESTER, 1988). *In vitro* an standardisiertem synthetischen Cerumen wurde die beste zeruminolytische Eigenschaft für einen Salicyl-, Milch-, Ölsäure, Propylenglycol, Ethoxydiglycol und Glycerin enthaltenden Ohrreiniger (Otoclean<sup>®</sup>) gefunden. Wirksam sind auch Menthol, Chlorothymol und Borax oder Squalene enthaltende Ohrreinger (SANCHEZ-LEAL et al., 2006). Zeruminolythen werden ausgespült oder in Narkose mit Fremdkörpergreifzangen, Küretten oder Ohrlöffelchen entfernt (NUTALL & COLE, 2004).

Der Reiniger wird eingebracht (bei ruhigen Hunden auch mit Ballspritze) und wirkt kurz ein. Sofort anschließend erfolgt die Massage des Gehörganges (NUTALL & COLE, 2004). Danach wird überschüssiges Material unter Sicht mit einem Wattebausch oder einer Ballspritze entfernt oder vom Hund selber ausgeschüttelt (NUTALL & COLE, 2004; MELMAN, 2005). Gereinigt wird bei Bedarf bis zu dreimal täglich (MELMAN, 2005). Festsitzender Detritus lässt sich so jedoch nicht entfernen (NUTALL & COLE, 2004). Eine Gehörgangspülung unter Anästhesie wird vorgenommen, wenn die Gehörgangsreinigung durch den Besitzer nicht erfolgreich ist oder wenn eine purulente *OE*, eventuell mit gram-negativer Komplikation, eine *OM*, eine Neoplasie oder ein Fremdkörper vorhanden sind (GORTTEL, 2004, NUTALL & COLE, 2004). Zur vorbereitenden mechanischen Reinigung unter Sichtkontrolle dienen Drahtschlinge oder stumpfe Kürette (HARVEY et al., 2001).

Verschiedene Methoden und Instrumente stehen zur Verfügung:

- Ballspritze: die Spülflüssigkeit wird unter vorsichtigem Druck in den vertikalen Teil des äußeren Gehörganges eingebracht und wieder angesaugt, bis die abgesaugte Flüssigkeit klar ist.
- Munddusche: der sanft eingestellte Strahl bringt die Spülflüssigkeit bis vor das TM. Die Flüssigkeit läuft passiv aus dem Gehörgang oder wird abgesaugt. Ein zu starker Strahl kann das eventuell ohnehin schon angegriffene TM rupturieren lassen.

- Auriflush: Ein spezielles Gerät zum Anschluss an den Wasserhahn. Einbringen und parallel Absaugen der Spülflüssigkeit ist auch am wachen Patienten möglich.
- Harnkatheter/Ernährungssonde mit Videootoskopie: zur Spülung unter Sicht. Ein Dreiwegehahn mit aufgesetzter Spritze an die Sonde/den Katheter angeschlossen erleichtert Einbringen und Absaugen von Spülflüssigkeit. Eine Myringotomie im caudoventralen Quadranten des TM erlaubt Spülen der *Bulla tympanica* und Probenentnahme. Die retrograde Spülung der *Bulla tympanica* ist die effektivste Methode, das Mittelohr von Exsudat/Debris zu säubern. Videootoskope mit Spül- und Absaugvorrichtung stehen zur Verfügung (NUTALL & COLE, 2004).

Neurologische Störungen (Facialislähmung, Horner Syndrom, Vestibulärsyndrom, temporäre Taubheit) und Kopfschüttel sind mögliche Komplikationen. Die Gehörgangsspülung wird mit Spülflüssigkeit durchgeführt. Bei rupturiertem TM sind Wasser und isotone oder hypertone (3%ig) Kochsalzlösung sicher (GORTTEL, 2004; NUTALL & COLE, 2004). *In vitro* antimikrobiell sind Milch-, Salicyl-, Zitronen-, Bor-, Essigsäure, Glycerin/Glycerol, Isopropanol, Propylenglycol, Tris-EDTA und Chlorhexidin (SWINNEY et al., 2008). Isopropylalkohol wirkt mild austrocknend und desinfizierend, besonders bei fettigem Debris, kann allerdings irritierend sein (CHESTER, 1988). Milch- und Salicylsäure haben konzentrationsabhängig keratolytische und keratoplastische Eigenschaften und sind adstringierend, antiseptisch und antimykotisch (WILCKE, 1988). Sie werden bei Keratinisierungsstörungen angewendet (CHESTER, 1988). *In vitro* und *in vivo* war ein kommerzieller Ohrreiniger (EpiOtic<sup>®</sup>, in Verbindung mit Parachlorometaxylo (PCMX)) antimikrobiell wirksam (LLOYD et al., 1998; REME et al., 2006). Borsäure und Essigsäure wirken adstringierend, als Puffer und Lösungsmittel (CHESTER, 1988; WILCKE, 1988). Eine 2 - 2,5%ige Lösung (25 Prozent Wasser, 25 Prozent Isopropylalkohol, 50 Prozent Essig 5%ig) wird bei *Pseudomonas OE* empfohlen (GRIFFIN, 2007). Zweiprozentig tötet Essigsäure *Pseudomonas*, 5%ig Staphylokokken (HARVEY et al., 2001). Bei Malassezienotitis kann wöchentliche Anwendung von Bor- oder Essigsäureenthaltenden Reinigern ein Rezidiv verhindern (MELMAN, 2005).

Silber Sulfadiazin (1%ig) wird bei therapieresistenter *Pseudomonas aeruginosa OE* empfohlen (CHESTER, 1988; GOTTHELF, 2005; GRIFFIN, 2007) und ist als Kombination mit Enrofloxacin in Europa erhältlich (Baytril otic<sup>®</sup>).

Tris-EDTA erhöht die Sensitivität von *Pseudomonas* spp. gegenüber vielen Antibiotika (CHESTER, 1988). Gentamicin oder Enrofloxacin können dem Tris-EDTA-Reiniger zugegeben werden (MELMAN, 2005). In sauren Reinigern werden sie inaktiviert. *In vitro* und teils *in vivo* wurde für *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und gram-positive Keime ein Synergismus mit verschiedenen Antibiotika festgestellt (WOOLEY et al., 1983 a, b, c; FARCA & NEBBIA, 1994; FARCA et al., 1997). Für Tris-EDTA mit Benzylalkohol wurde *in vitro* eine Wirkung gegen  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp. und *Staphylococcus* spp. gefunden (COLE et al., 2006). Jodverbindungen (Polyvinylpyrrolidon; PVP, 0,05 bis 0,5%ig), Chlorhexidin (0,5%ig in Propylenglycol) und Essigsäure sind antibakteriell. PVP und Chlorhexidin werden durch organisches Material inaktiviert (CHESTER, 1988). Chlorhexidin 0,05%ig hat ein breites antibakterielles Spektrum ohne beim Hund im Gegensatz zur Katze ototoxisch zu sein (selbst bei rupturiertem TM), ist aber zu mild für *Pseudomonas* (HARVEY et al., 2001). Über 0,5%ig jedoch ist es ototoxisch (CHESTER, 1988). Eine Instillation bei rupturiertem TM wird kontrovers diskutiert (GORTTEL, 2004; HARVEY et al., 2001). Die antibakterielle Wirkung hängt mit der Adsorption des positiv geladenen Chlorhexidinmoleküls von der negativ geladenen bakteriellen Zellwand ab. Dies bedingt bei niedriger Konzentration eine erhöhte Permeabilität mit folgendem Ausstrom intrazellulärer Substanzen (HUGO & LONGWORTH, 1964; HUGO & LONGWORTH, 1965). Höhere Konzentrationen verursachen die Präzipitation des bakteriellen Zytoplasmas und Zelltod (HUGO & LONGWORTH, 1966). Propylenglycol spendet Feuchtigkeit und dient als Lösungsmittel für Wirkstoffe (WILCKE, 1988).

Es gibt keinen Hinweis auf die Förderung der Resistenzentwicklung durch Antiseptika/Desinfektionsmittel (WEBER & RUTALA, 2006). Allerdings wurde eine höhere bakterielle Kontamination nach mehrfachem Gebrauch in Tris-EDTA-enthaltenden Ohrreinigern (vor allem an der Applikatorspitze) im Vergleich zu anderen Ohrreinigern festgestellt (BARTLETT et al., 2011).

#### **4.1.1.2 Medikamentöse lokale Therapie**

Eine erfolgreiche *OE*-Therapie basiert auf lokaler Medikation. Diese richtet sich nach Otoskopie, Zytologie und Antibiotogramm. Da bei lokaler Medikation höhere Wirkstoffspiegel im Gehörgang erreicht werden als bei systemischer Applikation, können *in vitro* resistente Wirkstoffe *in vivo* erfolgreich sein (MORRIS, 2004). Es muss ausreichend Medikament in den Gehörgang eingebracht werden (WEFSTAEDT et al., 2011). Bei mikrobieller Besiedelung oder Infektion wird ein Antibiotikum appliziert, bei Hefen ein Antimykotikum, bei Ohrmilben ein Antiparasitikum, bei Erythem und vorherrschender Entzündung mit neutrophilen Granulozyten Glukokortikoide (MELMAN, 2005). Die akute *OE* wird mit gängigen Kombinationspräparaten (beispielsweise Surolan<sup>®</sup>, Aurizon<sup>®</sup>, Easotic<sup>®</sup>, Posatex<sup>®</sup>), bei Bedarf nach Gehörgangsreinigung, angegangen. Eine Abschlussuntersuchung wird empfohlen. Die chronische/rezidivierende *OE* bedarf einer vollständigen dermatologischen Aufarbeitung. Die Integrität des TM wird geprüft. Bei exzessivem Ödem und Proliferation, die eine erfolgreiche lokale Therapie verhindern, wird eine Abschwellung über orale Prednisolongabe versucht und eine Kontrolle nach zwei bis vier Wochen angestrebt (MORRIS, 2004). Ist eine *Pseudomonas aeruginosa-OE* zu therapieren, sind die Ziele die Beseitigung von Exsudat und Debris und die Vermeidung erneuter Ansammlungen, Entzündungsbeseitigung, Abtöten der Pseudomonaden und eine Veränderung des Mikroklimas zur Prävention erneuter Infektion. Topisch ist hier die Kombination von Ohrreinigern und Antibiotika/Antiphlogistika indiziert (GRIFFIN, 2010a).

Für die topische Anwendung stehen zugelassene Antibiotika zur Verfügung: Chloramphenicol, Marbofloxacin, Enrofloxacin, Orbifloxacin, Gentamicin, Neomycin und Polymixin B.

Chloramphenicol (Otiprin<sup>®</sup>) ist ein bakteriostatischer Proteinsynthesehemmer gegen gram-positive und gram-negative Keime. Der Verdacht der anaplastischen Anämie, analog zum Menschen, wird diskutiert; Hypersensitivität ist bekannt (WILCKE, 1988; MORRIS, 2004).

Die Fluorochinolone Marbofloxacin (Aurizon<sup>®</sup>), Enrofloxacin (Baytril otic<sup>®</sup>) und Orbifloxacin (Posatex<sup>®</sup>) sind zugelassen. Ciprofloxacin (Tricide<sup>®</sup>), der aktive Enrofloxacinmetabolit, kann auch appliziert werden (MORRIS; 2004; AUSTEL et al., 2009). Marbofloxacin und Ciprofloxacin sollen Enrofloxacin überlegen sein (COLOMBINI et al., 2000; MARTIN BARRASA et al., 2000; WILDERMUTH



et al., 2007). Die höhere Lipophilie von Enrofloxacin ist eventuell verantwortlich (TEJEDOR et al., 2003). Fluorochinolone wirken als mikrobielle Gyrase-Hemmer konzentrationsabhängig bakterizid gegen gram-positive wie gram-negative Keime bei geringer Ototoxizität; schnelle Resistenzentwicklung ist bekannt (MORRIS, 2004; GOTTHELF, 2005). Fluorochinolone werden bei komplizierter OE mit *Pseudomonas aeruginosa* eingesetzt (GOTTHELF, 2005). Marbofloxacin-Mikonazol-Dexamethason und Polymixin B-Clotrimazol-Prednisolon sind klinisch auch bei gram-negativer Infektion wirksam und vergleichbar (SALO et al., 2002; ROUGIER et al., 2005).

Die Aminoglycoside Gentamicin (Easotic<sup>®</sup>, Otomax<sup>®</sup>) und Neomycin (Panolog<sup>®</sup>) sind gängige bakterizide Hemmer der bakteriellen Proteinsynthese (MORRIS, 2004) bei gram-positiven und gram-negativen Keimen. Gentamicin ist Neomycin überlegen (MORRIS, 2004; ZAMANKHAN, 2010). Aminoglycoside wirken in basischem Milieu (MORRIS, 2004). Es besteht Ototoxizität durch Schäden der Haarzellen der Chochleae (PICKRELL et al., 1993; DE GROOT et al., 1990). Der Einsatz bei rupturiertem TM ist bedenklich (GOTTHELF, 2005). Bei therapieresistenten Otitiden wird dennoch nach Umwidmung Tobramycin oder Amikacin empfohlen (MARTIN BARRASA et al., 2000; PETERSEN et al., 2002; MORRIS, 2004; SENTHIL et al., 2010). Hypersensitivität ist häufig, besonders bei Neomycin (MORRIS, 2004).

Polypeptidantibiotika sind Colistin (Polymixin E) und Polymixin B. Polymixin B ist zugelassen (Surolan<sup>®</sup>). Chelatierung von Membranphospholipiden bewirkt erhöhte Permeabilität und osmotische Destruktion (MORRIS, 2004). Polypeptidantibiotika wirken bakterizid vorwiegend bei gram-negativen Keimen, etwa *Pseudomonas* spp.; deutlich schlechter bei gram-positiven Keimen (KOWALSKI, 1988; WILCKE, 1988; TEJEDOR & MARTIN BARRASA, 2002; MORRIS, 2004). Hypersensitivität ist selten (WILCKE, 1988). Wie die Aminoglycoside sind Polypeptidantibiotika potentiell ototoxisch (PICKRELL et al., 1993). Beide werden durch purulentes Exsudat inaktiviert (GRIFFIN, 2010a).

Antimykotika:

Hefen sind in der Regel *Malassezia* spp., seltener *Candida* spp. (GOTTHELF, 2005). Antimykotika sind

- Azole: Benzimidazole (Thiabendazol), Imidazole (Clotrimazol, Mikonazol, Ketokonazol), Triazole (Itrakonazol, Flukonazol, Posakonazol)

- Allylamine (Terbinafine)

- Polyene (Nystatin)

Azole agieren über P450-Hemmung und bewirken Zellwandzerstörung (MORRIS, 2004). Mikonazol, Ketokonazol und Itrakonazol sind gängig (LORENZINI et al., 1985). Als Lokalthapeutikum sind Clotrimazol (Surolan<sup>®</sup>), Mikonazol (Aurizon<sup>®</sup>) und Posaconazol (Posatex<sup>®</sup>) zugelassen. Die Innenohrtoxizität ist gering (GOTTHELF, 2005). Mikonazol und Polymixin B wirken synergistisch (PIETSCHMAN et al., 2008). Terbinafine bewirkt Zellwandzerstörung wie die Azole, allerdings P450-unabhängig, was die Sicherheit für den Patienten erhöht (MORRIS, 2004). Eine Veterinärzulassung gibt es nicht (MORRIS, 2004). Nystatin (Panolog<sup>®</sup>) ist ein Polyen und verursacht Membranschäden und osmotische Zerstörung (WILCKE, 1988; MORRIS, 2004).

Kortikosteroide/nichtsteroidale antiinflammatorische Wirkstoffe:

Kortikosteroide haben antiphlogistische, antiproliferative, antipruritische und antiexsudative Wirkungen (MORRIS, 2004). Das antiinflammatorische Potenzial gemessen an Hydrokortison ist bei Prednisolon (Surolan<sup>®</sup>) und Triamcinolon (Panolog<sup>®</sup>) fünffach, Dexamethason (Aurizon<sup>®</sup> 1 mg/ml, Otiprin<sup>®</sup> 0,4 mg/ml) 25-fach und Fluocinolon (Synotic<sup>®</sup>) 100-fach erhöht (WILCKE, 1988). Topische Applikation führt zu Verminderung von Entzündungszellen und Mastzelldegranulation. Systemische unerwünschte Arzneimittelwirkungen sind häufig (WILCKE, 1988). Dexamethason (0,1%ig) führt zu Erhöhung der Leberenzymaktivitäten, allerdings beeinträchtigt 0,01%iges Dexamethason weder Leberenzyme noch ACTH-Stimulationstest (ANIYA & GRIFFIN, 2007). Mometasonfuroat (Posatex<sup>®</sup>) ist als Kortikosteroid für die Veterinärmedizin erst seit kurzem erhältlich. Ist eine langfristige Therapie mit Kortikosteroiden nötig, sollte Hydrokortison eingesetzt werden (GRIFFIN, 1993; GRIFFIN, 2007).

Nichtsteroidale antiinflammatorische Wirkstoffe:

Dimethylsulfoxid (DMSO)(Otiprin<sup>®</sup>) hat entzündungshemmende Eigenschaften. Die Resorption der Wirkstoffe wird verstärkt; dies hat Vorteile, etwa als Träger von Fluorochinolonen, ist aber in der Kombination mit Steroiden zu bedenken. DMSO kann Erythem hervorrufen (WILCKE, 1988). Tacrolimus (Protopic<sup>®</sup>), ein Immunsuppressivum, kann eine Alternative zu Glukokortikoiden sein. Ein erhöhtes Risiko der Hefe-OE ist vorhanden. Im Blut sind keine messbaren Spiegel zu erwarten (KELLEY et al., 2010).

#### Lokalanästhetika:

Tetracain kann lokal angewendet werden. Es wirkt gleichzeitig antipruritisch (WILCKE, 1988). Proparacain 0,05%ig (Ophthalmologikum, Proparacain-POS 0,5%ig<sup>®</sup>) kann ebenso als Lokalanästhetikum eingesetzt werden (GRIFFIN, 1993).

Medikamente verbleiben wegen des Cerumens und der Anatomie länger im Gehörgang. Cerumen kann Medikamente inaktivieren. Die Resorption der Medikamente ist bedingt durch die geringe Haarfollikeldichte eher gering. Die Löslichkeit eines Wirkstoffes in fettiger oder wässriger Basis ist mitverantwortlich für das pharmakologische Verhalten. Fettlösliche Wirkstoffe penetrieren besser die Haut. Auch Trägerstoffe beeinflussen die Eigenschaften; weniger fettlösliche Wirkstoffe in wässrigem Träger penetrieren die Haut besser. Trägerstoffe sind neben Wasser lindernde Stoffe wie Gummi, Cellulosederivat (Methylcellulose) und Polyhydroxyderivate wie Glycerin, Propylenglycol, Polyethylenglycol oder Hautpflegemittel wie Pflanzenöle (Olivenöl, Kakaobutter), tierische Fette (Lanolin) und Hydrocarbonsäuren (Paraffin, Petroleum, Mineralöl). Entzündung, Ulzeration, Hyperkeratose und ein rupturiertes TM sind weitere Einflussfaktoren (WILCKE, 1988). Ist die *OE* eher von trocken-schuppiger Haut und Krusten begleitet, wird man einen rückfettenden Träger wie Öl wählen. Exsudative *OE* sollte mit Lotionen und nicht mit porenverschießender fettiger Grundlage angegangen werden (GRIFFIN, 1993).

#### 4.1.2 Systemische Therapie

Eine systemische Therapie der *OE* wird zusätzlich zur lokalen Therapie gewählt (ROSYCHUK, 1994). Systemische Applikation ergibt selten ausreichende Wirkstoffspiegel im entzündeten Gehörgang, wird aber bei Ulzerationen und Erosionen chronischer Otitiden, *OM* oder periauraler Dermatitis empfohlen (ROSYCHUK, 1994; MORRIS, 2004). Systemische Glukokortikoide (Prednison, Prednisolon) werden zur schnellen Reduktion von Entzündung, Schwellung und Schmerz eingesetzt (ROSYCHUK, 1994), wegen eventueller Nebenwirkungen aber nur kurzfristig verwendet (HENKE et al., 2008). Die Mittelohrmukosa ist gut durchblutet und lässt eine Diffusion der Wirkstoffe zu (MORRIS, 2004). Bei mikrobieller Infektion ist eine systemische Antibiose indiziert (TOBIAS &

MORRIS, 2005). Das Antibiotikum wird nach Antibiogramm gewählt. Empfohlen werden mit Clavulansäure potenzierte Penicilline (Amoxicillin/Clavulansäure), Fluorochinolone (Marbofloxacin, Enrofloxacin), bei Kokken auch Cefalosporine (Cefalexinmonohydrat) (MORRIS, 2004, GOTTHELF, 2005). Intravenös appliziertes Enrofloxacin erreicht höhere Gewebespiegel im äußeren Gehörgang und Mittelohr als Plasmaspiegel. Eine Dosisanpassung wird je nach Keimbesiedelung empfohlen. Eine Dosiserhöhung für systemische Fluorochinolone empfiehlt HILL (2009) in Kombination mit topischer Therapie bei *Pseudomonas aeruginosa*-OE (HILL, 2009a). Es wird auch Ticarcillin, ein Carboxypenicillin bei therapieresistenter *Pseudomonas aeruginosa*-Infektion vorgeschlagen (NUTALL, 1998; HILL, 2009a). Bei OM mit Hefen werden systemische Antimykotika (Itrakonazol, Ketokonazol) verabreicht (NOLI & SCARAMPELLA, 2005). Eine OE kann schmerzhaft sein. Analgetika oder Metamizol sind in solchen Fällen gerechtfertigt (HENKE et al., 2008).

## 4.2 Chirurgische Therapie

Die chirurgische Intervention ist in Verbindung mit der Therapie der Primärursache Teil eines umfassenden Therapieplans (BRADLEY, 1988; HARVEY et al., 2001; TOBIAS & MORRIS, 2005). Indikationen sind progressive, irreversible Gehörgangsstenose und konservativ nicht kontrollierbare OM (TOBIAS & MORRIS, 2005), granulomatöse Proliferationen, traumatische Gehörgangsseparationen und Paraauralabszesse und Neoplasien (HOBSON, 1988). Die Resektion der lateralen Wand, die Resektion des vertikalen Anteils des äußeren Gehörganges und die Gehörgangsablation mit Bullaosteotomie (Total ear canal ablation with lateral bulla osteotomy: TECA-LBO) und die ventrale Bullaosteotomie sind die gängigen am Ohr durchgeführten Operationen (LANZ & WOOD, 2004; TOBIAS & MORRIS, 2005; GRIFFIN, 2008).

Die Resektion des lateralen Gehörganges (Zepp-Operation) wird zur besseren Belüftung sowie bei angeborener Stenose /Atresie (TOBIAS & MORRIS, 2005) und in den seltenen Fällen einer traumatischen Ohrkanalseparation mit paraaurealem Abszess durchgeführt (MCCARTHY et al., 1995). Beim Cocker Spaniel ist diese Methode wegen rassebedingt hyperplastischer Reaktion ungeeignet. (HARVEY et al., 2001; ANGUS et al., 2002; TOBIAS & MORRIS,

2005). Die laterale Wand des vertikalen äußeren Gehörganges wird v-förmig bis zum Gehörgangswinkel inzidiert, nach ventral umgeklappt und an der Unterlage adaptiert ohne den Abfluss zu verlegen (BRADLEY, 1988). Der Operationserfolg ist bei 50 Prozent exzellent, teils wird weiterhin Lokaltherapie benötigt (TOBIAS & MORRIS, 2005). Grundsätzlich ist diese Operation bei chronisch-pathologischen Veränderungen nicht zu empfehlen, in solchen Fällen sollte eine TECA-LBO durchgeführt werden.

Vertikale Gehörgangsresektionen dienen der Entfernung von Tumoren, Polypen oder chronischen Veränderungen des vertikalen Gehörganges. Der gesamte vertikale Teil wird entfernt, die Pinna verschlossen und die Belüftung/der Abfluss des horizontalen Gehörganges über eine separate Öffnung am Gehörgangswinkel sichergestellt. (BRADLEY, 1988; LANZ & WOOD, 2004). Der Erfolg liegt bei 70 Prozent (TOBIAS & MORRIS, 2005).

Eine TECA-LBO ist bei Veränderungen des horizontalen Gehörgangs oder *OM* indiziert (TOBIAS & MORRIS, 2005; Griffin, 2008). Der äußere Gehörgang mit Knorpel und Knochen inklusive ventraler und lateraler Teile der *Bulla tympanica* wird unter Schonung umliegender Strukturen (*N. facialis*, *N. hypoglossus*, *A. carotis*, *A. maxillaris*) entfernt (TOBIAS & MORRIS, 2005). Nach Kürettage folgt der Wundverschluss mit Applikation von Lokalanästhetika (Lidokain/Bupivakain) (TOBIAS & MORRIS, 2005). Postoperative lokale Lidokainapplikation über Infusionssysteme verlängert die Analgesie, Wundheilungsstörungen sind möglich (WOLFE et al., 2006). Komplikationen können massive intraoperative Blutungen, postoperative Wundheilungsstörungen mit paraauraler Abszess- oder Fistelbildung und Schädigung der Nervenstrukturen mit folgender *Facialisparese*, *Keratokonjunktivitis sicca*, Horner Syndrom, Schluckbeschwerden, Ataxie, Kopfseitenvorzugshaltung sowie Nekrose der *Pinna* sein (MASON et al., 1988; LANZ & WOOD, 2004). Hörverlust bis hin zur Taubheit ist eine häufige Folge, allerdings ist bei den schweren chronischen Fällen das Hörvermögen schon so stark eingeschränkt, dass vor und nach der Operation kein Unterschied in der BEAR besteht. Diese Komplikationen müssen vorher mit dem Besitzer besprochen werden (LANZ & WOOD, 2004). In jedem Fall ist eine gute perioperative Analgesie nötig (LANZ & WOOD, 2004). Opiode eignen sich bei tolerablen Nebenwirkungen hervorragend. (TACKE, 2010). Zugelassen sind Butorphanol (Alvegesic<sup>®</sup>, Dolorex<sup>®</sup>), Buprenorphin

(Buprenovet<sup>®</sup>, Vetergesic<sup>®</sup>) und L-Methadon (L-Polamivet<sup>®</sup>) (TACKE, 2010). Sie können mit Metamizol (Vetalgin<sup>®</sup>) kombiniert werden. Präemptiv werden nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) wie Meloxicam (Metacam<sup>®</sup>) oder Carprofen (Rimadyl<sup>®</sup>, Carprodyl<sup>®</sup>) verabreicht (HENKE et al., 2008). Die perioperative Antibiose wird nach Antibiotogramm gewählt (HARVEY et al., 2001).

Die Chirurgie mit Laser (CO<sub>2</sub>- und Diodenlaser) bietet sich an. Die Rekonvaleszenz ist schneller; das Befinden der Patienten postoperativ besser. (MOLL et al., 2005).

### **III Kumulativer Teil der Dissertation**

**Kapitel I: Bouassiba C, Osthold W, Mueller RS. Vergleich von vier zytologischen Färbeverfahren für Ohrabstriche beim Hund. *Tierärztl Prax* 2013; 41(K): 7-15**

**Kapitel II: Bouassiba C, Osthold W, Mueller RS. Aktuelle Resistenzlage der bei der caninen *Otitis externa* isolierten Bakterien in Nordrhein-Westfalen, Deutschland (2009-2010). *Prakt Tierarzt* 2013; 94: 486-496**

**Kapitel III: Bouassiba C, Osthold W, Mueller RS. *In-vivo*-Wirksamkeit eines Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreinigers - eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie. *Tierärztl Prax* 2012; 40(K): 161-170**

Anteile an diesen Arbeiten: Cosima Bouassiba hat das Studiendesign mitentworfen, die klinischen Untersuchungen, Abstrichnahme und Probenweiterverarbeitung, Färbungen, mikroskopische Auswertung, Auswertung der mikrobiologischen Untersuchungen und Antibiotogramme, Besitzerinstruktion und Kontrolluntersuchungen, Auswertung der plazebokontrollierten Doppelblindstudie nach Abschluss der klinischen Phase, Teile der statistischen Auswertung sowie die schriftlichen Ausarbeitungen durchgeführt. Wolfgang Osthold, in dessen tierärztlicher Praxis für Kleintiere der klinische Teil der Studie durchgeführt wurde, hat den Entwurf des Studiendesigns unterstützt, die Kontrolle der mikroskopischen Auswertung vorgenommen und die schriftlichen Ausarbeitungen unterstützt. Ralf S Mueller hat das Studiendesign mitkonzipiert, die statistische Auswertung und die schriftliche Ausarbeitung unterstützt.

## **Kapitel I: Vergleich von vier zytologischen Färbeverfahren für Ohrabstriche beim Hund**

**Bouassiba C, Osthold W, Mueller RS**

*Tierärztl Prax 2013; 41(K): 7-15*



## **Zusammenfassung**

**Gegenstand und Ziel:** Die zytologische Untersuchung nimmt in der Diagnostik wie auch Klassifizierung der caninen Otitis externa eine zentrale Stellung ein. Die Färbung dieser Abstriche soll Mikroorganismen als perpetuierende Faktoren der Otitis externa erkennen lassen. Ziel der Studie war es, vier verschiedene Färbeverfahren (Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> mit Acetonvorabtauchverfahren, Gram-color-Färbeset<sup>®</sup> und ein Otitis-Schnellfärbeset) für Ohrabstriche von Hunden mit Otitis externa zu vergleichen sowie die Übereinstimmung von Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung zu eruieren.

**Material und Methoden:** Im Rahmen einer Studie an Hunden mit Otitis externa wurden unmittelbar nacheinander von insgesamt 224 Ohren je ein steriler Abstrich für eine mikrobiologische Untersuchung und vier Ohrtupfer für die Zytologie aus dem horizontalen Teil des äußeren Gehörganges entnommen. Die Beurteilung der Abstriche erfolgte semiquantitativ.

**Ergebnisse:** Diff-Quik<sup>®</sup> mit und ohne Aceton sowie das Gram-color-Färbeset<sup>®</sup> wiesen hohe Übereinstimmungen bei der Detektion von Mikroorganismen auf (Kokken  $p=0,2366$ ; Stäbchen  $p=0,4832$ ; Hefen  $p=0,1574$ ), während das Otitis-Schnellfärbeset signifikant weniger Mikroorganismen erkennen ließ ( $p<0,001$  für alle Vergleiche). Bei den drei erstgenannten Färbungen deckten sich die Ergebnisse bei über 70 Prozent mit der mikrobiologischen Untersuchung, das Otitis-Schnellfärbeset lag etwas darunter. Am schnellsten und einfachsten in der Durchführung war die Färbung mit Diff-Quik<sup>®</sup>.

**Schlussfolgerung:** Diff-Quik<sup>®</sup> mit und ohne Aceton sowie das Gram-color-Färbeset<sup>®</sup> sind bei der Diagnostik der Otitis externa infectiosa nahezu gleichwertig. Weniger geeignet ist das Otitis-Schnellfärbeset.

**Klinische Relevanz:** Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie kann für die routinemäßige Zytologie von Ohrabstrichen Diff-Quik<sup>®</sup> empfohlen werden. Eine mikrobiologische Untersuchung kann ergänzend indiziert sein und wird in Verbindung mit der Zytologie interpretiert.

## **Schlüsselworte**

Otitis externa, Hund, Schnellfärbung, Zytologie

## Summary

**Aim:** The cytologic examination is crucial for the diagnosis and classification of canine otitis externa. Staining should reveal micro-organisms as perpetuating factors of otitis externa. The aim of the study was to compare four different staining methods (Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> after dipping in acetone, Gram Quick stain<sup>®</sup> and a commercial rapid stain for otitis externa) for ear cytology of dogs with otitis externa and to investigate the agreement of cytology and culture.

**Material and Methods:** In a study evaluating dogs with otitis externa five (one for culture and four for cytology) subsequent ear swabs were taken from the horizontal part of the external auditory canal of 224 affected ears and compared semi-quantitatively.

**Results:** Diff-Quik<sup>®</sup> with and without prior dipping in acetone as well as the Gram Quick stain<sup>®</sup> had a high agreement in the detection of micro-organisms (cocci  $p=0.2366$ ; rods  $p=0.4832$ ; yeasts  $p=0.1574$ ), while the commercial otitis rapid stain revealed significantly less micro-organisms ( $p<0,001$  for all comparisons). The results of the first three stains corresponded to culture results in more than 70 percent; the agreement was lower with the commercial otitis rapid stain. The quickest and easiest method was staining with Diff-Quik<sup>®</sup>.

**Conclusion:** Diff-Quik<sup>®</sup> with and without prior dipping in acetone and the Gram Quick stain<sup>®</sup> had a high agreement in the detection of microorganisms and can thus be considered nearly equivalent for the diagnosis of otitis externa infectiosa. The commercial otitis rapid stain is less reliable.

**Clinical relevance:** Based on this study Diff-Quik<sup>®</sup> can be recommended for the routine cytology of ear swabs. Additionally, a culture may be indicated and must be interpreted in context of the cytology.

## Keywords

otitis externa, dog, fast stain, cytology

## **Einleitung**

Die Otitis externa, die Entzündung des äußeren Gehörganges, ist eine multifaktorielle Erkrankung (17). Eine Differenzierung in Primärursachen, prädisponierende Faktoren und perpetuierende Faktoren hat sich etabliert (1; 3). Nur die Primärursachen, können eine Otitis externa auslösen (25). Prädisponierende Faktoren begünstigen eine Otitis externa, während perpetuierende Faktoren diese aufrecht halten. Bakterien und Hefen spielen hierbei eine wichtige Rolle (3; 12).

Immer ist eine zytologische Untersuchung des Exsudates indiziert (1; 22), um Bakterien, Hefen und Entzündungszellen zu detektieren und eine bakterielle Überbesiedelung von einer durch Phagozytose gekennzeichneten Infektion zu differenzieren (1; 19; 21). Die Zytologie ist preiswert, einfach und ermöglicht eine optimale Therapie (1). Bakteriologische Untersuchungen und Antibiotogramme geben die Diagnose der Bakterienspezies mit deren Resistenzsituation (1; 18). Die semiquantitative Beurteilung einer zytologischen Probe ermöglicht bei unterschiedlicher Anzahl der verschiedenen Bakterientypen die Auswahl der geeigneten antimikrobiellen Therapie für den zahlenmäßig dominierenden Keimtypen (15; 21). Auch die Therapiekontrolle erfolgt über die Zytologie mit Dokumentation der Zell- und Mikroorganismen-Zahlen (1; 20). In der Regel wird ein Abstrich aus dem Übergang vom vertikalen zum horizontalen Gehörgang genommen (1). Routinemäßig wird eine Schnellfärbung vom Romanowsky-Typ wie Diff-Quik® oder Hemacolor® (4; 15), teils auch die Gramfärbung (18; 21) angewendet. Eine Arbeitserleichterung kann ein einphasiges Färbesystem wie das Otitis-Schnellfärbeset sein. Da Cerumen lipophil ist, wird für Diff-Quik® gelegentlich ein Vorabtauchen in Aceton empfohlen (20; 21). Nach Wissen der Autoren wurden bisher Färbungen mit dem Gram-color Färbeset®, Diff-Quik® mit /ohne Aceton und die Otitis-Schnellfärbung noch nicht in semiquantitativer Beurteilung anhand der Mikroorganismen- und Zellzahlen und in Verbindung mit mikrobiologischer Untersuchung sowie hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Einstufung nach Quantität in fünf Kategorien (von zytologisch nicht bis massenhaft nachweisbar) verglichen. Ziel der Studie war es, diese vier verschiedenen Färbeverfahren für Ohrabstriche von Hunden mit Otitis externa

diesbezüglich zu vergleichen, sowie die Übereinstimmung von Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung zu eruieren.

## **Material und Methoden**

### *Studienpopulation und Studiendesign*

In die Studie aufgenommen wurden 75 Hunde (n = 120 Ohren), die in einer tierärztlichen Überweisungspraxis für Veterinärdermatologie mit Tätigkeitsschwerpunkten Allergologie und Ohrenheilkunde mit einer klinischen und otoskopisch diagnostizierten Otitis externa in der Zeit von März 2009 bis Oktober 2010 vorgestellt wurden. Das Vorliegen der klinischen Symptome Juckreiz, Schwellung und/oder Dolenz des äußeren Gehörganges, Ohrenausfluss, Kopfschütteln und/oder Rötung und die Feststellung von Rötung, Papeln, Krusten und/oder Exsudation aus dem äußeren Gehörgang bei der otoskopischen Untersuchung per Videootoskopie definierten eine Otitis externa (2; 3). Bei Bedarf wurde eine Sedation/Narkose (Diazepam 0,5 mg/kg KGW; Diazepam 10 mg Rotex medica<sup>®</sup>, Rotexmedica, Trittau, D; und Ketaminhydrochlorid 5 mg/kg KGW; Narketan<sup>®</sup>, Vetoquinol, Ravensburg, D; intravenös verabreicht) vorgenommen. Die routinemäßige Kontrolluntersuchung der Therapie der Otitis externa erfolgte nach 14 Tagen. Auch hier wurden analog Tupferproben bei 64 Hunden (n=104 Ohren) genommen. Alle Hunde erhielten zugelassene Otologika (zweimal täglich Ohrreiniger mit Chlorhexidin und Tris-EDTA, Epibac<sup>®</sup>, Alfabet, Neumünster, D; einmal täglich Marbofloxacin/Dexamethason/ Clotrimazol, Aurizon<sup>®</sup>, Vetoquinol, Ravensburg, D), welche am Tag der Kontrolluntersuchung nicht eingebracht werden sollten.

### *Probennahme*

Direkt nacheinander wurden zuerst ein steriler Tupfer (Steriles Abstrichbesteck mit Transportmedium, Heinz Herenz Medizinal Bedarf GmbH, D) für eine mikrobiologische Untersuchung und dann vier nicht sterile, markierte Wattetupfer (Abb. 13) für die zytologische Untersuchung von der Umschlagstelle vom vertikalen in den horizontalen Anteil des äußeren Gehörganges entnommen (11). Bei größeren Hunden wurden die Tupfer durch einen sterilen Otoskopkonus genommen (7; 24). Die Markierung stellte einheitlich eine Rotation um 360° bei der Probenentnahme sicher. Dann wurde jeder Wattetupfer auf einem

Objektträger (Assistent<sup>®</sup> Elka Objektträger, Glaswaren-Fabrik Karl Hecht KG, Sondheim, D) in vertikaler Richtung zur Längsachse des Objektträgers im 45° Winkel ausgerollt (Abb. 14). Der Abstrich eines rechten Ohres wurde auf der rechten Seite des Objektträgers ausgerollt, der Abstrich eines linken Ohres zentral. Die linke Seite des Objektträgers wurde unveränderlich mittels Diamantschreiber mit der laufenden Studiennummer (ID), analog zur Folge der Entnahme mit den Buchstaben A, B, C, D versehen und luftgetrocknet (7). Die Tupfer der Kontrolluntersuchungen erhielten zusätzlich ein: „re“ für „reevaluation; Kontrolluntersuchung“ (Abb. 15). Von jedem Hund wurden somit vier Objektträger je Untersuchungstermin angefertigt.

### *Probenverarbeitung*

Zur unmittelbaren Diagnostik wurde ein Objektträger nach Hitzeфикation (dreimaliges Ziehen durch die Flamme eines Bunsenbrenners) der Rotationstabelle folgend direkt mit Diff-Quik<sup>®</sup> (Medion Diagnostics AG, Düringen, Ch) (Diff) gefärbt, für die initiale Therapie der Otitis externa untersucht und bis zur Auswertung für die Studie dunkel und trocken aufbewahrt. Jeweils am Ende einer Woche wurden die übrigen Objektträger analog entsprechend der Rotationstabelle von derselben Person (CB) unter Verwendung von Diff-Quik<sup>®</sup> nach Vorabtauchen in Aceton (Hedinger, Stuttgart, D) (Diffac), Gram-color Färbeset<sup>®</sup> (Merck KGaA, Darmstadt, D) (Gram) und einem Otitis-Schnellfärbeset (Alfavet, Neumünster, D) (Alfa) von Hand in Küvetten nach Standardanleitung gefärbt. Dabei war die Reihenfolge der Färbung immer gleich: Diff, Diffac, Alfa und Gram. Mit jeder ID, fortlaufend für jeden Hund vergeben, erfolgte der Versatz um eine Spalte. So wurde sichergestellt, dass für kein Färbeverfahren ein Nachteil bestand, falls bei vier direkt nacheinander entnommenen Tupfern die Mikroorganismen- und Zellzahlen sukzessive geringer geworden sein sollten. Bei ID 1 wurde Objektträger A Diff, Objektträger B Diffac, Objektträger C Alfa und Objektträger D Gram gefärbt, bei ID 2 Objektträger A Gram, Objektträger B Diff, Objektträger C Diffac und Objektträger D Alfa, bei ID 3 Objektträger A Alfa, Objektträger B Gram, Objektträger C Diff und Objektträger D Diffac. Die Tabelle wurde entsprechend fortgesetzt. Tabelle 1 zeigt exemplarisch die Färbungen nach Rotationstabelle für ID ein bis sechs.

Diff-Quik<sup>®</sup> ist eine mehrphasige, differenzierende Schnelfärbung vom Romanowsky-Typ. Die hitzefixierten Objektträger wurden nacheinander jeweils fünf Mal für eine Sekunde in die Fixierlösung (Fast Green (0,002 g/l) in Methanol) und die Färbelösungen I (EosinY, 1,22g/l in Phosphatpuffer (pH 6,6) und Natriumazid (<0,1%) als Konservierungsmittel) und II (Thiazin-Farbstoff (1,1g/l) in Phosphatpuffer (pH 6,6)) getaucht, abgetropft, unter fließendem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Der Zeitaufwand für die Färbung betrug pro Objektträger etwa 20 Sekunden.

Ein weiterer Objektträger von jeder ID wurde vor der oben beschriebenen Diff-Quik<sup>®</sup> Färbung dreimal für je eine Sekunde in Aceton getaucht und luftgetrocknet. Der Zeitaufwand für die Färbung betrug insgesamt ungefähr 30 Sekunden.

Auch die differenzierende Schnelfärbung mit dem Gram-color Färbeset<sup>®</sup> erfolgte in mehreren Schritten. Der Objektträger wurde 30 Sekunden in Färbelösung I (Kristallviolett 0,25-1%, Phenol 0,1-1%, wässrig-ethanolische Farbstofflösung), nach Abspülen 30 Sekunden in Färbelösung II (Lugols Lösung stabilisiert; Homopolymer aus 1-Vinylpyrrolidon-2, Komplex mit Jod 2,5-10%, wässrige Lösung mit anorganischen und organischen Bestandteilen) getaucht, abgespült, entfärbt (Entfärbelösung, Aceton 20-50%) 15 Sekunden in Färbelösung III (Safraninlösung, wässrig-ethanolische Farbstofflösung) getaucht, abgespült und luftgetrocknet. Der Zeitaufwand für die Färbung lag für geübte Personen bei mindestens zwei Minuten.

Die einphasige Otitis-Schnelfärbung ist auch eine Färbung vom Romanowsky-Typ. Die Färbelösung (May-Grünwald Eosin-Methylenblau, enthielt Methanol, 9 ml ad 54 ml Aqua dest.) wurde als Konzentrat geliefert und mit destilliertem Wasser verdünnt. Der Objektträger wurde fünf Mal für jeweils eine Sekunde eingetaucht, abgespült und luftgetrocknet. Der Zeitaufwand für die Färbung betrug maximal 10 Sekunden.

Alle fertig gefärbten Objektträger wurden in speziellen Kästen zur Aufbewahrung von Objektträgern dunkel, trocken und bei Zimmertemperatur bis zur mikroskopischen Auswertung aufbewahrt.

### *Probenauswertung*

Verblindete Proben wurden von derselben Person mikroskopisch untersucht (CB). Bei der mikroskopischen Untersuchung (Hund EH 500 Mikroskop, Giessen, D)

wurde zunächst mit den Trockensystemen (x100, x400) auf Bereiche mit optimaler Schichtdicke und Färbequalität ohne Färbeartefakte zentriert. Dann wurden unter Ölimmersion (x1000) die Objektträger auf Kokken und Stäbchen, Hefen und Keratinozyten sowie neutrophile Granulozyten und Makrophagen (7; 18) durchgemustert und das Ergebnis wie bei Budach et al. in eine der folgenden fünf Kategorien eingeteilt:

0 = negativ, keine Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern des gesamten Präparates (Ölimmersion/x1000);

1 = gelegentlich und nicht in jedem Gesichtsfeld (Ölimmersion/x1000) Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern;

2 = in geringer Zahl in jedem Gesichtsfeld (Ölimmersion/x1000) Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern;

3 = in größerer Zahl in jedem Gesichtsfeld (Ölimmersion/x1000) Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern;

4 = massenhaft und sofort in jedem Gesichtsfeld (Ölimmersion/x1000) Bakterien/Hefen/Zellen als Rasen oder dicht aneinander/übereinander gelagert nach Durchmustern festzustellen (6).

Nicht auswertbar waren Objektträger, bei denen nach Durchmustern keine Areale mit ausreichender Färbequalität aufzufinden waren. Diese wurde definiert als bei Ölimmersion (x1000) eindeutige Erkennbarkeit von Zellen/Mikroorganismen. Färbepräzipitate, eine nicht optimale Schichtdicke und fettiges Cerumen alleine galten nicht als mangelnde Färbequalität.

#### *Bakteriologische Untersuchung*

Die bakteriologische Untersuchung wurde in einem akkreditierten Labor (LABOKLIN, Bad Kissingen, D) durchgeführt. Die aerobe Anzucht der Proben erfolgte auf den kommerziell erhältlichen Columbia Schafblutagar und Endoagar (Firma BD, Heidelberg) bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Brutschrank: Haereus, Osterode) für 18-24 Stunden.

Nach Anreicherung des Tupfers in Thioglycolat-Bouillon (Firma BD, Heidelberg) folgte eine weitere aerobe Bebrütung auf Columbia Schafblutagar und Endoagar bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Brutschrank: Haereus, Osterode) für 18-24 Stunden.

Die Keimdifferenzierung wurde anhand der Koloniemorphologie, mikroskopischer Untersuchung eines Gram-Präparates (Färbekit „Color Gram 2“,

BioMerieux, Frankreich), Zusatzreaktionen wie Oxidase (MAST-ID, MAST-DIAGNOSTICS, U.K.), Katalase (Enzymkatalase, Fa. Merck, Darmstadt) und Koagulase (Röhrchentest mit Kaninchenplasma, Fa. BD, Heidelberg), sowie weiterer Differenzierung mittels Massenspektroskopie (MALDI TOF, Axima Assurance, Shimadzu Biotech, Manchester; Software: Anagnostec) vorgenommen.

