

**Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration von
Silbersulfadiazin und anderen topischen antimikrobiellen
Chemotherapeutika bei multiresistenten *Pseudomonas
aeruginosa*-Isolaten caniner Otitis externa**

von Maritta Sophie Esmeralda Gräfin von Silva-Tarouca

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

**Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration von
Silbersulfadiazin und anderen topischen antimikrobiellen
Chemotherapeutika bei multiresistenten *Pseudomonas
aeruginosa*-Isolaten caniner Otitis externa**

von Maritta Sophie Esmeralda Gräfin von Silva-Tarouca
aus Rosenheim

München 2019

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 27.Juli.2019

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
II	LITERATURÜBERSICHT	4
1.	Phylogenie und Biologie von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4
2.	Bedeutung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> als Krankheitserreger in der tiermedizinischen Dermatologie.....	5
2.1	Hautinfektionen.....	5
2.2	Otitis externa/media	6
3.	Pathophysiologie und Ursachen von Ohrinfektionen bei Kleintieren...7	
3.1	Primäre Ursachen	7
3.1.1	Parasiten	8
3.1.2	Fremdkörper	8
3.1.3	Allergien.....	8
3.1.4	Keratinisierungsstörungen.....	9
3.1.5	Autoimmunerkrankungen.....	9
3.2	Sekundäre Ursachen	10
3.2.1	Bakterien	10
3.2.2	Hefen	10
3.3	Prädisponierende Faktoren	10
3.3.1	Anatomische Besonderheiten	11
3.3.2	Klimafaktoren.....	11
3.3.3	Iatrogene Faktoren.....	11
3.4	Perpetuierende Faktoren	12
3.4.1	Fortgeschrittene pathologische Veränderungen	12
3.4.2	Veränderungen des Trommelfells	13
3.5	Otitis media	13
4.	Diagnose und Therapie von Ohrinfektionen bei Hund und Katze.....	14
4.1	Klinisches Bild einer Otitis externa	14
4.2	Otoskopische Befunde beim Vorliegen einer Otitis externa.....	15
4.2.1	Gehörgang	16
4.2.2	Trommelfell.....	16
4.3	Zytologische Befunde beim Vorliegen einer bakteriellen Otitis externa...17	

4.3.1	Probengewinnung und -vorbereitung.....	17
4.3.2	Mikroskopische Auswertung.....	18
4.4	Kultur und Resistenztest als Therapiegrundlage.....	19
4.5	Topische antibakterielle Therapie.....	20
4.6	Systemische antibakterielle Therapie.....	23
4.7	Potentielle Toxizität antibakterieller Therapie.....	24
4.8	Bekämpfung von prädisponierenden/primären/perpetuierenden Faktoren	25
4.9	Unterstützende Therapie.....	26
4.10	Möglichkeiten im Therapienotstand.....	27
5.	Resistenzbildung von Mikroorganismen im allgemeinen und	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> im speziellen.....	28
5.1	Natürliche Resistenz von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
5.2	Erworbene Resistenz von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
5.2.1	Enzymatische Inaktivierung.....	31
5.2.2	Reduktion der intrazellulären Wirkkonzentration.....	32
5.2.3	Zielort-Mutationen.....	33
6.	Definition von Multiresistenz.....	34
7.	Aktuelle Resistenzlage in der Tiermedizin.....	35
8.	Silbersulfadiazin als mögliche Therapieoption bei multiresistenten	
	Keimen.....	37
8.1	Pharmakologische Eigenschaften von Silbersulfadiazin.....	37
8.2	Einsatz in der Humanmedizin.....	38
8.3	Einsatz in der Tiermedizin.....	39
9.	Arbeitshypothese und Zielsetzung.....	40
III	PUBLIKATION.....	41
IV	DISKUSSION.....	50
1.	Resistenzmuster von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	51
2.	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration.....	52
V	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
VI	SUMMARY.....	63
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	64

VIII	DANKSAGUNG	86
-------------	-------------------------	-----------

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

®	Registrierte Marke
Abb.	Abbildung
AMG	Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln
BTK	Bundestierärztekammer
BVL	Bundesministerium für Landwirtschaft und Verbraucherschutz
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	United States Food and Drug Administration
MDPA	Multi-resistente <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MHK	Minimale Hemm-Konzentration
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSP	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
SSD	Silbersulfadiazin

I EINLEITUNG

Als Alexander Fleming am 03. September 1923 von seinem Sommerurlaub zurückkehrte, bemerkte er, dass Schimmelpilze der Gattung *Penicillium*, die eine Kultur *Staphylococcus aureus* kontaminiert hatten, in der Lage waren das Bakterienwachstum einzudämmen. Die „offizielle“ Entdeckung von Penicillin läutete den Siegeszug der Wissenschaft über gefürchtete bakterielle Erkrankungen ein¹

Dank der Erforschung und Entwicklung von immer neuen Stoffen schien die Medizin in der Lage, auch therapieaufwändige Infektionen zu kontrollieren. Die Hybris ging sogar so weit, dass William H. Stewart, zu dieser Zeit der US Surgeon General, 1969 vorschlug, dass es Zeit wäre das Buch der Infektionskrankheiten zu schließen².

Seitdem ist viel passiert und Antibiotika gehören heute zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Medikamenten. In der Humanmedizin werden jährlich allein in Deutschland ca. 700-800 Tonnen Antibiotika eingesetzt³.

Aber wie schon Alexander Fleming in seiner Rede bei der Nobelpreisverleihung 1945 warnte „es besteht die Gefahr, dass der Unwissende sich unterdosiert und so seine Mikroben resistent macht“⁴.

Leider sollte er Recht behalten und die zunehmenden Resistenzen stellen eine ernstzunehmende Bedrohung der Gesundheit von Mensch und Tier dar. Nicht einmal 100 Jahre nach ihrer Entdeckung müssen wir der Wahrheit ins Auge blicken, dass viele Wirkstoffe gegen „Superkeime“ wie MRSA und MRSP wirkungslos geworden sind und wir Gefahr laufen, dass der Schrecken zurückkehrt, den die Antibiotika einst lebensbedrohlichen Infektionskrankheiten nahmen.

Auch in der Tiermedizin ist die Resistenzproblematik ein präsent Thema. Zahlreiche Initiativen beschäftigen sich mit der Kontrolle und Reduktion eingesetzter Antibiotika und der Dokumentation von Resistenzen.

Die „Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antimikrobiell wirksamen Tierarzneimitteln“, die seit dem Jahr 2000 von der BTK herausgegeben werden und das GERM-Vet Monitoring-Programm des BVL sind hier nur als Beispiel zu nennen. Seit der Änderung des Arzneimittelgesetzes durch die 16. AMG-Novelle 2014 sind Ziele wie das Risiko der Entstehung und Ausbreitung von Resistenzen zu begrenzen und den Einsatz von Antibiotika in der Tierhaltung zu minimieren sogar gesetzlich verankert⁵.

In der Veterinärdermatologie ist neben MRSA und MRSP vor allem *Pseudomonas aeruginosa* als „Problemkeim“ bekannt, welcher überwiegend bei suppurativen Pyodermien, chronischen Wundheilungsstörungen und purulenten Otitiden isoliert wird^{6 7}.

Er ist berüchtigt für seine intrinsische Antibiotika Resistenz, die mögliche Therapieoptionen deutlich einschränkt. Erschwerend kommt hinzu, dass zunehmend sogar Resistenzen gegenüber den grundsätzlich wirksamen Antibiotikaklassen, wie Aminoglykosiden und Fluorchinolonen beobachtet werden^{8 9}.

Die Auswahl eines geeigneten Antibiotikums kann so in der Praxis zu einer schier unlösbaren Aufgabe werden. Insbesondere, wenn im Falle einer durch *P. aeruginosa* verkomplizierten Otitis, die Auswahl zugelassener Medikamente begrenzt ist und einige Wirkstoffe potentiell ototoxisch sind.

In Fällen bei denen ein Therapienotstand vorliegt, hat sich die Umwidmung einer Creme aus der Humanmedizin (Flammazine®) bewährt, die als aktive Substanz Sulfadiazin-Silber (SSD) enthält. SSD zeigt eine sehr gute Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa*^{10 11} und wird in veterinärdermatologischen Praxen bereits als Behandlungsoption bei therapieresistenten *Pseudomonas*-Otitiden angewendet¹².

Vor der Auswahl eines geeigneten Antibiotikums zur Therapie empfehlen zahlreiche Quellen eine Testung der *in vitro*-Empfindlichkeit mittels MHK-Testung, insbesondere bei Erregern, bei denen bekannt ist, dass eine eingeschränkte Wirksamkeit vorhanden sein könnte^{13 3}. Daten für Silbersulfadiazin sind jedoch aktuell noch nicht verfügbar.

Ziel dieser Studie war es daher einen Überblick über Resistenzdaten und

Therapieoptionen bei durch *P. aeruginosa* verursachter Otitis externa beim Hund zu bieten und die minimale Hemmstoffkonzentration von SSD *in vitro* zu bestimmen.

II LITERATURÜBERSICHT

1. Phylogenie und Biologie von *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein stäbchenförmiges gramnegatives Bakterium, das der Klasse der Gammaproteobacteria angehört. Es ist Oxidase positiv und misst ca. 0,5 – 1,0 µm mal 3 – 4µm. Bewegliche Stämme sind monotrich begeißelt und nutzen die polar stehende Flagelle zur Chemotaxis. Haftfimbrien ermöglichen zudem die Anheftung an Schleimhautoberflächen und Epithelzellen.

Die Namensgebung beruht auf dem lateinischen Wort *aerugo* (Grünspan), da *P. aeruginosa* in verschiedenen Nährmedien Farbstoffe wie Pyozyanin (bläulich, nicht fluoreszierend) und Pyoverdin (gelblich fluoreszierend), seltener auch Pyomelanin (bräunlich bis schwarz) und Pyorubin (rötlich braun) produziert. Ein weiteres Merkmal ist der charakteristisch süßliche Geruch der *P. aeruginosa* Kolonien nach Lindenblüten oder Weintrauben (ortho-Aminoacetophenon) ¹⁴.

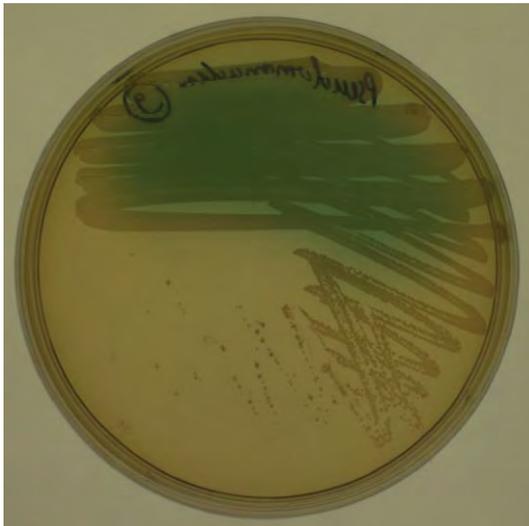


Abbildung 1: Kultur von *P. aeruginosa* auf Mueller-Hinton Agar

Obwohl *P. aeruginosa* klassischerweise als Aerobier bezeichnet wird, scheint es mikroaerophile Bedingungen zu bevorzugen. So konnte in einer Studie eine deutlich höhere Wachstumsrate bei einer Sauerstoffsättigung von 1% beobachtet werden, wohingegen höhere Sauerstoffkonzentrationen zu oxidativem Stress, vermindertem Wachstum und einer längeren 'Lag-Phase' führten ¹⁵. Neben Glukose nutzt *P. aeruginosa* eine Vielzahl verschiedener organischer Stoffe als

Kohlenstoff- und Energiequelle, wodurch es in der Lage ist selbst bei minimalem Nährstoffangebot zu überleben¹⁶. Sogar in destilliertem Wasser ist ein Überleben möglich, sofern Spuren von organischen Substanzen enthalten sind¹⁷. Allgemein gelten *P. aeruginosa* zwar als Bakterien, die nicht in der Lage sind eine Gärung durchzuführen, jedoch konnte unter anaeroben Bedingungen die Fermentation von Arginin und Pyruvat gezeigt werden¹⁸. Außerdem können unter anoxischen Bedingungen Nitrat oder Nitrit als alternative Elektronenakzeptoren für die Energiegewinnung fungieren (Denitrifikation).

Diese überragende Anpassungsfähigkeit von *P. aeruginosa* sorgt dafür, dass das Bakterium sich ubiquitär verbreiten kann und trägt zur Bedeutung der Bakterien als nosokomiale Krankheitserreger bei.

2. Bedeutung von *Pseudomonas aeruginosa* als Krankheitserreger in der tiermedizinischen Dermatologie

Pseudomonas aeruginosa wird als opportunistischer Krankheitserreger betrachtet, der als Bestandteil der mikrobiellen Flora gesunder Individuen nur selten isoliert wird¹⁹. Er ist als solcher jedoch in der Lage, die Immunschwäche erkrankter Patienten optimal auszunutzen und gehört daher zu den bedeutendsten Erregern nosokomialer Infektionen²⁰.

In der Veterinärdermatologie ist *P. aeruginosa* bekannt als Problemkeim bei Hautinfektionen und chronischen Otitiden²¹⁶. Diese schwerwiegenden Infektionen stellen für den Tierarzt häufig eine therapeutische Herausforderung dar und können zu einer starken Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten führen¹².

2.1 Hautinfektionen

Auf intakter trockener Haut kann sich *P. aeruginosa* nur schwer festsetzen, feuchte oder vorgeschädigte Haut hingegen bietet ideale Bedingungen für eine Adhäsion und Pathogenität des Erregers²⁰.

In der Humanmedizin ist *P. aeruginosa* der bedeutendste gramnegative Vertreter bei postoperativen Wundinfektionen²². Zudem ist er verantwortlich für eine Vielzahl dermatologischer Krankheitsbilder in der Humanmedizin, wie z. B. das Grüne-Nägel Syndrom, Ecthyma gangraenosum oder durch *P. aeruginosa* ausgelöste Cellulitis.

Auch wird der Erreger häufig im Zusammenhang mit Brandwunden isoliert^{20 23}.

In der Tiermedizin wird *P. aeruginosa* bei bakteriellen Hautinfektionen nur selten als alleiniger Auslöser identifiziert. Häufiger liegen Mischinfektionen mit *E.coli* oder *Staphylococcus pseudintermedius* vor⁶. In einer retrospektiven Studie wurde *P. aeruginosa* zwischen 1992 und 2005 in 66 Hautproben von Hunden isoliert, in 20 davon als alleiniges Agens⁶. Eine andere retrospektive Studie beschreibt einen Nachweis von *P. aeruginosa* in 42 von 561 Proben, die über einen Zeitraum von 6 Jahren zur Diagnostik eingesendet wurden. In 14 Fällen (2,49%) zeigte die Kultur einzig ein Wachstum von *P. aeruginosa*²⁴. Beide Studien beobachteten jedoch, dass *P. aeruginosa* mit zunehmender Häufigkeit isoliert wurde.

Die klinischen Anzeichen in den spärlichen Publikationen aus der Veterinärdermatologie sind variabel. Es überwiegen tiefe Pyodermien, die meist sekundär zu einer unterliegenden Erkrankung wie Demodikose, Akraler Leckdermatitis oder Pemphigus auftreten oder sich unter immunsuppressiver Therapie entwickeln^{25 6}. Akute tiefe pseudomonale Pyodermien zeigen bei den betroffenen Hunden ein charakteristisches Krankheitsbild: Papeln und hämorrhagische Bläschen am Rücken zwischen Hals und Schwanzansatz, wobei manche der Bullae ulzerieren können. Die meisten Hunde mit diesem Krankheitsbild hatten dichtes, längeres Fell, so dass die Läsionen erst nach dem Scheren sichtbar waren⁶.

2.2 Otitis externa/media

Die Otitis ist ein häufiger Vorstellungsgrund in der Kleintierpraxis. Studien zufolge sind bis zu 20% der Hunde und 10% der Katzen betroffen^{26 27 28}. Unter den dermatologischen Erkrankungen ist Otitis die häufigste Diagnose, obwohl sie in vielen Fällen eigentlich als Symptom einer Primärerkrankung zu betrachten ist²⁹.