### *Statistik*

Die klinische Seitenverteilung der Otitis externa wurde mit dem Fishers Exakter Test verglichen. Die Mittelwerte für Stäbchen, Kokken, Hefen und Entzündungszellen wurden für die vier Färbungen mittels einer Varianzanalyse (ANOVA; bei nicht normal verteilten Daten mittels eines Friedman Tests) je mit Dunn post test verglichen (Prism 5, Graphpad, San Diego, USA). Für die Feststellung der Reproduzierbarkeit wurden je zwei Färbungen miteinander verglichen. Als Übereinstimmung zwischen den Färbungen wurde nach Durchmustern ausschließlich die Einstufung der jeweils zwei zu vergleichenden Präparate derselben ID und unterschiedlicher Färbung in dieselbe Kategorie (0-1-2-3-4) gewertet. Abweichungen um eine oder mehrere Kategorien wurden einheitlich als „nicht übereinstimmend“ betrachtet. Für die Übereinstimmung mit den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchung wurde in den mikrobiologischen Nachweis von Kokken und Stäbchen differenziert und mit deren zytologischem Nachweis verglichen. Als Übereinstimmung galt bei gleicher ID ein gleichermaßen positives oder negatives Ergebnis ungeachtet der Quantität oder Kategorie.

## **Ergebnisse**

### *Studienpopulation*

In die Studie eingeschlossen wurden 75 Hunde beider Geschlechter im Alter von drei Monaten bis 16 Jahren. Das mediane Alter lag bei 5,8 Jahren. Neben Mischlingen (n=13) waren Deutsche Schäferhunde und Labradore die häufigsten Patienten (je n=8), gefolgt von Beaglen und Golden Retrievern (je n=4). 37 Prozent der Hunde waren männlich (n=28), 12 Prozent (n=9) männlich kastriert, 33 Prozent weiblich (n=24) und 18 Prozent weiblich kastriert (n=14). Bei zwei



Drittel der Hunde (n=46; 62 Prozent) lag eine bilaterale Otitis externa vor, bei einem Fünftel der Hunde (n=15; 20 Prozent) eine unilaterale Otitis externa links und bei unwesentlich weniger Hunden (n=14; 18 Prozent) eine unilaterale Otitis externa rechts (p=0.82, Fishers Exakter Test). Ohne Angabe von Gründen erschienen 10 Hunde (n=14 Ohren) nicht zur Kontrolluntersuchung. Außerdem musste ein Hund (n=2 Ohren) aus Gründen, die nicht im Zusammenhang mit der Otitis externa standen, euthanasiert werden. Es gelangten von 64 Hunden (n=104 Ohren) der Kontrolluntersuchung Tupfer in die Auswertung.

### *Probenauswertung*

Je 224 Präparate mit Diff-Quik<sup>®</sup>, Gram-color Färbeset<sup>®</sup> und Diff-Quik<sup>®</sup> mit Aceton wurden ausgewertet. Die vorhandenen Bakterien, Hefen, Keratinozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen konnten sicher erkannt und die Bakterien morphologisch in Kokken und Stäbchen differenziert werden. Wegen mangelhafter Detailerkennbarkeit, der Definition von ausreichender Färbequalität in dieser Studie nicht entsprechend, konnten nur 141 von 224 der mit dem Otitis-Schnellfärbeset gefärbten Präparate ausgewertet werden. Teils war keine Anfärbung auf dem Präparat zu erkennen. Auch erneute Fixierung in Methanol und eine längere Nachfärbung aller Präparate brachten keinen Erfolg. Bei den ausgewerteten Präparaten allerdings konnte analog wie oben beschrieben differenziert werden. Die Abbildungen 1, 2, 3 und 4 zeigen exemplarisch Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> mit Vorabtauchen in Aceton, Gram-color Färbeset<sup>®</sup> und mit der Otitis-Schnellfärbung (auswertbar) gefärbte Präparate.

Der Vergleich der verschiedenen Färbungen ergab keinen Unterschied zwischen dem Gram-color Färbeset<sup>®</sup>, und Diff-Quik<sup>®</sup> mit/ohne Aceton (Friedmann Test, Kokken p=0,2366; Stäbchen p=0,4832; Hefen p=0,1574; Keratinozyten p=0,2875; neutrophile Granulozyten p=0,2299; Makrophagen, p=0.0283, Dunn post tests der Individualvergleiche alle p>0,05). Allerdings war die Anzahl der festgestellten Kokken und Hefen bei allen drei Färbungen deutlich höher als bei dem Otitis-Schnellfärbeset (Friedmann Test mit Dunn Post Test, p<0,001 für alle Vergleiche). Mit Diff-Quik<sup>®</sup> ohne Aceton wurden mehr Stäbchen entdeckt als mit Otitis-Schnellfärbeset (Friedmann Test mit Dunn Post Test, p<0,05). Bei Diff-Quik<sup>®</sup> mit/ohne Aceton sowie Gram-color Färbeset<sup>®</sup> wurden signifikant mehr Keratinozyten gefunden als bei dem Otitis-Schnellfärbeset (p<0,05 und p<0,01).

Bei neutrophilen Granulozyten und Makrophagen war zwischen den Färbungen kein Unterschied festzustellen (Friedmann Test mit Dunn Post Test,  $p > 0,05$  für alle Vergleiche). Tabelle 2 zeigt die Mittelwerte und Konfidenzintervalle für Kokken, Stäbchen, Hefen, Keratinozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen für jede Färbemethode. Abbildung 5 stellt die Mittelwerte graphisch dar.

Im Hinblick auf die Übereinstimmung der Einstufung in dieselbe Kategorie wurden bei Kokken und Hefen deutliche Differenzen zwischen dem Otitis-Schnellfärbeset und den anderen drei Färbungen festgestellt. Die Differenzen bei Stäbchen und Keratinozyten waren jedoch nur mäßig. Bei neutrophilen Granulozyten und Makrophagen stimmten alle Färbungen nahezu gleichwertig überein. Insgesamt war die Übereinstimmung von Diff-Quik® mit und ohne Acetonvorabtauchen und Gram-color Färbeset® besser als im Vergleich mit dem Otitis-Schnellfärbeset.

Die Übereinstimmung der Einstufung der jeweiligen Präparate in dieselbe Kategorie ist in Tabelle 3 in Prozent und mit Hinweis auf die Signifikanz angegeben.

### *Mikrobiologische Untersuchung*

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die häufigsten Isolate waren Bacillales (Staphylococcaceae) und Pseudomonales (Pseudomonaceae und Moraxellaceae).

Die Übereinstimmung von mikrobiologischer Untersuchung und Zytologie nach den verschiedenen Färbemethoden wurde für Kokken und Stäbchen in Tabelle 5 aufgeführt. In den meisten Fällen mit divergierenden Ergebnissen waren bei negativer Kultur Keime zytologisch festzustellen, bei Kokken bei Diff-Quik® mit und ohne Acetonvorabtauchen und Gram-color Färbeset® in 79,7/ 87,6/ 81,3 Prozent, bei Stäbchen in 59,2/66,6/67,6 Prozent. Beim Otitis-Schnellfärbeset lagen die Werte mit 25,6 Prozent bei Kokken und 9,3 Prozent bei Stäbchen deutlich niedriger.

### **Diskussion**

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass Diff-Quik® mit und ohne Acetonvorabtauchen sowie das Gram-color Färbeset® für die Erkennung von Mikroorganismen und Zellen bei caninen Ohrtupferpräparaten nahezu gleichwertig sind. Die meisten Spezialisten bedienen sich bei der Färbung von Hautzytologien der modifizierten Wright's Färbung (Diff-Quik®), welche einfach, schnell, anwenderfreundlich und für Blutaussstriche aber auch zytologische Untersuchungen anderer Gewebe geeignet ist (16). Auch Neu-Methylenblau oder Thiazine werden vorgeschlagen (10; 12; 27). Die Gramfärbung ist zur Differenzierung Gram-positiver von Gram-negativen Keimen geeignet. Da jedoch in der Regel bei Ohrabstrichen Kokken Gram-positiv und Stäbchen Gram-negativ sind, ist die zeitintensive Gramfärbung für die Routinediagnostik nicht zwingend erforderlich (18). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt, sowohl durch die mikrobiologische Untersuchung, bei der lediglich einmal ein Gram-positives Stäbchen, *Bifidobacterium asteroides*, isoliert wurde, als auch durch die hohe Übereinstimmung dieser Färbeverfahren untereinander. Allerdings benötigt die Untersuchung gramgefärbter Präparate etwas Übung, da blau erscheinende Melaningranula der Keratinozyten mit ebenfalls blau gefärbten kleinen Kokken verwechselt werden könnten.

Mit dem Otitis Schnellfärbeset wurden signifikant weniger Mikroorganismen erkannt. Die quantitative Beurteilungsmethode zeigt Differenzen zwischen verschiedenen Untersuchern (27). Die semiquantitative Beurteilung hingegen brachte keine signifikanten Differenzen zwischen verschiedenen geübten wie auch ungeübten Untersuchern (6) und kann daher für die Praxis empfohlen werden (5; 6; 23). Sie dient der Zeitersparnis bei der Diagnostik und Dokumentation in der täglichen Praxis. Lehner et al. erhielten bei zwei simultan entnommenen Abstrichen reproduzierbare Ergebnisse für Bakterien sowie moderate Reproduzierbarkeit bei Hefen und halten somit einen einzigen Abstrich für ausreichend (14). In vorliegender Studie wurden vier Abstriche genommen und semiquantitativ beurteilt. Das Risiko der mangelnden Reproduzierbarkeit aufgrund sukzessive geringer werdenden Mikroorganismen- oder Zellgehaltes wurde durch Verwendung der Rotationstabelle für die Färbungen minimiert. Das in der vorliegenden Studie durchgeführte Durchmustern des gesamten Präparates erhöht die Sensitivität vor allem bei der Detektion von Stäbchen (9) und die Übereinstimmung gerade bei den Kategorien 0 und 1. Ginel et al. haben für

Mikroorganismen eine höhere Übereinstimmungen bei geringer Keimbelastung bei Beurteilung von 10 HPF festgestellt (x400) (8). Trotz Durchmustern ist bei dem Otitis-Schnellfärbeset ein signifikanter Informationsverlust vorhanden.

Eine weitere Aufschlüsselung einzelner Zellpopulationen nach Bakterienspezies war im vorliegenden Studiendesign nicht vorgesehen, wenn es auch eventuell teils einer Verdeutlichung der Ergebnisse hätte dienen können. Es sollte jedoch unter Praxisbedingungen, bei denen das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung retrospektive mit der Zytologie in Verbindung gesetzt wird, untersucht werden.

Die Übereinstimmung von Zytologie und bakteriologischer Untersuchung liegt in der vorliegenden Studie für Kokken bei etwa 65 Prozent, allerdings nicht für das Otitis-Schnellfärbeset; hier war die Übereinstimmung unter 45 Prozent. Für Stäbchen wurde in der vorliegenden Studie mit etwa 80 Prozent eine höhere Übereinstimmung erzielt; allerdings wurde für das Otitis-Schnellfärbeset weniger als 55 Prozent erreicht. Im gesunden Gehörgang sind Kokken und Hefen regelmäßig, Stäbchen und Entzündungszellen selten vorhanden (1; 24; 26). Bei einer Otitis externa sind Kokken (vorwiegend *Staphylococcus* spp.) und Hefen oft so deutlich vermehrt (9), dass Grenzwerte von untergeordneter Bedeutung sind (25). Gram-negative Stäbchen sind meist *Pseudomonas* spp., seltener *Proteus* spp., oder coliforme Keime (1). Auch in der vorliegenden Studie waren *Staphylococcus* spp. und *Pseudomonas* spp. die häufigsten Isolate. Eine bakteriologische Untersuchung mit Resistenztest kann bei Otitis externa indiziert sein (9; 13). Die Übereinstimmung von bakteriologischer Untersuchung und Zytologie liegt bei zwei simultan entnommenen Abstrichen durch einen sterilen Otoskopkonus bei 68 Prozent (9). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt mit Ausnahme des Otitis Schnellfärbesets, was an der mangelnden Detailerkennbarkeit bei dieser Färbung gelegen haben kann. Die Übereinstimmung bei Stäbchen ist höher als bei Kokken. Stäbchen werden bei Otitis externa seltener isoliert als Kokken und so kann die Übereinstimmung negativer Ergebnisse häufig zu erwarten sein. Während bei Graham-Mize und Rosser die mikrobiologische Untersuchung sensitiver war (9), ist in der vorliegenden Studie die Zytologie der mikrobiologischen Untersuchung in der Detektion von Bakterien überlegen, was durch das Durchmustern des gesamten Objektträgers begründet sein kann. Eine Ausnahme ist das Otitis-Schnellfärbeset, welchem die mikrobiologische Untersuchung überlegen ist.

Alle Hunde hatten Otologika zur Therapie der Otitis externa erhalten. Da dies alle Tupfer der Kontrolluntersuchung betraf, welche auch der Rotationstabelle entsprechend gefärbt wurden, ist eine Beeinflussung der Färbungen zum Nachteil einer bestimmten Methode unwahrscheinlich. Auch im Vergleich der Übereinstimmung von Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Initial- und der Kontrolluntersuchung ermittelt werden.

Es wurde im Rahmen der vorliegenden Studie keine mykologische Untersuchung durchgeführt, so dass hier keine Aussage zur Übereinstimmung mit der Zytologie möglich ist.

### **Fazit für die Praxis**

Für Ohrabstriche bei der caninen Otitis externa können die Schnellfärbungen Diff-Quik<sup>®</sup> mit und ohne Aceton sowie das Gram-color Färbeset<sup>®</sup> zur Färbung von Mikroorganismen als gut geeignet und vergleichbar bezeichnet werden. Unter Berücksichtigung des zeitlichen Aufwands bei der Färbung kann die Diff-Quik<sup>®</sup> Färbung für die Zytologie des caninen Ohrabstriches und als eine Interpretationshilfe bei einer ergänzenden mikrobiologischen Untersuchung empfohlen werden.

### **Interessenkonflikte**

Diese Studie wurde von Alfavet gesponsort. Das Studiendesign, die Durchführung und Auswertung der Daten erfolgte ohne Einflussnahme des Sponsors. Weiterhin hat Ralf Mueller in den letzten fünf Jahren durch Bayer Animal Health, Boehringer Ingelheim, Dechra Veterinary Products, Intervet, Merial, Novartis Animal Health, Pfizer Animal Health, Procter & Gamble, Royal Canin, Selectavet, und Virbac unterstützte Vorträge, Studien und Beratungen durchgeführt. Wolfgang Osthold hat in den letzten fünf Jahren von Essex Tierarznei und Alfavet unterstützte Vorträge durchgeführt. Cosima Bouassiba hat keine unterstützten Vorträge oder Studien durchgeführt.

## **Literaturverzeichnis**

1. Angus JC. Otic cytology in health and disease. Vet Clin of North Am: Small Anim Pract 2004; 34: 411-424.
2. Angus JC, Campbell KL. Uses and indications for video-otoscopy in small animal practice. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2001; 31: 809-827.
3. August JR. Otitis externa: A disease of multifactorial etiology. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18:731-742.
4. Baker, R. und Lumsden, JH. Color atlas of Cytology of the Dog and Cat. Mosby Year Book, St. Louis, MO 2000; 263.
5. Beale KM. Cytology: an important tool in veterinary dermatology. Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Annual ESVD Congress Mainz 2007; 51-52.
6. Budach S, Mueller RS. Die Evaluierung einer semiquantitativen Beurteilungsmethode zytologischer Hautpräparate. Vortragszusammenfassungen der 12. Jahrestagung der DGVD Berlin 2011; 25.
7. Chickering WR. Cytologic evaluation of otic exudates. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18: 773-782.
8. Ginel PJ, Lucena R, Rodriguez JC, Ortega J. A semi-quantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. Vet Dermatol 2002; 13: 152-156.
9. Graham-Mize CA, Rosser EJ. Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. J Am Anim Hosp Assoc 2004; 40: 102-108.
10. Griffin GE, Rosenkrantz W, Boord M. Cytology of the skin: Techniques and Interpretation 2009; <http://www.vcaspecialtyvets.com/ckfinder/userfiles/files/Animal%20Specialty%20Group/CytologyoftheSkin%2520final.pdf>

11. Griffin CE. Otitis Techniques to improve practice. Clin Tech Small Animal Pract 2006; 21: 96-105.
12. Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. Canadian Vet J 2006; 47: 253-255.
13. Kowalski JJ. The microbial environment of ear canal in health and disease. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18: 743-754.
14. Lehner G, Louis CS, Mueller RS. Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. Vet Rec 2010; 167: 23-26.
15. Linek M. Otitis externa und media bei Hund und Katze. Tierärztl Prax 2011; 39 (K): 451–463.
16. Long SN, Anderson TJ, Long FH, Johnston PE. Evaluation of rapid staining techniques for cytological diagnosis of intracranial lesions. Am J Vet Res 2002; 63): 381-386.
17. McKeever PJ, Torres AM. Ear disease and its management. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1997; 27: 1523-1536.
18. Mendelsohn C, Rosenkrantz W, Griffin CE. Practical cytology for inflammatory skin disease. Clin Tech Small Anim Pract 2006; 21: 117-127.
19. Morris DO. Medical therapy of otitis externa and otitis media. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2004; 34: 541-555.
20. Osthold W, Wagner R. Otitis externa bei Hund und Katze. Kleintiermedizin 2009; 9/10: 262-275.
21. Osthold W, Beck J, Stechmann K, Hofmann T. Ohrzytologie in der Kleintierpraxis- adspektorische, parasitologische und zytologische Aspekte. Der Praktische Tierarzt 2005; 86; 390-397.

22. Rosser EL Jr. Causes of otitis externa. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2004; 34: 459-468.
23. Rosychuk RAE. Management of otitis externa. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1994; 24: 921-952.
24. Saridomichelakis MN. Diagnostic approach to otitis, Proceedings of the WSAVA continuing education program, Hong Kong 2008; 87-94.
25. Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinast AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Vet Dermatol 2007; 18: 341-347.
26. Tater KC, Scott DW, Miller WH Jr, Erb HN. The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. J Vet Med A Physiol Clin Med 2003; 50: 370-374.
27. Toma S, Cornegliani, L, Persico, P, Noli C. Comparison of 4 fixation and staining methods for the cytologic evaluation of ear canals with clinical evidence of ceruminous otitis externa. Vet Clin Pathol 2006; 35: 194-198.



**Abbildungsverzeichnis/Tabellen:**

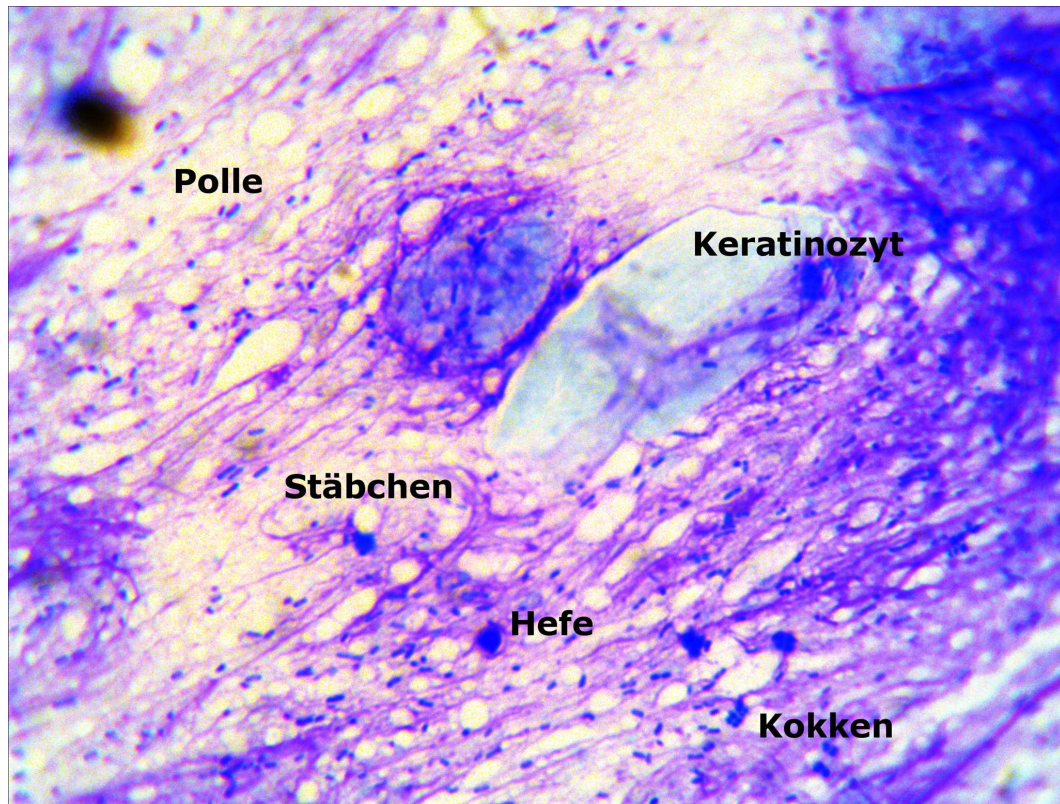


Abb. 1 Zytologie eines caninen Ohrtupferpräparates, Diff-Quik® (Ölimmersion, x 1000); Hefe, Kokken, Stäbchen, Kerationzyten, Polle

Pict. 1 Cytology of a canine ear swab, Diff-Quik® (oilimmersion, x 1000); yeast, cocci, rods, keratinocysts, poll

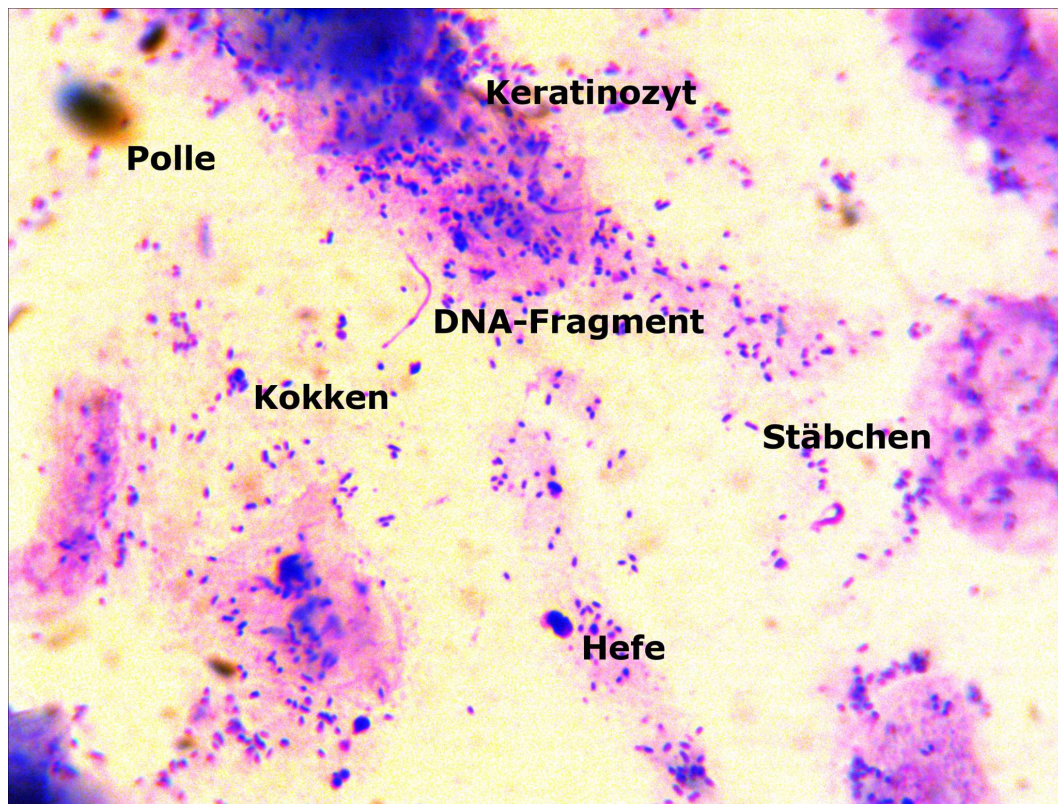


Abb. 2 Zytologie eines caninen Ohrtupferpräparates, Diff-Quik<sup>®</sup> mit Vorabtauchen in Aceton (Ölimmersion, x 1000); Hefe, Kokken, Stäbchen, Keratinozyten, Polle, Zellkern(DNA)-Fragment eines Neutrophilen

Pict. 2 Cytology of a canine ear swab, Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping (oilimmersion, x 1000); yeast, cocci, rods, keratinocytes, poll, DNS-part of a neutrophile



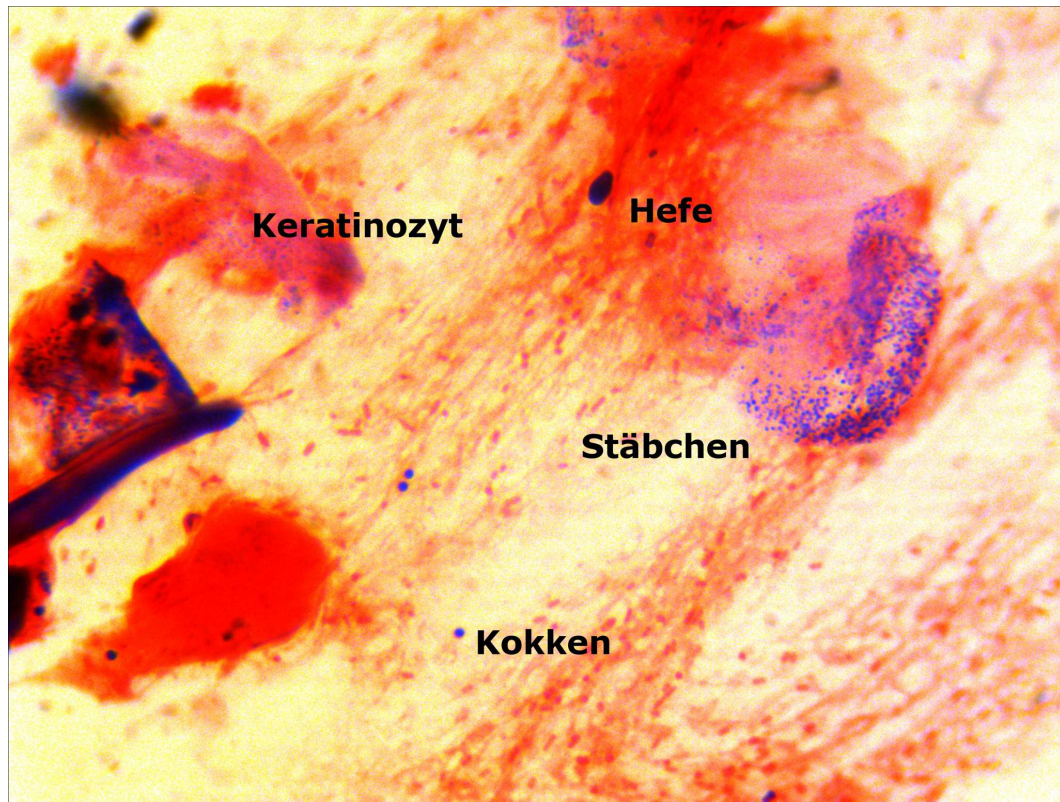


Abb. 3 Zytologie eines caninen Ohrtupferpräparates, Gram-color-Färbeset<sup>®</sup> (Ölimmersion, x 1000); Hefe, Kokken, Stäbchen, Keratinozyten

Pict. 3 Cytology of a canine ear swab, Gram-color-stain<sup>®</sup> (oilimmersion, x 1000); yeast, cocci, rods, keratinocyts

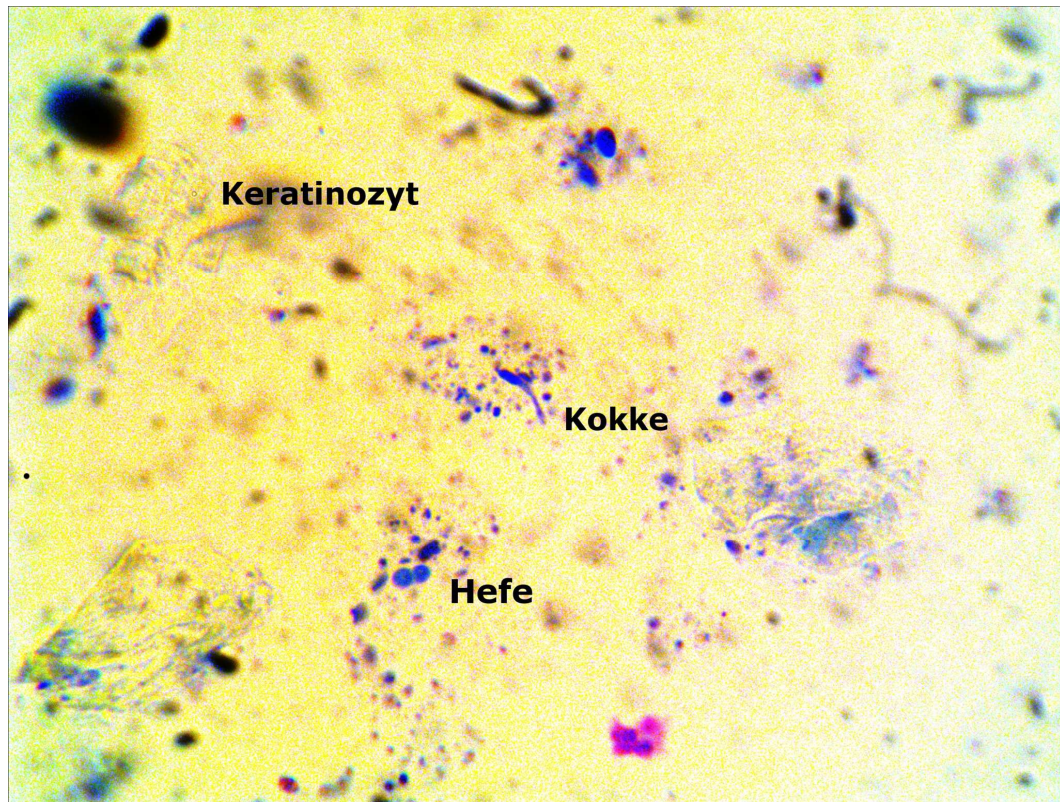


Abb. 4 Zytologie eines caninen Ohrtupferpräparates, Otitis-Schnellfärbeset (Ölimmersion, x 1000); Hefe, Kokken, Keratinozyten

Pict. 4 Cytology of a canine ear swab, otitis rapid stain (oilimmersion, x 1000); yeast, cocci, keratinocytes

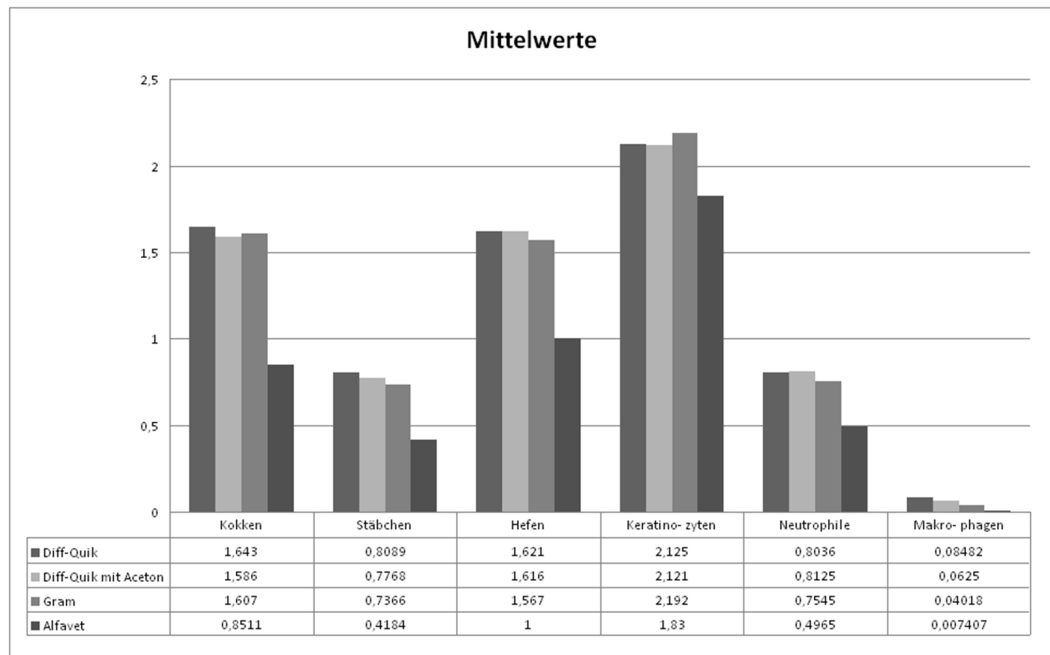


Abb. 5 Mittelwerte für Kokken, Stäbchen, Hefen, Keratinozyten, Neutrophile, Makrophagen von mit Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> mit Vorabtauchen in Aceton, Gram-color Färbeset<sup>®</sup> und Otitis-Schnellfärbeset gefärbten zytologischen Abstrichen von caninen Ohrtupfern in semiquantitativer Beurteilung (Ölimmersion/x1000)

Illustr. 5 Mean of cocci, rods, yeasts, keratinocysts, neutrophiles, macrophages for Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping, gram-color stain and the commercial otitis rapid stain of canine ear cytology (semiquantitative, oilimmersion/x1000)

Tabelle 1 Rotationstabelle der Färbungen für die Zytologie der caninen Ohrtupferpräparate mit Versatz um eine Spalte je Patient Objektträger A, B, C, D = Tupfer 1, 2, 3, 4 entsprechend der Reihenfolge der Entnahme; ID=laufende Studiennummer; Diff=Diff-Quik<sup>®</sup> (grau unterlegt); Diffac=Diff-Quik<sup>®</sup> mit Vorabtauchen in Aceton; Alfa=Alfabet-Otitisfärbeset; Gram=Gram-color Färbeset<sup>®</sup>

Table 1 Sequence of stains of the canine ear swabs was rotated with each patient to avoid bias of stain sequence. The first six patients are listed; rotation was continued throughout the study. Slide A, B, C, D = swab 1, 2, 3, 4 according to the sequence; ID=identification; Diff=Diff-Quik<sup>®</sup> (gray background); Diffac=Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping; Alfa=a commercial rapid stain made by Alfabet; Gram=Gram Quick stain<sup>®</sup>

ID	Objektträger A (Slide A)	Objektträger B (Slide B)	Objektträger C (Slide C)	Objektträger D (Slide D)
1	Diff	Diffac	Alfa	Gram
2	Gram	Diff	Diffac	Alfa
3	Alfa	Gram	Diff	Diffac
4	Diffac	Alfa	Gram	Diff
5	Diff	Diffac	Alfa	Gram
6	Gram	Diff	Diffac	Alfa

Tabelle 2. Mittelwerte (Mean) und Konfidenzintervalle (CI) für Kokken, Stäbchen, Hefen, Keratinozyten, Neutrophilen und Makrophagen von caninen zytologischen Ohrtupferpräparaten bei semiquantitativer Beurteilung durchgemustert (Ölimmersion, x 1000). Diff: Diff-Quik®; Diffac: Diff-Quik® mit Vorabtauchen in Acteon; Gram: Gram –color Färbeset®; Alfa: Otitis-Schnellfärbeset

Table 2. Mean and confidence interval (CI) for cocci, rods, yeasts, keratinocytes, neutrophils and macrophages of canine ear cytology (semiquantitative, oilimmersion, x 1000). Diff=Diff-Quik®; Diffac=Diff-Quik® with acetone pre-dipping, Gram=Gram Quick stain; Alfa=a commercial rapid stain made by Alfavet

Mittelwerte	Kokken	Stäbchen	Hefen	Keratinozyten	Neutrophile	Makrophagen
Diff Mean (CI)	1,643 (1,5-1,8)	0,8089 (0,6-1,0)	1,621 (1,4-1,8)	2,125 (2,0-2,2)	0,8036 (0,7-1,0)	0,0848 (0,03-0,13)
Diffac Mean (CI)	1,586 (1,4-1,7)	0,7768 (0,6-0,9)	1,616 (1,4-1,8)	2,121 (2,0-2,2)	0,8125 (0,7-1,0)	0,0625 (0,02-0,11)
Gram Mean (CI)	1,607 (1,5-1,8)	0,7366 (0,6-0,9)	1,576 (1,4-1,7)	2,192 (2,0-2,3)	0,7545 (0,6-0,9)	0,0401 (0,01-0,11)
Alfa Mean (CI)	0,8511 (0,7-1,1)	0,4184 (0,3-0,6)	1,0 (0,8-1,2)	1,83 (1,7-2,0)	0,4965 (0,3-0,7)	0,0074 (0,00-0,02)

Tabelle 3. Übereinstimmung (Einstufung in dieselbe Kategorie bei semiquantitativer Beurteilung) der Ergebnisse der Färbungen bei je zwei miteinander verglichenen Färbeverfahren für Kokken, Stäbchen, Hefen, Keratinozyten, neutrophile Granulozyten und Makrophagen in Prozent, Diff-Gram: Übereinstimmung von Diff-Quik<sup>®</sup> mit Gram-color Färbung<sup>®</sup>; Diff-Diffac: Übereinstimmung von Diff-Quik<sup>®</sup> mit Diff-Quik<sup>®</sup> nach Acetonvorabtauchen; Diff-Alfa: Übereinstimmung von Diff-Quik<sup>®</sup> mit Alfavet-Otitis-Schnellfärbung; Gram-Diffac: Übereinstimmung von Gram-color Färbung<sup>®</sup> mit Diff-Quik<sup>®</sup> nach Acetonvorabtauchen; Gram-Alfa: Übereinstimmung von Gram-color Färbung<sup>®</sup> mit Alfavet-Otitis-Schnellfärbung; Diffac-Alfa: Übereinstimmung von Diff-Quik<sup>®</sup> nach Acetonvorabtauchen mit Alfavet-Otitis-Schnellfärbung, Signifikanz des Unterschiedes:  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ,  $P < 0,001 = ***$

Table 3. Agreement (the same classification) of the results of the stains compared with each other in percent for cocci, rods, yeasts, keratinocytes, neutrophils and macrophages; Diff-Gram: agreement of Diff-Quik<sup>®</sup> and Gram fast stain; Diff-Diffac: agreement of Diff-Quik<sup>®</sup> and Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping; Diff-Alfa: agreement of Diff-Quik<sup>®</sup> and a commercial fast stain made by Alfavet; Gram-Diffac; agreement of Gram fast stain and Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping; Gram-Alfa: agreement of Gram fast stain and a commercial fast stain made by Alfavet; Diffac-Alfa: agreement of Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping and a commercial fast stain made by Alfavet, significance of difference:  $p < 0,05 = *$ ;  $p < 0,01 = **$ ,  $p < 0,001 = ***$

Übereinstimmung bei je zwei Färbeverfahren in Prozent	Diff-Gram	Diff-Diffac	Diff-Alfa	Gram-Diffac	Gram-Alfa	Diffac-Alfa
Kokken	71	67	38,3(***)	74,5	47,5(***)	51,7(***)
Stäbchen	87	75,3	76,6(*)	91,5	75,9	74,5
Hefen	68,3	71	54,6(***)	70,5	54,6(***)	62,4(***)
Keratinozyten	72,8	69,6	69,2(**)	72,8	53,9(**)	65,2(*)
Neutrophile	80,4	79,9	79,4	79,5	81,6	81,6
Makrophagen	94,2	92,4	92,9	96	97,1	95



Tabelle 4. Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung von 224 caninen sterilen Ohrtupferproben; insgesamt wurden 182 Isolate nachgewiesen; *P.* = *Pseudomonas*; *sp.* = subspezies; *S.* = *Staphylococcus*

Table 4. Result of the culture of 224 canine sterile ear swabs; 182 isolates; *P.* = *Pseudomonas*; *sp.* = subspezies; *S.* = *Staphylococcus*

Bakterienfamilie	Gattung/Spezies	Anzahl Isolate
Staphylococaceae	<i>S. pseudintermedius</i>	81
	<i>S. hämolyticus</i>	4
	<i>S. aureus</i>	2
	<i>S. schleiferi</i>	2
	<i>S. equorum</i>	1
	<i>S. sciuri</i>	1
	<i>S. capitis</i>	1
	<i>S. saprophyticus</i>	1
Streptococaceae	<i>β</i> -hämolisierende Streptokokken	10
Enterococcaceae	<i>Streptococcus canis</i>	2
	<i>Aerococcus viridans</i>	2
	<i>Enterococcus faecium</i>	6
	<i>Enterococcus sp.</i>	2
Micrococcaceae	<i>Arthrobacter sp.</i>	3
Microbacteriaceae	<i>Arthrobacter arilaritensis.</i>	1
	<i>Microbakterien</i>	2
Pseudomonadaceae	<i>P. aeruginosa</i>	18
Moraxellaceae	<i>P. sp.</i>	7
	<i>P. fluorescens,</i>	2
	<i>P. putida</i>	2
	<i>P. strutzeri,</i>	1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	4
	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2
	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1
Enterobacteriaceae	<i>Proteus mirabilis</i>	6
	<i>Pantoea agglomerans</i>	6
	<i>Leclercia sp.</i>	1
	<i>Serratia marescens</i>	1
	<i>Escherichia vulneris</i>	1
	<i>Escherichia coli</i>	1
	<i>Rahnella aquatilis</i>	1
Pasteurellaceae	<i>Pasteurella multocida</i>	2
	<i>Pasteurella sp.</i>	1

Xanthomonadaceae	<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	2
Sphingomonadeaceae	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1
Bifidobacteriaceae	<i>Bifidobacterium asteroides</i>	1

Tabelle 5. Übereinstimmung (Nachweis von Kokken und/oder Stäbchen in jeweils demselben beprobten Ohr) von Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung für Kokken und Stäbchen von caninen Ohrtupfern in Prozent; Diff: Diff-Quik<sup>®</sup>; Diffac: Diff-Quik<sup>®</sup> mit Vorabtauchen in Acteon; Gram: Gram –color Färbeset<sup>®</sup>; Alfa: Otitis-Schnellfärbeset

Table 5. Agreement (simultaneous detection of cocci and/or rods in the same ear) of cytology and culture for cocci and rods of canine ear swabs (percent); Diff=Diff-Quik<sup>®</sup>; Diffac=Diff-Quik<sup>®</sup> with acetone pre-dipping, Gram=Gram Quick stain; Alfa=a commercial rapid stain made by Alfavet

Keime Färbungen	Kokken	Stäbchen
Diff	64,7%	78%
Diffac	64,3%	82,5%
Gram	63,8%	83,4%
Alfa	42,4%	53%

**Kapitel II: Aktuelle Resistenzlage der bei der caninen *Otitis externa* isolierten Bakterien in Nordrhein-Westfalen, Deutschland (2009-2010)**

**Bouassiba C, Osthold W, Mueller RS**

*Prakt Tierarzt 2013; 94: 486-496*

### **Zusammenfassung**

Die Resistenzentwicklung von Bakterien ist von großer Bedeutung und beeinflusst maßgeblich die Therapieempfehlungen. In dieser Studie wurde die aktuelle Resistenzlage von insgesamt 106 Bakterienisolaten von 75 Hunden mit Otitis externa gegenüber 31 antimikrobiellen Wirkstoffen ausgewertet. Die häufigsten Isolate waren *Staphylococcus* spp. gefolgt von *Pseudomonas* spp. und *Streptococcus* spp.. Die Wirksamkeit der als Lokaltherapeutika zugelassenen antimikrobiellen Stoffe Gentamicin, Enrofloxacin, Marbofloxacin und Polymixin B (insbesondere *Pseudomonas aeruginosa*) war gut, etwa 70-100 Prozent aller Keime waren sensitiv für diese Antibiotika. Zur systemischen Anwendung eignen sich bei grampositiven Kokken Amoxicillin/Clavulansäure (96 Prozent aller Keime sensitiv) oder Cefalosporine wie Cefalexin (96 Prozent sensitiv). Für gramnegative Stäbchen wird, wie auch für Kokken, eine Keimdifferenzierung und ein Antibiotogramm empfohlen (gem. Antibiotika Leitlinie der Bundestierärztekammer) Die lokale Initialbehandlung kann bis zum Vorliegen der bakteriologischen Untersuchung mit Gentamicin, Polymixin B oder Enrofloxacin/Marbofloxacin begonnen werden. Immer ist eine größtmögliche Resistenzprävention durch zielgerichtete Diagnostik und Therapie anzustreben.

### **Schlüsselworte**

Staphylokokken, Pseudomonas, Hund, Ohren, Antibiotika

### **Summary**

The development of bacterial resistance is of paramount importance and influences the therapeutic recommendations. In this study, current resistance patterns of 106 bacterial isolates of 75 dogs with otitis externa against 31 antimicrobial agents were determined. Most frequently isolated were *Staphylococcus* spp. followed by *Pseudomonas* spp. and *Streptococcus* spp.. The efficacy of registered topical antimicrobial agents such as gentamicin, enrofloxacin and marbofloxacin was good with 70-100 % of isolates sensitive to those antibiotics. In grampositive coccal infections amoxicillin/clavulanic acid and cefalexin (efficacious against 96 % of all isolated cocci, respectively) are suitable for systemic therapy. For gramnegative rods (and cocci), a culture and sensitivity is recommended, gentamicin, polymixin B or enrofloxacin/marbofloxacin are suitable as empirical initial therapy until the results of culture and sensitivity are available. Efforts should be made by diagnostic testing and appropriate therapy to minimize the development of bacterial resistance.

### **Keywords**

Staphylococci, Pseudomonas, dog, ear, antibiotics

## **Einleitung**

Die canine Otitis externa ist einer der häufigsten Vorstellungsgründe in der tierärztlichen Praxis; die Prävalenz liegt bei 5-20 Prozent (August, 1988). Die Entzündung des äußeren Gehörganges ist eine multifaktorielle Erkrankung (McKeever und Torres, 1997). Primärursachen sind in der Lage, eine Otitis externa auszulösen. Prädisponierende Faktoren können in Verbindung mit Primärfaktoren eine Otitis externa begünstigen; perpetuierende Faktoren erhalten eine bestehende Otitis externa aufrecht. Mikroorganismen spielen als perpetuierende Faktoren eine wichtige Rolle (August, 1988). Staphylokokken, vor allem *Staphylococcus pseudintermedius*, und Hefen, vorwiegend *Malassezia* spp., finden sich häufig in geringer Zahl auch im gesunden Gehörgang. Dabei nimmt die bakterielle Belastung zum Trommelfell hin ab, die Hefenbelastung steigt (Aoki-Komori et al., 2007). *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Escherichia coli* und andere gramnegative Stäbchen sind dagegen vor allem bei chronischen Otitiden und nur selten aus dem gesunden Gehörgang zu isolieren (Aoki-Komori et al., 2007; Kiss et al., 1997). Anaerobier werden bei einer Otitis externa in der Regel nicht nachgewiesen (Aoki-Komori et al., 2007).