P. aeruginosa gehört nicht zu der normalen Mikroflora im gesunden Ohr und sollte besonders dann als Erreger in Erwägung gezogen werden, wenn eine chronische, purulente Otitis externa oder media vorliegt und stäbchenförmige Bakterien in der Ohr-Zytologie gesehen werden^{30 7}.

So wird *P. aeruginosa* bei diesem Krankheitsbild in bis zu der Hälfte aller Fälle nachgewiesen und gilt als der wesentliche Verursacher der Erkrankung^{31 32 33}.

Gerade chronische rezidivierende Otitiden können sich zu ernsthaften Erkrankungen mit potentiell schwerwiegenden Folgen entwickeln. Bei Hunden kommt es in 50 – 80% der chronischen Gehörgangs Entzündungen zu einer Komplikation durch eine Otitis media^{34 35}. Dies kann den Therapieerfolg zusätzlich beeinflussen und sogar eine chirurgische Intervention nötig machen³⁶.

3. Pathophysiologie und Ursachen von Ohrinfektionen bei Kleintieren

Entzündliche Prozesse, die sich auf den Gehörgang und die entsprechenden anatomischen Strukturen beschränken, werden als Otitis externa bezeichnet³⁷. Ist das Mittelohr betroffen spricht man von einer Otitis media. Bei Hunden tritt in ungefähr 16% der akuten und mehr als der Hälfte der chronischen Fälle eine Otitis media sekundär zu einer Otitis externa auf³⁶. Wie viele andere dermatologische Entzündungsgeschehen ist eine Otitis oft ein Hinweis auf eine zugrundeliegende Erkrankung. Durch die, durch verschiedenen Faktoren ausgelöste, Entzündung im Gehörgang kommt es zu einer Veränderung des Mikromilieus, einer vermehrten Produktion von Cerumen und einer Zunahme der relativen Feuchtigkeit. Daraus resultiert eine Störung der „epithelialen Migration“, der Selbstreinigungsfunktion des Gehörgangs³⁷, was einen idealen Nährboden für die Ausbreitung opportunistischer Krankheitserreger zur Folge hat. Besonders bei Otitiden, an denen *Pseudomonas spp.* beteiligt sind, kommt es zudem zu einer signifikanten Erhöhung des pH-Wertes im Gehörgang²⁶. Um die Vielfalt an Ursachen und beteiligten Faktoren zu systematisieren wurde das „PPSP“-System entwickelt. Das von August 1988 erstellte und von Griffin modifizierte Klassifizierungssystem unterscheidet primäre und sekundäre Ursachen für eine Otitis externa und prädisponierende und perpetuierende Faktoren^{38 39}.

3.1 Primäre Ursachen

Als primäre Ursachen werden Prozesse oder Faktoren bezeichnet, die unmittelbar für das Entzündungsgeschehen im Gehörgang verantwortlich sind³⁸. Für einen nachhaltigen Therapieerfolg ist es daher wichtig, diese Ursachen zu identifizieren und gesondert zu behandeln⁴⁰.

Primäre Ursachen können unter Anderem zugrundeliegende systemische Erkrankungen, Parasiten oder Fremdkörper im Ohrkanal sein.

3.1.1 Parasiten

Verschiedene Parasiten werden mit dem Auftreten einer Otitis externa in Verbindung gebracht. Die Ohrmilbe *Otodectes cynotis* parasitiert nahezu ausschließlich am Ohr und wurde in bis zu 50% der Otitiden bei Katzen und 5 - 10% der Fälle bei Hunden nachgewiesen³⁹. Ihr natürliches Habitat ist die Pinna und der äußere Gehörgang, bei schwerem Befall kann sie sich aber auch auf den Kopf und andere Körperregionen ausdehnen⁴¹. Typischerweise ist bei einem Befall mit *Otodectes cynotis* schwarzes, krümeliges, fast Kaffeesatz-artiges Cerumen zu beobachten⁴⁰ und betroffene Tiere zeigen intensiven Juckreiz. Aber auch asymptomatische Trägertiere können vorkommen⁴². Demodexmilben können bei Hunden und Katzen in seltenen Fällen eine bilaterale ceruminöse Otitis externa auslösen. Dabei kann die Erkrankung auf den Ohrkanal beschränkt sein oder es können simultane Hautveränderungen auftreten⁴⁰. Andere parasitäre Hauterkrankungen im Kopfbereich können durch Juckreiz und Selbsttrauma eine sekundäre Otitis externa verursachen. Hierzu gehören *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*, *Cheletiella spp* und *Euthrombicula spp*⁴⁰.

3.1.2 Fremdkörper

Abgestorbene Haare, Pflanzensamen, Schmutz oder Sand können sich im Ohrkanal festsetzen und so eine Otitis externa verursachen. Mögliche Hinweise auf eine derartige Ursache sind eine unilaterale Präsentation und ein saisonales Auftreten, besonders bei Pflanzensamen oder Grannen. Die Patienten zeigen typischerweise akutes Kopfschütteln und Juckreiz an dem betroffenen Ohr⁴². Eine sofortige Konsultation des Tierarztes ist in so einem Fall unumgänglich, da Grannen feine Widerhaken besitzen und tief in den horizontalen Teil des Gehörgangs wandern können. Dies erhöht die Gefahr einer Perforation des Trommelfells und einer daraus resultierenden Otitis media⁴⁰.

3.1.3 Allergien

Allergien in Form einer Atopischen Dermatitis oder einer Futtermittelallergie stellen die häufigste primäre Ursache einer Otitis externa dar. Vor allem Patienten mit chronischen, bilateralen Otitiden sind oft an einer der Allergieformen erkrankt. Je nach Literaturstelle waren zwischen 75 - >90% der Hunde, die

aufgrund von chronischer Otitis bei einer Spezialisten-Praxis vorgestellt wurden, Atopiker^{43 44 40}. Bei den futtermittelallergischen Hunden waren es bis zu 80%⁴⁵. Die meisten allergischen Hunde zeigen zusätzlich Juckreiz und Effloreszenzen an anderen Körperteilen; Berichten zufolge war jedoch bei 3 – 5% der atopischen Hunde und 25% der futtermittelallergischen Hunde eine Otitis externa das einzige Symptom^{46 45}. Bei einer Allergie wird die Otitis externa sekundär durch Selbsttrauma ausgelöst oder die Hypersensitivitätsreaktion dehnt sich auf den Gehörgang aus. Betroffene Hunde zeigen initial meist ein Erythem der Pinna und des Gehörgangs zusammen mit einer milden epithelialen Hyperplasie gefolgt von Juckreiz und Kopfschütteln⁴³. Da eine Futtermittelallergie klinisch oft nicht von einer atopischen Dermatitis unterschieden werden kann ist eine systematische Allergieaufarbeitung wichtig, um die Grunderkrankung zu identifizieren und zu therapieren.

Kontaktallergien dienen im Vergleich selten als Ursache einer Otitis externa und treten vor allem als Reaktion auf Medikamentenapplikation im Gehörgang auf⁴⁰. Es handelt sich um eine Typ IV Hypersensitivität, die bewirkt, dass der Patient sich unter Therapie verschlechtert, und die zu einem vermehrten Erythem, Erosionen oder Ulzerationen im Gehörgang führen kann⁴⁰.

3.1.4 Keratinisierungsstörungen

Keratinisierungsstörungen werden durch hormonelle Imbalancen wie Hypothyreose oder Hyperöstrogenismus, primäre idiopathische Seborrhoe oder Sebadenitis ausgelöst. Infolge der veränderten Keratinstruktur und Zeruminaldrüsen-Funktion kommt es zu einer ceruminösen Otitis⁴⁰. Die Hyperthyreose ist die häufigste Endokrinopathie, bei der eine Otitis externa als Symptom auftreten kann, und betrifft überwiegend ältere Hunde oder Hunde mittleren Alters. Eine Rasseprädisposition konnte bei Cocker- und Springerspaniel, Bullterriern, Neufundländern, Bordeauxdoggen, English Setter und Labrador Retrievern beobachtet werden⁴³. Typischerweise zeigen die Hunde zusätzliche Symptome wie Gewichtszunahme, Lethargie, Fellveränderungen oder Sekundärinfektionen der Haut⁴⁷.

3.1.5 Autoimmunerkrankungen

Zu den Autoimmunerkrankungen, die die Pinna oder den externen Gehörgang betreffen können gehören Pemphigus foliaceus und erythematodes, discoidaler

Lupus, Vaskulitis und das bullöse Pemphigoid. All diese Erkrankungen sind sehr selten und präsentieren sich mehrheitlich multifokal an mehreren Körperstellen. Unter anderem sind häufig mukokutane Übergänge betroffen ⁴⁰.

3.2 Sekundäre Ursachen

Sekundäre Ursachen können eine Entzündung in bereits vorgeschädigten Ohren erhalten oder verschlimmern ⁴⁸. Manche Autoren ordnen die sekundären Ursachen den perpetuierenden Faktoren zu, sie sollen hier aber getrennt beleuchtet werden, da sie im Zusammenspiel mit anderen Faktoren in der Lage sind, als Trigger für eine Erkrankung zu fungieren, und die Prognose und Therapie unterschiedlich ist ⁴².

3.2.1 Bakterien

In vielen Fällen von Otitis werden *Staphylococcus intermedius/pseudintermedius*, *Pseudomonas ssp.*, *Proteus mirabilis*, *Escheria coli*, *Klebsiella*, *Corynebacterium spp.* oder *Streptococcus ssp* isoliert ^{49 35 27}. Manche dieser Keime können zwar auch als residente oder transiente Mikroflora im gesunden Ohr vorkommen, wird das Mikroklima jedoch durch eine vorliegende Entzündung beeinflusst, kann das Bakterienwachstum außer Kontrolle geraten. Es kommt zu „bacterial overgrowth“, der in einer klinisch apparenten Infektion resultieren kann ²⁷.

3.2.2 Hefen

Bei den Hefepilzen hat *Malassezia pachydermatis* die größte klinische Bedeutung. Auch dieser Erreger gehört in Maßen zur natürlichen Hautflora und kann bei Hunden in bis zu der Hälfte aller gesunden Ohren isoliert werden ⁵⁰. Liegt eine Otitis externa vor, können *Malassezia ssp.* in bis zu 76% der Hunde und 95% der Katzen nachgewiesen werden, oft simultan mit *Staphylococcus ssp.* ^{42 51}. Bei der Katze kommen seltener auch lipidabhängige *Malassezia ssp.* vor, wie *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. furfur* oder *M. restricta* ⁵¹. Ideale Bedingungen für eine Überwucherung mit *M. pachydermatis* finden sich bei Hunden, die häufig schwimmen oder eine allergische Grunderkrankung, haben ⁴².

3.3 Prädisponierende Faktoren

Prädisponierende Faktoren sind Prozesse oder Faktoren, die durch eine Veränderung des Mikroklimas im Ohr das Risiko erhöhen, an einer Otitis externa zu erkranken. Im Zusammenspiel mit perpetuierenden Faktoren und primären

bzw. sekundären Ursachen können sie eine klinisch manifeste Erkrankung auslösen⁴⁰.

3.3.1 Anatomische Besonderheiten

Manche Hunderassen haben aufgrund der charakteristischen Anatomie der Pinna und des Gehörgangs ein höheres Risiko an einer Otitis zu erkranken. Relevant scheinen hierfür unter anderem die Form der Ohrmuschel und des Gehörgangs, die Menge der Haare und die Anzahl an Talgdrüsen und apokrinen Drüsen im Gehörgang zu sein^{52 53 54}. Überrepräsentiert sind Cocker Spaniel (Schlappohren), Shar Peis und Bulldoggen (enge Gehörgänge), Pudel und Pudelkreuzungen (haarige Gehörgänge) und Deutschen Schäferhunde^{44 47 55}. Auf eine Monokausalität anatomischer Faktoren kann jedoch nicht geschlossen werden, da nicht alle Hunde mit Schlappohren oder haarigen Gehörgängen an einer Otitis externa erkranken. Vielmehr muss man davon ausgehen, dass diese Rassen auch eine Prädisposition für primäre Ursachen oder perpetuierende Faktoren aufweisen⁴⁰.

Andere anatomische Abnormitäten die das natürliche Milieu im Gehörgang beeinflussen können, sind entzündliche Polypen oder Neoplasien. Sie führen zu einer Stenose und mangelnden Belüftung, was in einer gestörten epithelialen Migration des Gehörgangs resultiert. Dadurch wird das Ohr empfänglich für Sekundärinfektionen^{40 47}. Polypen sind gutartige Zubildungen der epithelialen Mukosa, des Nasopharynx, der Tuba auditiva oder des Mittelohrs und werden mehrheitlich bei jungen Katzen gefunden^{56 57}. Tumore des Gehörgangs sind eher ungewöhnlich, häufiger können Zubildungen der Pinna beobachtet werden²⁶. Die meisten Tumore gehen von den Zeruminaldrüsen aus und können sowohl gutartig (Adenome) als auch bösartig (Adenokarzinome) sein. Weitere gutartige Neoplasien des Gehörgangs sind Papillome, Basalzelltumore, Tagdrüsenadenome und Histozytome. Zu den malignen Neoplasien gehören außerdem Plattenepithelkarzinome, Melanome, Sarkome und andere Karzinome⁵⁸.

3.3.2 Klimafaktoren

Sowohl ein verändertes Klima im Gehörgang, als auch eine Veränderung im Umgebungsklima kann einen Einfluss auf das Entstehen einer Otitis externa haben. Frequentes Baden führt bei Hunden zu einer vermehrten Feuchtigkeit im Ohr und unter Umständen auch zu einer Kontamination mit opportunistischen

Mikroorganismen (vor allem *P. aeruginosa*) oder hautirritierenden Substanzen⁴². Durch die Aufweichung des Gehörgangsepithels wird zusätzlich die Barrierefunktion der Haut herabgesetzt, was eine Entzündung durch opportunistische Keime ermöglicht⁴⁰. Auch eine Erhöhung von Umgebungstemperatur und Luftfeuchtigkeit spiegelt sich im äußeren Gehörgang wieder. So konnte beobachtet werden, dass die Häufigkeit einer Otitis externa zunimmt, wenn Umgebungstemperatur und relative Luftfeuchtigkeit ansteigen und es vermehrt regnet⁵⁹. Zusätzlich finden sich bei heißem und feuchtem Klima eine höhere Anzahl von Bakterien im äußeren Gehörgang⁶⁰. Es ist zudem wahrscheinlich, dass bei umweltallergischen Tieren eine Erhöhung des Pollenflugs zu einem gehäuften Auftreten von Otitis externa beitragen kann⁴⁷.

3.3.3 Iatrogene Faktoren

Zu den iatrogenen Faktoren gehört übermäßige Pflege des Gehörgangs, vor allem der Einsatz von Wattestäbchen oder das Ausreißen von Haaren, der Einsatz reizender Ohrmedikamente oder die zweckwidrige Anwendung antibakterieller Substanzen^{47 40}. Alle diese Faktoren führen zu einer Traumatisierung des Gehörgangs und einer Hautirritation, die es opportunistischen Erregern erleichtert, eine Erkrankung auszulösen. Säurehaltige oder adstringierende Ohrreiniger, sowie Ohrreiniger auf Alkoholbasis müssen mit besonderer Vorsicht verwendet werden, vor allem bei bereits vorgeschädigten Ohren⁴⁷. Die unsachgemäße Verwendung von Antibiotika kann zu einem Shift der Mikroflora und zu einer Selektion multiresistenter Bakterien im Gehörgang führen⁴⁰.

3.4 Perpetuierende Faktoren

Perpetuierende Faktoren können eine Gehörgangs-Entzündung unterhalten, auch wenn die primäre oder sekundäre Ursache bereits therapiert ist⁴⁷. Sie entstehen durch ein Zusammenwirken verschiedener Prozesse und müssen gezielt behandelt werden, damit die Erkrankung abheilen kann.