Die Zahl der Mikroorganismen (Bakterien und Hefen) ist bei der Otitis externa signifikant erhöht (Yoshida et al., 2002). Dabei können *Staphylococcus* spp. und *Pseudomonas* spp. sowohl als Monoinfektion wie auch in gemischter Infektion vorhanden sein, während *Streptococcus* spp. und *Proteus* spp. in der Regel in gemischter Infektion vorkommen (Bornand, 1992; Kowalski, 1988). Bis zu acht Keime können in einem erkrankten Ohr differenziert werden (Kowalski, 1988). Die häufigste Kombination stellen *Malassezia* spp. und *Staphylococcus pseudintermedius* dar gefolgt von *Pseudomonas aeruginosa* (Bornand, 1992).

Eine unkomplizierte Otitis externa wird mit topischer Medikation behandelt. Bei chronischer Problematik und Mittelohrbeteiligung sollte die diagnostische Aufarbeitung immer eine bakteriologische Untersuchung mit Antibiotogramm beinhalten, zwingend bei zytologischem Nachweis von Stäbchen und bei nicht auf Therapie ansprechender Otitis. Im Idealfall wird ein nach Antibiotogramm sensibler Wirkstoff gewählt. Eine Therapie wird in der Praxis jedoch häufig empirisch ausgewählt. Aktuelle Daten zur Resistenzlage dienen als Basis einer empirischen Therapie (Hariharan et al., 2006). Die letzte Studie, die in größerem Rahmen die Resistenzlage von Bakterien in Deutschland überprüfte, wurde 2004-2006 von

BftGermVet durchgeführt und ist über GERMAP 2008 veröffentlicht. Ziel unserer Studie war, die derzeit an der caninen Otitis externa beteiligten Bakterien in Nordrhein-Westfalen aktuell zu identifizieren sowie deren Resistenzlage für den Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe festzustellen.

## **Material und Methoden**

### *Studienpopulation und Studiendesign*

In die Studie eingeschlossen wurden 75 Hunde mit einer klinischen und/oder otoskopischen Otitis externa, welche im Zeitraum von März 2009 bis Oktober 2010 in einer veterinärdermatologischen Überweisungspraxis in Nordrheinwestfalen, Deutschland, mit Tätigkeitsschwerpunkten Ohrenerkrankungen und Allergologie vorstellig wurden. Definiert wurde die Otitis externa klinisch durch Juckreiz, Schwellung und/oder Dolenz des äußeren Gehörganges, Ohrenausfluss, Kopfschütteln und/oder Rötung, otoskopisch durch Rötung, Papeln, Krusten und/oder Exsudation aus dem äußeren Gehörgang (August, 1988). Dabei wurde die Video-Otoskopie zur besseren Visualisierung verwendet (Angus und Campbell, 2001). Bei Bedarf wurde eine Sedation/Narkose (0,5 mg/kg KG Diazepam, Faustan®, Temmler Pharma GmbH & Co. KG, D, und 5 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid, Narketan®, Vetoquinol, CH, intravenös verabreicht) vorgenommen. Hunde mit möglicher Mittelohrbeteiligung (vermutet oder diagnostiziert durch getrübbtes, rupturiertes oder nicht einsehbares Trommelfell oder durch Röntgendiagnostik festgestellte Verschattung der Bullae tympanicae) wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Trommelfellintegrität wurde teils mittels Instillation von Fluorescein in den äußeren Gehörgang mit anschließender intraoraler Kontrolle, teils durch Nachweis aufsteigender Luftbläschen bei der Gehörgangsspülung bewertet (Angus und Campbell, 2001). War das Trommelfell intakt, wurde der Hund in die Studie eingeschlossen und die zuvor durch einen sterilen Otoskopkonus aus dem horizontalen Anteil des äußeren Gehörganges entnommenen Tupfer (Steriles Abstrichbesteck mit Transportmedium, Heinz Herenz Medizinal Bedarf GmbH, D) gelangten in die Auswertung. Der Transport zum Labor in AimesMedium erfolgte in der Regel innerhalb 6 Stunden mit einem Kurierdienst. In den 14 Tagen vor Tupfernahme war kein Hund antibiotisch behandelt worden. Die routinemäßig zur Therapiekontrolle der Otitis externa genommenen Tupfer gelangten nicht in die



Auswertung der Resistenzsituation. Von jedem Hund mit bilateraler Otitis externa gelangten zwar zwei Tupfer ins Labor, von beidseitig identifizierten Bakterien fertigte das Labor jedoch zur Vermeidung von Copystämmen nur ein Antibiotogramm an.

#### *Bakteriologische Untersuchung*

Die bakteriologische Untersuchung wurde in einem akkreditierten Labor (LABOKLIN, Bad Kissingen, D) durchgeführt.

Die aerobe Anzucht der Proben erfolgte auf den kommerziell erhältlichen Columbia Schafblutagar und Endoagar (Firma BD, Heidelberg) bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Brutschrank: Haereus, Osterode) für 18-24 Stunden.

Nach Anreicherung des Tupfers in Thioglycolat-Bouillon (Firma BD, Heidelberg) folgte eine weitere aerobe Bebrütung auf Columbia Schafblutagar und Endoagar bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Brutschrank: Haereus, Osterode) für 18-24 Stunden.

Die Keimdifferenzierung wurde anhand der Koloniemorphologie, mikroskopischer Untersuchung eines Gram-Präparates (Färbekit „Color Gram 2“, BioMerieux, Frankreich), Zusatzreaktionen wie Oxidase (MAST-ID, MAST-DIAGNOSTICS, U.K.), Katalase (Enzymkatalase, Fa. Merck, Darmstadt) und Koagulase (Röhrchentest mit Kaninchenplasma, Fa. BD, Heidelberg), sowie weiterer Differenzierung mittels Massenspektroskopie (MALDI TOF, Axima Assurance, Shimadzu Biotech, Manchester; Software: Anagnostec) vorgenommen.

#### *Resistenztest*

Die Empfindlichkeitstestung wurde als Mikrodilutionsverfahren durchgeführt. Es wurde dazu 96-Well-Mikrotiterplatten (Micronaut S Kleintier, Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel) mit verschiedenen Antibiotikagruppen, 1 bis 2 Konzentrationsstufen und Wachstumskontrollen verwendet.

Die Auswertung der Micronaut-Platten erfolgte photometrisch mit dem Micronaut Skan (Firma MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Software MCN Version 6.00).

Als Inokulum für die Resistenztestung wurde eine Bakteriensuspension in 0,9% NaCl-Lösung mit einem McFarland von 0,5 hergestellt. Der Trübungsgrad dieser

Suspension wurde visuell mit bloßem Auge anhand eines kommerziell erhältlichen Trübungsstandards (BioMerieux – Frankreich) eingestellt.

Nach Einimpfung von Kolonien in 0,9% NaCl-Lösung (McFarland 0,5) wurden je nach Bakterienart zwischen 50µl und 200µl davon in 11 ml Mueller-Hinton II Bouillon überführt und gut homogenisiert. Die Beimpfung der Mikrotiterplatten erfolgte automatisiert mit dem Micronaut Sprint (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel), 100µl je Vertiefung der Mikrotiterplatten.

Nach 18-24 Stunden aerober Inkubation bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Ablesung photometrisch mit folgender Interpretation:

Sensibel: kein Wachstum in Gegenwart beider Grenzwertkonzentrationen

Intermediär: kein Wachstum in Gegenwart der oberen Grenzwertkonzentration, aber Wachstum in Gegenwart der unteren Grenzwertkonzentration

resistent: Wachstum in Gegenwart beider Grenzwertkonzentrationen

Die physiologische Standortflora (aerobe Sporenbildner,  $\alpha$ -hämolisierende Streptokokken, *Staphylococcus epidermidis*) gelangte nicht in den Resistenztest.

Die Resistenztestung erfolgte gegen folgende Wirkstoffgruppen: Penicilline, Cefalosporine, Aminoglycoside, Polypeptide, Fluorochinolone, Tetrazycline, Fenicole, Makrolide, Lincosamide und Sulfonamide.

In der vorliegenden Studie wurde eine Multiresistenz als phänotypische Resistenz gegen mindestens drei Wirkstoffe verschiedener Wirkstoffgruppen definiert (Schwarz et al., 2010).

Die intrinsischen Resistenzen blieben hier unberücksichtigt.

## **Ergebnisse**

Bei 75 Hunden im Alter von drei Monaten bis 16 Jahren zeigte sich an 120 untersuchten Ohren eine Otitis externa, zu 62 Prozent bilateral, zu 38 Prozent unilateral. Das mediane Alter lag bei 5,8 Jahren. Neben Mischlingen (n=13) waren Deutsche Schäferhunde und Labradore die häufigsten Patienten (je n=8), gefolgt von Beaglen und Golden Retrievern (je n=4). 45 Prozent waren männlich/männlich-kastriert, 55 Prozent weiblich/weiblich-kastriert.

Die bakteriologische Untersuchung ergab 106 Bakterienisolate. 57 Isolate waren Staphylococaceae, hauptsächlich *Staphylococcus (S.) pseudintermedius* (n=49),

außerdem je ein Mal *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* sowie *S. hämolyticus* und *S. aureus* je zwei Mal. Zweithäufigste Isolate waren Pseudomonales (n=22), bestehend aus Pseudomonaceae mit *Pseudomonas* (*P.*) spp. (n=20) und Moraxellaceae mit *Acinetobacter* spp. (n=2). Es waren *P. aeruginosa* (n=10), *P. spp.* (n=10), davon *P. sp* fünf Mal, *P. fluorescens* und *P. putida* je zwei Mal und *P. stutzeri* ein Mal sowie *Acinetobacter baumannii* (n=1) und *Acinetobacter lwoffii* (n=1) vertreten. Es folgten Streptococaceae (n=10) mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken (n=9), davon *Streptococcus canis* (n=2), *Aerococcus viridans* (n=1) und Enterococaceae (n=5), hauptsächlich *Enterococcus faecium* (n=3) und *Enterococcus sp.* (n=2). *Arthrobacter arilaitensis* war ein Mal vertreten. Die Enterobacteriaceae (n=11) waren vor allem *Pantoea agglomerans* (n=4) und *Proteus mirabilis* (n=3), gefolgt von je einem Mal *Serratia marescens*, *Rahnella aquatilis*, *Leclercia sp.* *Escherichia vulneris*. Abbildung 1 stellt die Keimverteilung mit Prozentzahlen dar.

Bakterielle Monoinfektionen waren zu 56 Prozent vorhanden, Infektionen mit zwei bakteriellen Erregern zu 29 Prozent. Sechs Mal wurden drei Keime und lediglich ein Mal vier Keime gleichzeitig aus einem Ohr isoliert. 85 Prozent der Monoinfektionen waren *Staphylococcus* spp. und *Pseudomonas* spp.. Streptokokken kamen zu 89% in Mehrfachinfektionen vor. Hefen blieben in dieser Studie unberücksichtigt.

Die Resistenzlage einiger Keime ist in Tabelle 1 sowie Abbildung 2 (*Staphylococcus pseudintermedius*) und Abbildung 3 (*Pseudomonas aeruginosa*) dargestellt. Über 90 Prozent der Staphylokokken waren empfindlich für Cefalexin, Cefovecin, Amoxicillin/Clavulansäure und Gentamicin, wie auch für Enrofloxacin und Marbofloxacin. Enrofloxacin und Marbofloxacin waren zu 100 Prozent wirksam gegen Streptokokken.

Kein Wirkstoff war wirksam gegen alle gramnegativen Isolate. Die Wirksamkeit von Polymixin B und Gentamicin war gegen *Pseudomonas* spp. inklusive *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* sehr gut, gegen *Proteus mirabilis* nur die von Gentamicin. Enrofloxacin/ Marbofloxacin zeigten gute Wirksamkeit gegen *Pseudomonas* spp. inklusive *Pseudomonas aeruginosa* und *Proteus mirabilis*, nicht aber gegen *Acinetobacter baumannii*. *Pseudomonas aeruginosa* zeigte jedoch bei Gentamicin 21 Prozent intermediäre Reaktion. Bei

den gramnegativen Stäbchen insgesamt war Gentamicin hochwirksam, Enrofloxacin und Marbofloxacin waren ebenfalls gut wirksam.

Die beste Wirkung gegen Kokken und Stäbchen zeigten Enrofloxacin und Marbofloxacin gefolgt von Gentamicin. Polymyxin B/Colistin war bei Stäbchen gut und bei Kokken wenig wirksam, während Chloramphenicol insgesamt häufig nur mäßig wirksam war.

Lediglich zwei Isolate (je einmal *Staphylococcus pseudintermedius* und *Arthrobacter arilaitensis*.) waren für alle Wirkstoffe sensibel. Multiresistenz lag bei 98,9 Prozent der Keime vor. Wurde Metronidazol als Wirkstoff, welcher in der Regel nicht gegen Aerobier einzusetzen ist, außer Acht gelassen, waren 89,5 Prozent der Isolate multiresistent. Kein Keim war gegen alle Wirkstoffe resistent.

### **Diskussion**

Die prozentuale Verteilung der Bakterien bestätigt vorherige Studien, die in absteigender Häufigkeit *Staphylococcus (pseud)intermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp. und *Proteus* spp. bei caninen Otitiden identifizieren (Hariharan et al., 2006; Lyskova et al., 2007; Martin Barrasa et al., 2000; Morris, 2004; Penna et al., 2010). Senthil hingegen isoliert 43 Prozent gramnegative Keime und nur 30 Prozent grampositive Keime bei der Otitis externa des Hundes (Senthil et al., 2010). Lilenbaum beschreibt im Gegensatz zur vorliegenden Studie deutlich mehr koagulasenegative Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis*, *simulans*, *hämolyticus*, *saprophyticus*) als koagulasepositive (*Staphylococcus pseudintermedius* und *aureus*) (Lilenbaum et al., 2000). Geographische Gegebenheiten und Chronizität oder Purulenz der Otitis externa, sowie eine eventuell zugrunde liegende Otitis media können für die differierenden Resultate verantwortlich sein, insbesondere im Hinblick auf *Pseudomonas* spp., vor allem *Pseudomonas aeruginosa*.

Bei Zamankhan sind 73 Prozent der bakteriellen Infektionen Monoinfektionen (Zamankhan et al., 2010). Diese Zahlen ähneln denen der vorliegenden Studie mit knapp sechzig Prozent bakterieller Monoinfektionen, meist verursacht durch *Staphylococcus* spp. oder *Pseudomonas* spp.. Oliveira und Graham-Mize stellen wesentlich weniger Monoinfektionen fest, in beiden Studien sind Hefen allerdings mit berücksichtigt, was eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz darstellt (Graham-Mize und Rosser, 2004; Oliveira et al., 2008).

Größer angelegte Resistenzmonitorings fehlen abgesehen von BftGermVet in Deutschland, so dass im vorliegenden Artikel auch für den Praktiker interessante Informationen aus Wirksamkeitsstudien betrachtet werden. Viele der in regulären Antibiogrammen beurteilten Antibiotika sind nicht zur lokalen Therapie geeignet oder zugelassen. In der vorliegenden Studie sind die Tupferproben unter den in einer Kleintierpraxis gängigen Bedingungen genommen und im Labor untersucht worden, wie es in der täglichen Praxis üblich ist, so dass routinemäßig Antibiogramme mit 31 für diese Tierart und Indikation zugelassenen und nicht zugelassenen Wirkstoffen angefertigt wurden. Auch sind nicht für alle Antibiotika CLSI-Grenzwerte für den Einsatz bei Haut/Ohrinfektionen verfügbar.  $MHK_{50}$  und  $MHK_{90}$  können bei größerem Probenumfang als die vorliegende Studie bietet und bei überregionalem Testgebiet berechnet werden. Ein Vergleich mit einem Resistenzmonitoringprogramm ist wegen Differenzen im Studiendesign schwierig, dennoch werden in der Kleintierpraxis tätigen TierärztInnen Hinweise auf mögliche Therapieoptionen gegeben.

Die Resistenzlage ist bei Staphylokokken insgesamt noch gut (Graham-Mize und Rosser, 2004). Nach Zamankhan sind im Disc Diffusionstest (DDT) Fluorochinolone, Aminoglycoside, und Cefalosporine gegen Staphylokokken zu empfehlen (Zamankhan et al., 2010). Tejedor ebenso wie Petersen geben eine gute Resistenzlage für Amoxicillin/Clavulansäure, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Tobramycin und Gentamicin an (Petersen et al., 2002; Tejedor et al., 2003). Für Staphylokokken und Streptokokken kann eine nur gering unterschiedliche Resistenzlage festgestellt werden. Vergleichbar mit GERMAP 2008-Daten ist die Sensibilität der  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken auf Penicilline, Cefalosporine und Fluorochinolone hervorragend. *Staphylococcus pseudintermedius* ist nach Petersen im Allgemeinen sensibel für Cefalothin und Oxacillin (Petersen et al., 2002). In vorliegender Studie kann eine Sensibilität von 95 Prozent der Staphylokokken gegen Oxacillin bestätigt werden. Oxacillin gilt wie Methicillin als Indikator für Resistenz gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Vanni et al., 2009). Der enge Kontakt von Mensch und Haustier fördert die Übertragung resistenter Keime von Wirt zu Wirt, beispielsweise durch Anhaften resistenter caniner Staphylokokken an humane Korneozyten (Woolley et al., 2007) und Weitergabe von Resistenzgenen von einem Bakterienstamm zum Anderen (Guardabassi et al., 2004; Woolley et al., 2007). Dies gilt für Pathogene wie für Kommensalen

(Guardabassi et al., 2004; Lu und McEwan, 2007). So ist eine Keimdifferenzierung mit Antibiotogramm sinnvoll (Ganiere et al., 2004). Eine Übertragung von (methicillinresistenten) *Staphylococcus pseudintermedius* etwa wird einer aktuellen Studie zufolge für wahrscheinlich gehalten (Horstmann, 2011). GERMAP 2008 berichtet für *Staphylococcus pseudintermedius* und *Staphylococcus aureus* eine gute Sensibilität auf Clavulansäure potenziertes Amoxicillin, Cefalosporine und Enrofloxacin, wie auch seltene Oxacillinresistenz (GERMAP 2008). Dies läuft mit Resultaten der vorliegenden Studie konform. Im Gegensatz zu einer Wirksamkeitsstudie von Engelen (Engelen et al., 2010), in der die Resistenzlage von Polymixin B hervorragend ist, liegt in vorliegender Studie die Resistenz von 98 Prozent bei *Staphylococcus* spp., 100 Prozent bei *Staphylococcus pseudintermedius* und 85 Prozent bei *Streptococcus* spp.. Diese Befunde sind ähnlich den Ergebnissen von Kowalski, der für Polymixin B im Bereich der Kokken eine Resistenz von 57 Prozent bei *Staphylococcus* spp. und 100 Prozent bei *Streptococcus* spp. feststellt (Kowalski, 1988). Die publizierte Wirksamkeit bei *Pseudomonas* spp. ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar (Tejedor und Martin Barrasa, 2002).

Aminoglykoside wie Gentamicin werden für die topische Applikation bei Otitis externa mit gramnegativen Bakterien vorgeschlagen (Greene, 2006). In der vorliegenden Studie kann eine gute Empfindlichkeit der gramnegativen Keime einschließlich *Pseudomonas* spp. festgestellt werden. Auch auf Tobramycin sind die meisten Pseudomonaden sensitiv, Tobramycin zeigt sich zudem zu 100 Prozent wirksam gegen *Acinetobacter* spp.. Bei schwerer chronischer Otitis externa wird eine Therapie mit Tobramycin oder Amikacin nach Umwidmung vorgeschlagen (Morris, 2004). Verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Wirksamkeit von Gentamicin. Einige beurteilen die Wirksamkeit wie in dieser Studie als gut (Zamankhan et al., 2010), bei anderen wird die Wirksamkeit eher als mäßig angegeben (Graham-Mize und Rosser, 2004; Martin Barrasa et al., 2000). GERMAP 2008 berichtet für *Pseudomonas aeruginosa* eine Resistenz (inklusive Intermediärer) von über 50 Prozent für Gentamicin und über 70 Prozent für Enrofloxacin, sowie nahezu 100%iger Resistenzen bei allen anderen von 14 getesteten Wirkstoffen (GERMAP2008). Ein auffallend hoher Anteil intermediärer Reaktion wurde auch in vorliegender Studie festgestellt; ein Hinweis auf weitere Resistenzentwicklung bei *Pseudomonas aeruginosa*.

Für eine systemische Therapie bei Mittelohrbeteiligung werden zusätzlich zur lokalen Medikation die Fluorochinolone Enrofloxacin und Marbofloxacin empfohlen (Greene, 2006; Müller und Horn, 2009). Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Allerdings sollte die Anwendung einer Keimdifferenzierung mit Antibiotogramm folgen (Penna et al., 2010). Die Prävalenz multiresistenter Problemkeime wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* steigt derzeit an (Zavascki et al., 2010). Ein Unterschied in der Sensibilität zwischen Enrofloxacin und Marbofloxacin kann nicht festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu einigen Studien, welche von einer geringeren Wirksamkeit von Enrofloxacin im Vergleich zu Marbofloxacin (Martin Barrasa et al., 2000) und Ciprofloxacin (Colombini et al., 2000) berichten. Die höhere Lipophilie von Enrofloxacin ist eventuell für diese Ergebnisse verantwortlich (Tejedor et al., 2003). Ein rationaler Einsatz der Fluorochinolone wird zur Minimierung weiterer Resistenzbildung als wichtig erachtet (Noguchi et al., 2005).

Bei Fluorochinolonen ist eine Toxizität für den Bewegungsapparat wachsender Individuen, die Nieren und bei Katzen die Retina (nur Enrofloxacin) beschrieben. Außerdem können kardiovaskuläre und zentralnervöse Störungen auftreten (Greene, 2006). Aminoglykoside sind potentiell nephrotoxisch, abhängig von Dosis und Dauer der Anwendung. Zudem ist eine Toxizität für Vestibulärapparat und Gehörorgan insbesondere bei Applikation bei rupturiertem Trommelfell beschrieben. Viele Tiere tolerieren die Gabe von lokalen Aminoglykosiden sehr gut, aber gelegentlich kann akute Taubheit gesehen werden, die irreversibel sein kann. Senthil empfiehlt trotzdem die Anwendung von Amikacin bei Pseudomonasotitis und stellt die Ototoxizität in den Hintergrund (Senthil et al., 2010). Bei der Anwendung von Aminoglykosiden werden Nutzen und Risiko sorgfältig abgewogen.

Die Unterschiede in den verschiedenen Studien können durch unterschiedliche geographische Lokalisation und unterschiedliche Verfügbarkeit der Medikamente bedingt sein. Auch ist zu bedenken, dass unterschiedliche Testmethoden wie DDT und Mikrodilution verschiedene Resultate ergeben (Schwarz et al., 2010). Nach Colombini eignet sich der DDT zu qualitativen Diagnose, während die Mikrodilution über die Feststellung der MHK (=MIC) der Dosisfindung dient (Colombini et al., 2000). Nach Brooks testen 75 Prozent der Labore nur die

pathogenen Keime; hier gehen eventuell Informationen über Resistenzentwicklungen verloren. Akkreditierte Labore arbeiten seiner Studie zufolge häufiger nach Standards und Qualitätskontrollen des CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) (Brooks et al., 2003). Eine Umrechnung der Hemmhöfe des DDT in MHK sollte unterbleiben (Schick et al., 2007; Schwarz et al., 2010). Für Otitiskeime sind MHKs, wenn verfügbar, vorzuziehen. Sie sind leichter zu interpretieren und praxisrelevanter, da die Konzentrationen der lokal verabreichten Antibiotika im Gehörgang in der Regel deutlich höher liegen als die Serumkonzentrationen, auf denen der DDT basiert. In der vorliegenden Studie wurde im Mikrodilutionsverfahren mit in der Regel zwei Grenzwerten gearbeitet und eine Differenzierung in „resistent“, „intermediär“ und sensibel“ vorgenommen. Dies entspricht zwar den Alltagsbedingungen in der Praxis, erschwert aber den direkten Vergleich mit einem Resistenzmonitoring, welches MHK's eruiert.

Innerhalb einer Wirkstoffgruppe sind Kreuzresistenzen üblich (Greene, 2006; Zavascki et al., 2010). Multiresistenz wird in der vorliegenden Studie entsprechend den Ausführungen von Schwarz als phänotypische Resistenz gegen mindestens drei Wirkstoffe verschiedener Wirkstoffgruppen definiert (Schwarz et al., 2010). Eine „pandrug-resistance“, die Resistenz gegen jede verfügbare Therapieoption (Zavascki et al., 2010), liegt in unserer Studie nicht vor. Lilenbaum beschreibt eine Multiresistenz gegen mindestens drei Wirkstoffe bei 36,4 Prozent der Isolate (Lilenbaum et al., 2000). Als genotypische Resistenz bezeichnet man die bakteriellen Resistenzmechanismen und die dafür verantwortlichen Gene (Schwarz et al., 2010). Die steigende Prävalenz multiresistenter Keime ist bedingt durch verschiedene Resistenzmechanismen: inaktivierende Enzyme wie  $\beta$ -Lactamasen/ Methalo- $\beta$ -Lactamasen (Penicilline und Cefalosporine) und Aminoglycoside-modifizierende Enzyme, plasmid/ chromosomal vermittelte Membrancarrier (Fluorochinolone, Penicilline, Cefalosporine, Aminoglycoside), Modifikation der äußeren Zellmembran (Polymixine, Fluorochinolone), Modifikationen an Bindungsstellen wie Modifikationen an PBP (Penicillin binding protein), Mutationen in *gyrA* und *parC* Genen mit gesteigerter Aktivität der Membrancarrier über Quinolonresistenz bestimmende Gene (QRDR)(Fluorochinolone) und plasmidgebundene Methylation der Aminoglycoside-Bindungsregion. Plasmidgebundene Resistenz



entwickelt sich über horizontale Verbreitung schnell, während chromosomale Resistenzmechanismen mehrere Generationen in Anspruch nehmen (Angus, 2004; Shanti und Sekar, 2009; Tejedor et al., 2003; Zavascki et al., 2010). In der Humanmedizin gelten derzeit *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* mit Resistenzen gegen alle Wirkstoffklassen inklusive Carbapenemen als multiresistente Problemkeime (Shanti und Sekar, 2009). Insbesondere Immunsupprimierte oder Intensivpatienten sind gefährdet, die Mortalität bei Infektion kann 57 Prozent betragen (Shanti und Sekar, 2009). Primäre Resistenz, die Wirkungslosigkeit eines Antibiotikums bei bestimmten Bakteriengattungen, bleibt hier unberücksichtigt.

Zusammenfassend ist basierend auf diese Ergebnisse bei topischen Medikamenten Gentamicin maximal wirksam, außerdem Enrofloxacin/ Marbofloxacin, bei Stäbcheninfektion auch Polymixin B. Bei unkomplizierter Otitis externa sollte eine lokale Therapie einer systemischen vorgezogen werden, da die im Ohr mit Lokaltherapeutika erreichten Wirkstoffkonzentrationen um ein Vielfaches höher liegen als bei systemischer Behandlung. Eine an die Größe des Hundes angepasste Volumenapplikation wird empfohlen (Wefstaedt, 2011). Die systemische Unterstützung der topischen Therapie bei Stäbchen kann mit Enrofloxacin/ Marbofloxacin erfolgen. Systemisch kann bei Kokken bei Bedarf Amoxicillin/ Clavulansäure gefolgt von Cefalexin und Sulfonamid/ Trimethoprim eingesetzt werden. Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit denen vorheriger Studien überein. Die Notwendigkeit einer bakteriologischen Untersuchung mit Antibiotogramm ist bedingt durch die zahlreichen multiresistenten Keime und die auch bei gut wirksamen Antibiotika in einer kleineren Anzahl von Fällen auftretenden Resistenzen. In Deutschland gibt es seit 2004 ein Monitoringprogramm zur Empfindlichkeitslage (BftGermVet/GERMAP 2008). Obgleich die vorliegende Studie eine deutlich geringere Probenstärke aufweist, sind die ermittelten Daten vergleichbar mit den über GERMAP 2008 veröffentlichten Daten dieses Monitoringprogrammes. Die Primärursachen der Otitis externa und wenn möglich die prädisponierenden Faktoren müssen diagnostiziert und gegebenenfalls behandelt werden, um über selteneren aber dann ausreichend dosierten und zielgerichteten Antibiotikaeinsatz gemäß der Antibiotikaleitlinien einer Resistenzentwicklung entgegen zu wirken (Angus, 2004).

Tabelle 1:

Resistenzlage der bei der caninen OE isolierten Bakterien von 75 Hunden mit Otitis externa (2010)

Antimikrobielle Resistenz (%)

	CMP	RAM	AMP	AMX	AMC	PEN	OXA	CEX	CEQ	CPZ	CFV	DIF	ENR	MAF	IBA	FUS	CLI	LIN	ERY	SPM	COL	SXT	DOX	TET	MTR	GEN	KAN	NEO	SPT	STR	TOB	Anzahl Isolate
S ges	31	3	20	20	2	65	6	2	8	8	6	23	2	2	9	12	37	40	32	34	98	8	31	34	100	5	15	15	94	35	12	57
S ps	35	4	18	18	2	63	7	4	7	9	7	25	4	4	11	14	40	44	35	37	100	7	32	35	100	5	18	18	93	38	12	49
Strep	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	30	0	0	0	46	0	15	0	0	85	0	15	15	100	46	77	85	100	69	85	11
P ges	60	52	96	96	96	100	96	96	48	8	88	4	4	4	76	96	100	100	84	84	12	20	72	72	100	4	16	12	100	12	8	10
P aer	50	43	100	100	100	100	93	100	50	14	100	72	7	7	86	100	100	100	72	72	0	21	86	86	100	7	21	21	100	7	0	10
Ent	23	38	38	38	15	85	100	8	23	0	8	23	0	0	15	100	92	100	100	100	54	8	46	46	100	8	23	23	54	23	15	11

Die Zahlen in den Spalten geben den prozentualen Anteil der gegen den getesteten Wirkstoff (1. Zeile) resistenten Keime an.

Die letzte Spalte gibt die jeweilige Anzahl der Isolate an.

*S ges*, *Staphylococcus* spp. *S ps*, *Staphylococcus pseudintermedius*; *Strep*, *Streptococcus/Aerococcus* spp; *P ges*, *Pseudomonas* spp; *P aer*, *Pseudomonas aeruginosa*; Ent, Enterobacteriaceae, nicht enthalten in der Tabelle Enterokokken 5 Isolate, *Acinetobacter baumannii* 1 Isolat und *Acinetobacter lwoffii* 1 Isolat

CMP, Chloramphenicol; RAM, Rifampicin; AMP, Ampicillin; AMX, Amoxicillin; AMC, Amoxicillin/Clavulansäure; PEN, Penicillin G; OXA, Oxacillin; CEX, Cefalexin; CEQ, Cefquinom; CPZ, Cefoperazon; CFV, Cefovecin; DIF, Difloxacin; ENR, Enrofloxacin; MAF, Marbofloxacin; IBA, Ibafoxacin; FUS, Fusidinsäure; CLI, Clindamycin; LIN, Lincomycin; ERY, Erythromycin; SPM, Spiramycin; COL, Polymyxin B/ Colistin; SXT, Sulfonamid/Trimethoprim; DOX, Doxycyclin; TET,

Tetrazyclin; MTR, Metronidazol; GEN, Gentamicin; KAN, Kanamycin; NEO, Neomycin/Framycetin; SPT, Spectinomycin; STR, Streptomycin; TOB, Tobramycin

Grau unterlegt: Wirkstoffe, die in für diese Tierart und Indikation zugelassenen topisch anzuwendenden Medikamenten erhältlich sind

## **Literaturverzeichnis**

**Angus JC (2004):** Otic cytology in health and disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract 34(2): 411–24.

**Angus JC, Campbell KL (2001):** Uses and indications for video-otoscopy in small animal practice, Vet Clin North Am Small Anim Pract 31 (4): 809-28.

**Antibiotikaleitlinien, 2010** Bundestierärztekammer.  
www.bundestieraerztekammer.de

**Aoki-Komori S, Shimanda K, Tani K, Katayama M, Saito TR, Kataoka Y (2007):** Microbial flora in the ears of healthy experimental beagles. Exp Anim 56(1): 67–9.

**August JR (1988):** Otitis externa: A disease of multifactorial etiology. Vet Clin North Am Small Anim Pract 18: 731–42.

**Bornand V (1992):** Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. Schweiz Arch Tierheilkd. 134(7): 341-8.

**Brooks MB, Morley PS, Dargatz DA, Hyatt DR, Salman MD (2003):** Survey of antimicrobial susceptibility testing practices of veterinary diagnostic laboratories in the United States. J Am Vet Med Assoc 222(2): 168–73.

**CLSI** (Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS, National committee of Clinical Laboratory Science) CLSI guidelines

**Colombini S, Merchant SR, Hosgood G (2000):** Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. Vet Derm 11(4): 235–9.

**Engelen M, DeBock M, Hare J, Goossens L (2010):** Effectiveness of an Otic Product Containing Miconazole, Polymixin B and Prednisolone in the treatment

of Canine Otitis Externa: Multi-site Field Trial in the US and Canada. Intern J Appl Res Vet Med. 8(1): 21-30.

**Ganiere JP, Medaille C, Etoire F (2004):** In vitro antimicrobial activity of orbifloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolates from canine skin and ear infections. Res Vet Sci 77(1): 67–71.

**GERMAP 2008**, [www.bvl.bund.de/germap2008](http://www.bvl.bund.de/germap2008)

**Graham-Mize CA, Rosser EJ (2004):** Comparison of microbial isolates and susceptibility patterns from the external ear canal of dogs with otitis externa. J Am Anim Hosp Assoc 40: 102–8.

**Greene CE (2006):** Infectious diseases in the dog and cat. Saunders Elsevier 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis, Missouri, USA 274–301.

**Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH (2004):** Pet animals as reservoir of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 54: 321–32.

**Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R (2006):** Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. Can Vet J 47(3): 253–55.

**Horstmann C, Mueller RS, Straubinger RK, Werckenthin C (2011):** Screening und Typisierung multiresistenter Staphylokokken bei Hunden mit Pyodermie und ihren Besitzern. 12. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Veterinärdermatologie, Berlin, 27.-29. 05.2011

**Kiss G, Radvanyi S, Szigeti G (1997):** New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. J Small Anim Pract 38(2): 51–6.

**Kowalski JJ (1988):** The microbial environment of ear canal in health and disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract 18(4): 743–54.

**Lilenbaum W, Veras M, Blum E, Souza GN (2000):** Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. Lett Appl Microbiol 31(1): 42–5.

**Lu YF, McEwan NA (2007):** Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. Vet Derm 18: 29–35.

**Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J (2007):** Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. J Vet Med Physiol Pathol Clin Med 54(10): 559–63.

**Martin Barrasa JL, Luipola Gomez P, Gonzales Lama Z, Tejedor Junco MT (2000):** Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. J Vet Med series B 47(3): 191–6.

**McKeever PJ, Torres AM (1997):** ear disease and its management. Vet Clin North Am Small Anim Pract 27(6): 1523–36.

**Morris DO (2004):** Medical therapy of otitis externa and otitis media. Vet Clin North Am Small Anim Pract 34(2): 541–55.

**Müller E, Horn S (2009):** Wirksamkeit von Enrofloxacin und Marbofloxacin gegen Bakterienisolate von Hund und Katze. In vitro Studie zur Resistenzlage. Praktischer Tierarzt 90(6): 512–21.

**Noguchi N, Okihara T, Namiki Y, Kumaki Y, Yamanaka Y, Koyama M, Wakasugi K, Sasatsu M (2005):** Susceptibility and resistance genes to fluoroquinolones in methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2002. Int J Antimicrob Agents 25(5): 374–9.

**Oliveira LC, Leite AL, Brilhante RSN, Carvalho CBM (2008):** Comparative study of the microbial profile from bilateral otitis externa. Can Vet J 49: 785–88.

**Penna B, Varges R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W (2010):** Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet Derm* 21(3): 292–6.

**Petersen AD, Walker RD, Bowmann MM, Schott HC 2<sup>nd</sup>, Rosser EL Jr (2002):** Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992–1997). *J Am Anim Hosp Assoc* 38(5): 407–13.

**Schick AE, Angus JC, Coyner KS (2007):** Variability of laboratory identification and antibiotic susceptibility reporting of *Pseudomonas* spp. isolates from dogs with chronic otitis externa. *Vet Derm* 18: 120–6.

**Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W (2010):** Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother* 65: 601–4.

**Senthil K, Selvaraj P, Vairamuthu S, Mala S, Kathiresan D (2010):** Antibigram patterns of microbes isolated from otitis externa of dogs. *Tamilnadu J Vet & Anim Sci* 6(3): 145–7.

**Shanthi M, Sekar U (2009):** Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections among hospitalized patients: risk factors and outcomes. *J Assoc Physicians India* 57: 636,638–40,645.

**Tejedor JMT, Martin JL, Navia M, Freixes J, Vila J (2003):** Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Vet Microb* 94(4): 295–301.

**Tejedor JMT, Martin Barrasa JL (2002):** Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive staphylococci isolated from healthy dogs and

dogs suffering from otitis externa. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 49(9): 419–23.

**Vanni M, Tognetti R, Pretti C, Crema F, Soldani G, Meucci V, Intorre L (2009):** Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. Res Vet Sci 87(2): 192–5.

**Wefstaedt P, Behrens B-A, Nolte I, Bouguecha A (2011):** Finite element modeling of the canine and feline outer ear canal: benefits for local drug delivery? Berl Münch Tierärztl Wochenschr 124: 78-82.

**Woolley KL, Kelly RF, Fazakerley J, Williams NJ, Nuttall TJ, McEwan NA (2007):** Reduced in vitro adherence of *Staphylococcus* species to feline corneocytes compared to canine and human corneocytes. Vet Derm 19:1–6.

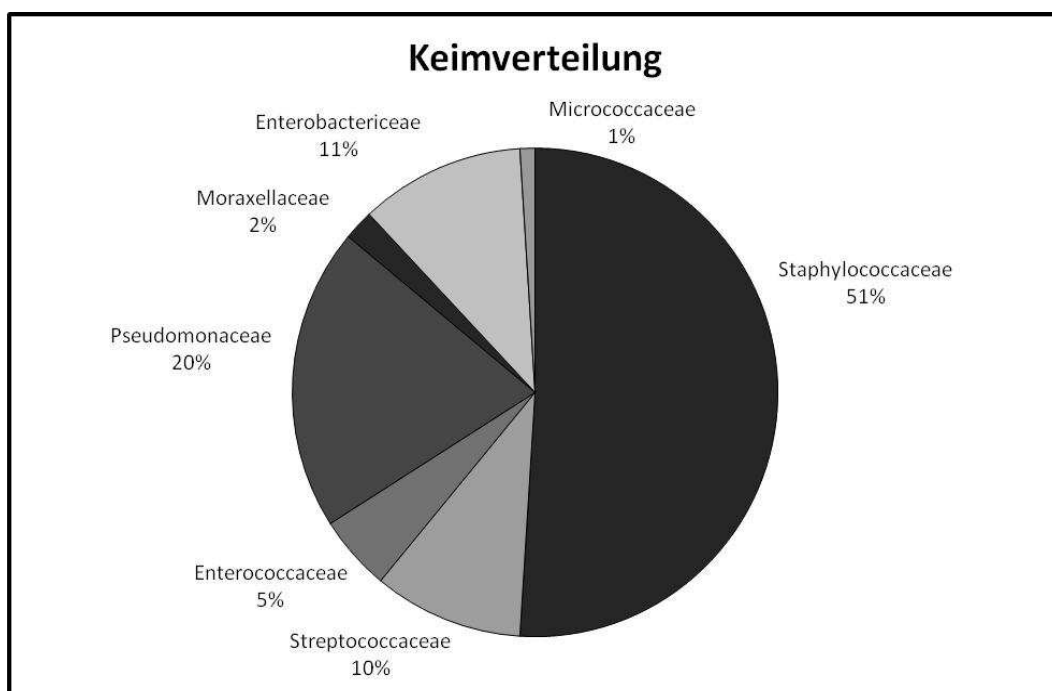
**Yoshida N, Naito F, Fukata T (2002):** studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. J Vet Med Sci 64(12): 1145–7.

**Zamankhan MH, Jamshidi S, Zahraei ST (2010):** Identification and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. Vet Res Commun 34(5): 435–44.

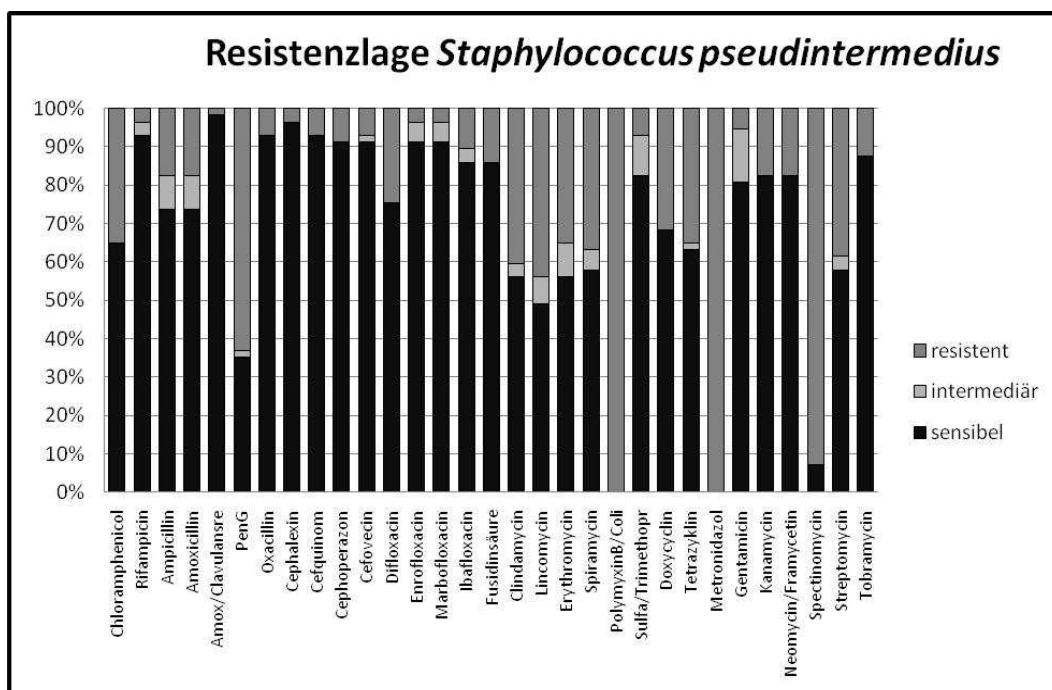
**Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC, Gales AC (2010):** Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther 8(1): 71–93.



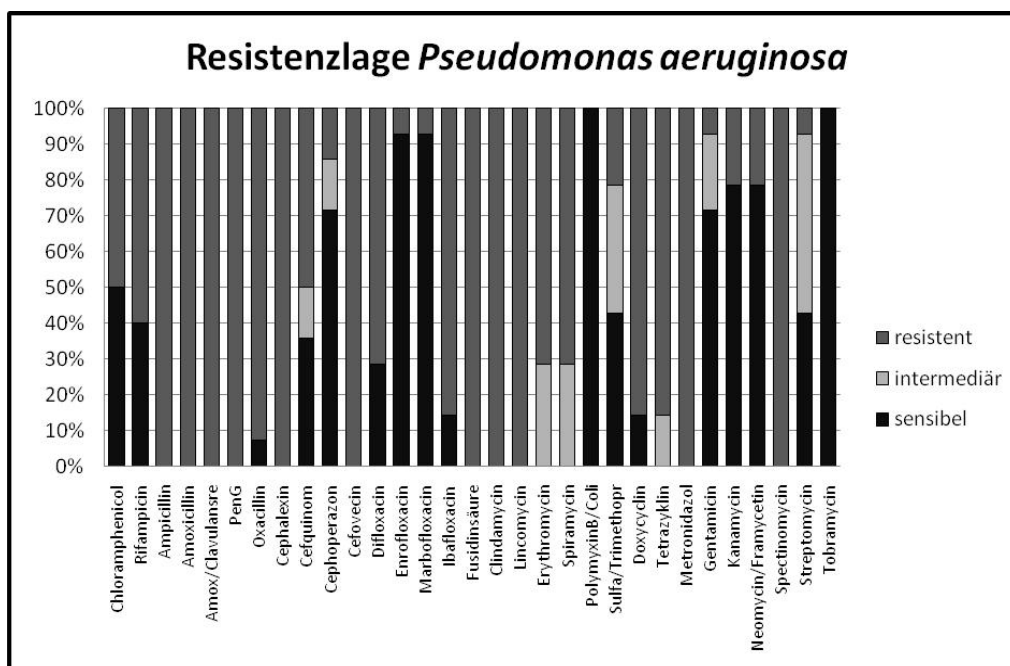
## Abbildungsverzeichnis



**Abbildung 1:** Keimverteilung der bei der caninen Otitis externa isolierten Bakterien in Prozent (Staphylococcaceae 51%, darin *Staphylococcus pseudintermedius* 45 %, Pseudomonaceae 20%, darin *Pseudomonas aeruginosa* 11%, Moraxellaceae 2%, darin *Acinetobacter baumannii* 1,3%)



**Abbildung 2:** Resistenzlage der bei der caninen Otitis externa isolierten *Staphylococcus pseudintermedius*



**Abbildung 3:** Resistenzlage der bei der caninen Otitis externa isolierten *Pseudomonas aeruginosa*

**Kapitel III: *in-vivo*-Wirksamkeit eines Chlorhexidin und TrisEDTA enthaltenden Ohrreinigers-eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie**

**Bouassiba, C., Osthold, W., Mueller, R.S.**

*Tierärztl Prax 2012; 40(K): 161-170*

## **Zusammenfassung**

**Gegenstand und Ziel:** Ein wichtiger Aspekt einer erfolgreichen Therapie der Otitis externa (OE) ist die Reinigung des Gehörgangs. Dafür stehen verschiedene Präparate zur Verfügung. Im Hinblick auf steigende Resistenzen bei Antibiotika wird eine Keimbekämpfung in Kombination mit Antiseptika angestrebt. Ziel der Studie war es, die *in-vivo* Wirksamkeit eines Chlorhexidin (1500µg/ml) und Tris-EDTA (48µg/ml) enthaltenden kommerziellen Ohrreinigers in einer plazebo-kontrollierten Doppelblindstudie anhand Klinik, Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung zu überprüfen.

**Material und Methoden:** An 64 Hunden (medianes Alter 5,0 Jahre) mit Otitis externa wurde dieser Ohrreiniger (Gruppe A)/ das Plazebo (Gruppe B) zweimal täglich angewendet, einmal täglich gefolgt von einem Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol enthaltenden Ohrenmedikament. Die Kontrolluntersuchung wurde nach 14 Tagen vorgenommen. Die Auswertung erfolgte klinisch und zytologisch. Außerdem wurde zu Beginn und nach 14 Tagen je die mikrobiologische Untersuchung eines sterilen Tupfers jeden Ohres vorgenommen.