3.4.1 Fortgeschrittene pathologische Veränderungen

Eine chronische Entzündung kann zahlreiche Veränderungen im Gehörgang auslösen. Dazu gehören epitheliale Hyperkeratose und Hyperplasie, Ödem und Fibrose der Dermis sowie Hyperplasie und Dilatation der Zeruminaldrüsen., oft begleitet von einer Hidradenitis⁴⁷. In Folge dieser Modifikationen stenosierte der Gehörgang und die epitheliale Migration, die im Normalfall für die Beseitigung

von Cerumen, Zelldetritus, Talg und Keimen aus dem Gehörgang zuständig ist, wird nachhaltig gestört und kann sich sogar umkehren⁴². So können sich Hautfalten im Gehörgang bilden, in denen sich Sekrete und Exsudate ansammeln und wiederum Mikroorganismen ansiedeln. Es kommt zu einem Circulus vitiosus und zu einer zunehmenden Fibrose und Kalzifikation des Gehörgangs. Diese Fälle präsentieren sich oft als therapieresistente Otitis, da Ohrmedikamente durch das zunehmend verlegte Lumen nicht mehr bis an den Ort des Geschehens vordringen können⁴⁷.

3.4.2 Veränderungen des Trommelfells

Ein verändertes Trommelfell kann ödematös, verdickt und undurchsichtig werden. Es erscheint nicht mehr transparent, sondern kann eine weiße, gelbe, braune oder graue Färbung haben und so unter Umständen leicht mit Exsudat oder Keratinpfropfen verwechselt werden³⁹. Gleichzeitig kann das Trommelfell in chronischen Fällen von Otitis externa ausdünnen, da proteolytische Enzyme des entzündlichen Exsudates das Trommelfell angreifen³⁶. In seltenen Fällen kann sich das Trommelfell bis in die Paukenhöhle ausstülpen. In dieser Tasche kann sich keratinhaltiger Detritus ansammeln, der einen optimalen Nährboden für Bakterien und damit einen stetigen Infektionsherd bildet⁴². Rupturiert das Trommelfell kann sich eine Otitis media oder ein Cholesteatom entwickeln⁴⁷.

3.5 Otitis media

Eine Otitis media kann in bis zu 16% aller Hunde mit akuter und 82,6 % aller Hunde mit chronischer Otitis externa auftreten^{61 35}. Bleibt sie unbehandelt, kann sie eine Quelle für ständige Reinfektionen des Gehörgangs darstellen. Typischerweise entsteht eine sekundäre Otitis media durch das Eindringen von Exsudat, Debris und infektiösen Mikroorganismen durch ein rupturiertes Trommelfell³⁶. Das kubische Epithel des Cavum tympani, das Mukoperiosteum, wird durch die Entzündung zylindrisch mit papillärem Erscheinungsbild. Zusätzlich nehmen sekretorische Zellen und Drüsen zu, was zu einer vermehrten Schleimsekretion in die Paukenhöhle führt³⁶. So wird die Infektion innerhalb des Mittelohrs abgeschottet und eine topische Therapie aussichtslos⁴⁷. Seltener kann eine Otitis media auch primär durch aufsteigende Infektionen über die Tuba auditiva oder eine hämatogene Verbreitung entstehen^{36 62}. In diesen Fällen kann sie als primäre Ursache für eine Otitis externa fungieren. Beim Cavalier King

Charles und einigen anderen brachycephalen Hunderassen ist außerdem eine sehr seltene primäre sekretorische Otitis media (PSOM) beschrieben^{63 64}.

4. Diagnose und Therapie von Ohrinfektionen bei Hund und Katze

Das Vorliegen einer Otitis externa kann oftmals relativ einfach durch eine gründliche Anamnese und klinische Untersuchung diagnostiziert werden⁴². Dennoch bedürfen Otitiden einer umfassenden Untersuchung, um alle Ursachen und beteiligten Faktoren zu identifizieren. Besonders wichtig ist dies bei chronischen oder rezidivierenden Otitiden⁶⁵. Eine systematische Herangehensweise ist Voraussetzung, um zu erarbeiten, welche Faktoren im konkreten Fall zu dem Krankheitsgeschehen beitragen, und um Prognose und Therapieoptionen zu präzisieren⁴⁰. Hierfür werden eine detaillierte Anamnese, eine allgemeine und spezielle dermatologische Untersuchung und eine otoskopische Untersuchung mit Zytologie empfohlen^{12, 66, 67}. Gegebenenfalls kann weitere Diagnostik, wie das Durchführen einer bakteriellen Untersuchung mit Antibiogramm oder einer neurologischen Untersuchung, angeschlossen werden^{12, 37}. Ein langfristiger Therapieerfolg kann nur auf Basis einer umfassenden Aufarbeitung gewährleistet werden⁶⁸ und beruht auf der Ergreifung verschiedener Maßnahmen. Dazu gehören die sorgfältige Reinigung des Gehörgangs, die Behandlung von Sekundärinfektionen und Entzündungen und das Bekämpfen von Primärursachen und prädisponierenden, bzw. perpetuierenden Faktoren^{12, 37, 68, 69}.

4.1 Klinisches Bild einer Otitis externa

Der erste diskrete Hinweis im Anfangsstadium einer Otitis externa ist oftmals die zunehmende Vaskularisation des Gehörgangs⁷⁰, die jedoch nur otoskopisch feststellbar ist. Schreitet die Entzündung fort, breitet sich das Erythem weiter über das äußere Ohr auf die Pinna aus. In der Folge kann eine Vielzahl klinischer Symptome auftreten. Neben einem veränderten Ohr-Geruch oder sichtbarer Sekretbildung fallen dem Besitzer häufig vermehrter Juckreiz oder Kopfschütteln auf⁴². Bei anhaltendem starken Kopfschütteln steigt in weiterer Folge das Risiko der Bildung eines Otthämatoms durch Verletzung der Blutgefäße im elastischen Ohrknorpel¹². In manchen Fällen kann ein Hörverlust oder reduziertes Hörvermögen durch gezielte Fragen der Anamnese ermittelt werden, was meist auf einer Obstruktion des Gehörgangs durch Debris beruht⁷¹. Handelt es sich um

chronische oder rezidivierende Otitiden sind proliferativen Veränderungen wie eine Hyperplasie, Fibrose oder Mineralisierung des Bindegewebes im Bereich des äußeren Gehörgangs nachweisbar ⁴⁰. Ist zusätzlich das Mittelohr betroffen, können Kopfschiefhaltung oder Schmerzen beim Öffnen des Fangs auftreten ⁶⁸. Die Befunde einer klinischen Untersuchung sind vielfältig. Neben Primärläsionen wie einer Rötung oder Schwellung können Sekundärläsionen wie Schuppen, Krusten, Exkorationen oder Alopezie vorkommen ⁶⁸; ⁴². Ohrausfluss, Schmerzhaftigkeit bei der Palpation oder geschwollene Ohr-Lymphknoten sind weitere mögliche Manifestationen ¹². Manche Hunde zeigen trotz einer vorliegenden Otitis keine erkennbaren klinischen Symptome. So konnte eine Studie nachweisen, dass von 200 Hunden, die aufgrund anderer Probleme vorgestellt wurden, 16% eine Otitis hatten, die mittels Otoskopie diagnostiziert werden konnte ⁶⁰. Eine sorgfältige klinische Untersuchung inklusive Otoskopie ist entscheidend, um diese Patienten zu identifizieren.

4.2 Otoskopische Befunde beim Vorliegen einer Otitis externa

Bei jedem Patienten mit Ohrproblemen sollte eine otoskopische Untersuchung durchgeführt werden ⁶⁵. Sie ist unentbehrlich, um Fremdkörper im Gehörgang oder eine vorliegende Otitis media zu erkennen sowie Läsionen, Exsudat und progressive pathologische Veränderungen im Gehörgang zu beurteilen ⁴². In jedem Fall sollten beide Ohren untersucht werden, auch wenn der Patient wegen einer einseitigen Otitis vorgestellt wird. So kann das gesunde Ohr als Referenz für den Normalbefund dienen und eine gegebenenfalls vorliegende mildere Otitis im „gesunden“ Ohr wird nicht übersehen ⁷². Das gesunde, oder weniger betroffene Ohr wird zuerst untersucht ^{12, 72}. Wichtig ist, beide Ohren mit einem separaten, desinfizierten Ohrtrichter zu untersuchen, um einer Übertragung von Mikroorganismen in das jeweils andere Ohr vorzubeugen ⁴². Mittels eines Otoskopes werden der vertikale und horizontale Gehörgang untersucht und pathologische Veränderungen notiert. Die Beschaffenheit des Trommelfells, soweit einsehbar, wird ebenfalls beurteilt.

4.2.1 Gehörgang

Der gesunde äußere Gehörgang ist eben, von blassrosa Farbe und kann minimale Mengen blassgelben oder braunen Cerumens enthalten^{26, 72}. Je nach Hunderasse kommen physiologischerweise mehr oder weniger Haare im Gehörgang vor. Insbesondere bei Rassen wie dem Cockerspaniel, Zwerg- und Riesenschnauzer oder Airdale Terrier befinden sich aus einem Primär- und mehreren Sekundärfollikeln zusammengesetzte Haarfollikel oftmals auf der gesamten Länge des Gehörgangs, wohingegen bei Mischlingshunden und Greyhounds eher spärlich positionierte, singuläre Primärfollikel vorherrschen^{54, 73}. Bei manchen Hunden findet sich zusätzlich ein Haarbüschel distal und ventral des Trommelfells⁷². Auch die Anzahl der Talg- und Schweißdrüsen variiert beim Hund deutlich. Während die meisten Talgdrüsen sich im distalen Teil des Gehörgangs befinden, kommen die Schweißdrüsen, auch Zeruminaldrüsen genannt, gehäuft im letzten Drittel des Gehörgangs, nahe am Trommelfell, vor^{74, 75}. Ist der Gehörgang aufgrund einer akuten Otitis externa entzündet, kommt es zu einer Ödematisierung und Rötung des Gehörgangs und infolgedessen zu einer Stenose. Eine Hyperplasie der Epidermis und der Zeruminaldrüsen engt das Lumen weiter ein und deuten auf ein chronisches Entzündungsgeschehen hin, wohingegen Erosionen oder Ulzerationen meist im Zusammenhang mit einer bakteriellen Infektion, insbesondere mit Pseudomonaden, gesehen werden¹². Bei der otoskopischen Untersuchung sollte auch auf mögliche Fremdkörper oder Gewebewucherungen geachtet und Konsistenz, Farbe und Geruch des Sekrets beurteilt werden⁶⁸. Durch die Entzündung des Gehörgangs kommt es zu einer Veränderung der Sekretqualität, die Konsistenz kann von wässrig oder dünn über purulent bis wachsartig variieren²⁶. Bei einer Infestation mit *Otodectes cynotis* ist ein krümelig-trockenes, schwarzbraunes (kaffeesatzartiges) Cerumen beschrieben⁴⁰. Farbe, Qualität und Geruch des Cerumens können einen Hinweis auf zugrundeliegende Faktoren geben, sollten aber aufgrund mangelnder Korrelation immer im Zusammenhang mit einer zytologischen Untersuchung beurteilt werden^{48, 65, 67}.

4.2.2 Trommelfell

Das gesunde Trommelfell erscheint als dünne, halbtransparente Membran, der von medial das Manubrium des Malleolus anliegt. Durch eine bestehende Entzündung kann es deutlich opak bis fleischfarben, verdickt oder farblich

verändert sein^{12, 26}. Bei einer akuten schmerzhaften Otitis externa sowie bei chronischen Otitiden kann sich die otoskopische Untersuchung des Trommelfells aufgrund von Abwehrbewegungen oder einer Stenosierung des Gehörganges als sehr schwierig herausstellen. Unter Umständen kann es in solchen Fällen nötig sein, den Patienten vor der Untersuchung zu sedieren oder die Untersuchung nach einer initialen antiinflammatorischen Therapie zu wiederholen⁷². Um Sekretmassen vor dem Trommelfell zu lösen, können nebst einer Reinigung mit Ceruminolytika weitere Techniken, wie eine Ohrspülung oder die Verwendung einer Ohrschlaufe angewandt werden⁷⁶. Dennoch ist bei einer Otitis externa das Trommelfell in der Praxis häufig nicht einsehbar⁷⁶. Ist eine Beurteilung des Trommelfells nicht möglich, ist theoretisch immer von einer Ruptur des Trommelfells auszugehen, was Einfluss auf die Auswahl potentiell ototoxischer Medikamente hat¹². Defekte wie Risse oder Löcher im Trommelfell zeigen an, dass eine Otitis media vorliegt, wohingegen ein intaktes Trommelfell diese nicht ausschließt⁷², da Trommelfelldefekte trotz gleichzeitiger Infektion des Mittelohrs abheilen können. Beispielsweise hatten in einer Studie bis zu 72,5% der Hunde mit Otitis media ein intaktes Trommelfell⁷⁷. Erscheint das Trommelfell in der otoskopischen Untersuchung abnormal, sollte eine Myringotomie durchgeführt werden, um Proben für eine zytologische und bakteriologische Untersuchung zu erhalten⁷².

4.3 Zytologische Befunde beim Vorliegen einer bakteriellen Otitis externa

Die zytologische Untersuchung des Ohrsekrets ist eine minimalinvasive, kostengünstige Methode, um mit einer Otitis assoziierte Sekundärinfektionen zu identifizieren²⁷. Sie ist in der Praxis rasch durchführbar und ermöglicht die Auswahl einer spezifischen Therapie¹². Durch die semiquantitative Beurteilung kann außerdem eine Therapiekontrolle erfolgen und bei ausbleibender Besserung die Therapie gegebenenfalls angepasst werden²⁷.

4.3.1 Probengewinnung und -vorbereitung

Die gängigste Methode einer zytologischen Untersuchung ist die Entnahme einer Tupferprobe aus dem Gehörgang, die dann auf einem sauberen Objektträger ausgerollt wird²⁶. Dafür wird ein Wattestäbchen in den vertikalen Anteil des Gehörganges eingeführt, bis der Übergang vom vertikalen zum horizontalen

Gehörgang erreicht wird. Ein prominenter Knorpelkamm und der natürliche Knick des Gehörganges am Übergang, verhindern ein zu tiefes Eindringen des Tupfers²⁷. So kann der Tupfer gefahrlos rotiert werden, ohne eine Verletzung des Trommelfells zu riskieren^{49; 27}. Anschließend wird das gewonnene Material auf einen Objektträger aufgebracht und gefärbt. Die Probenentnahme sollte stets vor einer Reinigung der Ohren erfolgen und beide Ohren sollten getrennt beprobt und evaluiert werden, da sich die mikrobielle Besiedelung unterscheiden kann²⁷. Eine Hitzefixierung des Materials wird vielfach empfohlen, es konnte jedoch in einigen Studien gezeigt werden, dass dieser Schritt nicht nötig ist^{12, 27}. Zur Färbung des Präparates stehen verschiedene Färbelösungen zur Verfügung, am weitesten verbreitet sind Schnellfärbungen vom Romanowsky-Typ wie DiffQuick® oder Hemacolor®^{12, 78}. Sobald die gefärbten Objektträger trocken sind, können sie unter dem Mikroskop beurteilt werden.

4.3.2 Mikroskopische Auswertung

Das Präparat wird zunächst mit geringer Vergrößerung (40-fach) mäanderförmig durchgemustert, um Stellen zu identifizieren, die einer näheren Betrachtung unterzogen werden sollen. Das 40x Objektiv (vierhundertfache Vergrößerung) ermöglicht eine gute Beurteilung von Leukozyten, Erythrozyten, Korneozyten, Hefen und größeren Bakterien²⁷. Die tausendfache Vergrößerung kann zur näheren Betrachtung von Kokken und Stäbchen nötig sein⁷⁹.

Physiologisches Cerumen besitzt eine hohe Lipidkonzentration und eine geringe Zellzahl. Daher färben sich Ausstriche aus dem gesunden Gehörgang sehr schlecht an und erscheinen auf dem Objektträger farblos und fast unsichtbar^{26, 27}. Unter dem Mikroskop sind gelegentlich schattenhafte Umrisse der Lipide und Korneozyten erkennbar, die Melaningranula enthalten können. Diese abgeschilferten Hautschuppen färben sich basophil an und können sich während der Probengewinnung aufrollen. Melaningranula sind kleine, runde bis ovale, gelblich-braune Strukturen, die aufgrund ihres Aussehens leicht mit Kokken verwechselt werden können. Da sie sich, anders als Kokken, jedoch nicht anfärben, können sie durch auf- und Ab-Fokussieren von diesen unterschieden werden²⁷. Auch im gesunden Ohr können vereinzelt Bakterien und Hefepilze vorkommen. Koagulase negative *Staphylococcus* spp., und *Streptococcus* spp gehören als Kommensale zur physiologischen Keimflora des Ohres. Auch eine geringe Anzahl *Malassezia* spp. kann vorkommen, obwohl sie, allen voran

Malassezia pachydermatis, potentiell opportunistisch pathogen sind. Kommt es indes zu einer mikrobiellen Überbesiedelung oder werden neben Bakterien auch neutrophile Granulozyten nachgewiesen, muss der Befund als pathologisch betrachtet werden ²⁷. Stäbchenbakterien befinden sich, mit Ausnahme von *Corynebacteria* spp. oder vereinzelt Coliformen, physiologischerweise nicht im Ohr ²⁷. Dominieren sie das zytologische Bild, sollte eine mikrobiologische Untersuchung mit Antibiotogramm angeschlossen werden, da es sich häufig um *Pseudomonas* spp. oder *Proteus* spp. handelt, bei denen es schnell zu einer Antibiotikaresistenz kommen kann ¹².

In einem entzündeten Gehörgang steigt gewöhnlich auch die Zellzahl, so dass der gefärbte Ausstrich bereits makroskopisch von einer Probe eines gesunden Ohres zu unterscheiden ist. Er färbt sich im Vergleich deutlich stärker an und erscheint so blauer ²⁶. Keratinozyten sind im entzündlichen Exsudat vermehrt kernhaltig und können, beim Vorliegen einer Autoimmunerkrankung, auch abgerundet, akantholytisch, sein. Neben neutrophilen Granulozyten werden auch Makrophagen und bei intraluminalen Tumoren vereinzelt neoplastische Zellen gefunden ²⁶. Gelegentlich können zudem Parasiten, wie *Otodectes cynotis*, *Demodex* spp, *Sarcoptes scabiei* oder *Notoedres cati* im zytologischen Präparat sichtbar sein, obgleich letztere eher die Pinna befallen, als den Gehörgang ²⁷. Typischerweise wird beim Verdacht auf Milbenbeteiligung jedoch ein Nativpräparat untersucht ¹²

4.4 Kultur und Resistenztest als Therapiegrundlage

In den meisten Fällen werden Otitiden, zumindest initial, empirisch therapiert, da es sich um ein akutes Geschehen handelt, dessen Behandlung keinen Aufschub duldet. Die Auswahl des anzuwendenden Antibiotikums beruht dann auf Ergebnissen der klinischen und zytologischen Untersuchung und der klinischen Erfahrung des Tierarztes ⁸⁰. Bei chronisch-rezidivierenden oder therapieresistenten Otitiden, dem Wechsel des Antibiotikums, bei einer Infektion mit Stäbchenbakterien oder wenn eine Otitis media vermutet wird, ist eine ergänzende bakterielle Kultur mit Antibiotogramm durchzuführen ^{81, 26}. Mittlerweile werden auch zunehmend Resistenzen bei grampositiven Bakterien, insbesondere *Staphylococcus* spp, dokumentiert, sodass eine mikrobielle Kultur mit Antibiotogramm auch bei Kokken erwogen werden sollte ¹². Zudem besteht gemäß der Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV), die

am 01.03.2018 in Kraft getreten ist, eine AntibioGrammpflicht beim Einsatz von Cephalosporinen der 3. oder 4. Generation und Fluorchinolonen bei Hunden.

Einige Studien konnten nachweisen, dass sich bei bilateralen Otitiden Keimbesiedelung und Resistenzverhalten beider Proben teils deutlich unterscheiden^{49, 82}. So konnten Oliviera et. al. in 68% der beprobten Hunde einen signifikanten Unterschied zwischen der kultivierten Mikroflora des linken und rechten Ohres demonstrieren. Daraus resultiert die Empfehlung bei bilateralen Otitiden beide Ohren getrennt zu beproben und zu kultivieren⁸². Um basierend auf Kultur und AntibioGramm eine Therapieempfehlung auszusprechen, sind folgende Limitationen zu berücksichtigen: die Kultur kann nicht zwischen einer physiologischen Bakterienflora, bakterieller Überwucherung und einer echten Infektion unterscheiden. Daher werden im Labor häufig Resistenzmuster für alle nachgewiesenen Bakterien angegeben. Es liegt in der Hand des behandelnden Tierarztes, klinisch relevante Spezies zu identifizieren und das geeignete Therapeutikum auszuwählen²⁷. Des Weiteren spiegelt eine *in-vitro* nachgewiesene antimikrobielle Resistenz nicht zwingend die Empfindlichkeit *in-vivo* wieder, da eine lokale Applikation des Wirkstoffes zu höheren Konzentrationen im Gehörgang führt, als bei der systemischen Anwendung des gleichen Wirkstoffes erreicht wird¹¹. Zusätzlich können mehrere Wirkstoffe einfacher kombiniert werden⁴². Daher sollte der klinische Verlauf im Zusammenhang mit den Ergebnissen des Resistenztests bewertet werden.

4.5 Topische antibakterielle Therapie

Die topische Therapie ist der Schlüssel zu einer erfolgreichen Otitis Behandlung¹¹. Um Sekundärinfektionen und Entzündungen im Gehörgang zu bekämpfen, ist die lokale Verabreichung Mittel der Wahl, da so leichter therapeutisch wirksame Konzentrationen im Exsudat erreicht werden¹¹. Kommerziell erhältliche Otologika sind meist trivalent, mit je einer antibakteriellen, einer antimykotischen und einer antientzündlichen Komponente. Zusätzlich sind Trägerstoffe, Stabilisatoren und Lösungsmittel enthalten¹¹. Durch diese Wirkstoffkombination wird der multifaktoriellen Genese einer Otitis Rechnung getragen, so dass in den meisten Fällen mit einem Therapieerfolg gerechnet werden kann⁸³. Beeinträchtigt wird er unter Umständen durch multiresistente Keime, bei denen lizenzierte Ohrmedikamente vielfach keine Wirkung mehr zeigen¹². Voraussetzung für das Gelingen einer topischen Therapie ist eine gute Besitzercompliance. Eine

umfassende Aufklärung über die Form des Gehörgangs und das richtige Einbringen des Medikamentes ist daher unentbehrlich ¹².

Eine Übersicht der antibakteriellen Wirkstoffe zugelassener Ohrtherapeutika findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Zugelassene antibakterielle Wirkstoffe in Deutschland zur Behandlung der Otitis externa bei Hunden

Wirkstoff	Konz.	Konz. pro Anwendung	Präparat	Zulassungsinhaber	Zulassung
Marbofloxacin	3,0 mg/ml	0,71 mg	Aurizon Otoxolan Marbodex NorOtic	Vetoquinol TAD Pharma Norbrook Norbrook	Nicht anwenden bei perforiertem Trommelfell
Orbifloxacin	8,5 mg/ml	0,5 – 2,1 mg	Posatex	Intervet	Nicht bei Hunden mit perforiertem Trommelfell anwenden
Florfenicol	0,008 mg/ml	10 mg	Osumia	Elanco	Nicht anwenden bei perforiertem Trommelfell, nur <i>Staph. pseudointermedius</i>
Polymyxin B	0,5293 mg/ml	0,0793 – 0,1323 mg 0,1323 mg	Surolan Mitex	Elanco WDT	Nicht anwenden bei einem perforierten Trommelfell Nicht anwenden bei Tieren mit perforiertem Trommelfell
Gentamicin	1505/ 2640 IU/ml	1505 IU 267,6 – 1070,4 IU	Easotic Otomax	Virbac Intervet	Nicht anwenden bei perforiertem Trommelfell
Chloramphenicol	10 mg/ml	1 – 4 mg	Otiprin N	Vetoquinol Selectavet	k. A.

Überwiegend werden Aminoglykosidantibiotika, Polypeptidantibiotika oder Fluorchinolone verwendet, die sich aufgrund ihres breiten Spektrums anbieten ¹¹.

Aminoglykoside, wie Neomycin oder Gentamicin wirken bakterizid und teilweise bakteriostatisch, indem sie an die 30s-Untereinheit bakterieller Ribosomen binden und so Ablesefehler der mRNA verursachen. Dies führt zur Bildung nichtfunktioneller Proteine, was unter anderem eine erhöhte Permeabilität der Plasmamembran und schließlich eine Lyse des Erregers zur Folge hat ^{11, 83}. Sowohl Gentamicin als auch Neomycin zeigen gute bis sehr gute Wirksamkeit gegen grampositive Kokken und auch gegen gramnegative Aerobier, bei *Pseudomonas* und *E.coli* werden jedoch Resistenzen beobachtet ^{11, 12}. „Third-line“-Aminoglykoside, wie Amikacin und Ticarcillin, die in den USA insbesondere bei multiresistenten *Pseudomonas*-Otitiden Anwendung finden, sind nicht in Form von Ohrpräparaten verfügbar ¹¹.

Das Polypeptidantibiotikum Polymyxin B kann sich in die Zellmembran gramnegativer Bakterien einlagern, wodurch deren Funktion als Permeabilitätsbarriere gestört wird ^{11, 84}. Es wirkt so bakterizid auf extrazelluläre Keime. Grampositive Keime sind weniger empfindlich gegenüber Polymyxin B, somit sind höhere MHC-Konzentrationen erforderlich um diese Erreger abzutöten ⁸⁵. Zudem wird Polymyxin B in eitrigem Exsudat inaktiviert. Um einen Therapieerfolg zu gewährleisten, ist es also entscheidend, Faktoren zu identifizieren, die eine Wirksamkeit beeinträchtigen könnten, wie z.B. ein geringer pH-Wert, eitriges Exsudat oder eine hohe Proteinkonzentration ⁸⁵. Auch gegen Polymyxin B sind mittlerweile resistente Isolate bakterieller Otitiden dokumentiert, vorwiegend bei *P. aeruginosa*, *Proteus ssp.* und *S. pseudintermedius* ⁸⁵. Zur Verbesserung der antibakteriellen Wirksamkeit kann Polymyxin B mit anderen antimikrobiellen oder auch antimykotischen Wirkstoffen kombiniert werden. Beispielsweise zeigen sich synergistische Effekte in Kombination mit Rifampicin, Azithromycin oder Imipenem ⁸⁶. Für die Veterinärmedizin relevant ist die synergistische Wirkung in Verbindung mit Miconazol vor allem gegen gramnegative Erreger und *Pseudomonas spp* ^{85, 87}.

Marbofloxacin und Orbifloxacin sind Vertreter aus der Klasse der Fluorchinolone, die in kommerziellen tiermedizinischen Otologika Verwendung finden. Sie wirken bakterizid, indem sie die bakterielle DNA-Gyrase, eine Topoisomerase II, hemmen. Infolgedessen wird eine Überspiralisierung der DNA (Supercoiling)

verhindert, was zu Strangbrüchen in der DNA und einer fehlerhaften Replikation führt. Gleichzeitig wird auch die Topoisomerase IV gehemmt, so dass auch die Zellteilung beeinflusst wird⁸⁴. Sie zeichnen sich durch ein sehr breites Wirkspektrum gegen fast alle gramnegativen und grampositiven Erregern aus¹¹ sollten jedoch nicht als Mittel der Wahl bei unkomplizierten Otitiden eingesetzt werden, da es, besonders wenn subtherapeutische Dosen verwendet werden, schnell zu Mutation und Resistenzbildung kommen kann¹². Ein Enrofloxacin-haltiges Otologikum ist auf dem deutschen Markt nicht verfügbar, jedoch kann eine Enrofloxacin-Injektionslösung (Baytril® 25mg/ml Injektionslösung, Bayer Vital GmbH) lokal im Ohr angewendet werden.

Seit 2015 neu auf dem europäischen Markt verfügbar ist ein trivalentes Ohrengel für Hunde, das den Wirkstoff Florfenicol enthält⁸⁸. Es gehört zu der Familie der Fenicole, wie auch Chloramphenicol, das ebenfalls in einem kommerziell erhältlichen Ohrpräparat zur Verfügung steht. Beide sind potente Hemmer der bakteriellen Proteinsynthese, indem sie an die Propandiolseitenkette der 50S-Untereinheit der Ribosomen binden und so die Peptidyltransferasenaktivität hemmen⁸⁴. Die Wirkung ist generell bakteriostatisch und umfasst die meisten grampositiven und gramnegativen Bakterien. *Pseudomonas aeruginosa* ist resistent gegen Fenicole, daher ist das Kombinationsprodukt mit Florfenicol nur „zur Behandlung einer [...] Otitis externa, hervorgerufen durch *Staphylococcus pseudintermedius* und *Malassezia pachydermatis*“ zugelassen⁸⁹. Von einer Wirkung gegen MRSA und MRSP wird ausgegangen⁸⁷.

Maßgeblich für den Therapieerfolg ist grundsätzlich ein ausreichendes Volumen an Ohrmedikation in den Gehörgang einzubringen. 1 Milliliter pro Ohr wird als Richtgröße für die Behandlung angegeben und bei manchen kommerziell erhältlichen Präparaten automatisch eingestellt. Das Volumen reicht nach Angaben der Hersteller aus, um eine therapeutisch wirksame Konzentration der enthaltenen Antibiotika zu erhalten⁸⁷. Bei großen Hunderassen kann es jedoch nötig sein, die Herstellerangaben anzupassen, um eine optimale Wirkstoffkonzentration im Außenohr zu erreichen⁹⁰.

4.6 Systemische antibakterielle Therapie

Eine systemische antibakterielle Therapie wird von vielen Autoren empfohlen, sobald ausgeprägte Ulzerationen oder Erosionen im Gehörgang vorliegen, der

Gehörgang durch proliferative Veränderungen zu 50% oder mehr obstruiert ist, eine Otitis media diagnostiziert wurde, oder die Besitzer nicht in der Lage sind ein topisches Produkt zu applizieren^{11, 12, 42, 48}. Für die Therapie einer Otitis media sollten Wirkstoffe ausgewählt werden, die knochengängig sind oder bereits mit guten Resultaten eingesetzt wurden⁴². Geeignet sind beispielsweise Clindamycin, Cephalexin, Trimethoprim-Sulfadiazin, oder Fluorchinolone⁴². Nach Möglichkeit sollte eine systemische Therapie immer anhand eines Antibiogramms mit Resistenztest erfolgen oder nach initialer empirischer Therapie angepasst werden¹¹.

4.7 Potentielle Toxizität antibakterieller Therapie

Ist das Trommelfell nicht intakt oder nicht vollständig einsehbar, reduziert sich die Auswahl anzuwendender Substanzen maßgeblich. Nahezu keines der kommerziell erhältlichen Otologika ist zur Anwendung bei einem perforierten Trommelfell zugelassen (s. Tabelle 1), da die Gefahr einer Ototoxizität besteht, wenn bestimmte Substanzen bis in die Cochlea oder den Vestibularapparat vordringen^{12, 48}. Als ototoxische Antibiotika werden vor allem Aminoglykoside wie Tobramycin, Amikacin und Neomycin betrachtet^{42, 87, 91}. Das gehörschädigende Potential von Gentamicin scheint von der Formulierung und Applikationsart abzuhängen⁸⁷. Während eine parenterale Gabe, besonders über einen längeren Zeitraum, potentiell ototoxisch ist und bei der Katze ein Vestibularsyndrom auslösen kann^{11, 92}, konnte nach einer topischen Applikation bei Hunden mit experimenteller Myringotomie kein ototoxischer Effekt nachgewiesen werden⁹². Systemisch angewendete Aminoglykoside können außerdem nephrotoxisch sein, daher sollte die Nierenfunktion unter Therapie kontrolliert werden⁸⁷. Polymyxin B besitzt ebenfalls ototoxisches und kontaktsensibilisierendes Potential^{12, 93}. Fluorchinolone weisen ein höheres Sicherheitsprofil auf, auch bei der Anwendung im Innenohr. Diverse experimentelle Studien konnten nachweisen, dass sowohl von der topischen, als auch der systemischen Anwendung von Ciprofloxacin kein ototoxischer Effekt ausgeht, obwohl der Wirkstoff die Perilymphe penetriert⁹⁴⁻⁹⁶. Jedoch sollten Fluorchinolone bei jungen Hunden unter 12 Monaten (18 Monaten bei großwüchsigen Rassen) nur nach strenger Indikation angewendet werden, da sie Knorpelschäden verursachen können⁸⁴. Zudem besteht bei Katzen die Gefahr einer Retinadegeneration bei der Anwendung hoher Dosen Enrofloxacin⁹⁷.