**Ergebnisse:** Verglichen mit dem Plazebo verursachte der Ohrreiniger eine signifikante Reduktion der Kokken ( $p < 0,0001$ ), Stäbchen ( $p = 0,007$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $p = 0,0001$ ). Hefen wurden in beiden Gruppen signifikant reduziert (Gruppe A  $p < 0,0001$ , Gruppe B  $p < 0,001$ ). Klinisch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt ( $p = 0,59$ ). Die Zahl Marbofloxacin-resistenter Bakterien stieg in Gruppe A von null auf 44 Prozent ( $p = 0,0025$ ), in Gruppe B von acht auf 31 Prozent ( $p > 0,05$ ).

**Schlussfolgerung:** Chlorhexidin und Tris-EDTA führen in Kombination mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol zu einer zytologisch verifizierbaren Keimreduktion bei der caninen Otitis externa infectiosa. Die Zahl Marbofloxacin-resistenter Bakterien stieg in Gruppe A signifikant an.

**Klinische Relevanz:** Die Ergebnisse dieser Studie lassen die Vermutung zu, dass eine Kombination von Chlorhexidin und Tris-EDTA in Kombination mit antimikrobiellen Ohrentropfen zur Reduktion der bakteriellen Besiedlung einer bakteriell infizierten Otitis externa empfohlen werden kann, allerdings das Risiko

der Resistenzentwicklung besteht. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie können lokale Nebenwirkungen erwartet werden.

**Schlüsselworte:** Otitis externa, Hund, Antiseptika, Zytologie

### **Summary**

**Aim:** The important aspect of a successful therapy for otitis externa (OE) is cleaning of the external canal. Several cleaners are available for this. In light of increasing bacterial resistance against antibiotics a combined therapy with antiseptics is desirable. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a cleaner containing chlorhexidine (1500µg/ml) and Tris-EDTA (48µg/ml) clinically, cytologically and microbiologically in a placebo-controlled double-blinded trial.

**Materials and Methods:** Ear cleaner (group A) or placebo (group b) was used in 64 dogs (median age of 5 years) twice daily followed by an ear medication containing marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole once daily. After two weeks patients were reevaluated clinically and cytologically. In addition at the beginning and after 14 days sensitivity testing of each ear was undertaken.

**Results:** On cytology, there was a significant reduction in the count of cocci ( $p<0.0001$ ), rods ( $p=0.007$ ) and neutrophils ( $p=0.0001$ ) in the treatment compared to the placebo group. Yeast were reduced significantly in both groups (group A  $p<0.0001$ , group b  $p<0.001$ ). The difference in clinical response between the two groups was not significant ( $p=0.59$ ). The number of marbofloxacin-resistant bacteria increased in group A from zero to 44 per cent ( $p=0.0025$ ), in group B from eight to 31 per cent ( $p>0.05$ ).

**Conclusion:** Chlorhexidine and Tris-EDTA in combination with marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole are effective in cytological reduction of bacteria in canine infectious otitis externa. The number of marbofloxacin-resistant bacteria increased significantly.

**Clinical relevance:** Based on this study, chlorhexidine and Tris-EDTA in combination with antimicrobial ear medication can be assumed to be recommended for the treatment of otitis externa complicated by bacterial infection to reduce bacteria, however the high risk of resistance development exists. Side effects are to be expected.

**Keywords:** Otitis externa, dog, antiseptics, cytology

## **Einleitung**

Die canine Otitis externa ist eine der häufigsten Vorstellungsgründe in der tierärztlichen Praxis, die Prävalenz liegt bei 5-20 Prozent (4). Die Entzündung des äußeren Gehörganges ist eine multifaktorielle Erkrankung (25). Eine Differenzierung in Primärursachen, prädisponierende Faktoren und perpetuierende Faktoren hat sich etabliert (1, 4). Nur die Primärursachen, häufig Allergien, Ektoparasiten oder Fremdkörper, sind in der Lage, eine Otitis externa auszulösen (34). Prädisponierende Faktoren, wie etwa Gehörgangstenosen, können in Verbindung mit Primärfaktoren eine Otitis externa begünstigen, während perpetuierende Faktoren diese, einmal bestehend, aufrecht erhalten. Bakterien spielen hierbei eine wichtige Rolle (4,16). Staphylokokken, vor allem *Staphylococcus (S.) pseudintermedius*, aber auch andere Gram-positive Kokken (etwa *Streptococcus* spp. und *Micrococcus* spp.)(6) sowie Hefen, vorwiegend *Malassezia* spp. finden sich häufig in geringer Zahl auch im gesunden Gehörgang, wobei die Zahl der Bakterien im Gegensatz zur Zahl der Hefen zum Trommelfell hin sinkt (3). *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. und andere Gram-negative Stäbchen sind dagegen eher bei chronischer Otitis externa beteiligt (5, 34) und nur selten aus dem gesunden Gehörgang zu isolieren (3, 44). Die Zahl der Mikroorganismen (Bakterien und Hefen) kann bei Otitis externa signifikant erhöht sein (30, 44). Eine Otitis externa wird mit topischer antibakterieller/antimykotischer Medikation in Verbindung mit steroidalen Antiphlogistika nach zytologischer und bakteriologischer Untersuchung, gegebenenfalls mit Resistenztest und Ohrspülung, angegangen. Basis einer erfolgreichen Therapie von vereiterten und verschmutzten Ohren ist dabei eine gründliche Ohrreinigung (20, 29). Ohrreiniger enthalten meist Komponenten wie Adstringentien, Ceruminolytika, Surfactants oder auch Antiseptika (15, 29). Bei Hautinfektionen werden topische Antiseptika empfohlen (15). Durch Chlorhexidin wird die Membran von Gram-positiven wie Gram-negativen Bakterien geschädigt. Tris-EDTA ist ein Chelatbildner, welcher kompetitiv mit den Mikroorganismen um Calcium- und Magnesiumionen konkurriert und so die

mikrobielle Zellwandsynthese stört (9, 39). *In-vitro* Untersuchungen ergaben synergistische Effekte von Chlorhexidin und Tris-EDTA, einerseits an vorselektierten Bakterienisolaten (17) andererseits bei diversen von caniner Otitis externa isolierten Keimen (14). Plazebo-kontrollierte Studien, die solche Wirkungen bestätigen, fehlen in der Literatur. Ziel der vorliegenden randomisierten, plazebo-kontrollierten Doppelblindstudie war es, die *in-vivo* Wirksamkeit eines Chlorhexidin/Tris-EDTA enthaltenden, kommerziellen Ohrreinigers in Kombination mit topischem Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol im Hinblick auf die Reduktion der mikrobiellen Besiedelung zu ermitteln.

## **Material und Methoden**

### *Studienpopulation und Studiendesign*

In die Studie eingeschlossen wurden Hunde mit einer klinischen und otoskopisch diagnostizierten Otitis externa, welche im Zeitraum von März 2009 bis Oktober 2010 in einer veterinärdermatologischen Überweisungspraxis mit Tätigkeitsschwerpunkten Ohrenerkrankungen und Allergologie vorstellig wurden. Zu diesem Zeitpunkt waren 75 Hunde (n=120 Ohren) in die Studie aufgenommen. Das Vorliegen der klinischen Symptome Juckreiz, Schwellung und/oder Dolenz des äußeren Gehörganges, Ohrenausfluss, Kopfschütteln und/oder Rötung und die Feststellung von Rötung, Papeln, Krusten und/oder Exsudation aus dem äußeren Gehörgang bei der otoskopischen Untersuchung definierten eine OE (4). Dabei wurde die Video-Otoskopie zur besseren Visualisierung und Besitzerinformation wie auch zur Beurteilung des Therapieerfolges verwendet (2). Bei Bedarf wurde eine Sedation/Narkose (Diazepam 0,5 mg/kg KGW (Diazepam 10 mg Rotex medica<sup>®</sup>, Rotexmedica, Trittau, D) und Ketaminhydrochlorid 5 mg/kg KGW (Narketan<sup>®</sup> 100 mg/ml, Vetoquinol, Ravensburg, D) intravenös verabreicht) vorgenommen. Hunde mit möglicher Mittelohrbeteiligung (vermutet oder diagnostiziert durch getrübbtes, rupturiertes oder nicht einsehbares Trommelfell oder durch Röntgendiagnostik festgestellte Verschattung der Bullae tympanicae) wurden aus der Studie ausgeschlossen. Die Trommelfellintegrität wurde teils mittels Instillation von Fluorescein in den äußeren Gehörgang mit anschließender intraoraler Kontrolle, teils durch Nachweis aufsteigender Luftbläschen bei der

Gehörgangspülung bewertet (2). Die Gehörgangspülung in Narkose erfolgte ausschließlich mit handwarmer physiologischer Kochsalzlösung (Isotone Natriumchlorid-Lösung ad us vet<sup>®</sup>, B Braun Melsungen AG, Melsungen, D) instilliert und abgesogen mittels Ballspritze bis kein Cerumen/Exsudat mehr zu mobilisieren und die Spülflüssigkeit klar war. Die Spülzeiten lagen hierbei zwischen zehn und 40 Minuten. Diese Gehörgangspülung in Narkose fand in der Bewertung der Ergebnisse keine Beachtung, da nur physiologische Kochsalzlösung eingesetzt wurde. War das Trommelfell intakt, wurde der Hund in die Studie eingeschlossen und die erste Gehörgangreinigung vom Besitzer in Anwesenheit einer Tierärztin (C.B.) nach deren Anleitung durchgeführt. Die Randomisierung in zwei Gruppen (Verum, Gruppe A, und Plazebo, Gruppe B) erfolgte mittels einer Randomisierungstafel vor dem Einschluss der Patienten durch eine Mitarbeiterin. Eine Vorselektion nach klinischen Kriterien, abgesehen von den Einschlusskriterien, fand nicht statt. Die Entblindung erfolgte nach Auszählen und Kontrolle aller Objektträger.

#### *Intervention*

Der Chlorhexidin und Tris EDTA enthaltende Ohrreiniger (Epibac<sup>®</sup>, Alfavet, Neumünster, D) oder Plazebo (Alfavet, Neumünster, D) wurde vom Besitzer zweimal täglich in den äußeren Gehörgang eingebracht, ohne mit dem Konus der Flasche den Gehörgang zu berühren, bis ein Flüssigkeitsspiegel sichtbar war. Danach wurde der Gehörgang in Richtung Ohrmuschel etwa 20-30 Mal massiert. Das Benutzen von Wattestäbchen war nicht erlaubt. Die Spülflüssigkeit wurde nach der Massage vom Hund selbst aus dem äußeren Gehörgang ausgeschüttelt. Zehn Minuten nach dem Ausschütteln wurde einmal täglich das zugelassene Kombinationspräparat aus Marbofloxacin, Dexamethasonacetat und Clotrimazol (Aurizon<sup>®</sup>, Vetoquinol, Ravensburg, D) nach Herstellerangaben (10 Tropfen) eingebracht. Die Kontrolluntersuchung erfolgte nach 14 Tagen. Das Plazebo enthielt Propylenglycol, Hamameliswasser, Spitzwegerichextrakt und Aloe vera. Das Verum (Epibac<sup>®</sup>) enthielt zusätzlich als Wirkstoffe Chlorhexidingluconat (1500µg/ml) und Tris-EDTA (48µg/ml). In den 14 Tagen vor Tupferprobennahme war kein Hund antibiotisch oder antimykotisch behandelt worden, weder lokal noch systemisch.

#### *Probenentnahme und -färbung*



Vor der ersten Intervention und zur Kontrolluntersuchung nach 14 Tagen wurde ein steriler Tupfer (Steriles Abstrichbesteck mit Transportmedium, Heinz Herenz Medizinal Bedarf GmbH, D) entnommen. War eine Gehörgangspülung zur Beurteilung des Trommelfells nötig, wurde der Tupfer vorher entnommen. Der Transport zum Labor (LABOKLIN, Bad Kissingen, D) in Amies-Medium erfolgte innerhalb von sechs Stunden per Kurierdienst. Die vorher markierten unsterilen Tupfer wurden (durch einen sterilen Otoskopkonus) in den horizontalen Teil des äußeren Gehörganges eingeführt und Proben durch eine Drehung um 360° gewonnen, auf Objektträger (Assistent® Elka Objektträger, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, D) ausgerollt, mit der laufenden Studiennummer (ID) versehen, luftgetrocknet und nach Hitzeфикation durch dreimaliges Ziehen durch die Flamme eines Bunsenbrenners mittels Diff-Quik (Dade, Schwalbach, D) gefärbt und mikroskopisch untersucht (Hund EH 500 Mikroskop Giessen, D). Diff-Quik ist ein differenzierend färbendes Set mit mehreren Färbeschritten. Die hitzefixierten Objektträger wurden nacheinander jeweils fünf Mal für eine Sekunde in die Fixierlösung und die Färbelösungen I und II getaucht, abgetropft, mit destilliertem Wasser abgespült und luftgetrocknet. Alle fertig gefärbten und luftgetrockneten Objektträger wurden in speziellen Kästen zur Aufbewahrung von Objektträgern dunkel, trocken und bei Zimmertemperatur bis zur verblindeten mikroskopischen Auswertung aufbewahrt.

#### *Klinische Bewertung*

In ein Formblatt wurden die Patientendaten (Besitzer, Name, Signalement, Krankheiten, Medikamente), laufende Studiennummer (ID), Datum der Probenentnahme und die klinische Klassifikation der OE mit Seitenkennung zu Beginn und bei der Kontrolluntersuchung eingetragen. Jede OE wurde in eine der Kategorien OE (Otitis externa) erythematosa, OE ceruminosa, OE erythematosa et ceruminosa, OE purulenta, OE proliferativa und OE purulenta et proliferativa (OE suppurativa) eingeteilt (4). Der klinische Erfolg bei der Erstuntersuchung und nach 14 Tagen bei der Kontrolluntersuchung wurde anhand der Einstufung in folgendes Punkteschema bewertet. Als klinische Remission nach Therapie wurde nur ein bei klinischer und otoskopischer Untersuchung gesundes Ohr ohne Symptome einer OE, wie sie als Einschlusskriterien für diese Studie definiert wurden, angesehen und mit 0 Punkten gewertet. Eine OE erythematosa, die

Rötung des äußeren Gehörganges, und eine OE ceruminosa, ein Ohr mit ceruminösem Detritus ohne Rötung, wurden mit je einem Punkt gewertet, deren Kombination, die OE erythematosa et ceruminosa mit zwei Punkten. Eine OE purulenta, eitriges Detritus im äußeren Gehörgang (mikroskopisch in der zytologischen Untersuchung Entzündungszellen mit einem Anteil von 90% neutrophilen Granulozyten), und eine OE proliferativa (partielle oder vollständige Stenose des äußeren Gehörganges aufgrund fibröser Proliferation des Epithels ohne ödematöse Schwellung) erhielten jeweils zwei Punkte, deren Kombination, die OE purulenta et proliferativa vier Punkte, was der maximal verteilten Punktzahl für ein Ohr entsprach. Als Therapieversager wurde jedes Ohr, welches keine klinische Remission oder Besserung zeigte, gewertet. Die Gesamtpunktzahl aller Ohren errechnete sich aus der Summe der je Ohr entsprechend der klinischen Kategorie vergebenen Punkte (maximal vier Punkte je Ohr). Der klinische Score der Gruppen A und B ist die gemittelte Gesamtpunktzahl aller Ohren der jeweiligen Gruppe (Gruppe A: gemittelte Gesamtpunktzahl von 46 Ohren; Gruppe B: gemittelte Gesamtpunktzahl von 58 Ohren)

Außerdem wurde anhand der Anamnese eine Einteilung in die Kategorien „akut“, eine OE, die weniger als 14 Tage bestand, und „chronisch-rezidivierend“, eine OE, die wiederholt auftrat (> zweimal pro Jahr) oder dauerhaft länger als 14 Tage bestand, vorgenommen.

#### *Zytologische Bewertung*

Bei der mikroskopischen Untersuchung wurde zunächst in geringerer Vergrößerung (x40, x100, x400) auf Areale stärkerer Färbung zentriert. Dabei wurden Bereiche optimaler Schichtdicke und Färbequalität ohne Färbeartefakte ausgewählt. Dann wurden unter Ölimmersion (x1000) je Objektträger in acht Gesichtsfeldern Kokken und Stäbchen, Hefen und Keratinozyten sowie neutrophile Granulozyten und Makrophagen ausgezählt und gemittelt (1). Alle Objektträger wurden von derselben Person (C.B.) ausgewertet.

#### *Mikrobiologische Untersuchungen*

Die bakteriologische Untersuchung wurde in einem akkreditierten Labor (LABOKLIN, Bad Kissingen, D) durchgeführt.

Die aerobe Anzucht der Proben erfolgte auf den kommerziell erhältlichen Columbia Schafblutagar und Endoagar (Firma BD, Heidelberg) bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Brutschrank: Haereus, Osterode) für 18-24 Stunden.

Nach Anreicherung des Tupfers in Thioglycolat-Bouillon (Firma BD, Heidelberg) folgte eine weitere aerobe Bebrütung auf Columbia Schafblutagar und Endoagar bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  (Brutschrank: Haereus, Osterode) für 18-24 Stunden.

Die Keimdifferenzierung wurde anhand der Koloniemorphologie, mikroskopischer Untersuchung eines Gram-Präparates (Färbekit „Color Gram 2“, BioMerieux, Frankreich), Zusatzreaktionen wie Oxidase (MAST-ID, MAST-DIAGNOSTICS, U.K.), Katalase (Enzymkatalase, Fa. Merck, Darmstadt) und Koagulase (Röhrchentest mit Kaninchenplasma, Fa. BD, Heidelberg), sowie weiterer Differenzierung mittels Massenspektroskopie (MALDI TOF, Axima Assurance, Shimadzu Biotech, Manchester; Software: Anagnostec) vorgenommen.

#### *Resistenztest*

Die Empfindlichkeitstestung wurde als Mikrodilutionsverfahren durchgeführt. Es wurde dazu 96-Well-Mikrotiterplatten (Micronaut S Kleintier, Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel) mit verschiedenen Antibiotikagruppen, 1 bis 2 Konzentrationsstufen und Wachstumskontrollen verwendet.

Die Auswertung der Micronaut-Platten erfolgte photometrisch mit dem Micronaut Skan (Firma MERLIN Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel, Software MCN Version 6.00).

Als Inokulum für die Resistenztestung wurde eine Bakteriensuspension in 0,9% NaCl-Lösung mit einem McFarland von 0,5 hergestellt. Der Trübungsgrad dieser Suspension wurde visuell mit bloßem Auge anhand eines kommerziell erhältlichen Trübungsstandards (BioMerieux – Frankreich) eingestellt.

Nach Einimpfung von Kolonien in 0,9% NaCl-Lösung (McFarland 0,5) wurden je nach Bakterienart zwischen 50µl und 200µl davon in 11 ml Mueller-Hinton II Bouillon überführt und gut homogenisiert. Die Beimpfung der Mikrotiterplatten erfolgte automatisiert mit dem Micronaut Sprint (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hersel), 100µl je Vertiefung der Mikrotiterplatten.

Nach 18-24 Stunden aerober Inkubation bei  $36\pm 2^{\circ}\text{C}$  erfolgte die Ablesung photometrisch mit folgender Interpretation:

Sensibel:       kein Wachstum in Gegenwart beider Grenzwertkonzentrationen  
Intermediär:   kein Wachstum in Gegenwart der oberen Grenzwertkonzentration,  
                  aber Wachstum in Gegenwart der unteren Grenzwertkonzentration  
resistent:       Wachstum in Gegenwart beider Grenzwertkonzentrationen

Die physiologische Standortflora (aerobe Sporenbildner,  $\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken, *Staphylococcus epidermidis*) gelangte nicht in den Resistenztest.

Die Resistenztestung erfolgte gegen folgende Wirkstoffgruppen: Penicilline, Cephalosporine, Aminoglycoside, Polypeptide, Fluorochinolone, Tetracycline, Fenicole, Makrolide, Lincosamide und Sulfonamide.

### *Statistik*

Die Gesamtsumme der klinischen Scores, die Anzahl der Mikroorganismen und der Zellen vor und nach der Behandlung wurde mittels ANOVA und bei nicht-parametrischen Daten mittels Kruskal Wallis Test und Dunn's Post Test verglichen. Für einen Vergleich der Anzahl der Hunde mit akuter/chronisch-rezidivierender OE, kompletter Remission, klinischer Besserung und Therapieversager kam der Fisher's Exact Test zum Einsatz. Statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt (Prism 5, Graphpad, San Diego, USA).

## **Ergebnisse**

### *Studienpopulation*

Eingangs in die Studie eingeschlossen wurden 75 Hunde beider Geschlechter im Alter von 3 Monaten bis 16 Jahren. Endgültig in die Auswertung gelangten 64 Hunde ( $n=104$  Ohren). Deren medianes Alter lag bei 5,0 Jahren. Neben Mischlingen ( $n=13$ ) waren Deutsche Schäferhunde und Labradore die häufigsten Patienten (je  $n=8$ ), gefolgt von Beageln und Golden Retrievern (je  $n=4$ ). Je 36 Prozent waren männlich und weiblich (je  $n=23$ ), 9 Prozent männlich kastriert ( $n=6$ ) und 19 Prozent ( $n=12$ ) weiblich kastriert. Bei zwei Drittel der Hunde ( $n=40$ ) lag eine bilaterale OE vor, bei einem Fünftel ( $n=13$  Hunde) eine unilaterale OE rechts und bei unwesentlich weniger Hunden ( $n=11$ ) eine unilaterale OE links

( $p=0,82$ , Fisher's Exact Test). 55 Ohren wurden mit dem Ohrreiniger behandelt, 65 mit Plazebo.

Ohne Angabe von Gründen erschienen 10 Hunde ( $n=14$  Ohren) nicht zur Kontrolluntersuchung. Außerdem musste ein Hund ( $n=2$  Ohren) aus Gründen, die nicht im Zusammenhang mit der OE standen, euthanasiert werden. Es gelangten von 64 Hunden ( $n=104$  Ohren) 46 Ohren in Gruppe A und 58 Ohren in Gruppe B in die Auswertung.

#### *Klinische Bewertung*

Zu Beginn der Studie waren beiden Gruppen hinsichtlich der Art ihrer Otitis gleich (69 und 63% OE erythematoso/ceruminosa in Gruppe A und B verglichen mit 31 und 37% der OE purulenta/proliferativa, Fisher's Exact test,  $p=0,2961$ ). Auch die Verteilung akut (30 und 36%) versus chronisch-rezidivierender OE (70 und 64%) vor Therapie ergab keine signifikanten Unterschiede (Fisher's Exact Test,  $p=0,6764$ ).

Der durchschnittliche klinische Score in Gruppe A betrug vor der Therapie 1,78 und besserte sich nach zweiwöchiger Therapie auf 0,76. Für Gruppe B betrugen die Werte 1,68 und 0,74. Sowohl in Gruppe A als auch in Gruppe B verbesserten sich die klinischen Scores signifikant ( $p<0,001$ , Kruskal Wallis Test und Dunn's Post Test).

Nach zweiwöchiger Therapie lag der Anteil der Tiere mit kompletter klinischer Remission bei 39 Prozent in Gruppe A und 37 Prozent in Gruppe B (Fisher's Exact Test,  $p=0,8393$ ). Eine klinische Besserung konnte in Gruppen A und B bei weiteren 44% und 42% festgestellt werden (Fisher's Exact Test,  $p=0,5891$ ). Ungefähr ein Fünftel der Tiere sprach klinisch nur unzureichend auf die Therapie an (17 Prozent Gruppe A und 21 Prozent Gruppe B). Hier war zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen (Fisher's Exact Test,  $p=0,803$ ). Auch bei Betrachtung der Therapieversager differenziert nach klinischen Kategorien (OE erythematoso, OE ceruminosa und OE erythematoso et ceruminosa zusammen versus OE purulenta, OE proliferativa und OE purulenta et proliferativa zusammen) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Fisher's Exact Test,  $p=0,356$ ). In Gruppe A waren nach Therapie noch 7 OE erythematoso von 9 OE purulenta und 5 OE purulenta et proliferativa ( $=7/14$  Ohren). In Gruppe B waren es 8 von 20 OE purulenta und 2 OE purulenta et proliferativa ( $=8/22$

Ohren); dies war kein signifikanter Unterschied (Fisher's Exact Test,  $p=0,4$ ). Die Resultate der klinischen Bewertung sind in Tabelle 1 aufgeführt.

#### *Zytologische Bewertung*

Die Keimreduktion und die Reduktion der Zellzahlen sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt. Beim Vergleich der Kokkenanzahl zwischen Verum und Plazebo vor und nach der Behandlung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Plazebo und Verum zu Beginn der Studie. In der Verumgruppe, nicht aber der Plazebogruppe, nahm die Anzahl der Kokken hochsignifikant ab (Dunn's Post Test, Gruppe A:  $p<0,001$ , Gruppe B:  $p>0,05$ ). Ebenso wurde für Stäbchen ( $p=0,0007$ ) und neutrophile Granulozyten ( $p<0,0001$ ) eine hochsignifikante Reduktion in Gruppe A erzielt, während die Reduktion in Gruppe B für Stäbchen ( $p>0,05$ ) und neutrophile Granulozyten ( $p>0,05$ ) nicht signifikant war. Die Reduktion der Hefen war in beiden Gruppen hochsignifikant (Gruppe A:  $p<0,0001$ ; Gruppe B:  $p<0,001$ ). Weder Keratinozyten noch Makrophagen zeigten signifikante Veränderungen. Bei Betrachtung der einzelnen klinischen Kategorien war in Gruppe A für die OE ceruminosa die Keimreduktion für Kokken ( $p<0,05$ ), Stäbchen ( $p<0,01$ ) und Hefen ( $p<0,01$ ) (hoch-) signifikant; für die OE erythematosa et ceruminosa war die Reduktion der Kokken hochsignifikant ( $p<0,001$ ), der Hefen signifikant ( $p<0,01$ ). Bei der OE purulenta war die Reduktion der Kokken und der neutrophilen Granulozyten signifikant (je  $p<0,01$ ). In Gruppe B konnte für die OE erythematosa eine signifikante Reduktion der Hefen und Neutrophilen (je  $p<0,01$ ), für die OE ceruminosa eine signifikante Reduktion der Neutrophilen ( $p<0,01$ ), für die OE erythematosa et ceruminosa eine signifikante Hefenreduktion ( $p<0,01$ ) und für die OE purulenta eine signifikante Reduktion von Kokken, Stäbchen und Hefen (je  $p<0,05$ ) sowie eine hochsignifikante Neutrophilenreduktion ( $p<0,001$ ) festgestellt werden. Bei der OE erythematosa musste eine Erhöhung der Mittelwerte für Stäbchen verzeichnet werden. Es waren in den klinischen Kategorien jeweils dieselben Ohren vor und nach Therapie verglichen worden. Die Probenstärke in den Kategorien OE erythematosa (Gruppe A), OE proliferativa und OE purulenta & proliferativa (beide Gruppen) war für eine statistische Auswertung mit weniger als fünf Ohren zu gering.

#### *Bakteriologische Untersuchung/Resistenzlage Marbofloxacin*

Die bakteriologische Untersuchung ergab insgesamt 111 Bakterienisolate. 54 Isolate waren Staphylococaceae, hauptsächlich *Staphylococcus* (*S.*) *pseudintermedius* (n=47), außerdem je einmal *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. capitis*, *S. saprophyticus* und *S. hämolyticus* sowie *S. aureus* zweimal. Zweithäufigste Isolate waren Pseudomonales (n=26), bestehend aus Pseudomonaceae mit *Pseudomonas* (*P.*) spp. (n=23) und Moraxellaceae mit *Acinetobacter* spp. (n=3). Es waren *P. aeruginosa* (n=12), *P. spp.* (n=11), davon *P. sp* sechs Mal, *P. fluorescens* und *P. putida* je zwei Mal und *P. stutzeri* ein Mal sowie *Acinetobacter baumannii* (n=2) und *Acinetobacter lwoffii* (n=1) vertreten. Es folgten Streptococaceae (n=10) mit  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken (n=10), davon *Streptococcus canis* (n=2), außerdem *Aerococcus viridans* (n=2) und Enterococaceae (n=6), hauptsächlich *Enterococcus faecium* (n=5) und *Enterococcus sp.* (n=1). *Arthrobacter arilaitensis* war ein Mal vertreten. Die Enterobacteriaceae (n=13) waren vor allem *Proteus mirabilis* (n=5) und *Pantoea agglomerans* (n=4), gefolgt von je einem Mal *Serratia marescens*, *Rahnella aquatilis*, *Leclercia sp.*, *Escherichia vulneris*.

Die Kontrolluntersuchung nach 14 Tagen ergab insgesamt 54 Bakterienisolate, 25 Isolate waren Staphylococaceae, davon 22 *S. pseudintermedius* und 3 *S. hämolyticus*. 9 Pseudomonales wurden isoliert, bestehend aus Pseudomonaceae mit *P. aeruginosa* (n=5) und Moraxellaceae mit *Acinetobacter sp* (n=1), *Acinetobacter radioresistens* (n=1) und *Acinetobacter baumannii* (n=2). Streptococaceae waren nur zweimal  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken. Enterococaceae waren *Enterococcus faecalis* (n=1) und *Arthrobacter spp.* (n=3); Microbacteriaceae *Microbacter sp.* (n=3). Die Enterobacteriaceae (n=11) waren *Pasteurella multocida* (n=3), *Pasteurella sp* (n=1), *Proteus mirabilis* (n=1), *Escherichia coli* (n=1), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=2), *Sphingomonas paucimobilis* (n=1), *Pantoea agglomerans* (n=2).

Es lag gegen Marbofloxacin in Gruppe A bei Erstuntersuchung von 51 Isolaten keine Resistenz vor. In der Kontrolluntersuchung war bei elf von 25 Isolaten eine Resistenz gegen Marbofloxacin bei *S. schleiferi* (n=2) und je einmal bei *P. aeruginosa*, *S. hämolyticus*, *Arthrobacter sp.*, *Enterococcus faecium*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Pasteurella multocida* und *Pasteurella sp.* sowie *Stenotrophomonas maltophila* vorhanden. Dabei war in der Erstuntersuchung *Proteus mirabilis* mit intermediärer Reaktion isoliert worden. Alle anderen

resistenten Keime wurden bei der Erstuntersuchung noch nicht nachgewiesen. Die Zunahme einzelner Marbofloxacin-resistenter Isolate ist nicht signifikant, deren Gesamtzunahme mit  $p=0,0025$  (Fisher's Exact Test) ist signifikant.

In Gruppe B wurden bei der Erstuntersuchung 60 Keime isoliert. Davon war je zweimal *S. pseudintermedius* und *Acinetobacter baumannii* und einmal *P. aeruginosa* gegen Marbofloxacin resistent. In der Kontrolluntersuchung war bei neun von 29 isolierten Keimen eine Resistenz gegen Marbofloxacin bei *S. pseudintermedius* ( $n=7$ ) und *P. aeruginosa* ( $n=2$ ) festzustellen. Dabei waren die in der Erstuntersuchung resistenten zwei Isolate *S. pseudintermedius* auch weiterhin resistent, die anderen fünf *S. pseudintermedius*-Isolate waren bei der Erstuntersuchung sensibel. Weder die Zunahme einzelner Marbofloxacin-resistenter Keime noch deren Gesamtzunahme ist signifikant.

Insgesamt sank die Sensibilität für Marbofloxacin von über 90 Prozent vor der Intervention in beiden Gruppen auf 56 Prozent in Gruppe A und 70 Prozent in Gruppe B nach der Intervention.

In Gruppe A waren unter den neun Ohren mit insgesamt elf Marbofloxacin-resistenten Keimen fünf Ohren Therapieversager, dabei ein Ohr mit Marbofloxacin-resistentem *Pseudomonas aeruginosa* und ein Ohr mit Marbofloxacin-resistenten *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli*. In Gruppe B waren dies vier von neun Ohren, dabei beide Ohren mit Marbofloxacin-resistenten *Pseudomonas aeruginosa*. In Tabelle 4 sind die gegen Marbofloxacin resistenten Isolate aufgeführt.

### *Nebenwirkungen*

Als unerwünschte Nebenwirkung musste bei 5 Hunden ( $n=10$  Ohren) eine geringgradige Rötung und Schwellung des äußeren Gehörganges in Verbindung mit Juckreiz nach einigen Tagen der Applikation festgehalten werden. Dies entspricht 9,6 Prozent. Zwei Hunde gehörten zur Gruppe A, drei Hunde zur Gruppe B.

### **Diskussion**

In dieser Studie wurde die *in-vivo* Wirksamkeit eines Chlorhexidin- und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreinigers in Kombination mit einer Mischung aus



Marbofloxacin/ Dexamethason/Clotrimazol für die Behandlung von mit Bakterien oder Hefen infizierter Otitis externa bewertet. Chlorhexidin wirkt konzentrations- und pH-abhängig bakterizid, fungizid und antiviral durch initiale Zellwandschädigung und Koagulation des Zytoplasmas und anschließendem Zelltod (21). Es wirkt besonders gegen Gram-positive Kokken. Der Chelatbildner Tris-EDTA ist durch den erhöhten Anteil für die Zellwandintegrität essentieller Peptidoglycane und Lipopolysaccharide bei Gram-negativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* zusätzlich gegen Gram-negative Keime wirksam (12, 42, 43). Tris-EDTA wäscht diese Lipide/Lipopolysaccharide aus der Zellwand und erleichtert so die Permeabilität für Antibiotika (9, 39). Tris optimiert den pH-Wert, was den antibakteriellen Effekt maximiert (9, 28). Es verstärkt den Effekt gleichzeitig angewandter Fluorochinolone, wobei ein Synergismus der mikrobiellen DNA-Gyrase-Hemmung und Bindung bivalenter Ionen wie Magnesium<sup>2+</sup> oder Calcium<sup>2+</sup> durch Tris-EDTA besteht (7, 11, 22, 39, 41). *In-vitro* wurden die minimalen Hemmkonzentrationen für Fluorochinolone und Aminoglycoside deutlich gesenkt (7). Die Kombination mit Chlorhexidin steigerte die *in-vitro* Effektivität (17). Der Prüfbericht eines Labors ergab für Epibac<sup>®</sup> die größte *in-vitro*-Breitenwirkung von sechs Dermatika. Getestet wurden chlorhexidinhaltiges Shampoo 1%ig und 4 %ig, ein Chlorhexidin und Salicylsäure enthaltender Ohrreiniger, sowie Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltendes Spray, Gel und Ohrreiniger (Epibac<sup>®</sup>). Alle Chlorhexidin-TrisEDTA-Kombinationen waren überlegen in der erzielten Hemmwirkung gegen Gram-negative Stäbchen und zeigten gegen alle Prüfkeime Hemmwirkungen. Gegen Hefen und Gram-positive Kokken bewirkte 4 %iges Chlorhexidin größere Hemmhöfe, nicht aber gegen Gram-negative Stäbchen (19). Chelatbildner eignen sich zur Behandlung äußerer Wundinfektionen (31). Chlorhexidin interferiert bei täglicher lokaler Applikation trotz *in-vitro* Zytotoxizität nicht mit der Wundheilung (33, 37). Chlorhexidinacetat (0,2%ig) provozierte beim Hund selbst nach Myringotomie und Instillation in die Bulla tympanica keine Innenohrschädigung (26). Vergleichbare Ergebnisse brachte Tris-EDTA (1,21 g/l) (26). Wegen möglicher Ototoxizität sollte nach Gortel dennoch eine Instillation von Chlorhexidin bei rupturiertem Trommelfell unterbleiben (10). Dieser Aspekt wird jedoch kontrovers diskutiert (18).

Alle Hunde dieser Studie erhielten ein lokales Antibiotikum, teils in Kombination mit Chlorhexidin/Tris EDTA, teils in Kombination mit einem Plazebo. Dies erschwert aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns einen Vergleich mit *in-vitro* wie *in-vivo* Studien.

In einer *in-vitro* Wirksamkeitsstudie wurde eine gute Wirksamkeit gegen *Staphylococcus (pseud-)intermedius* und (in höherer Verdünnung) *Pseudomonas aeruginosa* für einen Tris-EDTA und Chlorhexidingluconat (0,15%ig) enthaltenden Ohrreiniger (Tris Plus<sup>®</sup>, Dermapet) festgestellt (36). Die Wirksamkeit gegen Kokken, Stäbchen und Hefen konnte in vorliegender Studie bestätigt werden, die bessere Wirksamkeit gegen Stäbchen (*Pseudomonas aeruginosa*) nicht. Möglicherweise ist hier die Komplikation purulentes Sekret, welches *in-vivo* mit der antimikrobiellen Aktivität von Chlorhexidin interferieren kann (24). In einer weiteren *in-vitro* Studie zeigte sich analog zur vorliegenden Studie eine bessere Wirksamkeit gegen *Staphylococcus* spp. als gegen *Pseudomonas aeruginosa* und andere Gram-negative Keime, außerdem eine vollständige Hemmwirkung bei Hefen (14).

In einer *in-vivo* Studie von Otitiden mit resistenten Keimen erreichten Ghibaudo et al. mit einmal täglicher Applikation, teils mit Enrofloxacin, klinische Remission und negative Bakterienkulturen bei 10/11 Hunden (8). Die in einer weiteren Fallserie festgestellte Wirkung eines Tris-EDTA und 0,15%iges Chlorhexidin enthaltenden Ohrreinigers als alleinige Therapie der caninen OE gegen Kokken und Hefen (35) stimmt mit den zytologisch verifizierbaren Keimreduktionen dieser Studie überein. Im Gegensatz zu der mangelnden *in-vivo* Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa* (n=1) war der Ohrreiniger in vorliegender Studie auch gegen Stäbchen wirksam. Für die *in-vivo* Wirksamkeit bezüglich einer hochsignifikanten Reduktion von Stäbchen und Kokken sind weitere Faktoren als die alleinige *in-vitro* Wirksamkeit relevant. Aus tierschutzrelevanten Gründen wurden in vorliegender Studie alle Patienten zusätzlich mit einem zugelassenen Medikament behandelt, was zur Keimreduktion beigetragen hat. Nach zusätzlicher Behandlung mit dem Ohrreiniger wurde zytologisch eine signifikante Keimreduktion festgestellt, die bei Behandlung mit Plazebo nicht vorhanden war und die für die Wirksamkeit der Chlorhexidin/Tris-EDTA Kombination spricht. Besonders die Keimreduktion bei der OE ceruminosa und OE erythematosa et ceruminosa konnte mit

Chlorhexidin/TrisEDTA positiv beeinflusst werden, während bei der OE erythematosa sogar eine Erhöhung der Besiedelung mit Stäbchen nach Plazebo vorhanden war. Bei der OE purulenta war auch in der Plazebo-Gruppe eine Keimreduktion zu erkennen. Eventuell war der Spüleffekt vorteilhaft. Über die *in-vivo* Wirksamkeit des Ohrreinigers gegen Hefen ist keine eindeutige Aussage möglich, da das zusätzlich verabreichte Präparat Clotrimazol als hochwirksames Agens gegen Hefen enthielt und deshalb auch in der Plazebogruppe eine signifikante Verringerung der Hefeanzahl festzustellen war. Der Abschluss einer antimikrobiellen Otitis-Therapie kann nicht nach klinischen Kriterien alleine erfolgen, sondern die Keimreduktion muss zytologisch erfasst werden.

Mit weniger als 40 Prozent in Verum- und Placebo-Gruppe ist der Anteil kompletter klinischer Remission der Otitis externa nach zweiwöchiger Behandlung gering. In einer Studie an 19 Ohren wurde ein klinischer Erfolg bei etwa 70 Prozent der Hunde nach 11 beziehungsweise 18 Tagen Therapie ausschließlich mit einem Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreiniger erreicht (35). Eine alleinige Therapie mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol (Aurizon<sup>®</sup>, Vetoquinol, Ravensburg, D) lässt eine klinische Remission oder deutliche klinische Besserung bei 90 Prozent der Hunde erwarten. Es handelte sich dabei um akute (<14 Tage) oder subakute (15 - 30 Tage) Otitiden; exklusive chronische Otitiden (31). Die Kombination eines Ohrreinigers mit einem Lokaltherapeutikum hat eine deutlichere Verbesserung der klinischen Situation und einen Unterschied zum Plazebo erwarten lassen. Die Primärursache der Otitis externa muss gerade bei chronisch-rezidivierenden Otitiden diagnostiziert und behandelt werden. Diese diagnostische Aufarbeitung war meist nach zwei Wochen noch nicht abgeschlossen oder die Therapie war noch nicht effektiv. Allergien sind häufig Ursache chronischer Otitiden (34) und begründen die oft nach Therapie noch bestehende Otitis erythematosa. Zu beachten ist ferner, dass der Therapieerfolg als vollständige Elimination aller klinischen und otoskopisch erkennbaren Symptome definiert wurde, während in einer anderen Studie die Reduktion der klinischen Scores auf weniger als 50 Prozent ausreichte (35). Die Quote und Verteilung der Therapieversager ist in beiden Gruppen vergleichbar. Die alleinige klinische Beurteilung des Therapieerfolges spiegelte den Unterschied in der Reduktion der Mikroorganismen nicht wieder.

Topische Antiseptika werden bei Hautinfektionen zur Minderung einer Selektion auf bakterielle Resistenzen empfohlen (15). Wechselseitige Übertragung resistenter Keime oder einzelner Resistenzgene zwischen Haustieren und Menschen ist möglich (13). Resistenzen gegen Antiseptika sind selten (39). In vorliegender Studie wurde allerdings nur in der Verum-Gruppe eine signifikante Zunahme Marbofloxacin-resistenter Keime gefunden ( $p=0,0025$ , Fisher's Exact Test). Meist handelt es sich jedoch um Kontaminationsflora. Lediglich *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli* (je  $n=1$ ) sind als Problemkeime häufiger perpetuierende Faktoren der OE. Staphylococcaceae waren lediglich *S. schleiferi* ( $n=2$ ) und *S. hämolyticus* ( $n=1$ ). In der Plazebogruppe hatten zwei vorher sensible Keime vermutlich Resistenzen entwickelt. Alle Marbofloxacin-resistenten Keime sind *P. aeruginosa* ( $n=2$ ) oder *St. pseudintermedius* ( $n=7$ ), Keime die häufig perpetuierende Faktoren darstellen. Die eindeutige Identifizierung mittels Genotypisierung wurde allerdings nicht durchgeführt. Ein die Resistenzentwicklung positiv beeinflussender Effekt einer Chlorhexidin-Tris-EDTA Kombination mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol wurde nicht festgestellt. In jeder Gruppe war ein Ohr mit späterer Resistenz mit Marbofloxacin vorbehandelt worden. Eventuelle Vorbehandlungen beeinflussten das Ergebnis nicht. Eine aussagekräftige Probenstärke Marbofloxacin-resistenter Isolate ist in klinischen Studien selten zu erreichen. Die Resistenzlage für dieses Fluorochinolon ist mit einer Sensibilität von über 90 Prozent noch sehr gut. Außerdem muss bedacht werden, dass die breakpoints in vorliegender Studie mit 0,5 und 1 µg/ml unter dem im Vetoquinol-Resistenz-Monitoring-Programm angewandten breakpoint von 2 µg/ml liegen (31). Eventuell ist durch den Verdünnungseffekt eines Präparates zur Gehörgangreinigung der Wirkstoffspiegel von Marbofloxacin gesenkt worden, dies bezieht sich aber analog auf beide Gruppen. Eine nur mit Lokaltherapeutikum ohne vorbereitenden Ohrreiniger/Plazebo behandelte Gruppe war im Studiendesign jedoch nicht vorgesehen. Der lokal erreichte Wirkstoffspiegel vom Marbofloxacin (3mg/ml in Aurizon®) liegt weit über dem systemisch erreichbaren Wirkstoffspiegel ( $C_{max}$ : 1,3 mg/l)(23). So wurde der Verdünnungseffekt hier als vernachlässigbar erachtet, eine entsprechende Kontrolle des tatsächlichen Wirkstoffspiegels von Marbofloxacin zehn Minuten nach Anwendung eines Ohrreinigers im äußeren Gehörgang unterblieb allerdings.

Die Compliance der Besitzer in dieser klinischen Studie ist ein Unsicherheitsfaktor, allerdings analog in der Plazebo-Gruppe und sollte das Ergebnis nicht beeinflusst haben. Bei unruhigen, wehrigen Tieren kann eventuell nicht ausreichend Reiniger/Medikament verabreicht worden sein.

Da die mit dem Ohrreiniger/Plazebo in Verbindung gebrachten Nebenwirkungen Rötung, Schwellung und Juckreiz in beiden Gruppen auftraten, wird keine Kausalität von Chlorhexidin oder Tris-EDTA vermutet und deren Verträglichkeit als gut angesehen. Aurizon® provoziert in vier Prozent lokale Reaktionen, auch Propylenglycol kann lokal irritieren (31, 40).

Zusammenfassend kann bei der caninen Otitis externa infectiosa mit intaktem Trommelfell ein Ohrreiniger mit Chlorhexidin und Tris-EDTA (Epibac®) als zusätzliche Behandlung zu klassischen Ohrenmedikamenten empfohlen werden. Lokale Unverträglichkeitsreaktionen können auftreten. Die erfolgreiche Behandlung der mikrobiellen Besiedelung als perpetuierender Faktor muss neben klinischer Untersuchung auch zytologisch verifiziert werden. Mögliche Resistenzentwicklung relativiert die Vorteile der Keimreduktion, allerdings dient der Effekt der Keimreduktion auch der Rezidivprophylaxe.

### **Interessenkonflikte**

Diese Studie wurde von Alfavet gesponsort. Das Studiendesign, die Durchführung und Auswertung der Daten erfolgte ohne Einflussnahme des Sponsors. Weiterhin hat Ralf Mueller in den letzten fünf Jahren durch Bayer Animal Health, Boehringer Ingelheim, Dechra Veterinary Products, Intervet, Merial, Novartis Animal Health, Pfizer Animal Health, Procter & Gamble, Royal Canin, Selectavet, und Virbac unterstützte Vorträge, Studien und Beratungen durchgeführt. Wolfgang Osthold hat in den letzten fünf Jahren von Essex Tierarznei und Alfavet unterstützte Vorträge durchgeführt. Cosima Bouassiba hat keine unterstützten Vorträge oder Studien durchgeführt.