4.8 Bekämpfung von prädisponierenden/primären/perpetuierenden Faktoren

Neben der Behandlung der Sekundärinfektionen und Entzündungen ist es für ein erfolgreiches Otitis-Management von essentieller Bedeutung die primären Ursachen zu therapieren und prädisponierende/perpetuierende Faktoren zu optimieren^{12, 98}. Nur wenn diese identifiziert und gezielt angegangen werden, kann eine Otitis auf Dauer erfolgreich kontrolliert werden.

Eine gründliche Anamnese zusammen mit einer umfassenden dermatologischen Untersuchung bilden den Grundstein für die weitere Aufarbeitung und liefern erste Hinweise für die zugrundeliegende Primärursache. Je nach Befund und Verdacht werden weiterführende Untersuchungen, wie Blutuntersuchungen, Dermatopathologie oder eine Allergieaufarbeitung eingeleitet. Ist die Primärursache ermittelt, wird, soweit möglich, eine kausale Therapie eingeleitet.

Parasitosen, wie eine Infestation mit *Otodectes cynotis* werden mit einem geeigneten Akarizid (beispielsweise Selamectin oder Moxidectin) behandelt^{99, 100}. Ein 2015 für Katzen lizenziertes Kombinationsprodukt aus Fipronil, (S)-Methopren, Eprinomectin und Praziquantel, sowie die neue Klasse der Isoxazoline zeigen ebenfalls eine sehr gute Wirksamkeit gegen verschiedene Milbenspezies, unter anderem *Otodectes cynotis*¹⁰¹⁻¹⁰⁵, sind jedoch nicht alle für diese Indikation zugelassen.

Fremdkörper im Gehörgang werden mit einer Pinzette oder Fremdkörperzange unter Sichtkontrolle entfernt. Um diese Prozedur möglichst schmerzfrei zu gestalten und das Risiko einer Trommelfellperforation bei Abwehrbewegungen zu senken, sollte der Eingriff unter Allgemeinanästhesie durchgeführt werden⁷².

Wird mittels Allergieaufarbeitung eine Überempfindlichkeit gegenüber Futtermitteln nachgewiesen, kann durch das Umstellen auf eine geeignete Futterquelle eine klinische Besserung erreicht und das Rezidivrisiko minimiert werden. Mögliche Protein- und Kohlenhydratquellen können im Anschluss an eine Eliminations-Diät nach und nach auf Verträglichkeit getestet werden (sequentielle Provokation). Zeigt der Patient in einem Zeitraum von 14 Tagen nach der Futterumstellung keine Verschlechterung, kann davon ausgegangen werden, dass das Antigen verträglich ist^{45, 106, 107}. Eine Alternative zur sequentiellen Provokation stellt der Patch-Test dar, bei dem Futterproben auf die

Haut geklebt werden. In einer Studie von Bethlehem et al. konnte ein hoher negativer prädikativer Wert für Patch-Tests nachgewiesen werden (99.3%), folglich wird ein Antigen mit einem negativen Testresultat mit hoher Wahrscheinlichkeit von dem Patienten toleriert ¹⁰⁶.

Die atopische Dermatitis ist eine Ausschlussdiagnose ¹⁰⁸. Bevor sie gestellt werden kann, müssen alle anderen Ursachen, die in Betracht kommen, von der Differentialdiagnosen-Liste eliminiert werden. Die einzige kausale Behandlungsoption bei atopischer Dermatitis ist die Allergen Immuntherapie oder Hyposensibilisierung, bei der dem Patienten zunehmende Konzentrationen ausgewählter Allergene verabreicht werden, mit dem Ziel eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu verhindern und so die Symptome zu lindern ¹⁰⁹. Wird symptomatisch therapiert, ist das Ziel, die Allergenbelastung in der Umwelt und auf der Haut zu reduzieren und den Juckreiz medikamentös zu lindern ¹¹⁰.

Durch hormonelle Imbalancen verursachte Keratinisierungsstörungen werden therapiert, indem das hormonelle Gleichgewicht wiederhergestellt wird. Im Falle einer Hypothyreose wird dies durch die Substitution von Natriumlevothyroxin (synthetischem Thyroxin) erreicht. Gonadenabhängige Geschlechtshormon-Imbalancen sind häufig neoplastischen Ursprungs, daher ist die chirurgische Resektion der entarteten Organe meist Mittel der Wahl ¹¹¹. Idiopathische Keratinisierungsstörungen werden symptomatisch, beispielsweise durch zeruminolytische Ohrreiniger, behandelt.

Autoimmunerkrankungen werden durch die Gabe von Immunsuppressiva (überwiegend Glukokortikoide oder Cyclosporin, seltener auch Azathioprin, Chlorambucil, Cyclophosphamid oder Hydroxychloroquin) kontrolliert ⁴².

Prädisponierende und perpetuierende Faktoren können durch verbessertes Management und intensive Besitzeraufklärung minimiert werden. Teilweise ist auch eine gesonderte Therapie nötig, wie etwa bei einer Otitis media ¹¹.

4.9 Unterstützende Therapie

Die gründliche Reinigung des Gehörgangs ist ein wichtiger Teil des Behandlungskonzepts einer Otitis externa, damit das Management und die medikamentöse Therapie auch langfristig erfolgreich sind ^{48, 65, 112}. Bei der Säuberung des Gehörgangs werden Exsudat, Debris und Zerumen entfernt, die sonst eine vollständige Untersuchung des Gehörgangs und des Trommelfells und

eine Migration der Otologika zum Wirkort erschweren. Zusätzlich werden bakterielle Toxine, Zelldetritus und freie Fettsäuren beseitigt, die als Stimulus für weitere Entzündungsreaktionen dienen, sowie Eiter und entzündlicher Debris, welche die Wirksamkeit einiger Medikamente beeinträchtigen ⁴⁸. Eine breite Vielfalt verschiedenster Produkte mit unterschiedlichen Wirkstoffen steht zur Verfügung. Die Wahl des richtigen Ohrreinigers basiert auf der Qualität und Quantität des Ohrausflusses, dem Schweregrad der Entzündung, dem zytologischen Befund und darauf, ob das Trommelfell unversehrt ist ⁶⁸. Zeruminolytische Ohrreiniger werden vor allem bei starken wachsartigen Zerumenansammlungen angewendet. Sie enthalten Tenside wie z.B. Dioctylnatriumsulfosuccinat, Squalen oder Schaumbildner (z.B. Carbamidperoxid) die den Ohrschmalz aufspalten und emulgieren. Manche Inhaltsstoffe können jedoch reizend auf das Mittelohr wirken und sind daher bei einem rupturierten Trommelfell kontraindiziert ^{68, 112}. Mildere Reiniger auf Basis von Propylenglykol, Phytosphingosiden oder Glycerin werden bei leicht verschmutzten Ohren, oder zur Begleittherapie und Prophylaxe, beispielsweise bei atopischer Otitis eingesetzt ¹¹². Adstringentien trocknen die Oberfläche des Gehörgangs aus und verhindern so eine Mazeration. Aktive Bestandteile sind z.B. Essigsäure, Salicylsäure, Isopropylalkohol oder Schwefel. Ein Anwendungsgebiet dieser Gruppe ist die Otitis-Prophylaxe bei „Schwimmer-Ohren“ ^{68, 112}.

Manche Ohrreiniger enthalten auch antifungale (z.B. Essigsäure, Parachlorometaxylenol, Chlorhexidin) oder antibakterielle (z.B. Essigsäure, Salicylsäure, Chlorhexidin, Parachlorometaxylenol, TrisEDTA) Wirksubstanzen ^{68, 112}.

Bei chronischen Otitiden mit starker Verschmutzung und Entzündung müssen die Ohren initial gegebenenfalls stationär unter Sedation oder Vollnarkose gespült werden. Der Vorteil einer Ohrspülung unter Sichtkontrolle mittels Videootoskop besteht darin, dass auch besondere Reinigungsutensilien wie Bürsten oder Greifzangen verwendet werden können ¹¹².

4.10 Möglichkeiten im Therapienotstand

Ist das Trommelfell rupturiert oder liegt eine Infektion mit multiresistenten Keimen, insbesondere *P. aeruginosa*, vor, schränkt dies die medikamentösen Therapieoptionen deutlich ein. Einige Autoren beschreiben eine Umwidmung von

Reserveantibiotika wie Amikacin oder Tobramycin als Alternative bei Gentamicin-resistenten gramnegativen Keimen (besonders *P. aeruginosa*)^{11, 42, 65}. Ticarcillin, ein Carboxypenicillin, zeigte in einer Studie eine gute Wirksamkeit gegen Fluorchinolon-resistente *P. aeruginosa*, sowohl in der topischen Applikation als auch in Kombination mit einer systemischen Anwendung¹¹³. Für keinen dieser Stoffe steht jedoch ein zugelassenes Veterinärprodukt in Deutschland zur Verfügung, bei Amikacin und Tobramycin könnten humanmedizinische Injektionslösungen umgewidmet werden

Insbesondere bei multiresistenten Keimen ist es möglich eine Enrofloxacin-Injektionslösung (25 mg/ml, Baytril® 2,5%) als Ohrentropfen zu verwenden¹². In der Medizinischen Kleintierklinik der LMU München wird die Injektionslösung im Verhältnis 9:9:1 mit Natrium-Chlorid und Hexadreson oder im Verhältnis 6:6:6:1 mit Clotrimazol (Canesten®), Natrium-Chlorid und Hexadreson vermischt. Daraus ergibt sich eine Konzentration von 11,25, bzw. 7,5mg/ml. Ein zugelassenes Ohrmedikament, das Enrofloxacin in einer Konzentration von 5mg/ml und zusätzlich Silbersulfadiazin in einer Konzentration von 10mg/ml enthält (Baytril® Otic) ist auf dem deutschen Markt nicht erhältlich und müsste aus dem Ausland importiert werden.

Im Falle therapieresistenter chronischer Otitiden, in denen der Gehörgang bereits chronische Veränderungen wie Fibroplasie oder Ossifikation aufweist, die nicht mehr reversibel sind, wird die chirurgische Intervention durch Totalablation des Gehörgangs mit lateraler Bullaosteotomie als letzte therapeutische Maßnahme empfohlen⁴². Neben dieser Indikation wird auch eine chronische Mittelohrentzündung als Grund für eine operative Therapie angegeben, um das Übergreifen der Infektion auf das Os petrosum und später das Gehirn zu vermeiden¹².

5. Resistenzbildung von Mikroorganismen im Allgemeinen und *Pseudomonas aeruginosa* im Speziellen

Der Begriff „Antibiotikaresistenz“ wird definiert als Unempfindlichkeit eines Mikroorganismus gegenüber einem antimikrobiellen Wirkstoff^{114, 115}. Dies bedeutet, dass dieser Mikroorganismus die Fähigkeit besitzt, sich der wachstumshemmenden oder abtötenden Wirkung eines Antibiotikums zu widersetzen. Eine ursprünglich festgelegte minimale Hemmstoffkonzentration

(MHK), die in der Lage war das Bakterienwachstum zu unterdrücken reicht dann unter Umständen nicht mehr aus um den Erreger zu kontrollieren. Klinisch liegt eine Resistenz dann vor, wenn die erforderliche MHK für den Erreger so hoch ist, dass bei der Verwendung der zugelassenen Regeldosis (mit der sonst therapeutisch wirksame Gewebe- und Serumkonzentrationen erreicht werden können) kein Heilungserfolg zu erwarten ist ¹¹⁶. Wie stark die Wirksamkeit eingeschränkt wird, kann variieren, je nachdem welches Antibiotikum bei welchem Bakterienstamm eingesetzt wird und welche Resistenzmechanismen dieses Bakterium besitzt ¹¹⁵.

Anders als früher angenommen handelt es sich bei Antibiotikaresistenz keineswegs um ein modernes Phänomen: Bakterien, die aus einer Höhle des Höhlensystems Lechuguilla in Neu Mexiko isoliert wurden, die seit ca. vier Millionen Jahren von der Außenwelt abgeschnitten war, zeigten Resistenzen gegen mehrere gängige Antibiotika. Bei drei Stämmen konnte sogar eine Resistenz gegen 14 therapeutisch eingesetzte Antibiotika nachgewiesen werden ¹¹⁷. Funde bakterieller Resistenzgene in Permafrostboden, datiert auf das späte Pleistozän, unterstützten die These, dass Bakterien bereits lange vor der medikamentösen Verwendung von Antibiotika genetische Veränderungen durchmachten und natürliche Resistenzmechanismen entwickelten, die im Rahmen der Evolution ihr Überleben garantiert haben ¹¹⁸.

5.1 Natürliche Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa*

Generell kann zwischen natürlicher und erworbener Resistenz unterschieden werden. Natürliche, auch intrinsische oder primäre Resistenz, beschreibt ein Gattung- oder speziesspezifisches Merkmal, welches die Resistenz gegen eine bestimmte Wirkstoffklasse ermöglicht. Beispielsweise werden Wirkstoffe durch zelluläre Barrieren am Eindringen in die Zelle gehindert oder die spezifische Angriffsstelle für das Antibiotikum fehlt gänzlich ¹¹⁵.

Die natürliche Resistenz bei *P. aeruginosa* beruht auf mehreren spezifischen Eigenschaften des Bakteriums. Zum einen besitzt *P. aeruginosa*, wie andere gramnegative Bakterien eine, der Zellwand aufgelagerte, zweite (äußere) Membran. Diese asymmetrische Lipiddoppelschicht, bestehend aus einer inneren Lage Phospholipide und einer äußeren Lage amphiphiler Strukturen, unter anderem Lipopolysaccharid, dient als Diffusionsbarriere, vor allem für große

Moleküle und erschwert die Diffusion hydrophober Antibiotika ¹¹⁹. Eine Besonderheit bei *P. aeruginosa* ist die geringe Anzahl funktioneller Porine in der äußeren Membran ¹²⁰. Hydrophile Stoffe nutzen diese Kanalproteine um ins Innere der Bakterienzelle zu gelangen. Im Vergleich zu anderen gramnegativen Bakterien ist daher die Permeabilität der äußeren Membran noch um ein Vielfaches geringer ¹²¹. Die Membrandurchlässigkeit für β -Lactam-Antibiotika beträgt im Vergleich zu *E. coli* beispielsweise nur 1 – 5% ¹¹⁹.

Des Weiteren besitzt *P. aeruginosa* mehrere Multi-Drug Resistance Pumpen (MDR-Pumpen), die unerwünschte Stoffe aktiv aus der Bakterienzelle herausbefördern können. Bisher konnten sieben dieser Effluxsysteme bei *P. aeruginosa* charakterisiert werden: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexVW-OprM und MexGHI-OpmD. Alle gehören zu der Familie der RND-Transporter (Resistance-Nodulation-Cell Division Transporter), die vor allem in gramnegativen Bakterien zu finden sind ¹²².

MexAB-OprM und MexXY-OprM werden im Wildtyp konstitutiv exprimiert und tragen maßgeblich zur intrinsischen Antibiotikaresistenz bei. Durch Knock-out Versuche konnte gezeigt werden, dass MexAB-OprM vor allem für die Resistenz gegen Chinolone, Tetracycline, Chloramphenicol, Sulfamethoxazol, Trimethoprim und β -Lactame verantwortlich ist, wohingegen MexXY-OprM vor allem für Aminoglykosidantibiotika oder Erythromycin zuständig ist ¹²³. Im Gegensatz zu den konstitutiv exprimierten Pumpen kommen die anderen in klinischen Isolaten nachgewiesenen Systeme, MexCD-OprJ und Mex EF-OprN, nicht im Wildtyp vor ¹²⁴. Sie spielen somit keine Rolle für die intrinsische Resistenz von *P. aeruginosa* und werden nur in Anwesenheit ihrer Substrate exprimiert ¹²².

Ein dritter wichtiger Resistenzmechanismus bei *P. aeruginosa* ist eine chromosomal codierte, induzierbare AmpC- β -Lactamase. Das bei einigen gramnegativen Nonfermentern vorkommende Enzym kann den β -Lactamring von Cephalosporinen, aber auch Penicillinen, Monobactamen und teilweise sogar Carbapenem hydrolysieren und führt so zu einer eingeschränkten Wirksamkeit dieser Substanzen ¹²⁵. Zudem kann sie nicht durch β -Lactamase-Inhibitoren wie Clavulansäure oder EDTA gehemmt werden. Die AmpC- β -Lactamase wird gemäß der molekularen Klassifikation nach Ambler, entsprechend ihrer

Aminosäuresequenz, in die Klasse C eingeordnet und bei Bush et al zu der Gruppe der Cephalosporinasen (Gruppe 1) gezählt^{125, 126}. *P. aeruginosa* ist in der Lage auch Serin- β -Lactamasen anderer Klassen (A&D), sowie Metallo- β -Lactamasen und Extended-Spektrum- β -Lactamasen zu produzieren. Diese sind jedoch Plasmid- oder Integron-codiert oder entstehen durch Punktmutation¹²⁷. Wie auch die Überexpression der AmpC- β -Lactamase werden sie daher zu den erworbenen Resistenzen gezählt.

5.2 Erworbene Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa*

Zusätzlich zu den natürlichen Resistenzmechanismen besitzt *P. aeruginosa* erworbene, sekundäre, Resistenzen, die im Laufe der Zeit zufällig oder gezielt entstanden sind. Erworbene Resistenz beinhaltet einen Wirksamkeitsverlust eines primär nicht resistenten Bakteriums durch den Selektionsdruck unter Antibiotikaeinsatz und kann gegen jedes verwendete Therapeutikum gerichtet sein. Erworbene Resistenzmechanismen sind in der Regel charakteristisch für einen Bakterienstamm und resultieren aus der Mutation chromosomaler Gene oder der Übertragung mobiler DNA-Moleküle¹¹⁵. Sie können in drei Kategorien eingeteilt werden: enzymatische Modifizierung oder Inaktivierung der Wirksubstanz, Reduktion der intrazellulären Akkumulation oder Mutationen am Zielort des Antibiotikums¹²⁸.

5.2.1 Enzymatische Inaktivierung

Verschiedenste Enzyme befähigen *P. aeruginosa* dazu Antibiotika entweder direkt zu zerstören (Bsp. Spaltung des β -Lactamrings durch β -Lactamasen) oder durch Modifikation der chemischen Struktur zu inaktivieren. Zu den erworbenen Resistenzmechanismen dieser Art gehören die Überexpression der chromosomalen AmpC- β -Lactamase, erworbene β -Lactamasen, wie Extended-Spektrum- β -Lactamasen (ESBL) oder Metallo- β -Lactamasen (MBL) und Aminoglykosid-modifizierende Enzyme¹²⁹.

Eine konstitutive Überexpression der AmpC- β -Lactamase entsteht häufig durch eine Mutation der N-Acetylanhydromuramyl-L-Alanin Amidase (AmpD), was den komplexen Regulationsmechanismus der induzierbaren Amp-C-Expression außer Kraft setzt¹³⁰. Solche mutierten Bakterienzellen können mit einer Häufigkeit von bis zu 10^{-5} in einer Population auftreten und durch Selektion zu einer Resistenzentwicklung unter Therapie führen¹²⁵.

Erworbene β -Lactamasen umfassen verschiedenste Enzyme, die den β -Laktamring hydrolytisch über einen Serin-Rest oder mit Hilfe von bivalenten Zink-Ionen im katalytischen Zentrum spalten. Sie sind plasmidisch kodiert und können leicht von Bakterium zu Bakterium übertragen werden¹²⁵. Die bei *P. aeruginosa* am häufigsten nachgewiesenen erworbenen β -Lactamasen sind die Carbapenicillinasen PSE-1 und PSE-4. Sie können durch Clavulansäure inaktiviert werden und reagieren meist sensibel auf Carbapeneme¹²⁹. Ebenso die eher seltenen TEM- β -Lactamasen oder OXA-Oxalinasen¹²⁵. Punktmutationen in vielen bereits bekannten β -Lactamase-Genen führen zum Auftreten von Enzymen mit breiterem Spektrum, den Extended-Spektrum- β -Lactamasen (ESBL), die in der Lage sind auch Cephalosporine der 3. Generation zu hydrolysieren¹²⁹. Zu ihnen gehören beispielweise die TEM- oder SHV-ESBL, diverse OXA-Extended-Spektrum- β -Lactamasen und PER-1, eine Amler-Klasse A β -Lactamase^{129, 131}.

Von besonderer Bedeutung sind auch die Metallo- β -Lactamasen, die, bis auf wenige Ausnahmen, sämtliche β -Lactame, einschließlich der Carbapeneme inaktivieren können. Für *P. aeruginosa* konnten bislang vier unterschiedliche Typen von Metallo- β -Lactamasen in 28 Ländern nachgewiesen werden¹³². Ihre rasche, weltweite Verbreitung stellt eine erstzunehmende Gefahr dar, zumal auf demselben Plasmid auch Resistenzgene vorkommen können, die Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen, wie Aminoglykoside oder Fluorchinolone vermitteln¹³².

Zu diesen gehören auch die Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme. Sie modifizieren das Wirkstoffmolekül, indem sie Acetyl-, Adenyl- oder Phosphatgruppen anhängen und so die Fähigkeit des Moleküls an seine Zielstruktur zu binden signifikant reduzieren¹²⁸.

5.2.2 Reduktion der intrazellulären Wirkkonzentration

Die Reduktion der intrazellulären Wirkkonzentration eines Antibiotikums wird durch einen verstärkten Efflux oder einen reduzierten Influx der Substanz erreicht. Erworbene Resistenzmechanismen, die in diese Kategorie fallen sind der Verlust des Porins OprD (outer membrane protein) und die Überexpression von Effluxsystemen^{128, 129}.

OprD ist ein Transmembranprotein, das der Aufnahme basischer Aminosäuren dient. Carbapeneme können ebenfalls durch dieses Porin in die Bakterienzelle

gelangen. Der Verlust des Porins OprD führt zu einer deutlich erhöhten MHK für Imipenem und einer verminderten Empfindlichkeit der Mutanten für Meropenem^{128, 129, 133, 134}.

Die Überexpression der MDR-Pumpe MexAB-OprM, die bereits bei den natürlichen Resistenzmechanismen beschrieben wurde, reduziert die Empfindlichkeit gegenüber Fluorchinolonen, Penicillinen, Cephalosporinen und Meropenem¹²⁹. Erreicht wird dieses Phänomen meist durch Mutation im Repressor Mex-R des mexA-mexB-oprM. Auch andere Effluxsysteme, wie MexCD-OprJ, MexEF-OprN und MexXY-OprM können in ähnlicher Weise hochreguliert werden¹²⁹. Letzteres ist als einziges der bei *P. aeruginosa* relevanten Effluxsysteme in der Lage, aktiv Aminoglykoside aus der Bakterienzelle zu schleusen, und wird daher in Zusammenhang mit der adaptiven Aminoglykosid-Resistenz von *P. aeruginosa* gebracht¹³⁵.

5.2.3 Zielort-Mutationen

Die dritte Kategorie erworbener Resistenzmechanismen beruht darauf, Zielstrukturen innerhalb der Bakterienzelle so zu verändern, dass das eingesetzte Antibiotikum nicht mehr binden kann und so wirkungslos wird^{136, 137}.

Bei *P. aeruginosa* sind durch diesen Resistenzmechanismus vor allem die Fluorchinolone betroffen, deren Zielstrukturen, die DNA-Gyrase und Topoisomerase IV, durch Mutationen in den codierenden Genen (*gyrA*, *gyrB*, *parC* und *parE*) modifiziert werden. Ein Großteil der Mutationen befindet sich innerhalb der quinolone-resistance determining region (QRDR) in dem Gen *gyrA*, welches für die A-Untereinheit der DNA-Gyrase kodiert, dem Hauptangriffspunkt der Fluorchinolone¹³⁷. In welchem Umfang die Wirksamkeit einzelner Substanzen beeinträchtigt ist, hängt auch von deren Affinität zur veränderten Struktur ab. Ciprofloxacin beispielsweise hat im Vergleich zu anderen Fluorchinolonen die höchste Affinität gegenüber GyrA und die Wirkstärke in *gyrA*-Mutanten ist dadurch ca. um den Faktor 16 reduziert¹³⁶.

Eine ungewöhnlich hohe MHK gegenüber verschiedensten Aminoglykosid-Antibiotika in einigen *P. aeruginosa* Isolaten konnte durch ein Gen erklärt werden, welches durch eine Methylierung der ribosomalen 16S RNA die Zielstruktur dieser Antibiotika verändert¹³⁸.

Eine therapeutische Herausforderung ist spätestens dann gegeben, wenn mehrere

Resistenzmechanismen miteinander kombiniert werden. Solche panresistenten Phänotypen können gegen mehrere Antibiotikaklassen gleichzeitig resistent sein und die Behandlungsmöglichkeiten infizierter Patienten massiv beeinträchtigen¹³⁹.

6. Definition von Multiresistenz

Eine international einheitliche Definition von Multiresistenz existiert bis dato noch nicht^{140, 141}. In der Literatur finden sich mehrere Versuche, diese zu definieren. Die Erreger werden dabei als MDROs (multidrug-resistant organisms), MDR-GNB (multidrug-resistant gram-negative bacilli) oder HRMO (highly resistant microorganisms) bezeichnet¹⁴²⁻¹⁴⁴. Übereinstimmungen finden sich in der Grundlage der Eingruppierung, welche auf der Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen beruht, nicht auf Basis der jeweiligen Resistenzmechanismen. Dabei wird je nach Erreger eine dokumentierte Resistenz gegen Stoffe einer, zwei oder drei verschiedener Antibiotikaklassen als Multiresistenz definiert¹⁴²⁻¹⁴⁴. 2011 wurde durch eine internationale Arbeitsgruppe ein Vorschlag für Standarddefinitionen erworbener Resistenzen erarbeitet¹⁴⁵. Mit dem Ziel den Informationsaustausch zu erleichtern und die epidemiologische Überwachung zu verbessern und so Trends in der Resistenzbildung besser zu erkennen, wurden für einige relevante pathogene Erreger Kriterien für eine Multiresistenz, extensive Resistenz oder Panresistenz festgelegt.

Demnach gilt ein Isolat von *P. aeruginosa* als „multidrug-resistant“ (MDR) wenn es gegen mindestens 1 Vertreter in ≥ 3 von 8 vorgegebenen Antibiotika-Kategorien resistent ist. Als „extensively drug resistant“ (XDR) gelten Isolate, die gegen mindestens 1 Vertreter in allen bis auf maximal 2 Kategorien resistent sind. „Pandrug-resistant“ (PDR) bezeichnet Isolate, die gegen alle aufgeführten Antibiotikaklassen resistent sind¹⁴⁵. Als Grundlage für die Empfindlichkeitsprüfung dienen klinische Grenzwerte (clinical breakpoints), die durch das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), das Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) oder die US Food and Drug Administration (FDA) festgelegt werden.

Die aufgelisteten Antibiotika-Kategorien sind spezifisch auf den jeweils zu definierenden Erreger angepasst. Demnach sollte ein Isolat von *P. aeruginosa*

gegen folgende, therapeutisch relevante Gruppen getestet werden: Aminoglykoside, Carbapeneme, Cephalosporine, Fluorchinolone und Penicilline mit antipseudomonaler Wirkung, Monobactame, Epoxid-Antibiotika (Fosfomycin) und Polymyxine.

Einen mehr klinisch-therapeutischen Ansatz der Definition der Multiresistenz bei gramnegativen Stäbchen erarbeitete die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert-Koch Institut ¹⁴⁶. Auf Grundlage der klinischen Signifikanz einer Resistenz eines Phänotyps gegen einen bestimmten Stoff werden die Erreger der Gruppe 3MRGN (Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen 3 der 4 therapeutisch relevanten Antibiotikagruppen) oder 4MRGN (Multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen 4 der 4 therapeutisch relevanten Antibiotikagruppen) zugeordnet ¹⁴⁷.

Die Auswahl der Antibiotikagruppen basiert auf den für die Humanmedizin bedeutsamen antipseudomonalen Therapeutika. Ein Großteil dieser Gruppen und Leitsubstanzen werden nicht regelmäßig in der Veterinärmedizin eingesetzt bzw. gelten bei einer Umwidmung als Reserveantibiotika (z.B. Carbapeneme). Eine Ein-zu-Eins-Übertragung dieser Klassifikationen auf die Tiermedizin ist daher nicht zufriedenstellend.

7. Aktuelle Resistenzlage in der Tiermedizin

Die Zunahme pathogener Krankheitserreger, die gegenüber Antibiotika weniger empfindlich oder sogar völlig resistent geworden sind, ist längst ein globales Problem. Um Resistenzen besser vorbeugen zu können, ist es zunächst wichtig, Kenntnisse über die aktuelle Resistenzsituation und -entwicklung zu erlangen ¹⁴⁸. Zu diesem Zweck wurden in den letzten Jahrzehnten sowohl auf nationaler als auch auf internationaler Ebene Monitoring-Programme implementiert, mit dem Ziel valide Empfindlichkeitsdaten tier- und humanpathogener Bakterien zu erheben, den Antibiotikaverbrauch zu kontrollieren und den Zusammenhang zwischen dem vermehrten Einsatz von Antibiotika und dem Auftreten von Resistenzen zu evaluieren ^{148, 149}.

In Deutschland legt die Arbeitsgruppe GERMAP, die auf Initiative des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie und der Infektiologie Freiburg gegründet

wurde, seit 2011 regelmäßig Berichte über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland vor^{3, 150}. Die Resistenzdaten tierpathogener Bakterien basieren auf Studien des Resistenzmonitorings Germ-Vet und werden getrennt nach Tierart und Indikation ausgewertet¹⁵¹. Eine Publikation untersuchte im Rahmen des GermVet Programmes *P. aeruginosa* Isolate von Haut, Ohr oder Maul bei Hunden und Katzen und stellte fest, dass gegenüber den meisten Wirkstoffen eine Resistenz vorlag bzw. hohe MHK Werte nachgewiesen werden konnten¹⁵². Von 24 Antibiotika wurde eine MHK-Bestimmung mittels Bouillon Mikrodilution durchgeführt und mit vorhandenen Resistenz-Breakpoints des CLSI verglichen. Dabei konnte eine Resistenzrate von $\geq 97\%$ gegenüber den meisten getesteten Substanzen ermittelt werden. Bei Gentamicin und Enrofloxacin zeigte sich eine günstigere Resistenzlage: nur 27% bzw. 25% der 71 getesteten Isolate waren gegen diese beiden Antiinfektiva resistent. Vergleichbar niedrige MHKs konnten auch bei Colistin und Cefquinom beobachtet werden, jedoch lagen für diese Substanzen keine CLSI Breakpoints vor. Ein ähnliches Bild zeigt sich bei einer Studie aus dem Jahr 2011, in der über 6000 Ohrtupfer auf Keimverteilung und Resistenzmuster untersucht wurden¹⁵³. Hier wurde bei 30 Antibiotika, die in der Tiermedizin Verwendung finden unter Verwendung des MICRONAUT-Systems (Merlin Diagnostika GmbH, Deutschland) eine MHK- Bestimmung durchgeführt. Auch hier konnte eine relativ geringe Anzahl resistenter Isolate gegen Gentamicin nachgewiesen werden ($< 10\%$) wohingegen bei 18 Antibiotika Resistenzraten von $> 80\%$ beobachtet werden konnten. Bedenklicher Weise wurden zum Teil auch hohe Resistenzraten für *P. aeruginosa* gegen Antibiotika nachgewiesen, die für die Behandlung von caniner Otitis externa zugelassen sind. Penna et al. beispielsweise ermittelte in einer Studie im Agardiffusionstest Resistenzraten von 63,6% für Enrofloxacin und 71,4% für Gentamicin¹⁵⁴. Auch in anderen Studien waren über die Hälfte der getesteten Isolate resistent gegen Enrofloxacin¹⁵⁵⁻¹⁵⁷. Obwohl Marbofloxacin effektiver gegen *P. aeruginosa* zu sein scheint als Enrofloxacin¹¹, können Resistenzen bei 27% - 49% der Bakterienstämme auftreten^{8, 9, 156}. Besonders biofilmproduzierende *P. aeruginosa* haben offenbar eine signifikant höhere MHK gegenüber einigen Antibiotika als planktonische Isolate¹⁵⁸. Die zum Teil ungünstige Resistenzlage von *P. aeruginosa* bei caniner Otitis externa kann für den behandelnden Tierarzt eine ernsthafte Herausforderung darstellen und die Auswahl an geeigneten Therapeutika deutlich einschränken.