## Tabellen

**Tabelle 1:** Resultate der klinischen Bewertung (Anzahl Ohren) vor und nach zweiwöchiger Therapie mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol in Verbindung mit einem Chlorhexidin/TrisEDTA enthaltenden Ohrreiniger oder Plazebo (grau unterlegt)

**Table 1:** Results of clinical classification (number of ears) baseline and at day 14 after treatment with marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole in combination with an ear cleanser containing chlorhexidine/trisEDTA or placebo (grayed)

Anzahl Ohren Art der Otitis	Gesamt- Ohren	Verum vor Therapie	Plazebo vor Therapie	Verum nach Therapie	Plazebo nach Therapie	Verum Therapie- versager	Plazebo Therapie- versager
OE erythematos	17	5	12	20	18	2	3
OE ceruminosa	26	16	10	3	15	2	6
OE erythematos et ceruminosa	25	11	14	0	0	0	0
OE purulenta	29	9	20	4	2	3	2
OE proliferativa	0	0	0	0	1	0	0
OE purulenta et proliferativa	7	5	2	1	1	1	1

Kapitel III: *in-vivo* Wirksamkeit eines Chlorhexidin und TrisEDTA enthaltenden Ohrreinigers-  
eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie

Klinische Remission				18	21		
Gesamtzahl der Ohren	104	46	58	46	58	8	12

**Tabelle 2:** Gezählte Mikroorganismen und neutrophile Granulozyten/Gesichtsfeld (x1000 Ölimmersion) vor und nach zweiwöchiger Therapie mit Marbofloxacin/Dexamethason/ Clotrimazol in Kombination mit einem Chlorhexidin/TrisEDTA enthaltenden Ohrreiniger oder Plazebo (grau unterlegt)

**Table 2:** counted microorganism and neutrophils/HPF (high power field; x 1000, oilimmersion) baseline and at day 14 after treatment with marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole in combination with an ear cleanser containing chlorhexidine/trisEDTA or placebo (grayed)

Mittelwert	Vor Chlorhexidin/Tris-EDTA	Nach Chlorhexidin/Tris-EDTA	Vor Plazebo	Nach Plazebo
Kokken	52,6	4,3	51,1	14,1
Stäbchen	153,3	8,5	122,6	22,9
Hefen	55,7	3,5	47,7	6,6
Neutrophile Granulozyten	2,6	0,8	4,7	1,8

**Tabelle 3:** Mittelwerte gezählter Mikroorganismen und neutrophiler Granulozyten (x1000 Ölimmersion) in Relation zur Klinik der OE vor und nach zweiwöchiger Therapie mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol in Kombination mit einem Chlorhexidin/TrisEDTA enthaltenden Ohrreiniger oder Plazebo (grau unterlegt); bei OE erythematos, OE proliferativa und OE purulenta et proliferativa war die Probenstärke zu gering; Signifikanz der Reduktion: \*=signifikant (p<0,05), \*\*=signifikant (p<0,01), \*\*\*=hochsignifikant (p<0,001)

**Table 3:** means of counted microorganisms and neutrophils/HPF (high power field; x 1000, oilimmersion) in relation to clinical signs baseline and at day 14 after treatment with marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole in combination with an ear cleanser containing chlorhexidine/trisEDTA or placebo (grayed); significance of reduction: \*=significantly (p<0,05), \*\*=significantly (p<0,01), \*\*\*=high-significantly (p<0,001)

Mittelwerte Klinik der Otitis	Verum Kokken	Plazebo Kokken	Verum Stäbchen	Plazebo Stäbchen	Verum Hefen	Plazebo Hefen	Verum Neutrophile	Plazebo Neutrophile
OE erythematos								
Vor Therapie		2,68		1,45		33,06		0,72
Nach Therapie		3,16		30,8		0,69		0
Signifikanz		--		--		**		**
OE ceruminosa								
Vor Therapie	101,2	55,26	63,49	82,07	58,01	70,43	1,72	1,16
Nach Therapie	1,49	31,58	0,08	0,47	4,94	1,14	0,16	0,04
Signifikanz	*	--	**	--	***	--	--	**



Kapitel III: *in-vivo* Wirksamkeit eines Chlorhexidin und TrisEDTA enthaltenden Ohrreinigers-  
eine randomisierte, plazebokontrollierte Doppelblindstudie

OE erythematosa et ceruminosa								
Vor Therapie	35,77	8,86	4,67	1,0	12,07	46,21	0,63	2,38
NachTherapie	1,19	2,91	0,35	0,15	3,72	2,73	0	1,35
Signifikanz	***	--	--	--	**	**	--	--
OE purulenta								
Vor Therapie	17,64	85,59	142,8	205,9	24,96	37,65	7,53	8,9
NachTherapie	1,86	8,83	5,94	5,32	1,42	12,07	0,42	1,8
Signifikanz	**	*	--	*	--	*	**	***

**Tabelle 4:** Gegen Marbofloxacin resistente Isolate vor und nach Therapie für Verum: Chlorhexidin/TrisEDTA oder Plazebo (grau unterlegt); *P.=Pseudomonas*, *S.=Staphylococcus*

**Table 4:** Bacteria resistant against marbofloxacin baseline and after 14 days treatment for verum: chlorhexidine/trisEDTA or placebo (grayed); *P.=Pseudomonas*, *S.=Staphylococcus*

	Verum	Plazebo
Gesamtzahl Isolate vor Therapie	51	60
Resistente Isolate vor Therapie	--	- <i>S. pseudintermedius</i> (n=2) - <i>P. aeruginosa</i> (n=1) - <i>Acinetobacter baumannii</i> (n=2)
Anzahl resistenter Isolate vor Therapie	--	5
Gesamtzahl Isolate nach Therapie	25	29
Resistente Isolate nach Therapie	- <i>P. aeruginosa</i> (n=1) - <i>S. schleiferi</i> (n=2) - <i>S. hämolyticus</i> (n=1) - <i>Proteus mirabilis</i> (n=1) - <i>Escherichia coli</i> (n=1) - <i>Arthrobacter sp.</i> (n=1) - <i>Enterococcus faecium</i> (n=1) - <i>Pasteurella multocida</i> (n=1) - <i>Pasteurella sp.</i> (n=1) - <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (n=1)	- <i>S. pseudintermedius</i> (n=7) - <i>P. aeruginosa</i> (n=2)
Anzahl resistenter Isolate nach Therapie	11	9

## **Literaturverzeichnis**

1. Angus JC. Otic cytology in health and disease. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2004; 34(2): 411-24
2. Angus JC, Campbell KL. Uses and indications for video-otoscopy in small animal practice. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2001; 31(4): 809-27
3. Aoki-Komori S, Shimada K, Tani K, Katayama M, Saito TR, Kataoka Y. Microbial Flora in the ears of healthy experimental beagles. Exp Animal 2007; 56(1): 67-9
4. August JR. Otitis externa: A disease of multifactorial etiology, Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18(4): 731-42
5. Chickering WR. Cytologic evaluation of otic exudate. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18(4): 773-82
6. Cole LK. Anatomy and physiology of the canine ear, Vet Derm 2010; 20: 412-421
7. Farca AM, Piromalli G, Maffei GR. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. J Small Anim Pract 1997; 38: 243-5
8. Ghibaudo G, Cornegliani L, Martino P. Evaluation of the in vivo effects of Tris-EDTA and chlorhexidine digluconate 0,15% solution in chronic bacterial otitis externa: 11 cases. Vet Derm 2004; 15 (Suppl1): 65 (Abstract)
9. Goldschmidt MC, Wyss O. The role of Tris in EDTA Toxicity and Lysozyme Lysis. J Gen Microbio 1967; 47: 421-31
10. Gortel K. Otic flushing. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2004; 34(2): 557-65
11. Gray GW, Wilkinson SG. The effect of ethylenediaminetetra-acetic acid on the cell walls of some gram-negative bacteria. J Gen Microbio 1965; 39: 385-99 (abstract)

12. Greene CE. Infectious diseases in the dog and cat. Saunders Elsevier 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis, Missouri, USA; 2006; 274–301
13. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 321-32
14. Guardabassi L, Ghibaud G, Damborg P. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. Vet Derm 2009; 1-5
15. Guardabassi L, Houser GA, Frank LA et al. Guidelines for antimicrobial use in small animals. In: Guardabassi L., Jensen LB., Hilde K., Hrsg. Guide to antimicrobial use in animals. Oxford: Blackwell Publishing 2008; 183-206
16. Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa, Canadian Vet J 2006; 47(3); 253-5
17. Harper WES, Epis JA. Effect of chlorhexidine/ETA/Tris against bacterial isolates from clinical specimens. Microbios. 1987; 51; 107-12
18. Harvey RG, Harrari J, Delauche A. Ohrkrankheiten bei Hund und Katze. Manson Publishing. 2003
19. Heusinger A. Prüfbericht „Keimhemmung durch Präparate der Firma Alfavet“, LABOKLIN, Bad Kissingen, Germany 2007
20. Kowalski JJ. The microbial environment of ear canal in health and disease. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18(4); 743-54
21. Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. FEMS Microbiol Letters 1992; 79(1-3): 211-5
22. Lambert RJW, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on Pseudomonas aeruginosa. J Appl Microbio 2004; 96(2): 244-53

23. Lefebvre HP, Schneider M, Dupouy V, Laroute V, Costes G, Delesalle L, Toutain PL. Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. J Vet Pharmacol Ther. 1998 Dec; 21(6):453-61
24. McDonnell G, Russell D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance, Clin Micro Rev 1999; 12; 147-79
25. McKeever PJ, Torres AM. ear disease and its management, Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1997, 27(6); 1523-36
26. Merchant SR, Neer M, Tedford BL, Twedt AC, Cheramie PM, Strain GM. Ototoxicity Assessment of a chlorhexidine otic preparation in dogs. Progress in Vet Neuro 1993; 4(3): 72-5
27. Mills PC, Ahlstrom WJ. Ototoxicity and tolerance assessment of a TrisEDTA and polymethylene biguanide ear flush formulation in dogs. J Vet Pharm Ther 2005; 28(4): 391-7
28. Morris DO. Medical therapy of otitis externa and otitis media. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 2004; 34: 541-5
29. Nuttall T, Cole LK. Ear cleaning; the UK and US perspective. Vet Derm 2004; 15: 127-36
30. Oliveira LC, Leite CAL, Brilhante RSN, Carvalho CBM. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. Canadian Vet J 2008; 49: 785-8
31. Pankow WR, Bolkart B. Zur Wirksamkeit von AURIZON® bei akuter und chronischer Otitis externa (Hund) unter besonderer Berücksichtigung der antimikrobiellen Aktivität von Marbofloxacin. Vetoquinol GmbH, Chassot GmbH, 88212 Ravensburg, Manuskript „AURIZON® 2004“
32. Qiu D, Huang Z, Zhou T, Shen C, Hider R. In vitro inhibition of bacterial growth by iron chelators. FEMS Microbiol Letters 2011; 314: 107-111

33. Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Henderson RA, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. Vet Surg 1988; 17(6): 291-5 (abstract)
34. Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Vet Derm 2007 ESVD and ACVD Abstracts; 18: 341-7
35. Swanton A-K, Cikota R, Guardabassi L. Tris-EDTA and 0,15%iges Chlorhexidin als alleinige Behandlung der Otitis externa beim Hund, icfBulletin Results, 2009, [www.icfpet.com](http://www.icfpet.com)
36. Swinney A, Fazakerley J, McEwan N, Nuttall T. Comparative in vitro antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. Vet Derm 2008; 19: 373-9
37. Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative Study of Antiseptic Toxicity on Basal Keratinocytes, Transformed Human Keratinocytes and Fibroblasts, Skin Pharmacology; 1990; 3(3); 157-63
38. Trott DJ, Moss SM, See AM. Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of Pseudomonas aeruginosa isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. Australian Vet J 2007; 85: 464-6 (Abstract)
39. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbio Mol Biol Rev. 1992; 56(3): 395.411 (abstract)
40. Wilcke JR. Otopharmacology. Vet Clin North Am: Small Anim Pract 1988; 18(4): 783-98
41. Wooley RE, Jones MS. Action of EDTA-Tris and antimicrobial agent combinations on selected pathogenic bacteria. Vet Microbio1983; 8(3): 271-80
42. Wooley RE, Jones MS, Gilbert JP, Shotts EB. In vitro action of combinations of antimicrobial agents and EDTA- tromethamine on Pseudomonas aeruginosa. Am J Vet Res 1983b; 44(8): 1521-4

43. Wooley, R.E., Jones, M.S., Gilbert, J.P., Shotts, E.B. In vitro effect of combinations of antimicrobial agents and EDTA-tromethamine on certain gram-positive bacteria. Am J Vet Res 1983c; 44(11): 2167-9
44. Yoshida N, Naito F, Fukata T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. J Vet Med Sci 2002; 64(12): 1145-7

## V Diskussion

Ziele der Studie waren:

- I vier zytologische Schnellfärbeverfahren für Ohrabstriche zu vergleichen,
- II die Resistenzlage der an der caninen *Otitis externa* beteiligten Bakterien festzustellen,
- III die *in-vivo*-Wirksamkeit eines Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreinigers in Kombination mit einer Mischung aus Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol für die Behandlung von bakteriell und/oder mykotisch infizierter *Otitis externa* zu untersuchen.

Die canine *Otitis externa* ist ein häufiger Vorstellungsgrund in der tierärztlichen Praxis, die Prävalenz liegt bei bis zu 20 Prozent (AUGUST, 1988). Neben allgemeiner klinischer und dermatologischer Untersuchung ist immer eine zytologische Untersuchung eines Ohrabstriches indiziert (CHICKERING, 1988). Die Färbung erfolgt routinemäßig mit einem differenzierend färbenden System wie Diff-Quik® oder Gramfärbung (ANGUS, 2004; GRIFFIN, 2009a). In der ersten der hier vorgelegten Studien waren Diff-Quik®, Diff-Quik® mit vorheriger Acetonbehandlung und Gramfärbung alle gleichermaßen geeignet, Mikroorganismen zu identifizieren, das Otitis Schnellfärbeset (Alfabet) war diesen Färbeverfahren unterlegen. Von den drei erstgenannten war die Diff-Quik® Färbung am schnellsten und unkompliziertesten durchzuführen.

Für die Diagnostik der bakteriell und/oder mykotisch kontaminierten oder infizierten *Otitis externa* ist daher nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie Diff-Quik® am besten geeignet. Ein Vorabtauchen in Aceton ist nicht nötig. Die Gram-Schnellfärbung ist zwar geeignet, aber zu zeitintensiv für die tägliche Praxis. Das Otitis Schnellfärbeset lässt signifikant weniger Mikroorganismen erkennen.

Die Resistenzlage der an der caninen *Otitis externa* beteiligten Bakterien (vorwiegend Staphylokokken und Pseudomonaden) ist für die in zugelassenen Lokaltherapeutika enthaltenen Wirkstoffe Gentamicin, die Fluorochinolone Enrofloxacin und Marbofloxacin und Polymixin B (bei Stäbchen) gut. Außerdem sind bei Kokken Amoxicillin/Clavulansäure, Cefalexin und Sulfonamid/Trimethoprim effektiv. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stimmen mit denen des Resistenzmonitorings (BftGermVet/GERMAP 2008) überein.



Die konservative Therapie der *Otitis externa* beginnt vor einer antibakteriellen, antiphlogistischen oder antimykotischen Therapie mit einer im Idealfall schon keimreduzierenden Gehörgangreinigung. Nach Anwendung eines Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreinigers war in der vorliegenden Studie im Gegensatz zum Plazebo (beide in Kombination mit einer Mischung aus Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol) eine signifikante Reduktion der Gesamtzahl von Bakterien und Leukozyten festzustellen. Allerdings war auch eine signifikante Zunahme marbofloxacin-resistenter Kontaminationsflora vorhanden.

## **1. Vergleich von vier zytologischen Färbeverfahren für Ohrabstriche beim Hund**

Die Zytologie des Cerumens bietet die beste Diagnostik zur Identifikation von Mikroorganismen. Zahl und Morphologie von Bakterien und Hefen, Zahl und Typ eventuell vorhandener Entzündungszellen, die Präsenz von Korneozyten/Keratinocyten sowie eventuell vorhandene neoplastische Zellen werden erfasst (COLE, 2008). Im gesunden Gehörgang sind Kokken und Hefen regelmäßig in geringer Zahl zu finden, Stäbchen und Entzündungszellen jedoch in der Regel nicht (TATER et al., 2003; SARIDOMICHELAKIS, 2008; COLE, 2008; GRIFFIN, 2009). Weniger als drei Hefen, fünf Kokken und maximal ein Stäbchen pro Gesichtsfeld (Ölimmersion, x1000) gelten als Normalbefund (BEALE, 2007b; GRIFFIN, 2009a). Keratinozyten und Korneozyten finden sich teils aneinandergelagert als Klumpen auch im gesunden Gehörgang (TATER et al., 2003) ohne signifikanten Unterschied zu deren Zahl bei *Otitis externa* (COLE, 2008). Jeder Vermutung neoplastischer Zellen sollte eine Biopsie folgen (SARIDOMICHELAKIS, 2008). Wichtige Informationen über den Typ der *Otitis externa* und perpetuierende Faktoren sind mit der Zytologie schnell verfügbar (MENDELSON et al. 2006). Diff-Quik<sup>®</sup> mit und ohne Vorbehandlung in Aceton und das Gram-color Färbeset<sup>®</sup> erweisen sich als adäquate Schnelfärbesysteme für die Zytologie caniner Ohrtupferpräparate im Gegensatz zu dem Otitis Schnelfärbeset. Die Mittelwerte von Bakterien, Hefen und Keratinozyten sind signifikant niedriger als bei den anderen drei Färbeverfahren. Die Färbequalität ist auch nach Nachfärben mangelhaft. Die Stärke dieses

Färbesystems liegt in der Färbung von Entzündungszellen, wichtig für die Klassifizierung in die *Otitis externa purulenta*.

Gängige Schnelfärbesysteme für Blutausstriche haben sich etabliert, der Praktiker kennt die Färbeeigenschaften (ANGUS, 2004; MISCHKE, 2005). Auch für die Beurteilung zytologischer Hautproben werden verschiedene Färbeverfahren empfohlen. Die meisten Spezialisten bedienen sich der modifizierten Wright's Färbung (Diff-Quik®), welche einfach, schnell und anwenderfreundlich ist. Diese Färbung ist konzipiert für Blutausstriche, ist aber auch für zytologische Untersuchungen anderer Gewebe geeignet (LONG et al., 2002). Leukozyten sind dem Praktiker vertraut, Bakterien und Hefen erscheinen blau-violett. Bakterien lassen sich nur anhand der Morphologie (Kokken/Stäbchen) und am besten mit Ölimmersion (x1000) differenzieren (GRIFFIN, 2009a). Weiterhin wird Neumethylenblau empfohlen, wobei zytoplasmatische Strukturen und Mikroorganismen mit Diff-Quik® besser differenziert werden (ROSYCHUK, 1994; GRIFFIN, 2009a). TOMA und Mitarbeiter (2006) schlagen den alleinigen Gebrauch der blauen Gegenfärbung einer Schnelfärbung vom Romanowsky-Typ vor. In dieser Studie wurden hitzefixierte und nicht-hitzefixierte Präparate sowie die Färbung vom Romanowsky-Typ mit einer alleinigen blauen Gegenfärbung (Thiazine) verglichen (TOMA et al., 2006). Die Evaluierung von Keratinozyten, Hefen, Bakterien und Entzündungszellen zur Differenzierung perpetuierender Faktoren benötigt keine laborintensiven Färbungen wie May-Grünwald-Giemsa, es können Schnelfärbungen wie Diff-Quik® oder Hemacolor® angewendet werden (CHICKERING, 1988; MENDELSON et al., 2006). Die zytologische Untersuchung ist auf eine erhöhte Anzahl an Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, selten eosinophile Granulozyten) und Mikroorganismen (Kokken, Stäbchen, Hefen) fokussiert. Sind Kokken und Hefen vermehrt, dann häufig so deutlich (GINEL et al., 2002), dass Grenzwerte von untergeordneter Bedeutung sind (SARIDOMICHELAKIS, 2008). Nur die Gramfärbung ist zur Differenzierung gram-positiver von gram-negativen Keimen geeignet. Da jedoch in der Regel bei Ohrabstrichen Kokken gram-positiv und Stäbchen gram-negativ wie *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. oder Coliforme (ANGUS, 2004) sind, reicht die Erkennung der Morphologie, um eventuell weiterführende Diagnostik einzuleiten (ANGUS, 2004). Auch in der vorliegenden Studie waren *Staphylococcus* spp. und *Pseudomonas* spp. die häufigsten Isolate.

Die zeitintensive Gramfärbung ist für die Routinediagnostik nicht zwingend erforderlich (MENDELSON et al., 2006). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt, sowohl durch die mikrobiologische Untersuchung, bei der lediglich einmal ein gram-positives Stäbchen, *Bifidobacterium asteroides*, isoliert wurde als auch durch die hohe Übereinstimmung dieser Färbeverfahren untereinander. Allerdings benötigt die Untersuchung gramgefärbter Präparate etwas Übung, da blau erscheinende Melaningranula der Keratinozyten mit ebenfalls blau gefärbten kleinen Kokken verwechselt werden könnten. Der hohe Fettgehalt bedingt die generell schlechte Farbaufnahme des Cerumens. Der Abstrich normalen Cerumens erscheint nahezu farblos. Mikroorganismen und Zellen nehmen Farbe an. Artefakte wie Melaningranula und Färbeprecipitate, welche mit Bakterien verwechselt werden können, werden mittels Fokussieren erkannt (ANGUS, 2004; COLE, 2008). Es besteht keine Korrelation zwischen der makroskopischen Erscheinung des Cerumens und spezifischen Mikroorganismen (COLE, 2008).

OSTHOLD und Mitarbeiter (2005) empfehlen die Gram-Schnellfärbung bei bakterieller Beteiligung (OSTHOLD et al, 2005). In vorliegender Studie war der Mittelwert der nachgewiesenen Stäbchen bei semiquantitativer Beurteilung bei Diff-Quik<sup>®</sup> maximal, von einer Gram-Schnellfärbung kann abgesehen werden. Bei chronisch-rezidivierenden Otitiden hingegen kann die Gramfärbung eines Abstriches sowie die bakteriologische Untersuchung mit Antibiogramm aufgrund zunehmender Problematik multiresistenter Keime wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* sinnvoll sein (SHANTI & SEKAR, 2009). *Acinetobacter baumannii* ist ein zunächst kokkoides, gram-negatives Kurzstäbchen (GREENE, 2006), welches ohne Gramfärbung mit gram-positiven Kokken verwechselt werden könnte. Steht nur ein Abstrich zur Verfügung können ohne signifikanten Informationsverlust über Entfärben (etwa des Diff-Quik<sup>®</sup> gefärbten Präparates) und Neufärben (Gramfärbung) Details erkannt werden (MARCOS et al., 2009).

Die quantitative Beurteilungsmethode zeigt Differenzen zwischen verschiedenen Untersuchern (TOMA et al, 2006). Die semiquantitative Beurteilung hingegen brachte keine signifikanten Differenzen zwischen verschiedenen geübten wie auch ungeübten Untersuchern (BUDACH & MUELLER, 2012) und wird empfohlen (ROSYCHUK, 1994; GINEL et al., 2002; BEALE, 2007b; BUDACH &

MUELLER, 2012). LEHNER und Mitarbeiter (2010) erhielten bei zwei simultan entnommenen Abstrichen reproduzierbare Ergebnisse für Bakterien sowie moderate Reproduzierbarkeit bei Hefen und halten somit einen einzigen Abstrich für ausreichend (LEHNER et al., 2010). In vorliegender Studie wurden vier Abstriche genommen und semiquantitativ beurteilt. Das Risiko der mangelnden Reproduzierbarkeit aufgrund sukzessive geringer werdenden Mikroorganismen- oder Zellgehaltes, eventuell provoziert durch Auflockern des Ohrschmalzes bei der Probenentnahme, oder möglicherweise ungleichmäßiger mikrobiologischer Besiedelung der Gehörgangshaut wurde durch Verwendung der Rotationstabelle für die Färbungen minimiert. Zwar ist die Reproduzierbarkeit bei Mikroorganismen für zwei simultan entnommene Abstriche gegeben (LEHNER et al., 2010) jedoch war die Feststellung der Reproduzierbarkeit für vier simultan entnommene Abstriche nicht Gegenstand der vorliegenden Studie, so dass hier jedes Risiko mangelhafter Reproduzierbarkeit im Vorfeld vermieden wurde. Die semiquantitative Beurteilung dient der Zeitersparnis bei der Diagnostik und Dokumentation in der täglichen Praxis. Das in der vorliegenden Studie durchgeführte Durchmustern des gesamten Präparates erhöht die Sensitivität vor allem bei der Detektion von Stäbchen (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004) und die Übereinstimmung gerade bei den Kategorien 0 (negativ, keine Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern des gesamten Präparates) und 1 (gelegentlich und nicht in jedem Gesichtsfeld Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern). Eventuelle Agglomeration von Mikroorganismen konnte beim Durchmustern im Gegensatz zum Auszählen einzelner Gesichtsfelder festgestellt und berücksichtigt werden. Die geringen absoluten Zahlen können die hohe Übereinstimmung bedingen, zumal das ganze Präparat durchgemustert wurde. GINEL und Mitarbeiter (2002) haben für Mikroorganismen bei Beurteilung von zehn HPF (x400) eine höhere Übereinstimmungen bei geringer Keimbelastung festgestellt (GINEL et al., 2002). In der täglichen Praxis ist ein Durchmustern jedoch zu zeitintensiv (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). Trotz Durchmustern ist bei mit dem Otitis Schnellfärbeset gefärbten Präparaten ein signifikanter Informationsverlust vorhanden; diese Färbung ist weniger geeignet perpetuierende Faktoren zu erkennen wohl aber den Typ der *Otitis externa*.

Eine Entscheidungshilfe für eine bakteriologische Untersuchung mit Resistenztest ist der Nachweis von Stäbchen in der Zytologie des Cerumens (KOWALSKI,

1988; GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). Die Übereinstimmung von bakteriologischer Untersuchung und Zytologie liegt bei zwei simultan entnommenen Abstrichen durch einen sterilen Otoskopkonus bei 68 Prozent (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt mit Ausnahme des Otitis Schnellfärbesets, was an der mangelnden Detailerkennbarkeit bei dieser Färbung gelegen haben kann. Die Übereinstimmung von Zytologie und bakteriologischer Untersuchung liegt in der vorliegenden Studie für Kokken bei etwa 65 Prozent, allerdings nicht für das Otitis Schnellfärbeset (unter 45 Prozent). Für Stäbchen wurde mit etwa 80 Prozent in der vorliegenden Studie abgesehen vom Otitis Schnellfärbeset (unter 55 Prozent) eine höhere Übereinstimmung erzielt. Die Übereinstimmung bei Stäbchen ist höher als bei Kokken. Stäbchen werden bei *Otitis externa* seltener isoliert als Kokken und so kann die Übereinstimmung negativer Ergebnisse häufig zu erwarten sein. Um die Übereinstimmung zu optimieren, kann der sterile Tupfer vor Versenden in das Labor auf einen Objektträger getupft werden, so dass exakt derselbe Tupfer beurteilt wird (GRIFFIN, 2009a). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde zuerst ein Tupfer steril entnommen und anschließend vier separate, unsterile Tupfer. Sollte es bei der sterilen Tupfernahme schon zu Verringerung der Mikroorganismenzahlen gekommen sein, wäre eine höhere Sensitivität im Vergleich zur Zytologie zu erwarten gewesen. Während bei GRAHAM-MIZE und ROSSER (2004) die mikrobiologische Untersuchung sensitiver war (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004), ist in der vorliegenden Studie die Zytologie der mikrobiologischen Untersuchung in der Detektion von Bakterien überlegen. Dies kann durch das Durchmustern des gesamten Objektträgers begründet sein. Eine Ausnahme ist das Otitis Schnellfärbeset, welchem wohl aufgrund mangelhafter Detailerkennbarkeit die mikrobiologische Untersuchung überlegen ist. Eine weitere Aufschlüsselung einzelner Zellpopulationen nach Bakterienspezies war im vorliegenden Studiendesign nicht vorgesehen, wenn es auch eventuell teils einer Verdeutlichung der Ergebnisse hätte dienen können. Es sollte jedoch unter Praxisbedingungen, bei denen das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung retrospektive mit der Zytologie in Verbindung gesetzt wird, untersucht werden.

Alle Hunde hatten Otologika zur Therapie der *Otitis externa* erhalten. Da dies alle Tupfer der Kontrolluntersuchung betraf, welche auch der Rotationstabelle

entsprechend gefärbt wurden, ist eine Beeinflussung der Färbungen zum Nachteil einer bestimmten Methode unwahrscheinlich. Auch im Vergleich der Übereinstimmung von Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Initial- und der Kontrolluntersuchung ermittelt werden.

Eine mykologische Untersuchung ergänzend zur Zytologie erhöht die Sensitivität der Diagnostik (GIRÃO et al. 2006). Der Fokus der vorliegenden Studie lag jedoch eher im zytologisch-bakteriologischen Bereich und es wurden keine mykologischen Untersuchungen durchgeführt, so dass hier keine Aussage zur Übereinstimmung mit der Zytologie möglich ist.

## **2. Aktuelle Resistenzlage der bei der caninen *Otitis externa* isolierten Bakterien in Nordrhein-Westfalen, Deutschland (2009/2010)**

Die prozentuale Verteilung der Bakterien bestätigt vorherige Studien, die in absteigender Häufigkeit *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* spp. und *Proteus* spp. bei caninen Otitiden identifizieren (MARTIN BARRASA et al., 2000; MORRIS, 2004; HARIHARAN et al., 2006; LYSKOVA et al., 2007; PENNA et al., 2010). SENTHIL (2010) hingegen isoliert 43 Prozent gram-negative Keime und nur 30 Prozent gram-positive Keime bei der *Otitis externa* des Hundes (SENTHIL et al., 2010). LILENBAUM und Mitarbeiter (2000) beschreiben im Gegensatz zur vorliegenden Studie deutlich mehr koagulase-negative Staphylokokken (*Staphylococcus epidermidis*, *simulans*, *hämolyticus*, *saprophyticus*) als koagulase-positive (*Staphylococcus pseudintermedius* und *aureus*) (LILENBAUM et al., 2000). ANGUS (2004) isoliert bei Hunden mit *Otitis media* auch Anaerobier aus dem äußeren Gehörgang (ANGUS; 2004). Nach COLE und Mitarbeitern (1998) liegt im Mittelohr eine signifikant unterschiedliche bakterielle Flora vor (COLE et al., 1998). Geographische Gegebenheiten und Chronizität oder Purulenz der *Otitis externa*, sowie eine eventuell zugrunde liegende *Otitis media* können für die differierenden Resultate verantwortlich sein, insbesondere im Hinblick auf *Pseudomonas* spp., vor allem *Pseudomonas aeruginosa*. GRAHAM-MIZE und

ROSSER (2004) stellen bei simultaner Probenentnahme eine unterschiedliche Keimverteilung in 20 Prozent der Fälle und ein unterschiedliches Antibiotogramm in weiteren 20 Prozent fest (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). In der vorliegenden Studie waren Hunde mit otoskopisch und/oder radiologisch festgestellter *Otitis media* ausgeschlossen worden, eine simultane Probenentnahme aus der *Bulla tympanica* war nicht im Studiendesign vorgesehen. Auch die Wahl des kooperierenden Labors kann eine Rolle spielen. Bei simultaner Probenentnahme finden SCHICK und Mitarbeiter (2007) für *Pseudomonas* spp. eine Übereinstimmung von 83 Prozent in der Feststellung des Keimes; die Antibiotogramme insgesamt stimmen nicht überein, wenn auch für die einzelnen Wirkstoffe in 81 Prozent Übereinstimmung zu verzeichnen ist (SCHICK et al., 2007). Für die vorliegende Studie war ein einziges akkreditiertes Labor zuständig, unterschiedliche Untersuchungsmethoden wie disc diffusion test (DDT) Mikrodilution, Grenzwerte und deren Festlegung dürften innerhalb der Studienpopulation keine Rolle gespielt haben. Im Vergleich mit anderen Studien sollte dies jedoch bedacht werden.

Bei ZAMANKHAN und Mitarbeitern (2010) sind 73 Prozent der bakteriellen Infektionen Monoinfektionen (ZAMANKHAN et al., 2010). Diese Zahlen ähneln denen der vorliegenden Studie mit knapp sechzig Prozent bakterieller Monoinfektionen, meist verursacht durch *Staphylococcus* spp. oder *Pseudomonas* spp.. OLIVEIRA und Mitarbeiter (2008) und GRAHAM-MIZE und ROSSER (2004) stellen wesentlich weniger Monoinfektionen fest, in beiden Studien sind Hefen allerdings mit berücksichtigt, was eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz darstellt (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004; OLIVEIRA et al., 2008).

Größer angelegte Resistenzmonitorings fehlen abgesehen von BftGermVet (GERMAP 2008) in Deutschland. Viele der in regulären Antibiotogrammen beurteilten Antibiotika sind nicht zur lokalen Therapie geeignet oder zugelassen. In der vorliegenden Studie sind die Tupferproben unter den in einer Kleintierpraxis gängigen Bedingungen genommen und im Labor untersucht worden wie es in der täglichen Praxis üblich ist, so dass routinemäßig Antibiotogramme mit 31 für diese Tierart und Indikation zugelassenen und nicht zugelassenen Wirkstoffen angefertigt wurden. Auch sind nicht für alle Antibiotika CLSI-Grenzwerte (Clinical and Laboratory Standards Institute, USA) für den

Einsatz bei Haut/Ohrinfektionen verfügbar. MIC<sub>50</sub> und MIC<sub>90</sub> können bei größerem Probenumfang als die vorliegende Studie bietet und bei überregionalem Testgebiet berechnet werden. Ein Vergleich mit GERMAP 2008 ist wegen Differenzen im Studiendesign somit schwierig.

Sind im zytologischen Präparat gram-negative Stäbchen vorhanden, wird eine antimikrobielle Therapie nach vermuteter Sensitivität eingeleitet, bis das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung vorliegt (KOWALSKI, 1988). Die Resistenzlage der Bakterien aus gesunden Ohren entspricht der von Keimen aus erkrankten Ohren (PUNDIR, 2007). Eine Keimdifferenzierung mit Antibiotogramm ist auch bei zytologischem Nachweis von Kokken sinnvoll (GARNIERE et al., 2004), selbst wenn die Resistenzlage bei Staphylokokken etwa insgesamt noch gut ist (GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). Nach ZAMANKHAN und Mitarbeiter (2010) sind im DDT Fluorochinolone, Aminoglycoside, und Cephalosporine gegen Staphylokokken zu empfehlen (ZAMANKHAN et al., 2010). TEJEDOR und MARTIN BERRASA (2002) ebenso wie PETERSEN und Mitarbeiter (2002) geben eine gute Resistenzlage für Amoxicillin/Clavulansäure, Ciprofloxacin, Marbofloxacin, Tobramycin und Gentamicin an (PETERSEN et al., 2002; TEJEDOR & MARTIN BARRASA, 2002). Für Staphylokokken und Streptokokken kann eine nur gering unterschiedliche Resistenzlage festgestellt werden. Vergleichbar mit GERMAP 2008-Daten ist die Sensibilität der  $\beta$ -hämolisierenden Streptokokken auf Penicilline, Cephalosporine und Fluorochinolone hervorragend. *Staphylococcus pseudintermedius* ist nach PETERSEN und Mitarbeitern (2002) im Allgemeinen sensibel für Cefalothin und Oxacillin (PETERSEN et al., 2002). In vorliegender Studie kann eine Sensibilität von 95 Prozent der Staphylokokken gegen Oxacillin bestätigt werden. Oxacillin gilt wie Methicillin als Indikator für Resistenz gegen alle  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (VANNI et al., 2009). Der enge Kontakt von Mensch und Haustier fördert die Übertragung resistenter Keime von Wirt zu Wirt, beispielsweise durch Anhaften resistenter caniner Staphylokokken an humane Korneozyten (WOOLLEY et al., 2007) und Weitergabe von Resistenzgenen von einem Bakterienstamm zum anderen (GUARDABASSI et al., 2004; WOOLLEY et al., 2007). Dies gilt für Pathogene wie für Kommensalen (GUARDABASSI et al., 2004; LU & MCEWAN, 2007).



So ist eine Keimdifferenzierung mit Antibiotogramm nicht nur für Pathogene sinnvoll (GANIERE et al., 2004). Eine Übertragung von (methicillinresistenten) Staphylokokken etwa wird einer aktuellen Studie zufolge für wahrscheinlich gehalten (HORSTMANN, 2011). GERMAP 2008 berichtet für *Staphylococcus pseudintermedius* und *Staphylococcus aureus* über eine gute Sensibilität auf Clavulansäure potenziertes Amoxicillin, Cephalosporine und Enrofloxacin, wie auch seltene Oxacillinresistenz (GERMAP 2008). Dies läuft mit Resultaten der vorliegenden Studie konform.

Im Gegensatz zu einer Wirksamkeitsstudie von ENGELN und Mitarbeitern (2010) (ENGELN et al., 2010), in der die Resistenzlage von Polymixin B hervorragend ist, liegt in vorliegender Studie die Resistenz bei 98 Prozent bei *Staphylococcus* spp., 100 Prozent bei *Staphylococcus pseudintermedius* und 85 Prozent bei *Streptococcus* spp.. Diese Befunde sind ähnlich den Ergebnissen von KOWALSKI (1988), der für Polymixin B im Bereich der Kokken eine Resistenz von 57 Prozent bei *Staphylococcus* spp. und 100 Prozent bei *Streptococcus* spp. feststellt (KOWALSKI, 1988). Die publizierte Wirksamkeit bei *Pseudomonas* spp. ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vergleichbar (TEJEDOR & MARTIN BARRASA, 2002).

Aminoglykoside wie Gentamicin werden für die topische Applikation bei *Otitis externa* mit gram-negativen Bakterien vorgeschlagen (GREENE, 2006). In der vorliegenden Studie kann eine gute Empfindlichkeit der gram-negativen Keime einschließlich *Pseudomonas* spp. festgestellt werden. Auch auf Tobramycin sind die meisten Pseudomonaden sensitiv, Tobramycin zeigt sich zudem zu 100 Prozent wirksam gegen *Acinetobacter* spp.. Bei schwerer chronischer *Otitis externa* wird eine Therapie mit Tobramycin oder Amikacin nach Umwidmung vorgeschlagen (MORRIS, 2004). Verschiedene Studien zeigen unterschiedliche Wirksamkeit von Gentamicin. Einige beurteilen die Wirksamkeit wie in vorliegender Studie als gut (ZAMANKHAN et al., 2010), bei anderen wird die Wirksamkeit eher als mäßig angegeben (MARTIN BARRASA et al., 2000; GRAHAM-MIZE & ROSSER, 2004). Dies aber berichtet auch GERMAP 2008 für *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Resistenz (inklusive Intermediärer) von über 50 Prozent für Gentamicin und über 70 Prozent für Enrofloxacin, sowie nahezu 100%iger Resistenzen bei allen anderen von 14 getesteten Wirkstoffen (GERMAP 2008). Ein auffallend hoher Anteil intermediärer Reaktion wurde auch

in vorliegender Studie festgestellt; ein Hinweis auf weitere Resistenzentwicklung bei *Pseudomonas aeruginosa*. Bei den Aminoglycosiden sind mit Ausnahme von Amikacin und Tobramycin Kreuzresistenzen häufig (GREENE, 2006).

Für eine systemische Therapie bei Mittelohrbeteiligung werden zusätzlich zur lokalen Medikation die Fluorochinolone Enrofloxacin und Marbofloxacin empfohlen (GREENE, 2006; MÜLLER & HORN, 2009). Dies wird durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Allerdings sollte die Anwendung einer Keimdifferenzierung mit Antibiotogramm folgen (PENNA et al., 2010). Die Prävalenz multiresistenter Problemkeime wie *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* steigt derzeit an (ZAVASCKI et al., 2010). Eine Resistenzbildung gegen Fluorochinolone noch unter Therapie ist beschrieben (MORRIS, 2004; GREENE, 2006) und wird auch in vorliegender Studie vereinzelt für Marbofloxacin bemerkt. Ein Unterschied in der Sensibilität zwischen Enrofloxacin und Marbofloxacin kann nicht festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu einigen Studien, welche von einer geringeren Wirksamkeit von Enrofloxacin im Vergleich zu Marbofloxacin (MARTIN BARRASA et al., 2000) und Ciprofloxacin (COLOMBINI et al., 2000) berichten. Die höhere Lipophilie von Enrofloxacin ist eventuell für diese Ergebnisse verantwortlich (TEJEDOR et al., 2003). Für die Fluorochinolone wurde ein im Vergleich zum Serumspiegel deutlich höherer Gewebespiegel nach intravenöser Applikation nachgewiesen und für die perorale Gabe vermutet (COLE et al., 2008). Bei lokaler Applikation werden im Ohrkanal höhere Wirkstofflevel erreicht als bei alleiniger systemischer Medikation. Dennoch sollten nur im Resistenztest sensible oder intermediäre Wirkstoffe zum Einsatz kommen (KOWALSKI, 1988; COLE et al., 2008). Oral verabreichte Fluorochinolone alleine sollen jedoch keine lokalen MIC<sub>90</sub> Spiegel bei *Pseudomonas-Otitis externa* erreichen (HALL et al., 2005). Diese Wirkstoffgruppe sollte als Reserveantibiotikum erhalten werden, da derzeit die Resistenzlage insgesamt noch gut ist (MÜLLER & HORN, 2009). Ein rationaler Einsatz der Fluorochinolone ist wichtig zur Minimierung weiterer Resistenzbildung (NOGUCHI et al., 2005).

Bei Fluorochinolonen ist eine Toxizität für den Bewegungsapparat wachsender Individuen, die Nieren und bei Katzen die Retina (nur Enrofloxacin) beschrieben. Außerdem können kardiovaskuläre und zentralnervöse Störungen auftreten (GREENE, 2006). Aminoglykoside sind potentiell nephrotoxisch, abhängig von

Dosis und Dauer der Anwendung. Zudem ist eine Toxizität für Vestibulärapparat und Gehörorgan insbesondere bei Applikation bei rupturiertem Trommelfell beschrieben. Viele Tiere tolerieren die Gabe von lokalen Aminoglykosiden sehr gut, aber gelegentlich kann bei lokaler und systemischer Gabe akute Taubheit gesehen werden, die irreversibel sein kann. SENTHIL und Mitarbeiter (2010) empfehlen trotzdem die Anwendung von Amikacin bei *Pseudomonas-Otitis externa* und stellt die Ototoxizität in den Hintergrund (SENTHIL et al., 2010). Bei der Anwendung von Aminoglykosiden müssen Nutzen und Risiko sorgfältig abgewogen werden.

Die Unterschiede in den verschiedenen Studien können durch unterschiedliche geographische Lokalisation und unterschiedliche Verfügbarkeit der Medikamente bedingt sein. Auch ist zu bedenken, dass unterschiedliche Testmethoden wie DDT und Mikrodilution verschiedene Resultate ergeben (SCHWARZ et al., 2010). Nach COLOMBINI und Mitarbeiter (2000) eignet sich der DDT zu qualitativen Diagnose, während die Mikrodilution über die Feststellung der MIC der Dosisfindung dient (COLOMBINI et al., 2000). Nach BROOKS und Mitarbeitern (2003) testen 75 Prozent der Labore nur die pathogenen Keime; hier gehen eventuell Informationen über Resistenzentwicklungen verloren. Akkreditierte Labore arbeiten seiner Studie zufolge häufiger nach Standards und Qualitätskontrollen des CLSI (BROOKS et al., 2003). Eine Umrechnung der Hemmhöfe des DDT in MIC sollte unterbleiben (SCHICK et al., 2007; SCHWARZ et al., 2010). Für Otitiskeime sind MICs, wenn verfügbar, vorzuziehen. Sie sind leichter zu interpretieren und praxisrelevanter, da die Konzentrationen der lokal verabreichten Antibiotika im Gehörgang in der Regel deutlich höher liegen als die Serumkonzentrationen, auf denen der DDT basiert. In der vorliegenden Studie wurde im Mikrodilutionsverfahren mit in der Regel zwei Grenzwerten gearbeitet und eine Differenzierung in „resistent“, „intermediär“ und sensibel“ vorgenommen. Dies entspricht zwar den Alltagsbedingungen in der Praxis, erschwert aber den direkten Vergleich mit einem Resistenzmonitoring, welches MIC's eruiert.

Innerhalb einer Wirkstoffgruppe sind Kreuzresistenzen üblich (GREENE, 2006; ZAVASCKI et al., 2010). Multiresistenz wird in der vorliegenden Studie entsprechend den Ausführungen von SCHWARZ und Mitarbeitern (2010) als phänotypische Resistenz gegen mindestens drei Wirkstoffe verschiedener

Wirkstoffgruppen definiert (SCHWARZ et al., 2010). Eine „pandrug-resistance“, die Resistenz gegen jede verfügbare Therapieoption (ZAVASCKI et al., 2010), ist in vorliegender Studie nicht vorhanden. LILENBAUM und Mitarbeiter (2000) beschreiben eine Multiresistenz gegen mindestens drei Wirkstoffe bei 36,4 Prozent der Isolate (LILENBAUM et al., 2000). Als genotypische Resistenz bezeichnet man die bakteriellen Resistenzmechanismen und die dafür verantwortlichen Gene (SCHWARZ et al., 2010). Die steigende Prävalenz multiresistenter Keime ist bedingt durch verschiedene Resistenzmechanismen: inaktivierende Enzyme wie  $\beta$ -Lactamasen/Methalo- $\beta$ -Lactamasen (Penicilline und Cephalosporine) und Aminoglycoside-modifizierende Enzyme, plasmid/chromosomal vermittelte Membrancarrier (Fluorochinolone, Penicilline, Cephalosporine, Aminoglycoside), Modifikation der äußeren Zellmembran (Polymixine, Fluorochinolone), Modifikationen an Bindungsstellen wie Modifikationen an PBP (Penicillin binding protein), Mutationen in *gyrA* und *parC* Genen mit gesteigerter Aktivität der Membrancarrier über Quinolonresistenz bestimmende Gene (QRDR)(Fluorochinolone) und plasmidgebundene Methylation der Aminoglycoside-Bindungsregion. Plasmidgebundene Resistenz entwickelt sich über horizontale Verbreitung schnell während chromosomale Resistenzmechanismen mehrere Generationen in Anspruch nehmen (TEJEDOR et al., 2003; ANGUS, 2004; SHANTI & SEKAR, 2009; ZAVASCKI et al., 2010). In der Humanmedizin gelten derzeit *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* mit Resistenzen gegen alle Wirkstoffklassen inklusive Carbapenemen als multiresistente Problemkeime (SHANTI & SEKAR, 2009). Insbesondere Immunsupprimierte oder Intensivpatienten sind gefährdet, die Mortalität bei Infektion kann 57 Prozent betragen (SHANTI & SEKAR, 2009).

Primäre Resistenz, die Wirkungslosigkeit eines Antibiotikums bei bestimmten Bakteriengattungen, bleibt in der vorliegenden Studie unberücksichtigt.

Selbst bei klinischem Erfolg können persistierende und auch resistente Bakterien verbleiben. Die Festlegung von MPC (mutant prevention concentration) wird vorgeschlagen. Diese liegt immer über der MIC und schließt das MSW (mutant selection window). Das Mikrodilutionsverfahren unter Berücksichtigung erreichbarer Konzentrationen im Patienten am Zielorgan in Verbindung mit der Pharmakodynamik und –kinetik wird angestrebt. Da die bakterielle Belastung in einer akuten Infektion deutlich über den in der Labortechnik üblichen  $10^5$

Koloniebildenden Einheiten/ml (KbE/ml) liege, sollten zumindest immunsupprimierte Patienten mit MPC-Dosen therapiert werden (BLONDEAU 2010; ZAVASAKI et al., 2010).