Die einzige Lösung bei einem Therapienotstand besteht dann in der Umwidmung einer wirksamen Alternative.

8. Silbersulfadiazin als mögliche Therapieoption bei multiresistenten Keimen

Die Sulfonamide gehören zu den ältesten Chemotherapeutika weltweit. Schon 1908, lange bevor sich Alexander Fleming mit Staphylokokken beschäftigte, synthetisierte Paul Gelmo Sulfanilamid, den ersten Vertreter der Sulfonamide ¹⁵⁹. Die besondere Wirksamkeit dieser ersten synthetischen Chemotherapeutika gegenüber bakteriellen Erregern wurde jedoch erst 1935 von dem deutschen Arzt und Bakteriologen Gerhard Domagk entdeckt, dem 1939 für „die Entdeckung der antibakteriellen Wirkung des Prontosil“ der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde ¹⁶⁰. Bis heute werden Sulfonamide in der Tiermedizin gegen verschiedenste bakterielle Erkrankungen eingesetzt, als Einzelsubstanz oder in Kombination mit Diaminopyrimidinen.

8.1 Pharmakologische Eigenschaften von Silbersulfadiazin

Silbersulfadiazin ist das Silbersalz des Sulfadiazin, einem Sulfonamid und hat die Summenformel $C_{10}H_9AgN_4O_2S$.

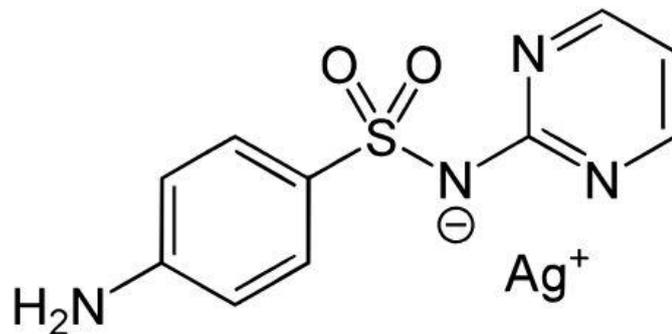


Abbildung 2: Strukturformel Silbersulfadiazin

Sulfonamide wirken bakteriostatisch durch kompetitive Hemmung der Dihydropteroat-Synthase im Folsäure-Stoffwechsel von Bakterien. Sie ähneln in ihrer chemischen Struktur der *p*-Aminobenzoesäure (PABA), einem Baustein der Folsäure und können diese im aktiven Zentrum des Enzyms verdrängen. Durch die Störung der Folsäure-Bildung steht dieser für die DNA-Synthese wichtige Stoff nicht mehr zur Verfügung und die Zellteilung wird behindert ¹⁶¹.

Kommt Silbersulfadiazin mit Wundexsudat in Berührung, wird Silber aus der Verbindung freigesetzt. Durch Komplexbildung mit bakterieller DNA beeinträchtigen die Silberionen die Replikation und Transkription der DNA und haben so eine bakterizide Wirkung¹⁶². Obwohl der Wirkmechanismus von Silbersulfadiazin noch nicht bis ins Detail entschlüsselt wurde, scheint der oligodynamische Effekt des Silberions eine entscheidende Rolle für die Wirksamkeit von Silbersulfadiazin gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* zu spielen¹⁶³.

Neben *Pseudomonas aeruginosa* ist Silbersulfadiazin wirksam gegen eine Vielzahl verschiedener Erreger, unter anderem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* und *E. coli*, auch gegenüber Problemkeimen wie MRSA¹⁶⁴⁻¹⁶⁶.

Silbersulfadiazin ist schlecht wasserlöslich und wird lokal, meist in Form einer 1%igen Creme (Flammazine[®], Alliance Pharmaceuticals, Chippenham, Vereinigtes Königreich) oder als Wundauflage nicht-haftende Wundauflage, Coloplast GmbH, Hamburg, Deutschland) angewendet.

8.2 Einsatz in der Humanmedizin

Die antiseptischen Eigenschaften von Silber sind der Menschheit schon lange bekannt. So wurde bereits im 18. Jahrhundert Silbernitrat¹⁶⁷ zur Therapie von Ulcera eingesetzt¹⁶⁸. 1968 kombinierte Charles L. Fox Silbernitrat mit Sulfadiazin mit dem Ziel, eine neue Therapiemöglichkeit für Patienten mit schweren Verbrennungen zu entwickeln. In den 1960er Jahren gehörten massive Wundinfektionen und Sepsis, vorrangig ausgelöst durch *Pseudomonas aeruginosa*-Infektionen, bei Patienten mit großflächigen Brandwunden zu den Haupt-Todesursachen und die Kombination beider Stoffe versprach eine Potenzierung der antimikrobiellen Eigenschaften bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen¹⁶⁹. Seit diesem Zeitpunkt fand Silbersulfadiazin breite Anwendung in der Therapie und Infektionsprophylaxe von Brandwunden und wurde lange als Therapiestandard in der konservativen Behandlung angesehen¹⁷⁰. Im Mausmodell konnte zudem nachgewiesen werden, dass Silbersulfadiazin die Reepithelisierung und Neovaskularisation tiefer Wunden im Vergleich zu anderen Wundheilmitteln signifikant beschleunigt¹⁷¹. Mit der Entwicklung neuerer Wundauflagen, die Silbersulfadiazin in punkto Zahl der nötigen

Verbandswechsel, Adhäsion an die Wunde, Schmerzhaftigkeit und Wundheilung überlegen sind, ist der Einsatz von Silbersulfadiazin im Wundmanagement von Brandwunden zurückgegangen¹⁷⁰.

Ein weiteres Einsatzgebiet von Silbersulfadiazin in der Humanmedizin ist das Imprägnieren zentral venöser Katheter (ZVK)¹⁷². Mehrere Studien konnten zeigen, dass Katheter, die mit Silbersulfadiazin und Chlorhexidin (CHX) beschichtet sind, das Risiko einer mikrobiellen Besiedelung der Katheter und einer katheterassoziierten Blutstrominfektion („catheter-related bloodstream infection, CRBSI) senken.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Chlorhexidin und Silbersulfadiazin scheinen dabei synergistisch zu wirken¹⁷⁴. Allerdings ist dieser Effekt zeitlich limitiert, da der imprägnierte Wirkstoff durch eine kontinuierliche Abnutzung des Katheters verloren geht¹⁷⁶. Leitlinien des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) und der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention¹⁴⁶ am Robert Koch-Institut (RKI) zur Prävention von Infektionen, die von Gefäßkathetern ausgehen empfehlen den Einsatz von antimikrobiellen ZVKs (z.B. mit CHX/Silbersulfadiazin) bei besonders gefährdeten Patienten oder wenn andere Maßnahmen keinen ausreichenden Effekt auf Infektionsraten zeigen^{146,177}.

8.3 Einsatz in der Tiermedizin

Da in Deutschland kein für die Tiermedizin zugelassenes Präparat mit Silbersulfadiazin existiert, kann Silbersulfadiazin gemäß §56a, Abs. 2 des Arzneimittelgesetzes (AMG) nur im Therapienotstand umgewidmet werden, wenn keine zugelassenen wirksamen Arzneimittel zur Verfügung stehen. In der Veterinärdermatologie wird Silbersulfadiazin daher meist bei Infektionen mit multiresistenten Keimen, vorrangig *Pseudomonas aeruginosa*, eingesetzt^{6, 11}. Wenngleich die Wirksamkeit von Silbersulfadiazin in der topischen Therapie bakterieller Hautinfektionen noch nicht ausreichend bewiesen wurde¹⁷⁸, wird Silbersulfadiazin in der Otitis -Behandlung seit langem mit Erfolg angewendet^{11, 12}. Durch seine sehr gute Wirksamkeit gegen problematische Otitis-Erreger, wie *Pseudomonas aeruginosa* und Methicillin-resistente Staphylokokken^{87, 179, 180}, stellt es eine vielversprechende Alternative im Management von *P. aeruginosa*-Otitiden dar, die aufgrund einer schnellen Resistenzbildung oft schwierig zu therapieren sind und einen sehr hohen Leidensdruck für den Patienten bedeuten¹². Ein weiterer Vorteil ist die reepithelisierende Wirkung von Silbersulfadiazin, da im Zusammenhang mit *Pseudomonas*-Infektionen oft ulzerative Otitiden

beobachtet werden können ¹².

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Keratomykose beim Pferd, eine durch verschiedene Pilzarten ausgelöste, schwerwiegende Hornhauterkrankung bei Pferden, bei der Therapieresistenz nicht selten zum Verlust des Auges führen kann. Silbersulfadiazin wird als 1%ige Hautsalbe direkt auf das Auge aufgebracht und zeigt *in vitro* eine fungizide Wirksamkeit gegen alle Feldisolate ¹⁸¹.

9. Arbeitshypothese und Zielsetzung

Otitiden, bei denen *Pseudomonas aeruginosa* beteiligt ist, können sich zu schwerwiegenden Erkrankungen mit schmerzhaften Ulzerationen und hohem Leidensdruck für Tier und Besitzer entwickeln ^{12, 158}. Eine schnelle Resistenzbildung und ein oftmals rupturiertes Trommelfell schränken die Therapieoptionen zusätzlich ein.

Um den Therapieerfolg nicht zu gefährden, sollte die Auswahl des Antibiotikums bei einer langwierigen Erkrankung, Rezidiven oder erfolglosen Vorbehandlungen auf einer mikrobiologischen Untersuchung mit Resistenztest basieren. Jedoch beziehen sich antibiotische Resistenztests derzeit auf den Serumwirkspiegel der Substanzen, der für die Abtötung des jeweiligen Infektionserregers nötig wäre. Dies schmälert die Aussagekraft der Untersuchung, da topisch verabreichte Wirkstoffe eine weitaus höhere Konzentration erreichen können ¹². Andere Wirkstoffe wiederum, die im Therapienotstand angewendet werden könnten, werden mangels spezifischer MHK Werte nicht im Resistenztest abgebildet.

Ziel dieser Studie war es daher, Resistenzmuster von *P. aeruginosa* Isolaten von Hunden mit Otitis externa aufzuzeigen und zu evaluieren, inwieweit ein Trend zur erhöhten Multiresistenz erkennbar ist. Ein weiteres Ziel war die Bestimmung der MHK Werte für antimikrobielle Wirkstoffe die bei der Therapie von *P. aeruginosa*-Otitis Verwendung finden. Insbesondere sollte eine minimale Hemmstoffkonzentration von Silbersulfadiazin bei *P. aeruginosa* Isolaten von Hunden mit Otitis externa als Grundlage für zukünftige Resistenzbestimmungen ermittelt werden.

III PUBLIKATION

This is the peer reviewed version of the following article: “Determination of minimum inhibitory concentrations for silver-sulfadiazine and other topical antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa”, which has been published in final form at <http://dx.doi.org/10.1111/vde.12718>. This article may be used for non-commercial purposes in accordance with Wiley Terms and Conditions for Use of Self-Archived Versions.

Veterinary Dermatology

Vet Dermatol 2019; 30: 145–e42

DOI: 10.1111/Avde.12718

Determination of minimum inhibitory concentrations for silver sulfadiazine and other topical antimicrobial agents against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa

Maritta S. E. von Silva-Tarouca* , Georg Wolf†  and Ralf S. Mueller* 

*Small Animal Medicine Clinic, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian University, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

†Department of Veterinary Sciences, Institute of Infectious Diseases and Zoonoses, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian University, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany

Correspondence: Maritta S.E. von Silva-Tarouca, Small Animal Medicine Clinic, Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian University, Veterinärstraße 13, 80539 Munich, Germany, E-mail: maritta.silvatarouca@googlemail.com

Background – Otitis externa is a common presenting complaint in practice. Ear infections by *Pseudomonas aeruginosa* are particularly problematic due to the organism's high level of resistance and ability to damage the tympanum. Treatment should be based on susceptibility testing although minimum inhibitory concentrations (MICs) are not available for all treatment options. Silver sulfadiazine has been used in cases of recurrent *P. aeruginosa* otitis, although a MIC for silver sulfadiazine as a single agent has not been established.

Objectives – To describe susceptibility patterns of *P. aeruginosa* isolated from canine otitis externa and determine the MIC for silver sulfadiazine and other topical antimicrobials.

Animals – Thirty-six *P. aeruginosa* isolates were collected from client-owned dogs, suffering from otitis externa.

Methods and materials – Susceptibility patterns were established using disc diffusion susceptibility testing against 17 antimicrobial agents. For determination of the MIC, selected strains were tested against increasing concentrations of marbofloxacin, enrofloxacin, gentamicin, polymyxin B and silver sulfadiazine using broth microdilution.

Results – For nine of 17 antimicrobial agents, complete resistance was seen in all isolates tested via disk diffusion susceptibility testing. Approximately 94% and 96% of isolates were susceptible to gentamicin and imipenem, respectively. These findings were consistent with broth dilution, where all strains were susceptible to gentamicin. Resistance was higher against polymyxin B and the fluoroquinolones. Silver sulfadiazine was effective *in vitro* with a MIC ranging from 1 to 64 µg/mL.

Conclusions and clinical significance – As the MIC of silver sulfadiazine was lower than the concentration in a 1% preparation, such a product potentially represents a treatment option for dogs with *P. aeruginosa* otitis.

Introduction

Otitis externa is one of the most common presenting complaints in small animal practice.¹ It is estimated to affect up to 20% of the canine population.^{2,3} Although not a directly life-threatening condition, long-standing chronic or recurrent otitis externa is one of the most frustrating diseases encountered in daily clinical practice and can severely diminish the quality of life of affected patients.

Pseudomonas aeruginosa is the most common problematic pathogen in dogs with chronic or recurrent bacterial otitis externa.⁴ This Gram-negative, rod-shaped bacterium is not part of the normal otic microflora.⁵ Due to its production of proteases and other enzymes, it can lead to extensive ulceration and inflammation in the ear canal.⁶

Treatment of *P. aeruginosa* otitis is challenging, because strains are innately resistant to numerous antimicrobial agents. In addition, they frequently develop resistance to antimicrobial agents considered to be the empirical treatments of choice, notably fluoroquinolones and aminoglycosides.^{7–12} Resistant phenotypes are frequently isolated from dogs, and multidrug-resistant *P. aeruginosa* (MDPA) strains are particularly common in dogs suffering from otitis.¹³ Active ingredients for topical treatment of otitis externa are typically chosen empirically, using clinical criteria and cytological evaluation.^{14,15} With topical therapy, high concentrations of active ingredients can be achieved in the ear canal. Thus, with the right management, a response to treatment can be

Accepted 19 November 2018

Conflict of interest: No conflicts of interest have been declared by Maritta S.E. von Silva-Tarouca and Georg Wolf. Ralf Mueller has acted as consultant and as lecturer for Elanco (manufacturer of Surofen®), Bayer Animal Health (manufacturer of Baytril®) and Virbac (Manufacturer of Easotic®). None of those companies had any influence on this study, its design, evaluation and writing of the manuscript.

Source of Funding: This study was self-funded.

© 2019 ESVD and ACVD, *Veterinary Dermatology*, 30, 145–e42.

145

Silva-Tarouca *et al.*

anticipated in most cases, especially in first-time infections.¹⁵ Considering their ability to readily acquire resistance, choosing a topical therapy for *Pseudomonas* otitis should preferably be based on culture and susceptibility testing, to avoid a selection of resistant organisms and prevent treatment failure.¹⁶ However, *in vitro* susceptibilities are usually based on the serum concentration of the chosen drug and therefore may not reflect its efficacy when used topically at higher concentrations.^{14,15} Quantitative results achieved by testing the breakpoint minimum inhibitory concentration (MIC) are more useful in assessing the required therapeutic dose for systemic therapy.⁹ Another limitation to susceptibility testing in standard susceptibility profiles is the lack of antimicrobial agents which are only used topically.¹⁴ The increasing antimicrobial resistance of some *P. aeruginosa* isolates to antipseudomonal antibiotics registered for veterinary use requires evaluation of different treatment options.