### **3. *In-vivo*-Wirksamkeit eines Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreinigers**

Die Wahl des Antibiotikums erfolgt in der Praxis häufig nach Toxizität und Pharmakokinetik/-dynamik im Hinblick auf den Patienten. Unglücklicherweise werden dabei teilweise auch humanmedizinische Reserveantibiotika eingesetzt. Wechselseitige Übertragung resistenter Keime oder einzelner Resistenzgene zwischen Haustieren und dem Menschen ist bei Kommensalen wie Pathogenen möglich (GUARDABASSI et al., 2004). Topische Antiseptika bei Hautinfektionen werden zur Minderung einer Selektion auf bakterielle Resistenzen empfohlen, zumal Lokaltherapeutika im Gegensatz zu systemischen Antibiotika ausschließlich im Bereich der Infektion wirken (GUADABASSI et al., 2008). Resistenzen gegen Antiseptika sind selten und in der Klinik nicht relevant, da diese in hohen Konzentrationen eingesetzt werden (VAARA, 1992). Über die antimikrobielle Wirkung hinaus bieten die meisten Antiseptika weitere Vorzüge. Chlorhexidin macht die Haut geschmeidig und ist deshalb für trockene, dehydrierte Haut günstig (WILCKE, 1988).

Die vorliegende Studie testete plazebokontrolliert die Wirkstoffe Chlorhexidin und Tris-EDTA. Dabei wurde eine signifikante Reduktion der zytologisch bewerteten Keimzahl gegenüber Plazebo festgestellt. Chlorhexidin, ein kathionisches Biguanid, wirkt konzentrations- und pH-abhängig bakterizid, fungizid und antiviral durch initiale Zellwandschädigung und Koagulation des Zytoplasmas mit anschließendem Zelltod. Chelatbildner sind effektiv gegen gram-positive wie gram-negative Keime und eignen sich zur Behandlung äußerer Infektionen wie etwa Wundinfektionen (QIU et al., 2011). Tris optimiert als Puffer den pH-Wert, was den antibakteriellen Effekt maximiert (GOLDSCHMIDT & WYSS, 1967; MORRIS, 2004). Es verstärkt die Wirkung gleichzeitig angewandter Fluorochinolone, wobei ein Synergismus der mikrobiellen DNA-Gyrase-Hemmung und der Bindung bivalenter Ionen wie Magnesium<sup>2+</sup> oder Calcium<sup>2+</sup> durch Tris-EDTA besteht (GRAY & WILKINSON,

1965; WOOLEY & JONES, 1983; FARCA et al., 1997; LAMBERT et al., 2004; TROTT et al., 2007). *In-vitro* wurden die minimalen Hemmkonzentrationen für Fluorochinolone und Aminoglycoside, beides gängige zugelassene Therapeutika der *Otitis externa*, und  $\beta$ -Lactam-Antibiotika deutlich gesenkt (FARCA et al., 1997). Für *Staphylococcus aureus* wurde eine einphasige Wirkung von EDTA gefunden, während für *Pseudomonas aeruginosa* ein konzentrationsabhängiger biphasischer Synergismus mit verschiedenen Antibiotika mit Reduktion der MICs um den Faktor fünf bis 30 gefunden wurde (LAMBERT et al., 2004). So konnte Tris-EDTA die Empfindlichkeit fluorchinolonresistenter *Pseudomonas aeruginosa* Stämme durch Ausschaltung ihrer Resistenzmechanismen erhöhen (FARCA et al., 1997). Die Kombination mit Chlorhexidin steigerte die *in-vitro*-Effektivität (HAPER & EPIS, 1965). Der Prüfbericht eines Labors ergab für Chlorhexidin/Tris-EDTA die größte *in-vitro*-Breitenwirkung von sechs verschiedenen Präparaten. Getestet wurden chlorhexidinhaltiges Shampoo in einer Konzentration von einem Prozent und vier Prozent, ein Chlorhexidin und Salicylsäure enthaltender Ohrreiniger, sowie ein Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltendes Spray, Gel und Ohrreiniger (Epibac®). Alle Chlorhexidin-Tris-EDTA-Kombinationen waren überlegen in der erzielten Hemmwirkung gegen gram-negative Stäbchen und zeigten gegen alle Prüfkeime Hemmwirkungen. Gegen Hefen und gram-positive Kokken bewirkte 4 %iges Chlorhexidin größere Hemmhöfe, nicht aber gegen gram-negative Stäbchen (HEUSINGER, 2007). Chlorhexidin interferiert bei täglicher lokaler Applikation nicht mit der Wundheilung, obgleich es *in-vitro* zytotoxisch ist (SANCHEZ et al., 1988; TATNALL et al., 1990). Für 0,2%iges Chlorhexidinacetat konnten MERCHANT und Mitarbeiter (1993) keine Anzeichen einer vestibulären oder cochleären Schädigung selbst nach Myringotomie und wiederholter Instillation in die *Bulla tympanica* feststellen (MERCHANT et al., 1993). Vergleichbare Ergebnisse fanden MILLS und AHLSTROM (2005) für Tris-EDTA (1,21 g/l) (MILLS & AHLSTROM, 2005). Dennoch sollte eine Instillation von Chlorhexidin bei rupturiertem Trommelfell unterbleiben (GORTTEL, 2004). Dieser Aspekt wird jedoch kontrovers diskutiert (HARVEY et al., 2003).

Alle Hunde dieser Studie erhielten ein lokales Antibiotikum, teils in Kombination mit Chlorhexidin/Tris-EDTA, teils in Kombination mit einem Placebo. Aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns ist ein Vergleich mit anderen *in-vitro*- wie

*in-vivo*-Studien schwierig. In einer *in-vitro*-Wirksamkeitsstudie wurde eine gute Wirksamkeit gegen *Staphylococcus (pseud)intermedius* (100%ige Wirkung bei 1:2 Verdünnung), *Malassezia* spp. (1:8 Verdünnung) und *Pseudomonas aeruginosa* (1:16 Verdünnung) für einen Tris-EDTA und Chlorhexidingluconat (0,15%ig) enthaltenden Ohrreiniger (Tris Plus<sup>®</sup>, Dermapet) festgestellt (SWINNEY et al., 2008). Die Wirksamkeit gegen Kokken, Stäbchen und Hefen konnte in vorliegender Studie bestätigt werden, die bessere Wirksamkeit gegen Stäbchen (*Pseudomonas aeruginosa*) im Vergleich zur Wirksamkeit gegen Kokken nicht. Möglicherweise ist hier die Komplikation purulentes Sekret, welches *in vivo* mit der antimikrobiellen Aktivität von Chlorhexidin interferieren kann (MCDONNELL & RUSSELL, 1999), *in vitro* aber keine Bedeutung hat. So wurde von GUARDABASSI und Mitarbeiter (2009) eine *in-vitro*-Effektivität bei einer 1:4 Verdünnung für alle Keime im Sinne einer 100%ige Abtötung erzielt. Es zeigte sich wie auch in der vorliegenden Studie eine bessere Wirksamkeit gegen *Staphylococcus* spp. ungeachtet einer eventuellen Methicillinresistenz (vollständige Hemmwirkung bei 1:16 Verdünnung) als gegen *Pseudomonas aeruginosa* und andere gram-negative Keime (mit der Ausnahme eines *Proteus mirabilis* Isolates vollständige Hemmwirkung bei 1:8 Verdünnung). Eine vollständige Hemmwirkung bei Hefen erreichten GUARDABASSI und Mitarbeiter (2009) bei einer 1:32 Verdünnung (GUARDABASSI et al, 2009). In einer *in-vivo*-Studie von Otitiden mit resistenten gram-positiven und gram-negativen Keimen erreichten GHIBAUDO und Mitarbeiter (2004) mit einmal täglicher Applikation klinische Remission und negative Bakterienkulturen bei zehn von elf Hunden. Dabei wurde dem Reiniger bei Bedarf nach 14 Tagen ein Antibiotikum (Enrofloxacin) zugegeben. Synergismus wurde hier vermutet (GHIBAUDO et al., 2004). Die in einer weiteren Fallserie festgestellte Wirkung eines Tris-EDTA und 0,15%iges Chlorhexidin enthaltenden Ohrreinigers als alleinige Therapie der caninen *Otitis externa* gegen Kokken und Hefen (SWANTON et al., 2009) stimmt mit den zytologisch verifizierbaren Keimreduktionen der vorliegenden Studie überein. Im Gegensatz zu der mangelnden *in-vivo*-Wirksamkeit gegen *Pseudomonas aeruginosa* (n = 1) war der Ohrreiniger in vorliegender Studie auch gegen Stäbchen wirksam.

Für die *in-vivo*-Effektivität bezüglich einer hochsignifikanten Reduktion von Stäbchen, wie sie bei den Kokken und Hefen vorhanden ist, sind weitere

Faktoren, beispielsweise Qualität der Reinigung/Massage und individuelle Gegenwehr des Hundes/Besitzercompliance bei dolenter purulenter *Otitis externa* als die alleinige *in-vitro*-Wirksamkeit zu vermuten. Aus tierschutzrelevanten Gründen wurden in vorliegender Studie alle Patienten zusätzlich mit einem zugelassenen Medikament behandelt, was zur Keimreduktion beigetragen hat. Nach zusätzlicher Behandlung mit dem Ohrreiniger wurde zytologisch eine signifikante Keimreduktion festgestellt, die bei Behandlung mit Placebo nicht vorhanden war und die für die Wirksamkeit der Chlorhexidin/Tris-EDTA Kombination spricht. Besonders die Keimreduktion bei der *Otitis externa ceruminosa* und *Otitis externa erythematosa et ceruminosa* konnte mit Chlorhexidin/Tris-EDTA positiv beeinflusst werden. Bei der *Otitis externa erythematosa* war sogar eine Erhöhung der Besiedelung mit Stäbchen nach Placebo vorhanden. Bei der *Otitis externa purulenta* war auch in der Placebo-Gruppe eine Keimreduktion zu erkennen. Eventuell war alleine schon der Spüleffekt vorteilhaft.

Über die *in-vivo*-Wirksamkeit des Ohrreinigers gegen Hefen ist keine eindeutige Aussage möglich, da das zusätzlich verabreichte Präparat Clotrimazol als hochwirksames Agens gegen Hefen enthielt, das auch in der Placebogruppe eine signifikante Verringerung der Hefeanzahl verursachte.

Mit weniger als 40 Prozent in Verum- und Placebo-Gruppe ist der Anteil kompletter klinischer Remission der *Otitis externa* nach zweiwöchiger Behandlung gering. In einer Studie an 19 Ohren wurde ein klinischer Erfolg bei etwa 70 Prozent der Hunde nach elf beziehungsweise 18 Tagen Therapie ausschließlich mit einer Chlorhexidin und Tris-EDTA enthaltenden Ohrreiniger erreicht (SWANTON et al., 2009). Eine alleinige Therapie mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol (Aurizon<sup>®</sup>, Vetoquinol, Ravensburg, D) lässt eine klinische Remission oder deutliche klinische Besserung bei 90 Prozent der Hunde erwarten. Es handelte sich dabei um akute (<14 Tage) oder subakute (15 - 30 Tage) Otitiden, chronische Otitiden waren nicht eingeschlossen (PANKOW & BOLKART, 2004). Die Kombination eines Ohrreinigers mit diesem Lokaltherapeutikum hat eine deutlichere Verbesserung der klinischen Situation und einen Unterschied zum Placebo erwarten lassen. Die Primärursache der *Otitis externa* muss gerade bei chronisch-rezidivierenden Otitiden diagnostiziert und behandelt werden. Diese diagnostische Aufarbeitung war meist



nach zwei Wochen noch nicht abgeschlossen oder die Therapie war noch nicht wirksam. Allergien sind häufig Ursache chronischer Otitiden (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007) und begründen die oft nach Therapie noch bestehende *Otitis externa erythematosa*. Zu beachten ist ferner, dass der Therapieerfolg als vollständige Elimination aller klinischen und otoskopisch erkennbaren Symptome definiert wurde, während in einer anderen Studie die Reduktion der klinischen Scores auf weniger als 50 Prozent ausreichte (SWANTON et al., 2009). Die Quote und Verteilung der Therapieversager ist in beiden Gruppen vergleichbar.

Die alleinige klinische Beurteilung des Therapieerfolges spiegelte den Unterschied in der Reduktion der Mikroorganismen nicht wieder.

Topische Antiseptika werden bei Hautinfektionen zur Minderung einer Selektion auf bakterielle Resistenzen empfohlen (GUARDABASSI et al., 2008). Wechselseitige Übertragung resistenter Keime oder einzelner Resistenzgene zwischen Haustieren und Menschen ist möglich (GUARDABASSI et al., 2004). Resistenzen gegen Antiseptika sind selten (VAARA, 1992). In vorliegender Studie wurde allerdings nur in der Verum-Gruppe eine signifikante Zunahme marbofloxacin-resistenter Keime gefunden. Meist handelte es sich jedoch um Kontaminationsflora, wie beispielsweise *Arthrobacter* sp. oder *Entococcus faecium*. In der Verumgruppe waren nach Therapieende lediglich *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli* (je n = 1), als Problemkeime häufiger perpetuierende Faktoren der *Otitis externa*, und unter den Staphylococcaceae nur *Staphylococcus schleiferi* (n = 2) und *Staphylococcus hämolyticus* (n = 1) vorhanden. In der Placebogruppe hatten zwei in der Erstuntersuchung sensible Keime vermutlich Resistenzen entwickelt. Hier waren alle nach Therapieende marbofloxacin-resistenten Keime *Pseudomonas aeruginosa* (n = 2) oder *Staphylococcus pseudintermedius* (n = 7), Keime die häufig perpetuierende Faktoren darstellen. Die eindeutige Identifizierung mittels Genotypisierung wurde allerdings nicht durchgeführt. Ein die Resistenzentwicklung positiv beeinflussender Effekt einer Chlorhexidin-Tris-EDTA Kombination mit Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol wurde nicht festgestellt. In jeder Gruppe war ein Ohr mit späterer Resistenz mit Marbofloxacin vorbehandelt worden. Eventuelle Vorbehandlungen beeinflussten das Ergebnis nicht. Eine aussagekräftige Probenstärke marbofloxacin-resistenter Isolate ist in

klinischen Studien selten zu erreichen. Die Resistenzlage für dieses Fluorochinolon ist mit einer Sensibilität von über 90 Prozent noch sehr gut. Außerdem muss bedacht werden, dass die breakpoints für die Mikrodilution in vorliegender Studie mit 0,5 und 1 Mikrogramm( $\mu\text{g}$ )/ml unter dem im Vetoquinol-Resistenz-Monitoring-Programm angewandten breakpoint von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  liegen (PANKOW & BOLKART, 2004). Eventuell ist durch den Verdünnungseffekt eines Präparates zur Gehörgangreinigung der Wirkstoffspiegel von Marbofloxacin gesenkt worden, dies bezieht sich aber analog auf beide Gruppen. Eine nur mit Lokaltherapeutikum ohne vorbereitenden Ohrreiniger/Plazebo behandelte Gruppe war im Studiendesign jedoch nicht vorgesehen. Der lokal erreichte Wirkstoffspiegel von Marbofloxacin (3mg/ml in Aurizon<sup>®</sup>) liegt weit über dem systemisch erreichbaren Wirkstoffspiegel (C max: 1,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (LEFEBVE et al., 1998). So wurde der Verdünnungseffekt hier als vernachlässigbar erachtet, eine entsprechende Kontrolle des tatsächlichen Wirkstoffspiegels von Marbofloxacin zehn Minuten nach Anwendung eines Ohrreinigers im äußeren Gehörgang unterblieb allerdings.

Die Compliance der Besitzer in dieser klinischen Studie ist ein Unsicherheitsfaktor, allerdings analog in der Plazebo-Gruppe und sollte das Ergebnis nicht beeinflusst haben. Bei unruhigen, wehrigen Tieren kann eventuell nicht ausreichend Reiniger/Medikament verabreicht worden sein.

Da die mit dem Ohrreiniger/Plazebo in Verbindung gebrachten Nebenwirkungen Rötung, Schwellung und Juckreiz in beiden Gruppen auftraten, wird keine Kausalität von Chlorhexidin oder Tris-EDTA vermutet und deren Verträglichkeit als gut angesehen. Aurizon<sup>®</sup> provoziert in vier Prozent lokale Reaktionen (PANKOW & BOLKART, 2004). Propylenglycol, in vorliegender Studie in Verum und Plazebo gleichermaßen enthalten, hat ceruminolytische, rehydrierende, keratinolytische und antimikrobielle Eigenschaften, welche jedoch durch Eiter gemindert wird, kann allerdings lokal irritieren (WILCKE, 1988) und kann somit auch für die Nebenwirkungen verantwortlich sein.

#### **4. Schlussfolgerung**

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass für Ohrabstriche bei der caninen *Otitis externa* die Färbemethode der täglichen Praxis, Diff-Quik<sup>®</sup>, keinen Nachteil gegenüber der zeitaufwändigeren Gramfärbung darstellt. Vorabtauchen in Aceton

mit anschließender Diff-Quik®-Färbung bringt keinen Vorteil. Das einphasige Otitis Schnellfärbeset (Alfavet) allerdings führt zu signifikantem Informationsverlust bei der *Otitis externa infectiosa*. Seine Stärke liegt in der Färbung von Entzündungszellen. Die Schnellfärbungen Diff-Quik® mit und ohne Aceton sowie die Gramschnellfärbung können als gut geeignet und vergleichbar in der Detektion der perpetuierenden Faktoren Bakterien und Hefen bezeichnet werden. Für die tägliche Praxis kann Diff-Quik® empfohlen werden.

Die häufigsten bei der caninen *Otitis externa* zytologisch erfassten Mikroorganismen sind Kokken und Hefen, die häufigsten in der mikrobiologischen Untersuchung isolierten Keime sind *Staphylococcus pseudintermedius* und *Pseudomonas aeruginosa*. Zur Lokalthherapie ist Gentamicin maximal wirksam, außerdem Enrofloxacin/Marbofloxacin, bei Stäbcheninfektion auch Polymixin B. Die systemische Unterstützung der topischen Therapie bei Stäbchen kann mit Enrofloxacin/Marbofloxacin erfolgen; bei Kokken bei Bedarf mit Amoxicillin/ Clavulansäure gefolgt von Cefalexin und Sulfonamid/Trimethoprim. Die ermittelten Daten sind vergleichbar mit den über GERMAP 2008 veröffentlichten Daten.

Bei der caninen *Otitis externa infectiosa* mit intaktem Trommelfell kann ein Ohrreiniger mit Chlorhexidin und Tris-EDTA (Epibac®) als zusätzliche Behandlung zu klassischen Ohrenmedikamenten empfohlen werden. Die Keimreduktion im Vergleich zum Plazebo ist signifikant. Lokale Unverträglichkeitsreaktionen können auftreten. Die erfolgreiche Behandlung der mikrobiellen Besiedelung als perpetuierender Faktor muss neben klinischer Untersuchung auch zytologisch verifiziert werden. Mögliche Resistenzentwicklung relativiert die Vorteile der Keimreduktion, allerdings dient die Reduktion der Keimanzahl auch der Prophylaxe neuer Resistenzentwicklung.

## V Zusammenfassung

Mit einer Prävalenz von bis zu 20 Prozent ist die *Otitis externa* eine der häufigsten Erkrankungen des Hundes. In der Diagnostik und initialen Therapie hat die Zytologie des Ohrabstriches zentrale Bedeutung für die Erfassung von Mikroorganismen und deren vermutete Resistenzsituation. Die Behandlung erfolgt in der Regel durch Reinigung und lokale Therapie. Die Ziele der Studie waren, vier verschiedene differenzierend färbende Verfahren für Ohrabstriche einschließlich Gram-color Färbeset<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> mit/ohne Acetonvorabtauchen und Otitis Schnellfärbeset (Alfavet) zu vergleichen, die Resistenzlage der bei der caninen *Otitis externa* isolierten Keime zu erfassen sowie in einer randomisierten, plazebokontrollierten Doppelblindstudie die *in-vivo*-Wirksamkeit eines Chlorhexidin (1500µg/ml) und Tris-EDTA (48µg/ml) enthaltenden, kommerziellen Ohrreinigers in Kombination mit topischem Marbofloxacin/Dexamethason/Clotrimazol zu ermitteln.

Die Studienpopulation umfasste 75 Hunde (120 Ohren) mit klinisch, otoskopisch und zytologisch diagnostizierter uni- oder bilateraler *Otitis externa*. Ein steriler und vier unsterile Tupfer wurden unmittelbar nacheinander aus dem äußeren Gehörgang genommen. Die vier separaten Objektträger für die Zytologie wurden mit Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> nach Vorabtauchen in Aceton, dem Gram-color Färbeset<sup>®</sup> oder dem Otitis Schnellfärbeset gefärbt. Die Gehörgangsreinigungen wurden vom verblindeten Besitzer mit Verum (Epibac<sup>®</sup>) oder Plazebo zweimal täglich durchgeführt; einmal täglich folgte das zugelassene Ohrpräparate (Aurizon<sup>®</sup>). Die Kontrolluntersuchung erfolgte bei 64 Hunden (104 Ohren) nach 14 Tagen analog der Erstuntersuchung.

Die gefärbten Abstriche wurden anhand der Mikroorganismen- und Zellzahlen semiquantitativ mit Einstufung in fünf Kategorien beurteilt. Die Reproduzierbarkeit wurde für je zwei Färbungen verglichen. Die Übereinstimmung von Zytologie und mikrobiologischer Untersuchung wurde anhand mikrobiologischen Nachweises von Kokken und Stäbchen und deren zytologischem Nachweis beurteilt. Die mikrobiologische Untersuchung durch ein akkreditiertes Labor bewertete die Bakterienspezies und die Resistenz mittels Mikrodilution gegen 31 Wirkstoffe.

Für Diff-Quik® mit/ohne Acetonvorabtauchen und das Gram-color Färbeset® wurden je 224 Objektträger und für das Otitis Schnellfärbeset wegen mangelhafter Färbequalität nur 141 Objektträger ausgewertet. Diff-Quik® mit und ohne Acetonvorabtauchen sowie das Gram-color Färbeset® wiesen eine Übereinstimmung von 70-90 Prozent bei Mikroorganismen auf. Weder für Kokken ( $p=0,2366$ ) noch für Stäbchen ( $p=0,4832$ ), Hefen ( $p=0,1574$ ), Keratinozyten ( $p=0,2875$ ) oder neutrophile Granulozyten ( $p=0,2299$ ) war ein signifikanter Unterschied festzustellen. Mit dem Otitis Schnellfärbeset wurden eher Entzündungszellen, aber signifikant weniger Mikroorganismen ( $p<0,001$ ) erkannt. Zytologie und Mikrobiologie stimmten mit Ausnahme des Otitis Schnellfärbesets für Kokken bei knapp 65 Prozent, für Stäbchen bei etwa 80 Prozent überein. Die Zytologie war mit Ausnahme des Otitis Schnellfärbesets sensitiver in der Erkennung von Mikroorganismen.

Von 106 Bakterienisolaten waren *Staphylococcus* spp. am häufigsten, gefolgt von *Pseudomonas* spp. und *Streptococcus* spp.. Gentamicin, Enrofloxacin, Marbofloxacin, bei Stäbcheninfektion auch Polymixin B waren maximal wirksam. Mit Verum wurden 46 Ohren, mit Plazebo 58 Ohren behandelt, beide Gruppen mit vergleichbaren klinischen Befunden vor ( $p=0,2961$  für die Klassifikation,  $p=0,6764$  für die Einstufung in akute versus chronisch-rezidivierende *Otitis externa*) und nach Therapie mit signifikanter Besserung ( $p<0,001$ ) ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ( $p=0,803$ ). Allerdings erreichte nur der Ohrreiniger zytologisch eine signifikante Reduktion der Kokken ( $p<0,0001$ ), Stäbchen ( $p=0,007$ ) und neutrophilen Granulozyten ( $p=0,0001$ ). Hefen wurden in beiden Gruppen signifikant reduziert (Verumgruppe  $p<0,0001$ , Plazebogruppe  $p<0,001$ ). Chlorhexidin und Tris-EDTA führen zu einer zytologisch verifizierbaren Keimreduktion, so dass trotz signifikanten Anstiegs Marbofloxacin-resistenter Bakterien in der Verumgruppe ( $p=0,0025$ ) im Gegensatz zur Plazebogruppe ( $p>0,05$ ) eine Kombination von Chlorhexidin und Tris-EDTA in Kombination mit antimikrobiellen Ohrentropfen zur Behandlung der *Otitis externa* empfohlen werden kann.

## VI Summary

With a prevalence of up to 20% *otitis externa* is one of the most common diseases in dogs. In the case of *otitis externa* ear cytology is crucial for the diagnosis and classification of *otitis externa*, immediate identification of microbial infection and the determination of initial therapy. Bacterial resistance based on cytology is expected and taken into consideration when giving therapeutic recommendations. Cleaning the external ear canal before initiating local antimicrobial treatment is paramount for the successful therapy of *otitis externa*. The study aimed at comparing four different staining methods (Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> after dipping in acetone, Gram Quick stain<sup>®</sup> and a commercial rapid stain for *otitis externa*) for ear cytology of dogs suffering from *otitis externa* and to investigate the agreement of cytology and culture; to determinate current resistance patterns of bacteria isolated in dogs with *otitis externa* as well as to evaluate the clinical, cytological, and microbiological efficacy of a cleaner containing chlorhexidine (1500µg/ml) and Tris-EDTA (48µg/ml) in a placebo-controlled double-blinded trial.

The study covered 120 ears of 75 dogs suspected to suffer from uni- or bilateral *otitis externa* due to history and dermatologic, otoscopic and cytologic examination. Using a standardized method five subsequent ear swabs (one for culture/sensitivity and four for cytology) were taken from the junction between the vertical and horizontal aspect of the external ear canal. The four glass slides for cytology were stained (Diff-Quik<sup>®</sup>, Diff-Quik<sup>®</sup> after dipping in acetone, Gram Quick stain<sup>®</sup> and a commercial rapid stain for *otitis externa*). Ear cleaner (Epibac<sup>®</sup>) or placebo was used twice daily followed by an ear medication containing marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole (Aurizon<sup>®</sup>) once daily. After two weeks 104 ears of 64 dogs were reevaluated. The stained slides were completely evaluated for microorganisms and cells and compared semi-quantitatively. In order to determine reproducibility stains were compared by twos. In order to determine the agreement of culture and cytology the results of the bacterial culture were broken down into cocci and rods and compared with the cytological evidence. The culture/sensitivity test was carried out by an accredited lab. Sensitivity was created in micro-dilution. The results were recorded along the lines of detected bacterial specie and each of the 31 antimicrobial tested.

For every staining method 224 slides were evaluated with the exception of the rapid stain due to its unacceptable quality (141 slides evaluated). Diff-Quik<sup>®</sup> with and without prior dipping in acetone as well as the Gram Quick stain<sup>®</sup> had a high congruence regarding the detection of micro-organisms (cocci  $p=0.2366$ ; rods  $p=0.4832$ ; yeasts  $p=0.1574$ ; keratinocytes  $p=0.2875$ ; neutrophils  $p=0.2299$ ) with no significant difference, while the commercial otitis rapid stain revealed significantly less microorganisms ( $p<0,001$ ). The results of the first three stains corresponded to culture results in nearly 65 percent for cocci and 80 percent for rods; the agreement was lower with the commercial otitis rapid stain. Cytology was more sensitive compared with culture except the rapid stain.

Current resistance patterns of 106 bacterial isolates of 75 dogs were determined. Most frequently isolated were *Staphylococcus* spp. followed by *Pseudomonas* spp. and *Streptococcus* spp.. Based on this study the efficacy of registered topical antimicrobial agents such as gentamicin, enrofloxacin/marbofloxacin and polymyxine (only rods) was good.

For evaluation of the ear cleaner efficacy 104 ears (64 dogs) were included, 46 ears of which got the verum and 58 ears the placebo. The distribution of clinical findings was similar in both groups ( $p=0.2961$  for the classification,  $p=0.6764$  for classification in acute *otitis externa* versus chronic recurrent *otitis externa*). In both groups, the clinical symptoms ( $p<0.001$ ) improved with no significant difference between the groups ( $p=0.803$ ). Compared with the placebo the ear cleaner caused a significant reduction of the cocci ( $p<0.0001$ ), rods ( $p=0.007$ ) and neutrophils ( $p=0.0001$ ). Yeasts were reduced significantly in both groups (verum  $p<0.0001$ , placebo  $p<0.001$ ). Chlorhexidine and Tris-EDTA in combination with marbofloxacin/dexamethasone/clotrimazole are effective in the cytological reduction of bacteria in canine infectious *otitis externa*. As a result, based on this study, a combination of chlorhexidine and Tris-EDTA may be recommended in combination with antimicrobial ear drops for the treatment of bacterially infected *otitis externa* despite the significant increase of marbofloxacin-resistant bacteria in the treated group ( $p = 0.0025$ ) compared to placebo ( $p> 0.05$ ).

## VII Literaturverzeichnis

- Aalbæk B, Bermis DA, Schjærff M, Kania SA, Frank LA, Guardabassi L.  
Coryneform bacteria associated with canine otitis externa. *Vet Microbiol.*  
2010; 145(3-4): 292-8.
- Alves A, Signorelli LR, Paula LF, Oliveira KD, Beltrame MAV, Conti LMC,  
Pissitante GL, Arruda VK. Cytological and microbiological evaluation of  
external otitis in dogs-preliminary results, Proceedings of the 34<sup>th</sup> world  
small animal veterinary congress; 2009 July 21-24; Sao Paulo, Brazil:  
2009: 47-8.
- Angarano DW. Diseases of the Pinna. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*  
1988; 18(4): 869-84.
- Angus JC, Campbell KL. Uses and indications for video-otoscopy in small animal  
practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2001; 31 (4): 809-28.
- Angus JC, Lichtensteiger C, Campbell KL, Schaeffer DJ. Breed variations in  
histopathologic features of chronic severe otitis externa in dogs: 80 cases  
(1995-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 221(7): 1000-6.
- Angus JC. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim  
Pract.* 2004; 34(2): 411-24.
- Angus JC. Cytology and Histopathology of the ear in Health and Disease. In:  
Gotthelf LN, editor. *Small Animal ear diseases, An illustrated guide.* 2nd  
ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 41-75.
- Aniya JS, Griffin CE. The effect of otic vehicle and concentration of  
dexamethasone on liver and adrenal function in healthy dogs, Selected  
abstracts from the NAVDF; 2007 April 18-22; Lihue, Kauai, Hawaii, USA.  
*Vet Dermatol.* 2007; 18: 175-95.
- Antibiotikaleitlinien, 2010 Bundestierärztekammer.  
[www.bundestieraerztekammer.de](http://www.bundestieraerztekammer.de)



- Aoki-Komori S, Shimada K, Tani K., Katayama M, Saito TR, Kataoka Y.  
Microbial Flora in the Ears of Healthy Experimental Beagles. Exp Anim.  
2007; 56(1): 67- 9.
- August JR. Diseases of the ear canal. In: The complete manual of ear care,  
Lawrenceville, New Jersey: Veterinary Learning Systems Co, Inc 1986:  
37-51.
- August JR. Otitis externa: A disease of multifactorial etiology. Vet Clin North Am  
Small Anim Pract. 1988; 18: 731-42.
- Austel M, Hensel P, Wooley RE, Ritchie BW. Comparison of the effect of tris-  
EDTA (Tricide<sup>®</sup>)-ciprofloxacin-fluconazole-dexamethasone-ear drops  
with Baytril-otic<sup>®</sup> in dogs with acute or chronic bacterial otitis externa.  
Abstracts of the NAVDF 2009. Vet Dermatol. 2009; 20(3): 214-30.
- Axlund TW. Otitis Interna and Vestibular Disease. In: Gotthelf LN, editor. Small  
Animal ear diseases, An illustrated guide. 2nd ed. St. Louis: Elsevier  
Saunders; 2005. p. 339-48.
- Baker R, Lumsden JH. Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat. Mosby Year  
Book, St. Louis, USA 2000: 263.
- Barbet JL, Snook T, Gay JM, Mealey KL. ABCB1-1  $\Delta$  (MDR1-1  $\Delta$ ) genotype is  
associated with adverse reactions in dogs treated with milbemycin oxime  
for generalized demodicosis. Vet Dermatol. 2009; 20 (2): 111-4.
- Bartlett S, Rosenkrantz W, Sanchez S. Bacterial contamination of commercial ear  
cleaners following routine use. Abstracts of the NAVDF 2011 April 13-  
16<sup>th</sup> 2011 Galveston, Texas, USA. Vet Dermatol. 2011; 22(3): 289-304.
- Beale KM. Approach to the pruritic patient. Proceedings of the 22<sup>nd</sup>  
Annual Congress of the ESVD-ECVD; 2007 Sep 13-15; Mainz,  
Deutschland. Williston: Blackwell; 2007a: 46-50.
- Beale KM. Cytology: an important tool in veterinary dermatology, Proceedings of  
the 22<sup>nd</sup> Annual Congress of the ESVD-ECVD; 2007 Sep 13-15; Mainz,  
Deutschland. Williston: Blackwell; 2007b: 51-4.

- Beale KM. Treatment of canine atopic dermatitis, Proceedings of the 22<sup>nd</sup> Annual Congress of the ESVD-ECVD; 2007 Sep 13-15; Mainz, Deutschland. Williston: Blackwell; 2007c: 65-9.
- Bell A. Otitis externa- preventing Pseudomonas. In: Veterinary continuing education; Summer Symposium: a Potpourri of Dermatology; 2003 März 08 - 09; Nelson, New Zealand: 29-31.
- Bischoff MG, Kneller SK. Diagnostic imaging of the canine and feline ear. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(2): 437-58.
- Blondeau JM. New concepts in antimicrobial susceptibility testing: the mutant prevention concentration and mutant selection window approach. Proceedings of the 25<sup>th</sup> NAVDF; 2010 April 14-17; Portland, Oregon, USA: 35-60.
- Bloom P. Adverse Food Reaction. In: Gotthelf LN, editor. Small Animal ear diseases, An illustrated guide. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 127-40.
- Blue JL, Wooley RE. Antibacterial Sensitivity Patterns of Bacteria Isolated from Dogs with Otitis Externa. J Am Vet Med Assoc. 1977; 171(4): 362-3.
- Bluestone CD, Doyle WJ. Anatomy and physiology of the Eustachian tube and middle ear related to otitis media. J Allergy Clin Immunology. 1988; 81: 997-1003.
- Bornand V. Bacteriologie et Mycologie de L'otite externe du chien. Schweiz Arch Tierheilkd. 1992; 134(7): 341-8.
- Bradley RL. Surgical Management of Otitis externa. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1988; 18(4): 813-9.
- Brooks MB, Morley PS, Dargatz DA, Hyatt DR, Salman MD. Survey of antimicrobial susceptibility testing practices of veterinary diagnostic laboratories in the United States. J Am Vet Med Assoc. 2003; 222(2): 168-73.
- Budach S, Mueller RS. Reproducibility of a semiquantitative method to assess

- cutaneous cytology. *Vet Dermatol.* 2012; 23(5): 426-e80.
- Carlotti DN. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. *J Small Anim Pract.* 1991; 32(8): 394-400.
- Carlotti DN. Non-neoplastic cutaneous cytology. In: *Proceedings of the ESVD-Workshop: Clinical Pathology*; 1997 July 09–12; Nantes, Frankreich: 1-6.
- Chester DK. Medical Management of Otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988; 18(4): 799-812.
- Chickering WR. Cytologic evaluation of Otic Exudates. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988; 18(4): 773-82.
- Chole RA, Kodama K. Comparative histology of the tympanic membrane and its relationship to cholestoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1989; 98(10): 761-6.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, formerly NCCLS, National committee of Clinical Laboratory Science) CLSI guidelines
- Cole LK. Anatomy and physiology of the canine ear. *Vet Dermatol.* 2010; 20: 412-21.
- Cole LK. Otic cytology. *Proceedings of the 81<sup>st</sup> Western Veterinary Conference*; 2008 Feb 15-19; Las-Vegas, USA: V2 44.
- Cole LK. Otoscopic Evaluation of the Ear Canal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004; 34(2): 397-410.
- Cole LK, Kwochka KW, Kowalski JJ, Hillier A. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *J Am Vet Med Assoc.* 1998; 212(4): 534-8.
- Cole LK, Kwochka KW, Hillier A, Kowalski JJ, Smeak DD. Comparison of bacterial organisms and their susceptibility patterns from otic exudates and ear tissue from the vertical ear canal of dogs undergoing a total ear canal ablation. *Vet Ther.* 2005; 6(3): 252-9.

- Cole LK, Luu DH, Rajala-Schultz PJ, Meadows C, Torres AH. In vitro activity of an ear rinse containing tromethamine, EDTA, and benzyl alcohol on bacterial pathogens from dogs with otitis. *Am J Vet Res.* 2006; 67(6): 1040-4.
- Cole LK, Papich MG, Kwochka KW, Hillier A, Smeak DD, Lehman AM. Plasma and ear tissue concentrations of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in dogs with chronic end-stage otitis externa after intravenous administration of enrofloxacin. *Vet Dermatol.* 2008; 20: 51-9.
- Cole LK, Weisbrode SE, Smeak DD. Variation in gross and histological appearance of the canine pars flaccida. *Vet Dermatol.* 2007; 18: 464-8.
- Colombini S, Merchant G, Hosgood G. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. *Vet Dermatol.* 2000; 11(4): 235-9.
- Cook LB. Neurologic Evaluation of the Ear. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004; 34(2): 425-35.
- Corfield GS, Burrows AK, Imani P, Bryden SL. The method of application and short term results of tympanometry tubes for the treatment of primary secretory otitis media in three Cavalier King Charles Spaniel dogs. *Aust Vet J.* 2008; 86(3): 88-94.
- Crespo MJ, Abarca ML, Cabanes FJ. Occurrence of *Malassezia* spp in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Med Mycol.* 2002; 40: 115-21.
- de Groot JC, Meewsen F, Ruizendaal WE, Veldman JE. Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea. *Hear Res.* 1990; 50(1-2): 35-42.
- Dickson DB, Love DN. Bacteriology of the horizontal ear canal of dogs. *J Small Anim Pract.* 1983; 24(7): 413-21.
- Eger CE, Lindsay P. Effects of otitis on hearing in dogs characterized by brainstem auditory evoked response testing. *J Small Anim Pract.* 1997; 38(9): 380-6.

- Engelen M, DeBock M, Hare J, Goossens L. Effectiveness of an Otic Product Containing Miconazole, Polymixin B and Prednisolone in the treatment of Canine Otitis Externa: Multi-site Field Trial in the US and Canada. Intern J Appl Res Vet Med. 2010; 8(1): 21-30.
- Eom K, Lee H, Yoon J. Canalographic evaluation of the external ear canal in dogs. Vet Radiol Ultrasound. 2000; 41(3): 231-4.
- Fan TM, Lorimier L-P. Inflammatory Polyps and Aural Neoplasia. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(2): 489-510.
- Farca AM, Nebbia P, Re G. Potentiation of antibiotic activity by EDTA-tromethamine against three clinically isolated gram-positive resistant bacteria. An in vitro investigation. Vet Res Commun 1994; 18(1): 1-6.
- Farca AM, Piromalli G, Maffei G, Re G. Potentiating effect of EDTA-Tris on the activity of antibiotics against resistant bacteria associated with otitis, dermatitis and cystitis. J Small Anim Pract. 1997; 38: 243-5.
- Fernando SAD. A Histological and Histochemical Study of the Glands of the External Auditory Canal of the Dog. Res Vet Sci. 1966; 7: 116-9.
- Franz H. Ablauf, Ursache und Wirkung der Epidermismigration des Trommelfells. European Arch Oto-Rhino-Laryngology. 1966; 186(3): 252-63.
- Galle HG, van-Haagen AJV. Ototoxicity of the antiseptic combination chlorhexidine/cetrimide (Savlon): effects on equilibrium and hearing. Vet Q. 1986; 8(1): 56-60.
- Ganière JP, Médaille C, Etoré F. In vitro antimicrobial activity of orbifloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolates from canine skin and ear Infections. Res Vet Sci. 2004; 77(1): 67-71.
- Gatineau M, Lussier B, Alexander K. Multiple follicular cysts of the ear canal in a dog. J Am Anim Hosp Assoc. 2010; 46(2): 107-14.
- GERMAP 2008, [www.bvl.bund.de/germap2008](http://www.bvl.bund.de/germap2008)

- Ghibaud G, Corneigliani L, Martino P. Evaluation of the *in vivo* effects of Tris-EDTA and chlorhexidine digluconate 0.15% solution in chronic bacterial otitis externa: 11 cases. Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Congress of Vet Derm. 2004 Aug 25-28, Vienna, Austria. Vet Dermatol. 2005; 15 Suppl 1: 65-74.
- Ginel PJ, Lucena R, Rodriguez JC, Ortega J. A semi-quantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. Vet Dermatol. 2002; 13(3): 151-6.
- Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. Malassezia pachydermatis isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. Vet J. 2006; 172(3): 544-8.
- Goldschmidt MC, Wyss O. The role of Tris in EDTA Toxicity and Lysozyme Lysis. J gen Microbiol. 1967; 47: 421-31.
- Gortel K. Otic flushing. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(2): 557-65.
- Gotthelf LN. Diagnosis and Treatment of Otitis Media in Dogs and Cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(2): 469-87.
- Gotthelf LN. Small animal ear diseases, An illustrated guide. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 23-40; 110-26; 141-86; 221-34; 275-338.
- Graham-Mize CA, Rosser EJ Jr. Comparison of Microbial Isolates and Susceptibility Patterns From the External Ear Canal of Dogs With Otitis Externa. J Am Anim Hosp Assoc. 2004; 40(2): 102-8.
- Gray GW, Wilkinson SG. The Effect of Ethylenediaminetetra-acetic Acid on the Cell Walls of Some Gram-Negative bacteria. J gen Microbiol. 1965; 39: 385-99.
- Greene CE. Infectious diseases in the dog and cat, 3rd ed. St. Louis: Elsevier Saunders. 2006. p. 274-301.
- Griffin CE. Cutaneous cytology. Proceedings of the 82<sup>nd</sup> Western Veterinary

- Conferences 2009a Feb 14-18; Las-Vegas; USA: T6.
- Griffin CE. Pseudomonas otitis. Proceedings of the Otitis workshop. 2010a Feb 04-06; St.Helens, UK: 69-71.
- Griffin CE. Diseases of the ear. In: Griffin CE, Kwochka K.W, McDonald JM, editors. *Current veterinary dermatology: The Science and Art of Therapy*. St. Luis: Mosby-Year Book; 1993. p. 245-62.
- Griffin CE. Otitis topical and systemic. Proceedings of the 56<sup>th</sup> SCIVAC; 2007 June 01-03; Rimini, Italy; 2007: 270-2.
- Griffin CE, Trimmer AM. Two unusual cases of auricular cartilage diseases. Selected abstracts from the NAVDF 2007 April 18-22; Lihue, Kauai, Hawaii, USA. *Vet Dermatol*. 2007; 18: 175-95.
- Griffin, CE. ESAVS Dermatology I-III, Wien, 2008/2009b/2010b
- Griffin CE. Chronic otitis, is it more Time for surgery. Proceedings of the 6<sup>th</sup> WCVD; 2008 Nov 19-22; Hongkong, China; 2008: 231-6.
- Griffin GE, Rosenkrantz W, Boord M. Cytology of the skin: Techniques and Interpretation 2009 <http://www.vcaspecialtyvets.com/ckfinder/userfiles/files/Animal%20Specialty%20Group/CytologyoftheSkin%2520final.pdf>
- Griffin CE. Otitis Techniques to improve practice. *Clin Tech Small Animal Pract* 2006; 21: 96-105.
- Griffin JS, Scott DW, Erb HN. Malassezia otitis externa in the dog: the effect of heat-fixing otic exudate for cytological analysis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2007; 54(8): 424-7.
- Grono LR. Studies of the Microclimate of the External Auditory Canal in the dog II. Hydrogen Ion Concentration of the Epithelial Surface of the External Auditory Meatus. *Res Vet Sci*. 1970a; 11: 312-5.
- Grono LR. Studies of the Microclimate of the External Auditory Canal in the Dog III. Relative Humidity within the External Auditory Meatus. *Res Vet Sci*. 1970b; 11: 316-9.

- Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54: 321–32.
- Guardabassi L, Houser GA, Frank LA. Guidelines for antimicrobial use in small animals. In: Guardabassi L, Jensen LB, Hilde K., editors. *Guide to antimicrobial use in animals.* Oxford: Blackwell Publishing; 2008. p. 183-206.
- Guardabassi L, Ghibaud G, Damborg P. *In vitro* antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Vet Dermatol.* 2010; 21(3): 282-6.
- Hall JA, Dick H, Waisglass SE, Lam ATH. Minimum inhibitory concentrations in the selection of appropriate oral fluoroquinolones for the treatment of *Pseudomonas* otitis externa in dogs; Abstracts from the joint meeting of the ACVD and the AAVD; 2005 April 06-10; Sarasota, Florida, *Vet Dermatol.* 2005; 16(abstrakt): 199.
- Hardie EM, Linder KE, Pease AP. Aural cholesteatoma in twenty dogs. *Vet Surg.* 2008; 3(7): 763-70.
- Hariharan H, Coles M, Poole D, Lund L, Page R. Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can Vet J.* 2006; 47(3): 253-5.
- Harper WES, Epis JA. Effect of chlorhexidine/ETA/Tris against bacterial isolates from clinical specimens. *Microbios.* 1987; 51: 107-12.
- Harvey RG, Harari J, Delauche A. *Ohrkrankheiten von Hund und Katze.* 1st ed. Stuttgart: Schattauer; 2001
- Hayes GM, Friend EJ, Jeffery ND. Relationship between pharyngeal conformation and otitis media with effusion in Cavalier King Charles Spaniels. *Vet Rec.* 2010; 167(2): 55-8.
- Hayes HM Jr, Pickle LW, Wilson GP. Effects of ear type and weather on the hospital prevalence of canine otitis externa. *Res Vet Sci.* 1987; 42(3): 294-8.



- Henke J, Erhardt W, Tacke S. Analgesieprotokolle vor, während und nach der Anästhesie von Hunden und Katzen mit schmerzhaften Zuständen. Tierärztl Prax. 2008; 36(K): 27-34.
- Henn V. Sensomotorik: supraspinale Mechanismen, Bewegungs- und Lagesinn. Klinke R, Silbernagel S, Herausgeber. Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart: Thieme; 1994. p. 668-76.
- Henneveld K, Rosychuk RAW, Zabel S. *Corynebacterium* spp. in dogs and cats with otitis externa and/or media: a retrospective study. Abstracts of the NAVDF; 2010 April 14-17; Portland, Oregon, USA. Vet Dermatol. 2010; 21: 311-28.
- Heusinger A. Prüfbericht „Keimhemmung durch Präparate der Firma Alfavet“. LABOKLIN, Bad Kissingen, Deutschland; 2007. 1-4.
- Hill PB. Dealing with Pseudomonas otitis? Proceedings of the European Veterinary Conference Voorjaarsdagen; 2009a April 23-25; Amsterdam, Netherlands. 8-10.
- Hill PB. ESAVS- Kurse Dermatology I-III, 2008, 2009b, 2010, Wien, Österreich
- Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. Vet Immunol and Immunopath. 2001; 81: 147-51.
- Hobson HP. Surgical Management of advanced ear disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1988; 18(4): 821-44.
- Horstmann C, Straubinger RK, Mueller RS, Werckenthin C. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* with commercially available selective media. Letters Applied Microbiol. 2011; 54: 26-31.
- House A. Atresia of the distal external acoustic meatus in a Bouvier des Flandres. J Small Anim Pract. 2001; 42(2): 88-9.
- Huang HP, Huang HM. Effects of ear type, sex, body weight and climate temperatures in the external acoustic meatus of dogs. Am J Vet Res. 1999 Sep; 60(9): 1173-6.

Huang HP, Little CJL, McNeil PE. Histological changes in the external ear canal of dogs with otitis externa. *Vet Dermatol.* 2009; 20: 422-8.

Hugo WB, Longworth A R. Some Aspects of the Mode of Action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol.* 1964; 16: 655-62.

Hugo W B, Longworth A R. (1965). Cytological Aspects of the Mode of Action of Chlorhexidine Diacetate. *J Pharm Pharmacol.* 1965; 17: 28-32.

Hugo W B, Longworth A R. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol.* 1966; 18: 569-578.

Kähler B, Kohn B, Waibl H, Brunnberg L. Unilaterale Gehörgangsatresie beim Hund. *Kleintierpraxis.* 2001; 46: 487-94.

Kelley LS, Flynn-Lurie AK, House RA, Simpson AC, Marsella R. Safety and tolerability of 0.1% tacrolimus solution applied to the external ear canals of atopic beagle dogs without otitis. *Vet Dermatol.* 2010; 21: 554-65.

Kirby AL, Rosenkrantz WS, Ghubash RM, Neradilek B, Polissar NL. Evaluation of otoscope cone disinfection techniques and contamination level in small animal private practice. *Vet Dermatol.* 2010; 21(2): 175-83.

Kiss G, Radványi S, Szigeti G. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. *J Small Anim Pract.* 1997a; 38(2): 51-6.

Kiss G, Radványi S, Szigeti G, Lukats B, Nagy G. New combination for the therapy of canine otitis externa II. Efficacy in vitro and in vivo. *J Small Anim Pract.* 1997b; 38(2): 57-60.

Knutsson J. Morphology and biochemistry of the tympanic membrane in relation to retraction pathology (dissertation). Karolinska Institutet, Schweden; 2010.

Koch HJ, Peters S. Erkrankungen des äußeren Ohres aus dermatologischer Sicht. 1991; Drupa-Verlag

- Kowalski JJ. The microbial environment of ear canal in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988; 18(4): 743-54.
- Kraft W. Otoskopie bei Hund und Katze. *Tierärztliche Endoskopie.* 1<sup>st</sup> ed. Stuttgart: Schattauer; 1993. p. 171-6.
- Kumar A, Roman-Auerhahn MR. Anatomy of the canine and feline ear. In: Gotthelf LN, editor. *Small Animal ear diseases, An illustrated guide.* 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 1-22.
- Kuyyakanond T, Quesnel LB. The mechanism of action of chlorhexidine. *FEMS Microbiol Lett.* 1992; 19(1-3): 211-5.
- Lambert RJ, Hanlon GW, Denyer SP. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *J Appl Microbiol.* 2004; 96(2): 244-53.
- Lane JG, Watkins PE. Para-aural abscesses in the dog and cat. *J Small Anim Pract.* 1986; 27(8): 521-31.
- Lanz OL, Wood BC. Surgery of the ear and pinna. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004; 34(2): 597-99.
- Lefebvre HP, Schneider M, Dupouy V, Laroute V, Costes G, Delesalle L, Toutain PL. Effect of experimental renal impairment on disposition of marbofloxacin and its metabolites in the dog. *J Vet Pharmacol Ther.* 1998; 21(6): 453-61.
- Lehner G, Sauter Louis CS, Mueller RS. Reproducibility of ear cytology in dogs with otitis externa. *Vet Rec.* 2010; 167 (1): 23-6.
- Liebich H.-G. *Funktionelle Histologie*, 2.Auflage Schattauer 1993. p. 315-21.
- Lilenbaum W, Veras M, Blum E, Souza GN. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett Appl Microbiol.* 2000; 31(1): 42-5.
- Linek M. Otitis externa und media bei Hund und Katze. *Tierärztl Prax.* 2011; 39 (K): 451–463.

- Linek M. Management der atopischen Dermatitis-Wie sich verschiedene Therapien zu einem Konzept addieren. Proceedings der 12<sup>ten</sup> Jahrestagung der DGVD; 2011 Mai 27-29; Berlin, Deutschland. 2011. p. 42-3.
- Little CJ, Lane JG. An evaluation of tympanometry, otoscopy and palpation for assessment of the tympanic membrane. Vet Rec. 1989; 124: 5-8.
- Little CJ, Lane JG, Gibbs C, Pearson GR. Inflammatory middle ear disease of the dog: the clinical and pathological features of cholesteatoma, a complication of otitis media. Vet Rec. 1991; 128(14): 319-22.
- Lloyd DH, Bond R, Lamport I. Antimicrobial activity in vitro and in vivo of a canine ear cleanser. Vet Rec. 1998; 143(4): 111-2.
- Logas DB. Otitis externa, etiology and pathogenesis/Diagnosis and medical treatment of otitis externa. Proceedings der 2<sup>ten</sup> Tagung der DGVD; 1999 Juni 04-06, Baden-Baden, Deutschland; 1999. p. 12-22.
- Long SN, Anderson TJ, Long FH, Johnston PE. Evaluation of rapid staining techniques for cytological diagnosis of intracranial lesions. Am J Vet Res. 2002; 63(3): 381-6.
- Lorenzini R, Mercantini R, De Bernardis F. In vitro susceptibility of Malassezia spp. to various antimycotics. Drugs Exp Clin Res. 1985; 11(6): 393-5.
- Lu YF, McEwan NA. Staphylococcal and micrococcal adherence to canine and feline corneocytes: quantification using a simple adhesion assay. Vet Dermatol. 2007; 18(1): 29-35.
- Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. J Am Vet Med Assoc. 1999; 214: 1336-41.
- Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2007; 54(10): 559- 63.

- Makino K, Amatsu M. Epithelial migration on the tympanic membrane and external canal. *European Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 1986; 243(1): 39-42.
- Marcos R, Santos M, Malhão F, Ferreira F, Monteiro RA, Rocha E. Use of destained cytology slides for the application of routine special stains. *Vet Clin Pathol*. 2009; 38(1): 94-102.
- Marignac G. Diseases that Affect the Pinna. In: Gotthelf LN, editor. *Small Animal ear diseases, An illustrated guide*. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 235-64.
- Martin Barrasa JL, Lupiola GP, Gonzáles LZ, Tejedor JMT. Antibacterial Susceptibility patterns of *Pseudomonas* Strains from Isolated from Chronic Canine Otitis Externa. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2000; 47(3): 191- 6.
- Mason A, Griffin C. Canine and Feline Ear Disease. In: Moriello K, Mason I, editors. *Handbook of small animal dermatology*. St. Louis: Elsevier Science Ltd, 1995. p. 259-67.
- Mason LK, Harvey CE, Orsher RJ. Total ear canal ablation combined with lateral bulla osteotomy for end-stage otitis in dogs. Results in thirty dogs. *Vet Surg*. 1988; 17(5): 263-8.
- Matousek JL. Diseases of the Ear Pinna. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2004; 34(2): 511-40.
- McCarthy PE, Hosgood G, Pechman RD. Traumatic ear canal separations and para- aural abscessation in three dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 1995; 31(5): 419-24.
- McDonnell G, Russell D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin Micro Rev*. 1999; 12: 147-79.
- McKay L, Rose CS, Matousek JL, Schmeitzel LS, Gibson NM, Gaskin JM.

- Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis. J Am Anim Hosp Assoc. 2007; 43: 307-12.
- McKeever PJ. Otitis externa. In: Locke PH, Harvey RG, Mason IS. editors. BSAVA Manual of small animal dermatology. 1993. p. 131-40.
- McKeever PJ, Torres AM. ear disease and its management. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1997; 27(6): 1523–36.
- Melman SA. Simple Diagnosis and Treatment of Pruritic Otitis. In: Gotthelf LN. editor. Small Animal ear diseases, An illustrated guide. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 265-74.
- Mendelsohn C, Rosenkrantz W, Griffin CE. Practical cytology for inflammatory skin disease. Clin Tech Small Anim Pract. 2006; 21: 117-27.
- Merchant SR, Neer TM, Tedford BL, Twedt AC, Cheramie PM, Strain GM. Ototoxicity assessment of a chlorhexidine otic preparation in dogs. Progress in Vet Neurol. 1993; 4(3): 72-5.
- Mills PC, Ahlstrom WJ. Ototoxicity and tolerance assessment of a trisEDTA and polyhexamethylene biguanide ear flush formulation in dogs. J Vet Pharmacol Therap. 2005; 28(4): 391-7.
- Mischke R. Weitere Behandlung der zytologischen Präparate. In: Mischke R. Herausgeber. Zytologisches Praktikum für die Veterinärmedizin. Schlütersche. 2005. p. 49- 62.
- Moll JR, Eeg PH, Berger N. Laser ear surgery. In: Gotthelf LN. editor. Small Animal ear diseases, An illustrated guide. 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 349-76.
- Morris DO. Medical therapy of otitis externa and otitis media. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004, 34(2): 541-55.
- Morris DO, Boston RC, O`Shea K, Rankin SC. The prevalence of carriage of methicillin-resistant staphylococci by veterinary dermatology practice staff and their respective pets. Vet Dermatol. 2010; 21(1): 400-7.

Mueller RS. Der Patient mit Otitis externa. In: Mueller RS, Herausgeber. Das Handbuch für die Kleintierpraxis, Dermatologie made easy. Berlin: Lehmanns Media GmbH, 2003. p. 107-13.

Mueller RS, Bensignor E, Ferrer L, Holms B, Lemarie S, Paradis M, Shipstone MA. Treatment of demodicosis in dogs: 2011 clinical practice guidelines. Vet Dermatol. 2012; 23(2): 86-96.

Mueller RS, Bettenay SV. A proposed new therapeutic protocol for the treatment of canine mange with ivermectin, J Am Anim Hosp Assoc. 1999; 35: 77-80.

Müller E, Heusinger A. Mikrobiologische Ergebnisse von Ohrtupfern bei Hund und Katze. Tierärztl Prax. 1994; 22: 80-4.

Müller E, Horn S. Wirksamkeit von Enrofloxacin und Marbofloxacin gegen Bakterienisolate von Hund und Katze - In vitro Studie zur Resistenzlage. Praktischer Tierarzt. 2009; 90(6): 512-21.

Nett-Mettler C. Immunvermittelte Dermatoze von Kopf und Pfoten und ihre Differenzialdiagnosen: Veränderungen im Bereich von Liedern und Ohren. Proceedings der 11<sup>ten</sup> Jahrestagung der DGVD; 2010a Juni 11-13; Bad Honnef, Deutschland; 2010. p. 8-12

Nett-Mettler C. Diagnose und klinisches Bild der futtermittelinduzierten atopischen Dermatitis des Hundes. Proceedings der 11<sup>ten</sup> Jahrestagung der DGVD; 2010b Juni 11-13; Bad Honnef, Deutschland; 2010. p. 24-5.

Newton HM, Rosenkrantz WS, Muse R, Griffin CE. Evaluation of otoscope cone cleaning and disinfection procedures commonly used in veterinary medical practice: a pilot study. Vet Dermatol. 2006; 17: 147- 50.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band I, Bewegungsapparat, 6. Auflage, Parey 1992 a; 179-82; 285-6; 298-311.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band III, Kreislaufsystem, 2. Auflage Parey 1992 b; 105-15; 223-40; 320-3.

Nickel R, Schummer A, Seiferle E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band

IV, Nervensystem, Gehirnnerven; Sinnesorgane, Gehör- und Gleichgewichtsorgan, 3. Auflage, Parey 1992 c; 299-349; 444-72.

Noguchi N, Okihara T, Namiki Y, Kumaki Y, Yamanaka Y, Koyama M, Wakasugi K, Sasatsu M. Susceptibility and resistance genes to fluoroquinolones in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in 2002. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25(5): 374-9.

Noli C, Scarampella F. *Praktische Dermatologie bei Hund und Katze*, 2ed. Hannover: Schlütersche; 2005.

Nutall TJ. Use of ticarcillin in the management of canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Small Animal Practice*. 1998; 39: 165-8.

Nutall T, Cole LK. Ear cleaning: the UK and US perspective. *Vet Dermatol*. 2004; 15: 127-36.

Oliveira LC, Leite CAL, Brilhante RSN, Carvalho CBM. Comparative study of the microbial profile from bilateral otitis externa. *Can Vet J*. 2008; 49: 785-8.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nutall T, Prélaud P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol*. 2010; 21(3): 233-48.

Olivry T, Rivierre C, Murphy KM. Efficacy of cyclosporine for treatment induction of canine pemphigus foliaceus. *Vet Rec*. 2003; 152: 53-4.

Osthold W, Beck J, Stechmann K, Hofmann T. Ohrzytologie in der Kleintierpraxis- adspektorische, parasitologische und zytologische Aspekte. *Der Praktische Tierarzt*. 2005; 86(6): 390-7.

Osthold W, Wagner R. Otitis externa bei Hund und Katze. *Kleintiermedizin*. 2009; 9/10: 262-75.

Osthold W, Wagner R. Strategisches Vorgehen bei Otitis externa: Diagnose und medikamentelle Therapie bei Hund und Katze. *Der Praktische Tierarzt*.



2008; 89(9): 716-26.

Pankow WR, Bolkart B. Zur Wirksamkeit von AURIZON® bei akuter und chronischer Otitis externa (Hund) unter besonderer Berücksichtigung der antimikrobiellen Aktivität von Marbofloxacin. Vetoquinol GmbH, Chassot GmbH, 88212 Ravensburg, Manuskript „AURIZON® 2004“

Park JK, Lee SK, Park SJ, Hong IH, Jeong KS. Fibroma with osseous metaplasia of external auditory canal in a dog. J Vet Diagn Invest. 2010; 22(4): 635-8.

Paterson S. A review of 200 cases of otitis externa in the dog. Abstracts of the 17<sup>th</sup> Annual Congress of the ESVD-ECVD. Vet Dermatol. 2003; 14: 237-67.

Paterson S. Pseudomonas Otitis. Consultant on call/NAVC Clinician`s Brief/June 2010.[http://www.vetnova.net/N\\_0/descarga/NAVC%20Clinician's%20Brief%20-%20Consultant%20On%20Call%20-%20Susan%20Paterson%20-%20Pseudomonas%20Otitis%20-%20June%202010.pdf](http://www.vetnova.net/N_0/descarga/NAVC%20Clinician's%20Brief%20-%20Consultant%20On%20Call%20-%20Susan%20Paterson%20-%20Pseudomonas%20Otitis%20-%20June%202010.pdf)

Penna B, Varges R, Medeiros L, Martins GM, Martins RR, Lilenbaum W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. Vet Dermatol. 2010; 21(3): 292-6.

Petersen AD, Walker RD, Bowmann MM, Schott HC 2<sup>nd</sup>, Rosser EJ Jr. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility patterns of Staphylococcus intermedius and Pseudomonas aeruginosa isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period ( 1992-1997). J Am Anim Hosp Assoc. 2002; 38(5): 407-13.

Pickrell JA, Oehme FW, Cash WC. Ototoxicity in dogs and cats. Semin Vet Med Surg (Small Anim). 1993; 8(1): 42-9.

Pietschmann S, Hoffmann K, Voget M, Pison U. Synergistic effects of Miconazole and Polymixin B on microbial pathogens. Vet Res Commun. 2009; 33(6): 489-505

Poulet FM, Valentine BA, Scott DW. Focal proliferative eosinophilic dermatitis of the external ear canal in four dogs. Vet Path. 1991; 28: 171-3.

- Pundir S. Clinico-Diagnosis and therapeutic Management of bacterial and fungal infections of canine ear with special reference to molecular characterization of certain pathogens (dissertation). Anand Agricultural University, India; 2007.
- Qiu D, Huang Z, Zhou T, Shen C, Hider RC. *In vitro* inhibition of bacterial growth by iron chelators. FEMS Microbiol Lett. 2011; 314: 107-11.
- Reme CA, Pin D, Collinot C, Cadiergues MC, Joyce JA, Fontaine J. The efficacy of an antiseptic and microbial anti-adhesive ear cleanser in dogs with otitis externa. Vet Ther. 2006; 7(1): 15-26.
- Rice LB. Challenges in identifying new antimicrobial agents effective for treating infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Infect Dis. 2006; 43 Suppl 2: 100-5.
- Rogers KS. Tumors of the ear canal. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1988; 18(4): 859-68.
- Rosenkrantz WS. Pemphigus: current therapy. Vet Dermatol. 2010; 15(2): 90-8.
- Rosser EJ. Evaluation of the patient with otitis externa. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1988; 18(4): 765-72.
- Rosser EJ Jr. Causes of Otitis Externa. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2004; 34(2): 459-68.
- Rosychuk RA. Management of otitis externa. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1994; 24(5): 921-52.
- Rosychuk RA, Luttgen P. Diseases of the ear. In: Ettinger SJ, Feldman EC. editors. Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat 5th edition. Philadelphia: WB Saunders; 2000. p. 986-1002.
- Roth L. Pathologic changes in otitis externa. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1988; 18(4): 755-64.
- Rougier S, Borell D, Pheulpin S, Woehrle F, Boisrame B. A Comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of

canine otitis externa. Vet Dermatol. 2005; 16: 299-307.

Rycroft AK, Saben HS. A clinical study of otitis externa in the dog. Can Vet J. 1977; 18(3) 64-70.

Salo E, Sancho PJ, Verde MT, Rios A, Morales R, Eguiluz C. Clinical Assessment of an Association of Marbofloxacin, Clotrimazole and Dexamethasone in Eardrops Suspension for the Treatment of Otitis Externa of Both Bacterial and Fungal Origin in Dogs. Proceedings of the 27<sup>th</sup> WSAVA Congress; 2002 October 03-05; Granada, Spain. 2002. <http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2733>

Sanchez IR, Swaim SF, Nusbaum KE, Hale AS, Henderson RA, McGuire JA. Effects of chlorhexidine diacetate and povidone-iodine on wound healing in dogs. Vet Surg. 1988; 17(6): 291-5.

Sanchez-Leal J, Mayos I, Homedes J, Ferrer L. *In vitro* investigation of ceruminolytic activity of various otic cleansers for veterinary use. Vet Dermatol. 2006; 17: 121-7.

Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinast AF. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. Vet Dermatol. 2007; 18: 341-47.

Saridomichelakis MN. Diagnostic approach to otitis. Proceedings of the WSAVA continuing education program; 2008 Nov 19-22; Hong Kong, China. 2008. p. 87-94.

Saridomichelakis MN. Clinical manifestations and diagnosis of canine atopic dermatitis. Proceedings der 11ten Jahrestagung der DGVD; 2010 Juni 11-13; Bad Honnef, Deutschland. 2010. p. 20-3.

Schick AE, Angus JC, Coyner KS. Variability of laboratory identification and antibiotic susceptibility reporting of *Pseudomonas* spp. isolates from dogs with chronic otitis externa. Vet Dermatol. 2007; 18: 120-6.

Schmidt K., PiaiaT, Bertolini G, De Lorenzi D. External auditory canal atresia of

- probable congenital origin in a dog. *J Small Anim Pract.* 2007; 48(4): 233-6.
- Schnorr B. Embryologie der Haustiere, Enke. 1989. p. 128-31.
- Schwarz S, Silley P, Simjee S, Woodford N, van Duijkeren E, Johnson AP, Gaastra W. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 601–4.
- Scott DW, Paradis M. A survey of canine and feline skin disorders seen in a university practice: Small Animal Clinic, University of Montreal, Saint-Hyacinthe, Québec (1987-1988). *Can Vet J.* 1990; 31: 830-5.
- Senthil K, Selvaraj P, Vairamuthu S, Mala Shammi, Kathiresan D. Antibigram patterns of microbes isolated from otitis externa of dogs. *Tamilnadu J Vet & Anim Science.* 2010; 6(3): 145-7.
- Shanthi M, Sekar U. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections among hospitalized patients: risk factors and outcomes. *J Assoc Physicians India.* 2009; 57: 636, 638-40, 645.
- Solano M. Diagnostic Imaging of the Ear. In: Gotthelf LN, editor. *Small Animal ear diseases, An illustrated guide.* 2nd ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2005. p. 77-110.
- Stern-Sertholtz W, Sjöström L, Håkanson NW. Primary secretory otitis media In the Cavalier King Charles spaniel: a review of 61 cases. *J Small Anim Pract.* 2003; 44: 253-6.
- Stout-Graham M, Kainer RA, Whalen LR, Macy DW. Morphologic measurements of the external horizontal ear canal of dogs. *Am J Vet Res.* 1990; 51(7): 990-4.
- Strain GM. Deafness prevalence and pigmentation and gender associations in dog breeds at risk. *Vet J.* 2004; 167(1): 23-32.
- Sturges BK, Dickinson PJ, Kortz GD, Berry WL, Vernau KM, Wisner ER, LeCouteur, RA. Clinical signs, magnetic resonance imaging features, and

outcome after surgical and medical treatment of otogenic intracranial infection in 11 cats and 4 dogs. J Vet Intern Med. 2006; 20(3): 648-56.

Swanton A-K, Cikota R, Guardabassi, L. Tris-EDTA and 0,15%iges Chlorhexidin als alleinige Behandlung der Otitis externa beim Hund, icfBulletin Results, 2009,[http://www.dermavet.com/adm/upload/clients/icf/icfBulletin\\_Otodine\\_in\\_vivo.pdf](http://www.dermavet.com/adm/upload/clients/icf/icfBulletin_Otodine_in_vivo.pdf)

Swinney A, Fazakerley J, McEvan N, Nutall T. Comparative *in vitro* antimicrobial efficacy of commercial ear cleaners. Vet Dermatol. 2008; 19: 373-9.

Tabacca NE, Cole LK, Hillier A, Rajala-Schultz. Epithelial migration on the canine tympanic membrane. Abstracts of the NAVDF 2011 April 13-16; Galveston, Texas, USA. Vet Dermatol. 2011; 22: 289-304.

Tacke S. Modernes Schmerzmanagement im perioperativen Zeitraum- Einsatz von Opioiden bei Hund und Katze. Kleintiermedizin. 2010; 13(5/6): 147-54.

Tater KC, Scott DW, Miller WH Jr, Erb HN. The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2003; 50(7): 370-4.

Tatnall FM, Leigh IM, Gibson JR. Comparative Study of Antiseptic Toxicity on basal Keratinocytes, Transformed Human Keratinocytes and Fibroblasts. Skin Pharmacol. 1990; 3(3): 157-63.

Tejedor JMT, Martin Barrasa JL. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive staphylococci isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2002; 49(9): 419-23.

Tejedor MT, Martin JL, Navia M, Freixes J, Vila J. Mechanisms of fluorquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. Vet Microbiol. 2003; 94(4): 295-301.

ter Haar G. Inner ear dysfunction related to ear disease in dogs and cats.

- European J Companion Animal Practice; 2006; 16(2): 127-35.
- Teske E, Slappendel RJ. Cytology in companion animal medicine. Proceedings of the ESVD-Workshop Clinical Pathology, Nantes, Frankreich; 1997 July 09-12; 1997. p. 1-6.
- Tobias KM, Morris D, The ear. In: Brockman DJ, Holt DE, editors. BSAVA Manual of canine and feline head, neck and thoracic surgery. Quedgeley, UK: British Small Anim Vet Assoc. 2005. p. 56-72.
- Toma S, Cornegiani L, Persico P, Noli C. Comparison of 4 fixation and staining methods for the cytologic evaluation of ear canals with clinical evidence of ceruminous otitis externa. Vet Clin Pathol. 2006; 35(2): 194-8.
- Trott DJ, Moss SM, See AM. Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. Austral Vet J. 2007; 85: 464-6.
- Trower ND, Gregory SP, Renfrew H, Lamb CR. Evaluation of the canine tympanic membrane by positive contrast ear canalography. Vet Rec. 1998; 142(4): 78-81.
- Tvedten H, Cowell RL. Zytologie neoplastischer und entzündlicher Gewebe. In: Willard MD, Tvedten H; Herausgeber. Labordiagnostik in der Kleintierpraxis, 1st ed. München: Elsevier; 2006. p. 437-65.
- Vaara M. Agents That Increase the Permeability of the Outer Membrane. Microbio Mol Biol Rev. 1992; 56(3): 395-411.
- van der Gaag I. The pathology of the external ear canal in dogs and cats. Vet Q. 1986; 8(4): 307-17.
- Vanni M, Tognetti R, Pretti C, Crema F, Soldani G, Meucci V, Intorre L. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. Res Vet Sci. 2009; 87(2): 192-5.

- Weber DJ, Rutala WA. Use of germicides in the home and the healthcare settings: is there a relationship between germicide use and antibiotic resistance?. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2006; 27(10): 1107-19.
- Wefstaedt P, Behrens B-A, Nolte I, Bouguecha A. Finite element modeling of the canine and feline outer ear canal: benefits for local drug delivery? *Berl Münch Tierärztl Wochenschr.* 2011; 124: 78-82.
- White-Weithers N. Ceruminous Diseases of the Ear. In: Gotthelf LN, editor. *Small Animal ear diseases, An illustrated guide.* 2<sup>nd</sup> ed. St. Louis: Elsevier Saunders. 2005. p. 203-20.
- Wilcke JR. Otophamacology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1988; 18(4): 783-97.
- Wildermuth BE, Griffin CE, Rosenkrantz WS, Boord MJ. Susceptibility of *Pseudomonas* Isolates From the Ears and Skin of Dogs to Enrofloxacin, Marbofloxacin and Ciprofloxacin. *J Am Animal Hosp Assoc.* 2007; 43: 337-41.
- Wolfe TM, Bateman SW, Cole LK, Smeak DD. Evaluation of a local anaesthetic delivery system for postoperative analgesic management of canine total ear canal ablation- a randomized, controlled, double-blinded study. *Vet Anaesth Analg.* 2006; 33(5): 328-39.
- Wooley RE, Jones MS. Action of EDTA-Tris and microbial agent combinations on selected pathogenic bacteria. *Vet Microbiol.* 1983; 8(3): 271-80.
- Wooley RE, Jones MS, Gilbert JP, Shotts EB. In vitro action of combinations of antimicrobial agents and EDTA-tromethamine on *Escherichia coli*. *Am J Vet Res.* 1983a; 44(6): 1154-8.
- Wooley RE, Jones MS, Gilbert JP, Shotts EB. In vitro action of combinations of antimicrobial agents and EDTA-tromethamine on *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Vet Res.* 1983b; 44(8): 1521-4.
- Wooley RE, Jones MS, Gilbert JP, Shotts EB. In vitro effect of combinations

of antimicrobial agents and EDTA-tromethamine on certain gram-positive bacteria. Am J Vet Res. 1983c Nov; 44(11): 2167-9.

Woolley KL, Kelly RF, Fazakerley J, Williams NJ, Nuttall TJ, McEwan NA.

Reduced in vitro adherence of *Staphylococcus* species to feline corneocytes compared to canine and human corneocytes. Vet Dermatol. 2007; 19(1):1-6.

Yoshida N, Naito F, Fukata T. Studies of Certain Factors Affecting the

Microenvironment and Microflora of the External Ear of the Dog in Health and Diseases. J Vet Med Sci. 2002; 64(12): 1145-7.

Zamankhan MH, Jamshidi S, Zahraei ST. Identification and antimicrobial

susceptibility patterns of bacteria causing otitis externa in dogs. Vet Res Commun. 2010; 34(5): 435-44.

Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant

*Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010; 8(1): 71-93.

Zenner H. Hören und Sprechen. Klinker R, Silbernagel S, Herausgeber.

Lehrbuch der Physiologie. Stuttgart: Thieme; 1994. p. 577-94.

Zur G. Bilateral ear canal neoplasia in three dogs. Vet Dermatol. 2005; 16: 276-80.

Zur G, Ihrke PJ, White SD, Kass PH. Canine atopic dermatitis: a retrospective

study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998, Part I. Clinical features and allergy testing results. Vet Dermatol. 2002; 13(2): 89-102.

Zur G, White SD, Ihrke PJ, Kass PH, Toebe N. Canine atopic dermatitis: a

retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992- 1998. Part II. Response to hyposensitization. Vet Dermatol. 2002; 13(2): 103-11.



## VIII Anhang

### 1. Tabellen

**Tabelle A: Patientendaten/Signalement, Klinik mit Seitenverteilung und Verum/Plazebo-Identifikation**

StNr	Rasse	Alter	Geschl	Seite	Kl I li	Kl I re	Kl II li	Kl II re	Ve/Pl
01	1	3,5	4	3	1	2	7	7	2
02	2	7	4	3	3	2	2	1	2
03	3	2	3	3	3	3	1	1	2
04	4	4,5	3	3	2	3	7	7	2
05	3	3	1	3	3	1	2	1	2
06	5	9,25	1	3	4	4	1	1	2
07	1	11	3	2	3	--	1	--	1
08	1	0,75	1	3	1	3	1	1	1
09	5	7	2	3	3	3	7	7	1
10	6	5	4	3	4	3	1	1	1
11	4	6	4	2	6	--	ne	--	1
12	7	3	3	1	--	4	--	7	1
13	1	3,5	1	3	4	4	2	2	2
14	5	5	3	3	4	4	4	1	2
15	8	9,75	4	3	1	1	7	7	2
16	6	1,25	1	3	3	3	7	7	2
17	1	6	1	2	6	--	5	--	2
18	9	6	2	3	3	1	7	7	2
19	10	3,25	4	2	1	--	7	--	1
20	5	0,25	1	1	--	2	--	1	1
21	5	13,5	2	3	4	4	ne	ne	1
22	11	6,5	4	3	1	1	7	1	1
23	12	4,5	3	3	6	6	6	1	1
24	3	3	4	3	4	4	1	1	1
25	13	9,75	1	3	1	4	ne*	ne*	2
26	14	7	3	3	2	2	2	2	2
27	15	2,25	1	3	3	3	1	2	2

28	16	14,5	4	3	4	4	2	2	2
29	6	8	2	1	--	4	--	1	2
30	17	0,25	3	3	1	3	1	1	2
31	3	7	1	3	4	4	4	4	1
32	18	0,75	4	1	--	2	--	1	1
33	19	10,75	3	3	2	2	7	1	1
34	20	1,25	3	3	2	2	7	7	1
35	6	0,75	3	3	1	4	7	7	1
36	1	2	1	3	4	4	ne	ne	1
37	5	0,75	3	3	4	4	2	4	2
38	5	12	3	3	4	1	2	7	2
39	21	4	3	3	2	2	ne	ne	2
40	9	6	1	3	2	2	2	2	2
41	6	16,75	4	1	--	4	--	7	2
42	5	8,5	1	3	4	4	1	1	2
43	9	7	1	3	6	6	1	1	1
44	22	0,75	1	2	4	--	ne	--	1
45	6	11	3	1	--	2	--	7	1
46	23	7	4	1	--	4	--	ne	1
47	17	4	1	1	--	4	--	ne	1
48	24	5,5	2	2	6	--	4	--	1
49	6	1	4	2	1	--	7	--	2
50	18	2	1	2	3	--	7	--	2
51	1	7,25	1	3	3	3	1	1	2
52	4	2	1	2	4	--	1	--	2
53	6	13	3	2	1	--	1	--	2
54	22	12,5	1	2	6	--	6	--	2
55	22	5	3	1	3	--	7	--	1
56	25	10,75	3	2	3	--	7	--	1
57	6	11	3	3	3	3	1	1	1
58	26	5,5	1	3	3	4	2	1	1
59	23	3	3	3	2	2	2	2	1
60	6	13	2	2	2	--	1	--	1

61	18	2	1	1	--	2	--	7	2
62	1	0,5	1	1	--	1	--	7	2
63	6	3,5	1	1	--	4	--	1	2
64	6	10,75	3	3	1	1	7	7	2
65	6	4	1	3	4	4	7	7	2
66	6	3,5	1	2	4	--	ne	--	2
67	18	3	3	3	2	2	7	7	1
68	4	4,25	3	1	--	3	--	7	1
69	1	11	2	1	--	4	--	4	1
70	27	11	4	3	2	2	7	7	1
71	26	4	3	3	2	2	1	1	1
72	6	0,75	1	2	6	--	ne	--	1
73	16	10	1	1	--	4	--	7	2
74	5	2	1	3	2	2	2	2	2
75	6	10	2	3	2	2	ne	ne	2

Index:

StNr = Studiennummer, fortlaufend

Rasse:	Anzahl:	Ausgeschieden:	Ausgewertet:
1=Deutscher Schäferhund	9	1	8
2=Hovawart	1		1
3=Beagle	4		4
4=Jack Russel Terrier	4	1	3
5=Labrador	9	1	8
6=Mischling	16	3	13
7=Galgo	1		1
8=Bearded Collie	1		1
9=Englische Bulldogge	3		3
10=Malinois	1		1
11=Welsh Springer Spaniel	1		1
12=Bernhardiner	1		1
13=Dackel (Rauhaar)	1	1	0
14=Amerikanischer Cocker Spaniel	1		1
15=Dalmatiner	1		1
16=Westhighland White Terrier	2		2

17=Schaapendoes	2	1	1
18=Golden Retriever	4		4
19=Cocker Spaniel	1		1
20=Shar Pei	1		1
21=Neufundländer	1	1	0
22=Berner Sennen Hund	3	1	2
23=Standardpudel	2	1	1
24=Griffon	1		1
25=Wolfsspitz	1		1
26=Boxer	2		2
27=Magya-Viszla	1		1

---

Gesamtzahl der Studienpopulation      75                      11                      64

Geschl=Geschlecht: 1=männlich, 2=männlich kastriert, 3=weiblich, 4=weiblich kastriert

Seite: 1=*Otitis externa* unilateral, rechts, 2=*Otitis externa* unilateral, links, 3=*Otitis externa* bilateral

Kl I li=klinische Klassifizierung der *Otitis externa* Erstuntersuchung linkes Ohr

Kl I re=klinische Klassifizierung der *Otitis externa* Erstuntersuchung rechtes Ohr

Kl II li=klinische Klassifizierung der *Otitis externa* Kontrolluntersuchung linkes Ohr

Kl II re=klinische Klassifizierung der *Otitis externa* Kontrolluntersuchung rechtes Ohr

1=*Otitis externa erythematosa*

2=*Otitis externa ceruminosa*

3=*Otitis externa erythematosa et ceruminosa*

4=*Otitis externa purulenta*

5=*Otitis externa proliferativa*

6=*Otitis externa purulenta et proliferativa*

7=klinische ohne besonderen Befund bei der Kontrolluntersuchung = obB

--=keine *Otitis externa* bei Erstuntersuchung/Kontrolluntersuchung

ne= nicht zur Kontrolluntersuchung erschienen

ne\*= Euthanasie vor Kontrolluntersuchung aus anderen Gründen

Ve/Pl=Verum oder Plazebo

1=Verum (Epibac® Ohrreiniger, Alfavet, Neumünster, D)

2=Plazebo (Alfavet, Neumünster, D)

**Tabelle B: Ergebnisse Zytologie für den Vergleich der Färbeverfahren und die Übereinstimmung mit der mikrobiologischen Untersuchung; Kokken und Stäbchen mit Einstufung in fünf Kategorien nach Durchmustern (Ölimmersion)**

ID	Diff-Quik® Kokken	Gram® Kokken	Diff-Quik®/Aceton Kokken	Alfavet Otitis Färbeset Kokken	Mikrobiologische Untersuchung	Diff-Quik® Stäbchen	Gram® Stäbchen	Diff-Quik®/Aceton Stäbchen	Alfavet Otitis Färbeset Stäbchen	Mikrobiologische Untersuchung
<b>Vor Therapie</b>										
1 li	2	2	2	2	2	0	1	1	0	3
1 re	3	3	3	2	3	0	0	1	1	0
2 li	1	1	1	1	2	0	0	0	0	0
2 re	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0
3 li	1	1	2	1	1	0	0	0	0	0
3 re	4	1	2	1	0	0	0	0	0	0
4 li	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
4 re	2	3	3	2	0	0	0	0	0	0
5 li	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0
5 re	2	3	1	1	0	0	0	0	0	0
6 li	2	2	2	1	0	4	4	4	2	4
6 re	2	3	3	1	0	4	4	4	0	4
7 li	3	3	3	1	3	0	0	0	0	0
7 re										
8 li	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
8 re	1	1	2	1	2	1	1	1	0	1
9 li	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
9 re	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
10 li	3	3	3	0	3	1	1	1	0	0
10 re	2	2	2	0	2	1	0	0	0	0
11 li	4	4	4		3	0	0	0		0
11 re										
12 li										
12 re	3	3	3		2	0	0	0		0
13 li	4	4	4		3	2	0	0		0
13 re	2	3	3		3	0	0	0		0
14 li	1	2	1		0	4	4	4		4
14 re	1	2	2		0	4	4	4		3
15 li	1	1	1		2	0	0	0		0
15 re	1	1	0		2	1	1	1		2
16 li	2	2	2		3	0	1	1		0
16 re	2	2	2		3	1	1	1		3

17 li	4	4	4		3	3	3	3		4
17 re										
18 li	1	1	1		0	0	0	0		0
18 re	1	2	1		0	1	0	0		0
19 li	0	1	0		0	1	1	1		2
19 re										
20 li										
20 re	1	1	1		0	1	1	1		1
21 li	4	3	4		4	1	0	0		0
21 re	4	4	4		4	0	0	0		0
22 li	1	2	2		3	1	1	1		1
22 re	1	1	1		0	0	0	0		3
23 li	4	4	4		3	4	4	4		4
23 re	4	4	4		3	4	4	4		4
24 li	1	2	2		2	1	1	2		0
24 re	1	2	2		2	2	1	2		1
25 li	2	2	2		3	4	4	4		0
25 re	4	4	4		4	1	1	1		0
26 li	4	3	4		4	1	0	0		0
26 re	4	4	4		4	0	0	0		0
27 li	1	2	1		2	0	0	0		0
27 re	2	2	2		3	0	0	0		0
28 li	2	1	1		3	0	1	1		0
28 re	4	4	4		3	1	1	1		0
29 li										
29 re	1	1	0		0	0	0	0		0
30 li	1	1	1		2	0	0	0		0
30 re	0	0	1		2	0	0	0		0
31 li	2	2	2		0	4	4	4		4
31 re	2	2	2		0	4	4	4		3
32 li										
32 re	0	0	1		0	0	0	0		0
33 li	1	1	2		2	0	0	0		0
33 re	2	2	1		0	1	0	0		2
34 li	0	0	0		1	0	0	0		0
34 re	1	1	1		3	0	0	0		0
35 li	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
35 re	1	2	2	2	2	0	0	0	0	0
36 li	3	3	3		0	4	4	4		4
36 re	4	4	4		4	4	4	4		4
37 li	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
37 re	1	1	1	1	0	1	1	1	1	2
38 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38 re	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0
39 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39 re	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 li	3	2	3	1	3	1	1	3	1	0
40 re	4	4	4	1	3	4	4	4	1	0
41 li	4	4	4	3	4	0	0	0	0	0
41 re										

42 li	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
42 re	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
43 li	4	4	4		4	4	3	4		4
43 re	3	3	3		3	4	4	4		3
44 li	4	4	4	4	3	2	2	2	2	0
44 re										
45 li										
45 re	2	2	2	0	0	4	4	4	1	0
46 li										
46 re										
47 li										
47 re	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0
48 li	2	2	3	1	0	0	0	0	0	2
48 re										
49 li	1	1	2	2	2	0	0	0	0	0
49 re										
50 li	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
50 re										
51 li	3	2	2	1	2	2	2	2	1	0
51 re	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
52 li	4	4	4	4	3	4	4	4	3	0
52 re										
53 li	1	1	1	0	0	0	0	0	0	2
53 re										
54 li	3	4	4	3	2	4	4	4	4	4
54 re										
55 li										
55 re	3	1	1	1	4	0	0	0	0	0
56 li	3	1	1	1	1	2	2	2	1	2
56 re										
57 li	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0
57 re	2	2	1	1	3	0	0	0	0	0
58 li	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
58 re	1	0	1	1	0	1	1	0	0	2
59 li	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
59 re	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60 li	2	1	1	1	0	1	0	0	0	0
60 re										
61 li										
61 re	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
62 li	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0
62 re										
63 li										
63 re	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
64 li	1	1	1	1	0	1	1	0	1	3
64 re	2	1	1	1	2	1	1	1	1	3
65 li	3	3	3	1	0	2	2	2	1	3
65 re	3	3	3	3	0	4	4	4	4	3
66 li	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
66 re										

67 li	3	2	2	2	0	3	3	2	0	3
67 re	2	2	2	1	0	2	2	2	0	3
68 li										
68 re	4	4	2	2	3	1	0	0	0	2
69 li										
69 re	3	3	4	3	0	4	4	4	4	4
70 li	0	0	0	0	0	0	1	0	0	3
70 re	3	1	2	1	0	4	2	2	1	3
71 li	4	3	4	1	4	3	2	2	1	4
71 re	3	4	4	4	4	4	4	4	4	0
72 li	2	2	2	2	3	0	0	0	0	0
72 re										
73 li										
73 re	2	2	2	1	2	1	1	1	0	1
74 li	1	1	1	1	0	1	0	0	3	3
74 re	1	1	1	1	1	0	0	0	4	0
75 li	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
75 re	2	2	2	2	2	0	0	0	0	0
nach Therapie										
1 li	1	2	1	1	2	0	0	0	0	0
1 re	1	2	1	1	2	0	0	0	0	0
2 li	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
2 re	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3 li	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0
3 re	2	2	2	0	2	0	0	0	0	0
4 li	2	2	3	2	1	0	0	0	0	0
4 re	2	3	2	1	0	0	0	0	0	0
5 li	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0
5 re	2	3	2	0	1	0	0	0	0	0
6 li	1	1	1	1	2	1	0	1	0	1
6 re	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1
7 li	2	2	2	2	3	1	1	1	1	2
7 re										
8 li	1	1	1	0	2	0	1	1	0	2
8 re	1	1	1	0	2	0	0	0	0	0
9 li	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
9 re	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
10 li	1	1	1	0	0	1	1	1	0	2
10 re	1	1	1	0	4	1	1	1	0	3
11 li										
11 re										
12 li										
12 re	1	1	1		0	0	0	0		0
13 li	0	2	0		0	0	0	0		0
13 re	1	1	1		2	0	0	0		0
14 li	0	1	1		0	1	1	1		4
14 re	0	1	1		0	1	0	1		0
15 li	0	0	0		2	0	0	0		0
15 re	0	0	0		2	0	0	0		0
16 li	1	1	2		3	1	1	1		0



16 re	2	2	2		2	1	1	2		0
17 li	3	2	2		2	0	0	0		0
17 re										
18 li	1	1	1		0	1	0	0		3
18 re	1	1	1		1	0	0	0		0
19 li	1	1	1		1	0	0	0		0
19 re										
20 li										
20 re	1	1	1		2	0	0	0		0
21 li										
21 re										
22 li	1	0	1		0	1	0	0		0
22 re	1	0	1		1	0	0	0		0
23 li	2	2	2		0	4	0	4		3
23 re	3	3	3		2	1	1	1		0
24 li	1	1	1		0	0	0	0		0
24 re	1	1	1		0	0	0	1		0
25 li										
25 re										
26 li	4	3	3		4	0	0	0		0
26 re	4	4	4		3	0	0	0		0
27 li	2	2	1		2	0	0	0		0
27 re	2	2	1		2	0	0	0		0
28 li	1	1	1		0	0	0	0		0
28 re	1	1	1		0	0	0	0		0
29 li										
29 re	0	1	0		1	0	0	0		0
30 li	1	1	1		0	0	0	0		0
30 re	1	1	1		1	1	1	1		2
31 li	1	1	1		1	1	1	0		0
31 re	1	1	1		0	2	2	2		2
32 li										
32 re	0	0	0		0	0	0	0		0
33 li	1	1	1		0	1	1	1		4
33 re	1	1	2		0	0	1	1		2
34 li	1	0	0		0	0	0	0		0
34 re	1	2	2		1	0	0	0		0
35 li	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1
35 re	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1
36 li										
36 re										
37 li	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
37 re	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
38 li	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
38 re	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
39 li										
39 re										
40 li	3	3	3	1	3	0	0	0	0	0
40 re	3	3	3	1	2	0	0	0	0	0

41 li	3	3	3	1	2	0	0	0	0	0
41 re										
42 li	1	1	0	1	2	1	1	1	0	1
42 re	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
43 li	4	4	4		3	2	3	2		0
43 re	2	2	2		2	0	0	0		0
44 li										
44 re										
45 li										
45 re	2	2	2	0	3	0	0	0	0	0
46 li										
46 re										
47 li										
47 re										
48 li	2	2	2	1	2	0	0	0	0	0
48 re										
49 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49 re										
50 li	2	1	1	0	2	0	0	0	0	0
50 re										
51 li	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
51 re	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
52 li	2	1	3	1	3	1	1	2	1	2
52 re										
53 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53 re										
54 li	3	3	3	1	0	4	4	4	2	4
54 re										
55 li										
55 re	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
56 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56 re										
57 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57 re	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
58 li	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
58 re	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59 li	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59 re	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60 re										
61 li										
61 re	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3
62 li	3	1	1	0	1	0	0	0	0	0
62 re										
63 li										
63 re	4	2	2	1	0	2	2	2	1	4
64 li	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
64 re	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

65 li	2	2	1	0	0	1	1	1	0	0
65 re	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
66 li										
66 re										
67 li	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0
67 re	2	1	1	1	3	0	0	0	0	3
68 li										
68 re	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
69 li										
69 re	3	3	3	2	0	4	4	4	2	4
70 li	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70 re	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
71 li	2	2	2	1	2	0	1	1	0	0
71 re	2	1	2	1	2	1	1	1	0	0
72 li										
72 re										
73 li										
73 re	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
74 li	2	2	2	1	0	1	1	1	1	1
74 re	2	2	2	1	0	1	1	1	1	0
75 li										
75 re										

Index:

ID=laufende Studiennummer; li=linker Gehörgang; re=rechter Gehörgang;

0= negativ, keine Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern/mikrobiologisch nicht nachweisbar

1=gelegentlich, Bakterien/Hefen/Zellen nach Durchmustern, vereinzelt, nicht in jedem Gesichtsfeld/mikrobiologisch nach Anreicherung nachweisbar

2=in geringer Zahl vorhanden und ohne Schwierigkeiten /Zeitaufwand festzustellen, Bakterien/Hefen/Zellen vereinzelt in jedem Gesichtsfeld/mikrobiologisch geringgradig nachweisbar

3=in größerer Zahl vorhanden und ohne Schwierigkeiten/Zeitaufwand festzustellen, Bakterien/Hefen/Zellen in größerer Zahl in jedem Gesichtsfeld/mikrobiologisch mittelgradig nachweisbar

4=massenhaft und sofort festzustellen, Bakterien/Hefen/Zellen als Rasen oder übereinander gelagert in jedem Gesichtsfeld/mikrobiologisch hochgradig nachweisbar

**Tabelle C(1): Ergebnisse Zytologie vor und 14 Tage nach täglicher zweimaliger Gehörgangsreinigung mit Plazebo; Anzahl Mikroorganismen und Zellen (Mittelwert aus acht Gesichtsfeldern bei Ölimmersion)**

ID	K v	K n	St v	St n	H v	H n	Ke v	Ke n	N v	N n	M v	M n
1 li	14,25	17,25			2,00	0,63	10,50	4,38				
1 re	39,71	48,43			19,00	0,14	8,29	7,14				
2 li	7,63		0,25			0,63	7,63	9,63				
2 re	4,75				11,00	2,75	8,50	6,75				
3 li	0,88				13,38	0,50	9,63	8,13				
3 re	71,50	7,25			0,50	0,25	10,50	12,00				
4 li		4,75			435,2	0,63	15,75	10,25				
4 re	6,75	4,00			0,25		5,75	10,75				
5 li		8,63			46,63		10,63	4,38				
5 re	5,00	4,63			1,00	0,75	7,75	7,13				
6 li	14,63	2,75	126,1	0,50	0,75		3,75	2,75	1,88			
6 re	10,75	3,13	1213,	0,25		0,13	5,50	5,13	8,13	0,13		
13 li	466,5				47,00		8,38	8,38	12,88			
13 re	8,50	2,13			169,8	1,13	10,13	6,25	1,88			
14 li	1,00	0,13	245,7	5,00		1,75	3,75	4,38	3,13	0,25		
14 re	1,13		139,1	0,13	1,63	1,25	3,38	4,00	4,00			
15 li	0,50				23,50	0,13	5,88	0,88				
15 re	0,50		1,00		27,25		11,50	1,25				
16 li	1,00	1,13		0,38	96,00	1,00	7,50	3,25				
16 re	1,25	1,75	0,38	0,13	8,63	0,25	5,75	3,75				
17 li	340,6	15,13	22,88			0,25	3,13	4,63	5,88		0,25	
18 li				0,38	1,75	0,13	4,50	5,00				
18 re	0,75	2,75			0,25	0,13	4,38	5,63				
26 li	105,1	131,7			1,00	0,25	12,38	14,63	1,38			
26 re	82,50	59,88			0,25	0,75	10,63	14,00	2,63	0,13		
27 li	0,75	3,00			118,3	26,88	10,50	9,50	0,13			
27 re	3,13	6,00			66,00	4,38	7,00	8,88				
28 li	4,50				106,7	2,25	9,88	10,13	1,25			
28 re	686,2	3,13	0,13		2,75	1,38	13,38	11,13	3,88			
29 re	0,88	0,50			2,13	1,75	3,38	6,38	16,38	4,63		
30 li		0,88		1,25	300,5	2,13	12,63	8,88	0,25			
30 re			0,38		122,7	3,63	9,25	4,13	6,75	6,75		
37 li			0,50	0,25	70,63	83,75	6,25	9,50	0,13	9,50		
37 re					105,0	2,38	13,63	5,13	7,25	0,63		
38 li	0,75	0,25			64,25	126,1	6,75	6,25	0,38	0,13		
38 re	0,75				1,00	0,25	3,00	3,38				
40 li	15,00	14,38	0,13		0,50		9,50	11,75	0,88			
40 re	250,0	24,25	328,1		0,25		16,38	11,00	1,00			
41 re	73,75	20,13			0,25	0,38	3,63	4,63	30,38	6,63	0,50	
42 li	0,50	0,38		0,50	59,38	1,88	5,63	4,75	10,00	0,88	1,13	
42 re	0,25				12,00	1,38	3,38	11,00	8,50	0,75		
49 li	0,63	0,75		0,25	1,13		2,38	1,50				
50 li	1,75	1,38			38,88		7,63	10,00	0,25			
51 li	10,50	1,13	5,00		125,7	0,50	12,25	5,00	4,13			
51 re	1,25	0,63			8,00	0,13	10,13	7,13	0,63			
52 li	22,13	15,63	2,38	1,63	1,63	1,75	11,38	6,38	45,88	12,38	0,38	
53 li	1,13						9,25	9,50				
54 li	38,75	46,13	66,75	349,6		9,25	4,63	6,00	40,75	63,50	3,13	2,00

61 re				0,88	1,75	1,50	11,25	3,50		0,13		
62 re	4,38	8,50			4,75		9,00	10,00	0,38			
63 re	208,1	90,63	315,3	44,63			26,38	19,38	0,38			
64 li	0,63	2,75	5,13		0,50		6,50	15,13	1,75			
64 re	3,63	0,38	1,13		1,75	3,63	7,63	13,13	0,50			
65 li	17,75	10,25	9,25	5,63	35,88	0,25	6,25	8,13	2,13		0,13	
65 re	19,50	7,88	213,0	0,50	32,50	1,13	7,25	6,63	3,88		0,50	
73 re	3,63	2,00	0,25		3,00	0,57	4,50	11,25	15,63		0,13	
74 li	0,13	3,00		1,00	91,63	3,25	9,25	8,13	0,63			
74 re	0,13				143,6	2,13	10,38	5,75	1,63			
Mi	51,11	14,13	122,5	22,94	47,65	6,58	8,37	7,54	6,69	7,60	0,77	2,00
Stabw	128,8	26,43	266,7	82,18	80,73	22,30	4,10	3,73	10,78	16,59	1,00	
Min	0,130	0,130	0,130	0,130	0,250	0,130	2,38	0,880	0,130	0,130	0,130	2,00
25%	0,848	1,26	0,380	0,250	1,13	0,250	5,60	4,63	0,630	0,130	0,160	2,00
Me	4,44	3,13	5,07	0,500	11,0	1,13	8,02	6,94	2,13	0,815	0,440	2,00
75%	20,2	14,8	158	2,47	66,0	2,19	10,5	10,0	7,69	7,44	0,973	2,00
Max	686	132	1213	350	435	126	26,4	19,4	45,9	63,5	3,13	2,00
L Ko	14,5	5,79	4,27	-17,9	24,9	-0,122	7,29	6,56	3,09	-1,98	-0,072	0,0
U Ko	87,7	22,5	241	63,8	70,4	13,3	9,45	8,52	10,3	17,2	1,61	0,0

**Tabelle C (2): Ergebnisse Zytologie vor und 14 Tage nach täglicher zweimaliger Gehörgangsreinigung mit Verum; Anzahl Mikroorganismen und Zellen (Mittelwert aus acht Gesichtsfeldern bei Ölimmersion)**

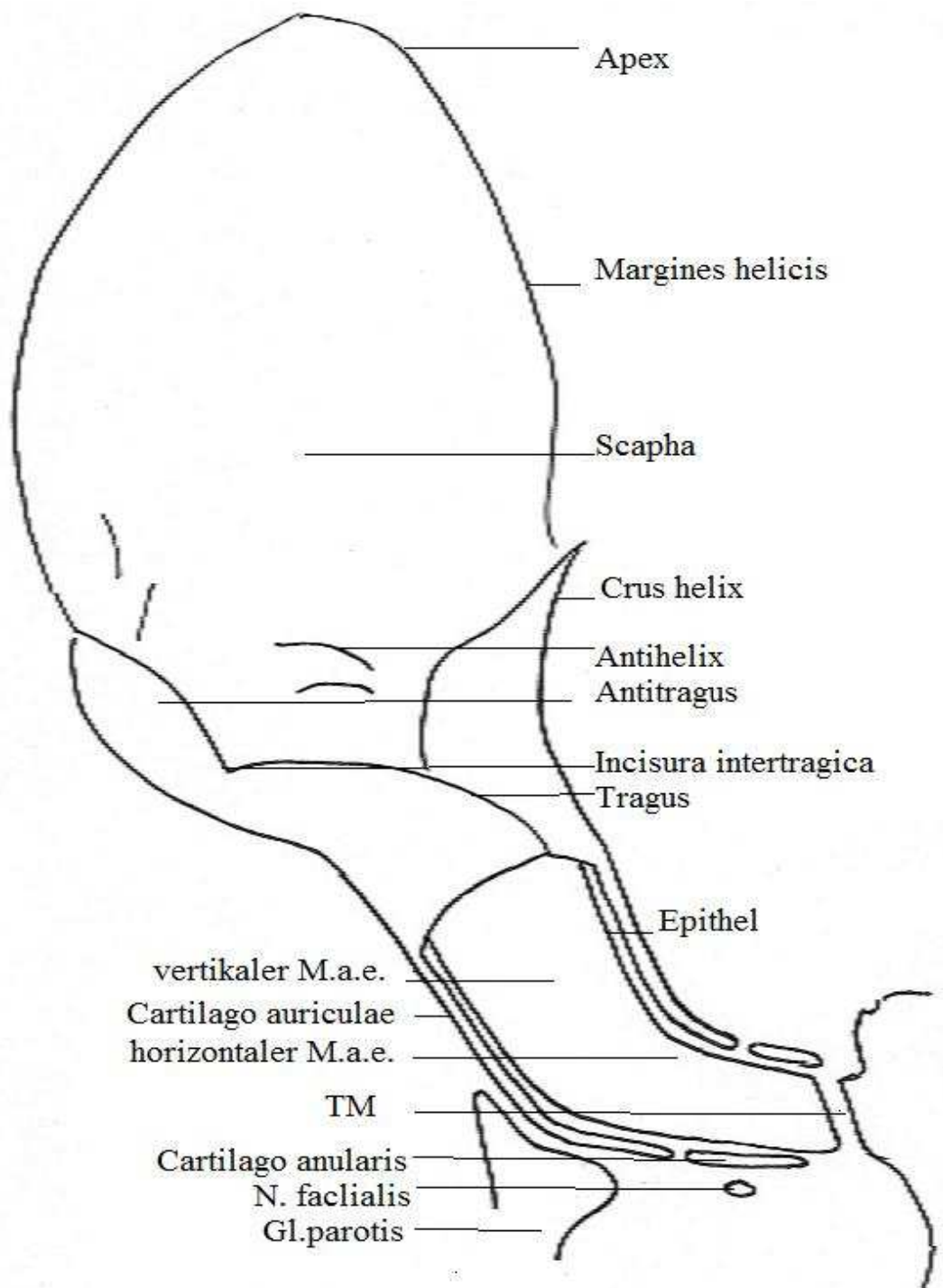
ID	K v	K n	St v	St n	H v	H n	Ke v	Ke n	N v	N n	M v	M n
7 li	71,25	5,63		0,88	3,88	0,50	3,75	3,38				
8 li	13,25	1,38	0,38		1,38	1,13	6,25	4,13	0,13			
8 re	16,63	1,25	6,63		126,1	1,25	4,88	2,75	2,75			
9 li					101,7	16,50	3,88	5,38	0,13			
9 re					88,38	2,38	3,25	3,00	0,50			
10 li	12,88	1,13	0,75	0,38	53,13	0,50	3,88	3,38	0,88			
10 re	6,00	0,25	4,63	0,88	8,88	0,63	5,50	4,50				
12 re	57,63				45,00	1,25	4,75	4,38	1,00			
19 li	5,75	0,88	0,38		0,63	0,63	2,25	2,25				
20 re	0,25	0,38	0,38		35,25	1,38	10,75	9,25				
22 li	45,38	1,38	0,25	0,13	53,13	0,75	7,13	7,50	0,13			
22 re	1,50				1,25	0,38	9,00	8,00	0,63			
23 li	70,38	3,50	1112,	62,25	6,25	1,00	13,38	6,88	12,25	10,38		
23 re	49,63	34,88	1081,	5,88	0,13	2,13	11,13	9,13	4,75	0,38		
24 li	1,88	0,25	0,88		26,00	4,75	5,75	8,63	4,00	0,25		
24 re	12,75	0,63	1,88		55,13	3,25	7,38	5,75	3,00	0,25		
31 li	2,63	0,38	83,63	0,63	0,25	0,25	1,75	5,50	12,50	0,38	2,13	
31 re	3,38	1,00	113,3	3,38			1,88	4,75	28,75	1,50	1,13	
32 re					33,50		8,75	1,00	0,25			
33 li	4,50	0,38		0,50	1,38	0,25	5,38	6,88		0,38		
33 re	3,75	0,38	0,50		5,63	1,13	14,50	8,38	0,25	0,25		
34 li		0,38			68,00	29,25	9,50	5,13				
34 re	1,00	0,50			65,38	34,50	7,13	4,50				
35 li	0,50	0,63		0,25	0,63	1,25	7,00	5,75				

35 re	13,13			0,25	17,13	0,75	6,38	6,13	2,00			
43 li	87,38	25,88	149,8	1,13		0,13	2,63	8,38	8,13	2,13	0,25	
43 re	9,38	5,63	58,13		0,25	0,63	2,75	8,75	4,63	0,75		
45 re	7,13	1,38	152,5		49,50	1,00	8,88	5,50	0,63			
48 li	8,25	4,13	0,13		0,88	0,25	9,25	5,00	3,25	19,25		
55 li	49,38	1,50			386,1	0,88	12,50	6,38				
56 li	9,63		11,00				7,50	7,13				
57 li	29,38				120,6	4,88	3,00	4,00	0,38			
57 re	13,50				153,5	9,75	6,50	5,75				
58 li					1,88	0,50	4,88	19,63				
58 re	2,75		0,25		1,63	0,13	8,50	10,63	0,63			
59 li	0,75				0,25		16,50	16,13				
59 re							19,75	12,63				
60 li	2,38				9,13		9,38	4,38	0,63			
67 li	13,25		14,13		1,75	0,25	16,25	6,63				
67 re	4,63		3,25		64,75	0,25	9,13	4,38	0,25			
68 re	90,38	0,88	1,13		216,2		7,38	3,63				
69 re	51,75	13,38	941,8	42,88	1,38	0,50	9,38	1,88	15,00	1,38	1,00	0,38
70 li			53,50		266,1		26,63	1,50				
70 re	64,00	0,38	194,2		208,8		30,38	2,00				
71 li	82,63	11,75	44,00		2,63	1,13	6,63	16,38	5,13	0,63		
71 re	1131,	3,88	261,3	0,25			25,38	11,13	6,63			
Mi	52,61	4,27	153,3	8,54	55,70	3,50	8,88	6,48	4,25	2,91	1,13	0,38
Stabw	179,4	8,00	322,9	19,09	84,43	7,66	6,39	3,91	6,33	5,61	0,77	
Min	0,25	0,250	0,130	0,130	0,130	0,130	1,75	1,00	0,130	0,250	0,250	
25%	3,38	0,380	0,563	0,250	1,38	0,500	4,85	4,10	0,410	0,315	0,438	
Me	12,8	1,13	8,82	0,755	17,1	0,940	7,26	5,63	1,50	0,630	1,07	
75%	49,6	4,01	141	4,01	66,7	1,94	9,81	8,38	5,04	1,82	1,88	
Max	1131	34,9	1113	62,3	386	34,5	30,4	19,6	28,8	19,3	2,13	
L Ko	-5,57	1,23	28,1	-2,48	29,1	0,909	6,98	5,32	1,80	-0,476	-0,102	
U Ko	111	7,32	279	19,6	82,4	6,10	10,8	7,64	6,71	6,31	2,36	

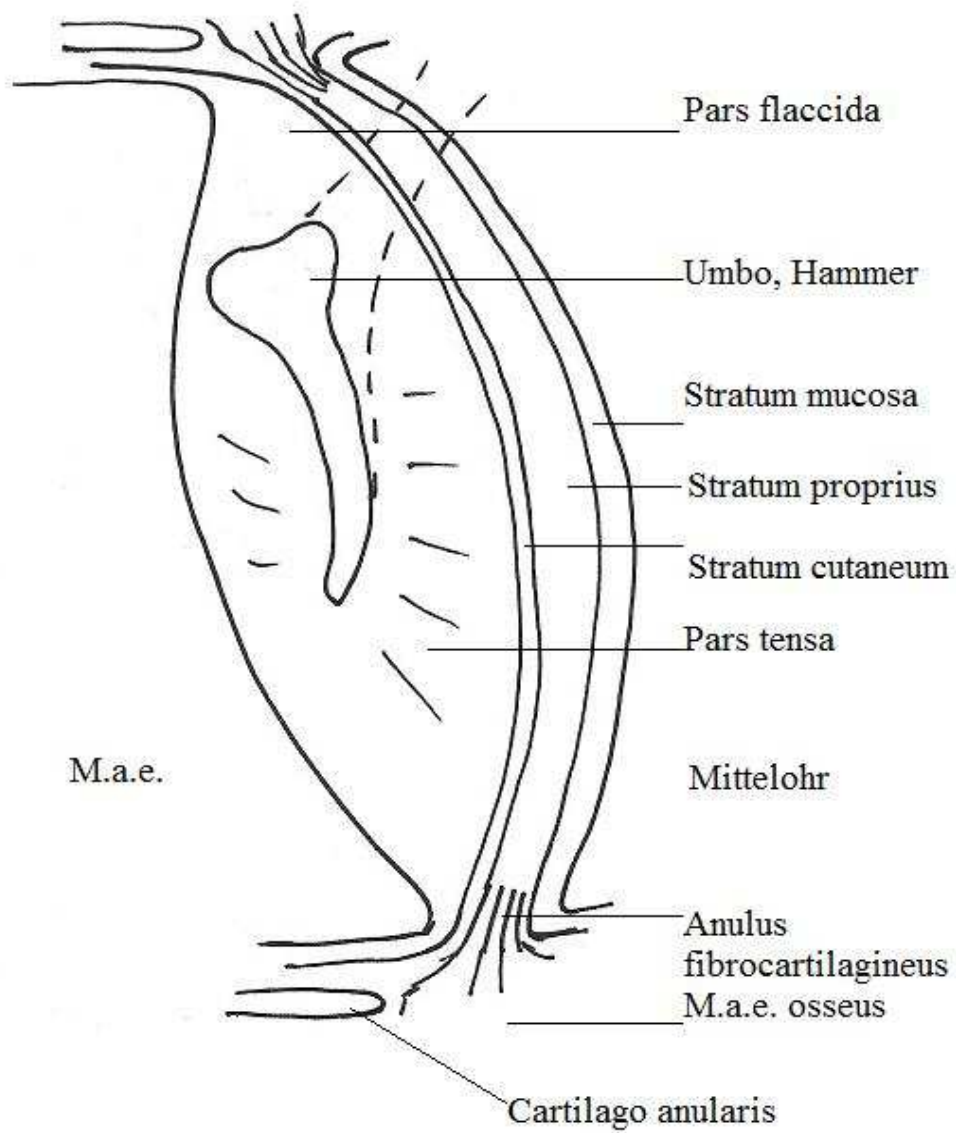
Index:

ID=laufende Studiennummer; li=linker Gehörgang; re=rechter Gehörgang; K= Kokken; St=Stäbchen; H=Hefen; Ke= Keratinozyten; N= Neutrophile Granulozyten; M= Makrophagen; v= Erstuntersuchung; n=Kontrolluntersuchung  
Mi=Mittelwert der jeweiligen Spalte; Stabw=Standardabweichung der Daten der jeweiligen Spalte; Min=Minimum; 25%=25% Perzentile; Me=Median; 75%=75% Perzentile; Max=Maximum; L Ko= Unterer 95% Konfidenzintervall; U Ko= Oberer 95% Konfidenzintervall

## 2. Abbildungen

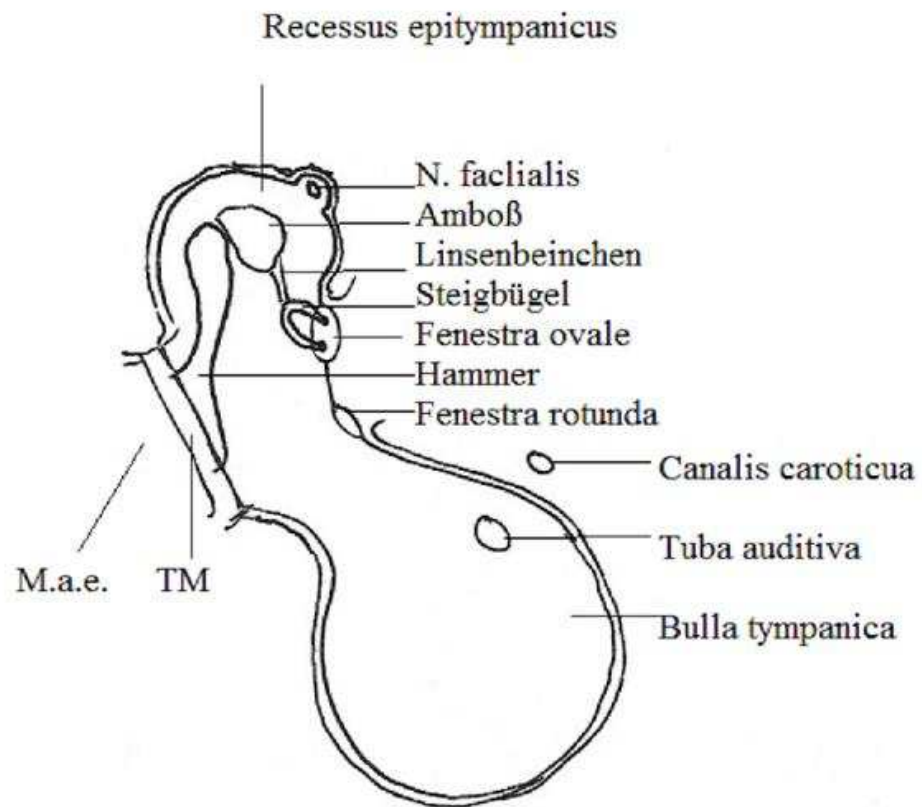


**Abbildung 1: Auris externa schematisch;** M.a.e.=rechter äußerer Gehörgang;  
TM=Trommelfell; N.=Nervus; Gl.=Glandula



**Abbildung 2: Trommelfell (TM) schematisch; M.a.e.=rechter äußerer Gehörgang**





**Abbildung 3: *Auris media* schematisch;** M.a.e.=rechter äußerer Gehörgang;  
TM=Trommelfell; N.=Nervus



**Abbildung 4: *Otitis externa erythematosa* (Jack-Russell-Terrier)**



**Abbildung 5: *Otitis externa ceruminosa* (Deutscher Schäferhund)**



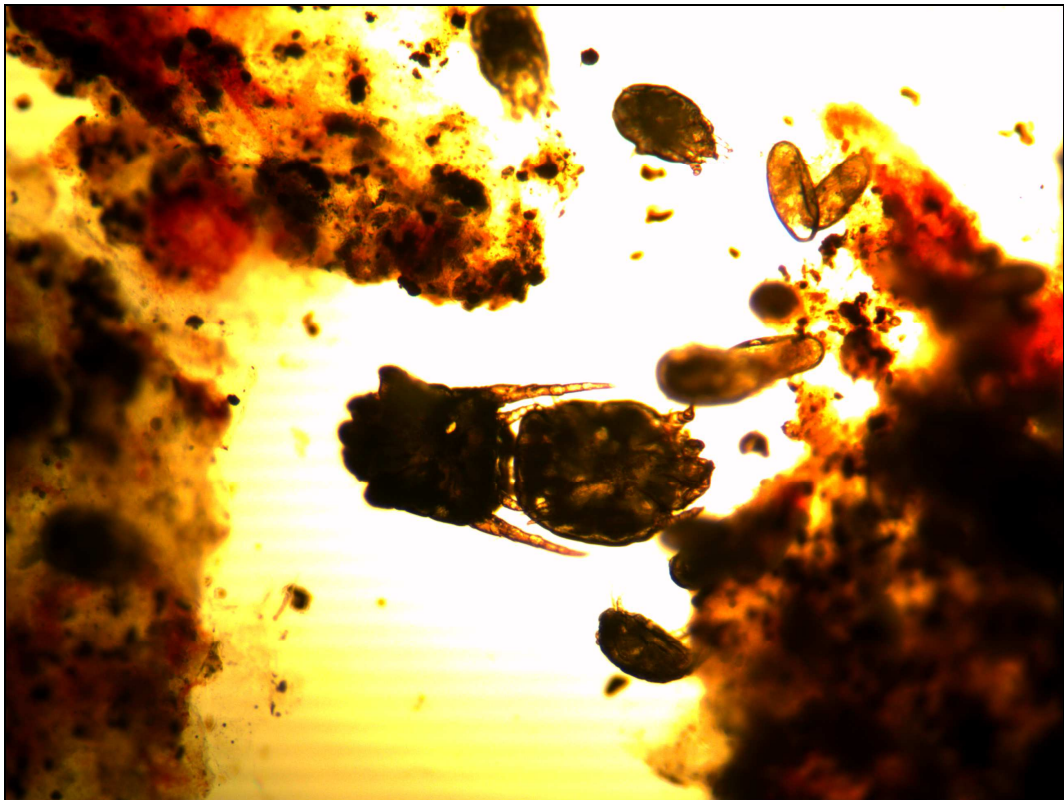


**Abbildung 6: *Otitis externa purulenta* (Berner Sennen Hund)**

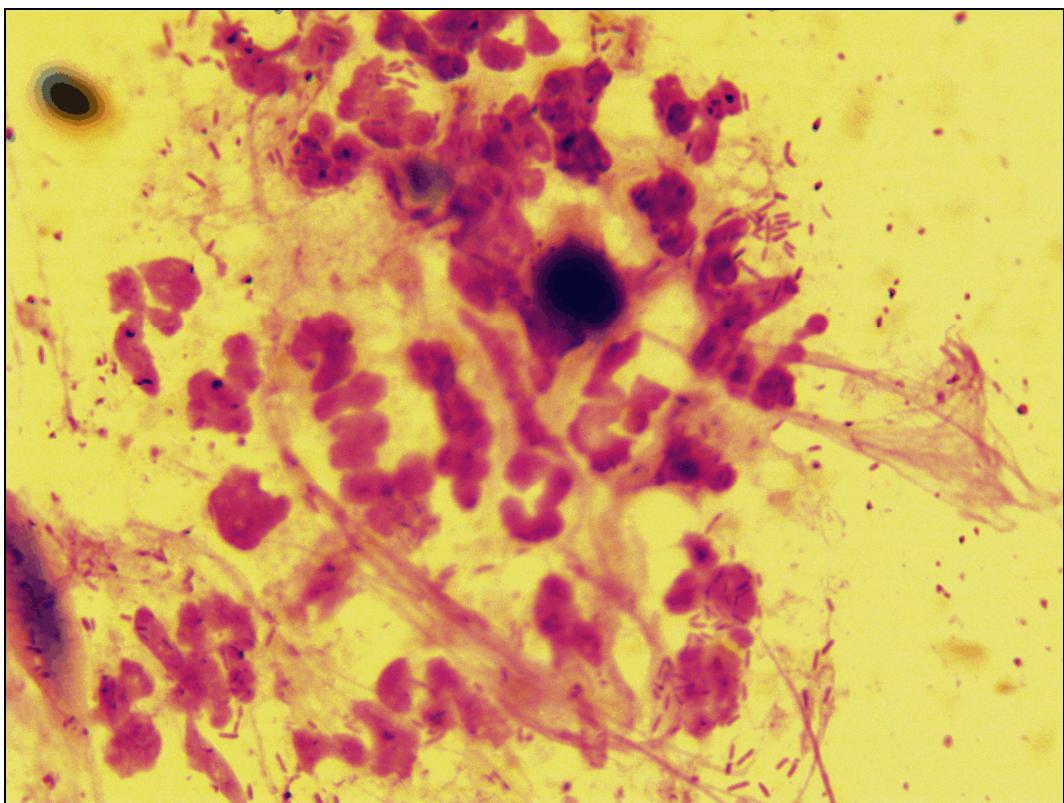


**Abbildung 7: *Otitis externa proliferativa* (West Highland White Terrier)(mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Wolfgang Osthold)**



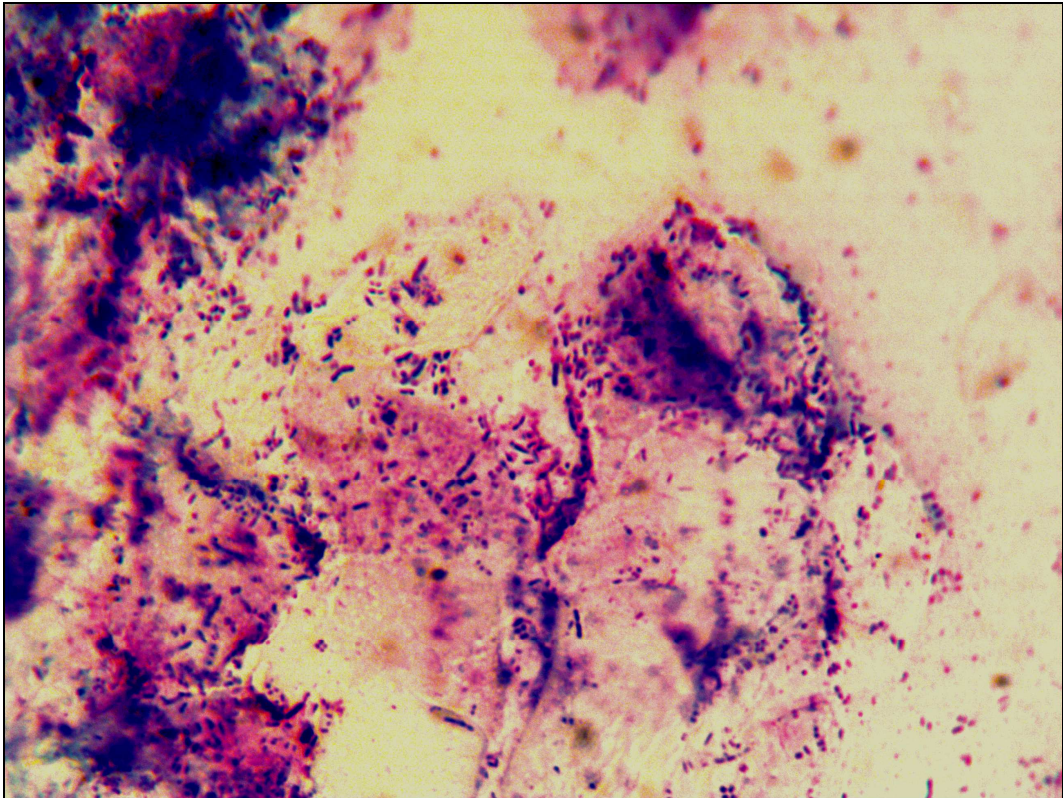


**Abbildung 8: Zytologisches canines Ohrtupferpräparat nativ: *Otitis externa parasitosa*, Ohrmilben, vermutlich *Otodectes cynotis*, nativ (x100)**

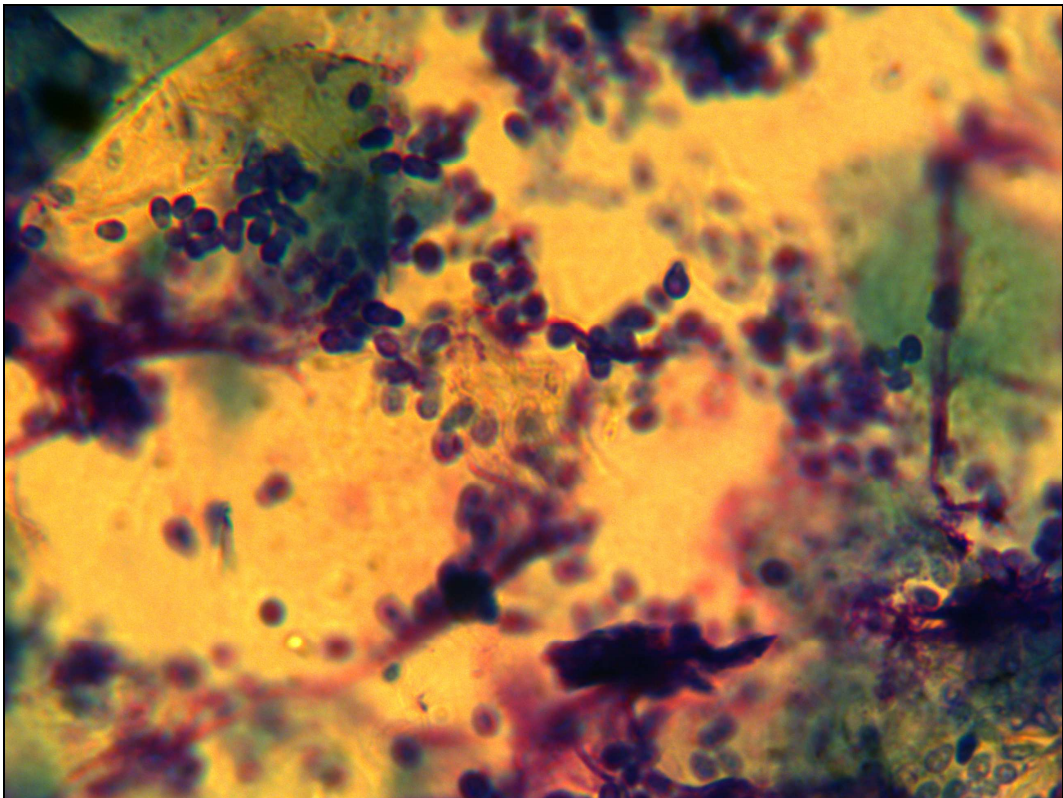


**Abbildung 9: Zytologisches canines Ohrtupferpräparat: Neutrophile Granulozyten, Infektion mit Kokken und Stäbchen, Diff-Quik® (Ölimmersion, x1000)**



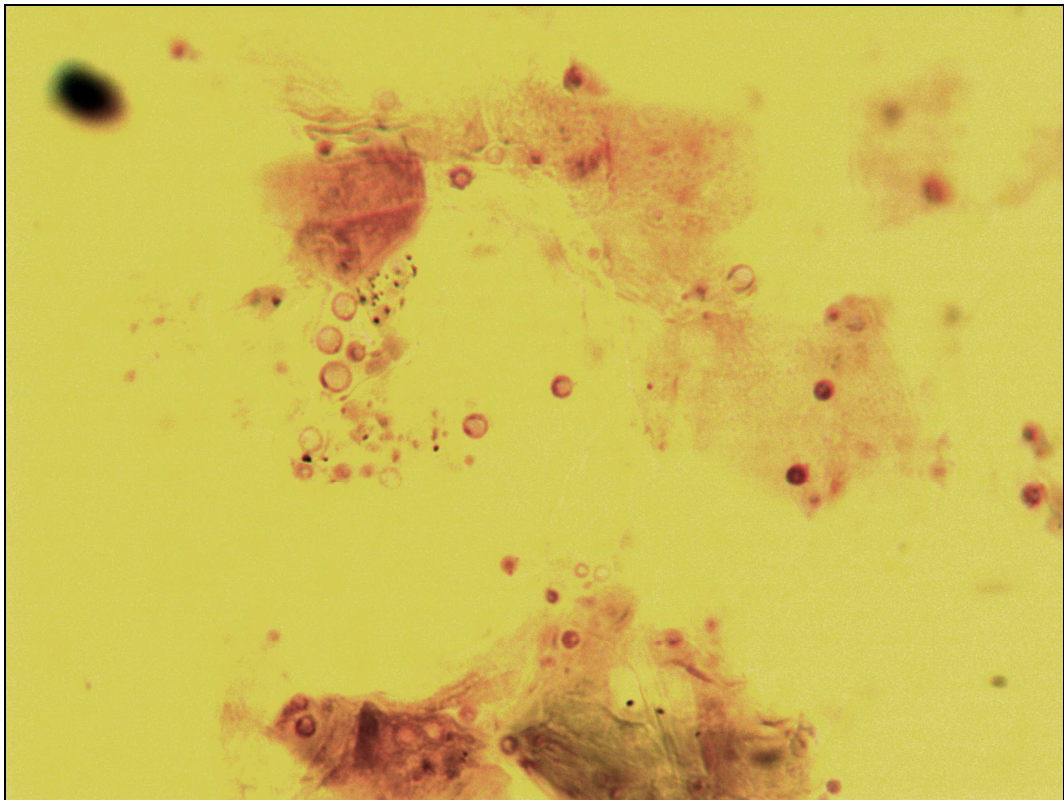


**Abbildung 10: Zytologisches canines Ohrtupferpräparat: Keratinozyten, Kokken und Stäbchen Überbesiedelung ohne Infektion, Diff-Quik® (Ölimmersion, x1000)**



**Abbildung 11: Zytologisches canines Ohrtupferpräparat: Keratinozyten, Hefen, vermutlich *Malassezia* spp., Diff-Quik® (Ölimmersion, x1000)**



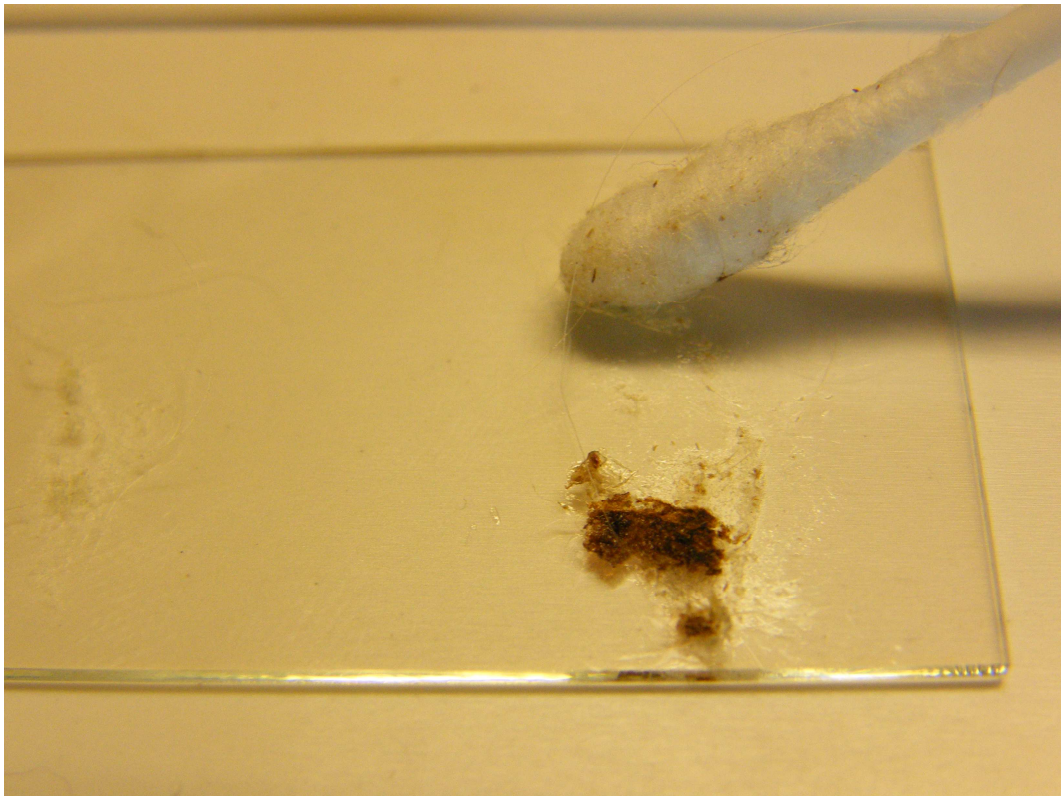


**Abbildung 12: Zytologisches canines Ohrtupferpräparat: Keratinozyten, einige Kokken, Hefen, vermutlich *Candida* spp., Diff-Quik® (Ölimmersion, x1000)**

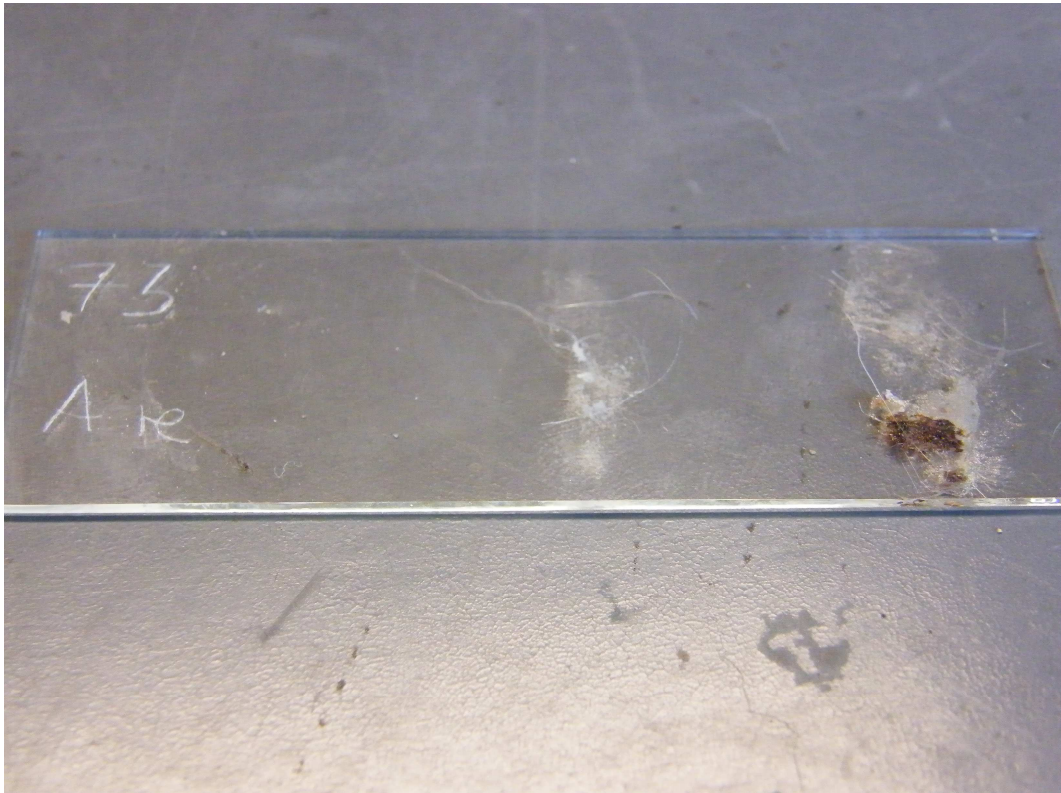


**Abbildung 13: Unsteriler, markierter Ohrabstrichtupfer, „A“=erster Tupfer; „R“=rechtes Ohr, senkrechte Markierung zur Orientierung für eine 360°Umdrehung im Gehörgang**





**Abbildung 14: Abstrich für die zytologische Untersuchung, rechtes Ohr; Tupfer vertikal zur Längsrichtung des Objektträgers im 45°Winkel ausgerollt**



**Abbildung 15: Abstrich für die zytologische Untersuchung; Objektträger Nr. (ID=laufende Studiennummer) 73; A=erster Tupfer;**

**re(reevaluation)=Tupfer der Kontrolluntersuchung nach 14 Tagen; mittig  
der Abstrich des linken Gehörganges und rechts der Abstrich des rechten  
Gehörganges**



ID							
Name owner/dog	/						
History:							
Breed							
Age							
Sex							
Food/diet							
Partners							
Pre-treatment							
- when?							
- with?							
- how long?							
Result?							
Other diseases							
medicine							
Clinical classification	left	right	bs	reevaluation	left	right	bs
<i>OE erythematosa</i>							
<i>OE ceruminosa</i>							
<i>OE erythematosa et ceruminosa</i>							
<i>OE purulenta</i>							
<i>OE proliferativa</i>							
<i>OE purulenta et proliferativa</i>							
parasites							

ID=laufende Studiennummer; bs=both sides

**Patientenerfassungsbogen zur Datenerhebung am Tag der Erst- und Kontrolluntersuchung**

## **IX Ein herzliches Dankeschön**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Ralf S Mueller, der meine Arbeit an der LMU München vertritt und der mir für Fragen jederzeit freundlichst zur Verfügung stand. Das große Interesse an meiner Arbeit ungeachtet der geographischen Entfernung war mir eine wertvolle Unterstützung.

Herrn Dr. Wolfgang Osthold, in dessen Tierärztlicher Praxis für Kleintiere diese klinische Studie durchgeführt wurde, danke ich für die fachliche Betreuung, die konstruktive Beratung und sein stets offenes Ohr bei der Lösung großer und kleiner Probleme, sowie die immer freundlich geleistete Unterstützung auch seines Teams bei der Durchführung der Studie ganz herzlich.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Phillip der Firma Alfavet, deren Produkte, der Ohrreiniger Epibac<sup>®</sup> und das Otitis Schnellfärbeset, in der Studie untersucht wurden, für die engagierte Zusammenarbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch Frau Dr. Müller und Herrn Dr. Heusinger stellvertretend für das kooperierende Labor LABOKLIN, die mir mit Rat zur Seite standen und die zusammen mit dem Laborteam einen wichtigen Part der Studie mit auf den Weg brachten.

Nicht vergessen werden soll Frau Dr. Astrid Nyari. Sie hatte stets Zeit und Verständnis für meine Arbeit und die damit verbundenen Probleme, stand mir in fachlichen wie privaten Angelegenheiten tatkräftig zur Seite und gab mir wertvolle Anregungen für meine Arbeit.

Für die Hilfe bei allen technischen Problemen, die der Computer so mit sich bringen kann, darf ich mich bei meinem Mann Nouredin bedanken, der mir das kleine 1 x 1 der PC-Bedienung durchaus mehrfach nahe zu bringen versuchte. Überdies war er stets auch und gerade wenn es mal nicht „rund“ lief die Batterie zum Aufladen neuer Energie. Danke!

Ein großes Dankeschön geht natürlich an meine Familie. Ohne meine Eltern Herta und Matthias Veltjens wäre mein Traumberuf ein Traum geblieben. Insbesondere die manchmal schwierige Vereinbarung von Familie und Beruf konnte nur mit ihrer tatkräftigen Hilfe zu Gunsten auch und vor allem meiner Kinder umgesetzt werden. Meiner Mutter möchte ich an dieser Stelle auch für ihr ausdauerndes Korrekturlesen danken.

Damit bin ich bei denjenigen, die mir das Wichtigste und Wertvollste sind und somit vor allen Anderen meinen ausgesprochenen Dank verdienen: meine Kinder Raduan und Ramón. Sie haben manche Stunde ohne Mama sich die Zeit vertreiben und große und kleine Probleme selber lösen müssen. Mancher Legostein blieb unverbaut und doch sind sie an der Situation erstarkt und werden auch mit Konsequenz ihre Wege meistern.

Nun ja, und dann ist da noch Labrador Sina, die geduldig auf den zugegebenermaßen auch für mich erholsamen Spaziergang warten konnte.