Silver sulfadiazine is a topical sulfonamide/silver antibacterial agent that is commonly used for burn wounds in humans.^{17,18} It has shown excellent activity against *P. aeruginosa*, alone as well as combined with enrofloxacin in an otic solution approved for the treatment of canine otitis externa in the USA.^{17,19,20} Although silver sulfadiazine is already being used by some clinicians for the treatment of MDPA infections with promising results, its MIC as a single agent against isolates from canine otitis externa has not been established.

The aim of this study was to describe antimicrobial susceptibility patterns of *P. aeruginosa* isolates obtained from dogs with chronic otitis externa. Furthermore, the breakpoint MIC of commonly used topical antimicrobial agents and silver sulfadiazine against MDPA was established.

Methods and materials

Antimicrobial susceptibility patterns

Between January 2010 and January 2017, isolates of *P. aeruginosa* were collected from 36 dogs suffering from otitis externa. Twenty-seven strains were submitted for disc diffusion susceptibility testing (DDST) during the diagnostic investigation, and the results were evaluated retrospectively. Nine samples were obtained prospectively and additionally used to evaluate the MIC. The samples were obtained from the transition between the vertical and horizontal ear canal by inserting a sterile cotton swab through a sterilized otoscopic cone and submitted for the identification of the organism and antimicrobial susceptibility testing. On the day of sample collection, swabs were inoculated onto agar plates, followed by streaking three loops for quantification. Mueller Hinton agar (#37580 Sigma-Aldrich; Steinheim, Germany) with 5% defibrinated sheep blood and without blood, Columbia CNA agar (#212104, Becton Dickinson; Heidelberg, Germany) with 5% defibrinated sheep blood, Rambach agar (#7500, Technolab GmbH, Herne, Deutschland) and Gassner agar (#TN1194, Sifin, Berlin, Germany) were used for cultivation. Plates were incubated aerobically at 38 ± 1°C. Colony growth was monitored for three days. Every colony type was differentiated by mass spectrometry using MALDI-TOF (Microflex LT and MALDI Biotyper identification software v3.1, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) as described previously.²¹ Antimicrobial susceptibility was assessed by disk diffusion on Mueller-Hinton agar against 17 antimicrobial agents, following the performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).²² The panel included doxycycline, sulfonamide/trimethoprim, amoxicillin/

clavulanic acid, ampicillin, cephalothin, cefovecin, gentamicin, streptomycin, erythromycin, enrofloxacin, marbofloxacin, clindamycin, pradofloxacin, imipenem, amikacin, colistin and chloramphenicol. After measuring the antimicrobial zone diameters, all isolates were categorized as sensitive, intermediary or resistant to the respective drug.

In order to assess the incidence of MDPA strains, resistance profiles were evaluated based on the definitions for multidrug-resistant (MDR), extensively drug-resistant (XDR) and pandrug-resistant (PDR) bacteria, created by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC).²³ Isolates that were resistant to at least one agent of three or more antimicrobial categories with demonstrated antipseudomonal efficacy (aminoglycosides, carbapenems, fluoroquinolones, polymyxin B) were defined as MDR.

Determination of the MIC

Nine of the 36 *P. aeruginosa* strains, collected between April 2014 and January 2015, were selected for establishing a MIC against various antimicrobials used in commercially available ear solutions to treat otitis externa, as well as enrofloxacin and silver sulfadiazine (both used off-label by diluting the pharmaceutical product). After cultivation, these isolates were stored at -80°C using a microbial storage system (Microbank™, Pro-Lab Diagnostics; Richmond Hill, ON, Canada) until further use. The strains were tested against increasing concentrations of marbofloxacin (Marbocyl® FD 1%, Vétocruel S.A.; Magny-Vernois, France), enrofloxacin (Baytril® 2.5%, Bayer Vital GmbH; Leverkusen, Germany), gentamicin (Genta 5%, Albrecht; Aulendorf, Germany) and polymyxin B (Polymyxin B, Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) using the microdilution broth method in accordance with the principles of the CLSI.²² As silver sulfadiazine is sparingly soluble in water, the dilution series of silver sulfadiazine (Silver Sulfadiazine, Aft Scientific Inc., Union City, CA, USA) was performed using macrodilution with cation-adjusted Mueller Hinton broth. Before transferring the solution onto the microtitre plate, each reagent was freshly vortexed to ensure an optimal distribution. After inoculation, the plates were incubated at 35 ± 2°C for approximately 18 h. For quality control, *P. aeruginosa* reference strain DSM 1117 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) was included in each batch. All MIC tests were conducted in triplicate. The MIC was determined as the lowest concentration of antibiotic that inhibited visible growth. This concentration was then compared to the clinical breakpoints, recommended by the CLSI for *P. aeruginosa* (Table 1).^{24,25} To evaluate the agreement between DDST and MIC testing, the results of the broth dilution method were matched with the resistance profile defined previously by disk diffusion.

Results

Antimicrobial susceptibility patterns

Susceptibility testing using DDST for 36 isolates of *P. aeruginosa* showed that among the 17 antimicrobial agents tested, gentamicin and imipenem were the most effective. Of all the strains tested, 94% and 96% were susceptible to gentamicin and imipenem *in vitro*. The resistance profiles of 36 *P. aeruginosa* isolates against all

Table 1. The MIC breakpoints recommended by the CLSI for *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobial agent	MIC breakpoint (µg/mL)		
	Sensitive	Intermediary	Resistant
Marbofloxacin	≤1	2	≥4
Enrofloxacin	≤0.5	1-2	≥4
Gentamicin	≤2	4	≥8
Polymyxin B	≤2	4	≥8

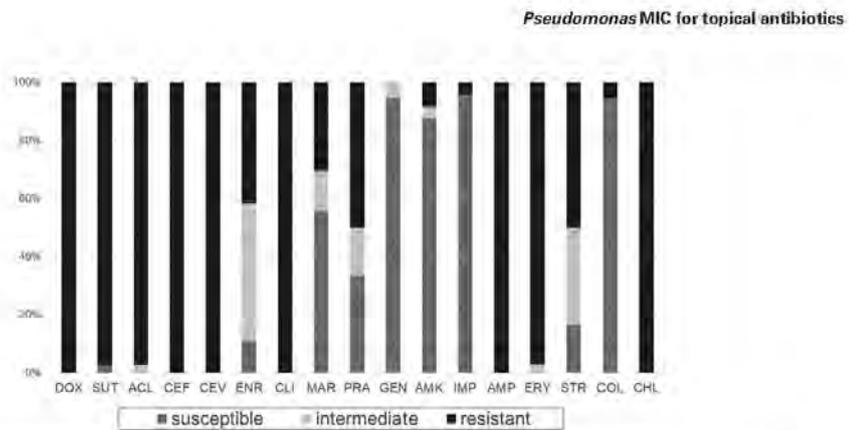


Figure 1. Antimicrobial resistance profile of 36 *Pseudomonas aeruginosa* isolates, isolated from dogs with otitis externa. ACL amoxicillin/clavulanic acid, AMK amikacin, AMP ampicillin, CEF cephalothin, CEV cefovecin, CHL chloramphenicol, CLI clindamycin, COL colistin, DOX doxycycline, ENR enrofloxacin, ERY erythromycin, GEN gentamicin, IMP imipenem, MAR marbofloxacin, PRA pradofloxacin, STR streptomycin, SUT sulfonamide/trimethoprim.

17 antimicrobial agents are summarized in Figure 1. All isolates were resistant *in vitro* to ampicillin, cephalothin, cefovecin, chloramphenicol, clindamycin, doxycycline and erythromycin. Resistance rates were >97% for amoxicillin/clavulanic acid and sulfonamide/trimethoprim. Other than gentamicin and imipenem, only amikacin, colistin and marbofloxacin inhibited bacterial growth in >50% of all isolates tested. Only one isolate was found to be MDR, and showed resistance to enrofloxacin, marbofloxacin, imipenem and colistin.

Determination of the MIC

Among the nine strains that were tested against selected antimicrobial agents commonly used to treat otitis externa, all were susceptible to gentamicin, with MICs ranging from 0.25 to 4 µg/mL (mean MIC 0.3 3.2 µg/mL). The MICs of five antimicrobial agents are listed in Table 2. Two of the strains were classified as resistant to polymyxin B with a mean MIC of 10.1 and 6.3 µg/mL, respectively. The MIC for polymyxin B ranged from 0.5 to 16 µg/mL (mean MIC 1.0 10.1 µg/mL). Enrofloxacin and marbofloxacin showed higher resistance rates with 88% and 44% of the strains being

nonsusceptible and the MICs of 0.2 1,024 µg/mL (mean MIC 0.8 1,024 µg/mL) and 0.063 256 µg/mL (mean MIC 0.25 203.2 µg/mL), respectively.

When compared to the antimicrobial susceptibility profiles established via DDST, broth dilution and DDST were in 100% agreement for gentamicin, because all isolates were classified as being susceptible with both methods. For marbofloxacin, both methods showed the same results in 67% of all isolates. In two cases, DDST underestimated the susceptibility compared to MIC testing, and in one case, a strain demonstrated resistance in MIC testing but was defined as being intermediary in DDST. For enrofloxacin, the results matched in 89% of all isolates with DDST underestimating the number of enrofloxacin-susceptible strains in one case. Because polymyxin B was not part of the DDST panel, the results of the MIC testing were matched against colistin, as almost complete cross-resistance exists between colistin and polymyxin B.²⁶ An agreement in 78% of all cases could be demonstrated. By contrast to DDST by which all isolates were classified as being susceptible to colistin, two strains were defined as being resistant according to the results of the MIC testing.

Table 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) in µg/ml of *Pseudomonas aeruginosa* strains against selected antimicrobial agents

Strains	Enrofloxacin		Marbofloxacin		Gentamicin		Polymyxin B		Silver sulfadiazine	
	MIC mean (µg/ml)	CLSI classification	MIC mean (µg/ml)	CLSI classification						
1	1.6	s	0.6	s	1.0	s	1.0	s	4.66	na
2	645.1	r	161.3	r	1.0	s	1.6	s	7.0	na
3	2.0	s	1.3	s	0.5	s	1.0	s	9.2	na
4	1,024.0	r	203.2	r	0.3	s	1.0	s	8.0	na
5	1.0	s	0.5	s	0.8	s	1.0	s	7.0	na
6	128.0	r	50.8	r	2.0	s	10.1	r	32.0	na
7	5.0	s	2.0	s	0.8	s	1.0	s	9.2	na
8	1.0	s	0.25	s	1.0	s	1.3	s	6.1	na
9	0.8	s	0.4	s	1.0	s	6.3	r	18.4	na
Quality control strain	2.0	s	1.3	s	0.6	s	1.3	s	9.2	na

r, resistant; i, intermediary; s, sensitive; na, not applicable.

Silva-Tarouca *et al.*

For silver sulfadiazine, the MIC ranged from 1 to 64 µg/mL (mean MIC 4.6–32.0 µg/mL) but most of the isolates had a mean MIC of <10 µg/mL, including the reference strain. Two of the strains were less susceptible to silver sulfadiazine with mean MICs of 32.0 and 18.4 µg/mL. Results of the MIC testing for silver sulfadiazine are presented in Table 2.

Discussion

Of 36 *P. aeruginosa* isolates, the majority of isolates were sensitive to amikacin, colistin, gentamicin, imipenem and marbofloxacin. Considering the intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to several antimicrobial classes, it is not surprising that ten of 17 antimicrobials tested with DDST had resistance rates >97%. However, even the fluoroquinolones, which are indicated for anti-pseudomonal treatment, showed relatively high levels of resistance. Gentamicin, amikacin and imipenem had a higher rate of efficacy, which is consistent with results from other studies. Resistance rates to gentamicin reported for *P. aeruginosa* isolates from canine infections have been low (83–95% susceptibility).^{7,13,27} However, a study reported from Brazil documented only 71.4% susceptibility to gentamicin among *P. aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa.¹¹

The isolates in this study were more susceptible to marbofloxacin than to enrofloxacin, both in DDST and in MIC testing. This also has been reported in other studies.^{12,27,28} In Germany, marbofloxacin is approved and available in numerous topical formulations for dogs, whereas enrofloxacin is used only as an injectable in off-label otic preparations. It is possible that enrofloxacin is a better substrate for the MexAB-OprM efflux pump described in *P. aeruginosa* because of its higher lipophilicity.²⁹

Although the isolates displayed resistance to multiple compounds in the DDST, only one met the criteria of MDR. However, the isolates in this study were not tested against all of the antimicrobial agents mentioned by the ECDC and the CDC to categorize *P. aeruginosa* isolates. Those recommendations are based on antibacterial agents approved for humans by the European Medicines Agency or the Federal Drug Administration. Many of those antimicrobial agents are not included in routine susceptibility testing of isolates from animals and animal-specific breakpoints are lacking. Hence, only half of the antimicrobial categories used to define MDR, XDR and/or PDR *P. aeruginosa* were used in this study. It is possible that some of the isolates would have been defined as MDR according to susceptibility panels used for human isolates.

The MIC testing of enrofloxacin, marbofloxacin, gentamicin and polymyxin B revealed highly variable MICs between the isolates tested. These results show higher MICs for enrofloxacin and marbofloxacin than presented previously, where the MIC of *P. aeruginosa* isolated from canine otitis ranged between 0.125 and 32 µg/mL for enrofloxacin, and between 0.25 and 8 µg/mL for marbofloxacin.^{6,10,29} Three isolates in particular showed high MICs for both fluoroquinolones (nos 2, 4 and 6) and these isolates also were classified as being resistant to both agents by DDST. It is possible that these isolates are biofilm producers because biofilm-embedded *P. aeruginosa*

have significantly higher MICs than their planktonic counterparts.⁶

It should be noted, however, that the concentration of these drugs available in topical ear medications greatly exceeds the MICs established by this study. For gentamicin used in Easotic[®] (Virbac; Carros, France), the dose recommended by the manufacturer (1 mL per application) contains 2.35 mg and is therefore 588× the highest MIC for gentamicin determined in this study. Polymyxin B is used at a concentration of 0.5293 mg/mL in Surolan[®] (Eli Lilly Benelux NV; Brussel, Belgium) which is 33× greater than the highest MIC established by this study. For marbofloxacin, the concentration supplied in Aurizon[®] (Vétoquinol S.A.) is 12× greater than the highest MIC (256 µg/mL) determined by this study. Topical enrofloxacin for treating bacterial otitis externa often is compounded by practitioners at a concentration of 11.25 mg/mL (using Baytril[®] 2.5%, Bayer Vital GmbH) which results in a concentration 11× greater than the highest MIC demonstrated for enrofloxacin in this study.

The efficacy of concentration-dependent drugs (e.g. aminoglycosides and fluoroquinolones) is reliant on delivering concentrations of at least ten times the MIC once daily.¹⁵ Therefore, there is a strong possibility that topical treatment against the *P. aeruginosa* isolates tested in this study would have been efficacious, independent of the choice of antibiotic and susceptibility testing. It has been reported that 90% of dogs suffering from *P. aeruginosa* otitis responded to topical treatment with empirically selected antibiotics, even though the strains tested were resistant upon DDST,³⁰ which supports this hypothesis. However, there are other causes that can compromise the therapeutic success and encourage resistance, such as poor owner compliance, inadequate owner education and thus improper administration technique, or inadequate removal of debris and purulent material. It also is possible that the reported response was partly due to the combination approach to treatment, because anti-septics and glucocorticoid therapy were administered concurrently.³⁰

To the best of the authors' knowledge, a MIC for canine *P. aeruginosa* isolates has not yet been established for silver sulfadiazine as a single agent. Its bactericidal effect is based on bacterial cell wall damage leading to osmotic changes. It is effective against most pathogens associated with otitis externa.¹⁴ Although its use is no longer widely recommended in human wound care due to a replacement with other, more effective products, it shows excellent activity against *P. aeruginosa*.²⁰ Because it is considered to be safe in the middle ear,¹⁰ it is a valid treatment option for dogs suffering from *P. aeruginosa* otitis, even if the integrity of the tympanum cannot be demonstrated, whereas polymyxin B and gentamicin are considered potentially ototoxic.¹⁵ One study investigated the combined efficacy of silver sulfadiazine and enrofloxacin against *P. aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and demonstrated a better efficacy for the combination of 0.5% enrofloxacin and 1% silver sulfadiazine (Baytril[®] otic, Bayer Healthcare LLC; Shawnee Mission, KS, USA) than for enrofloxacin alone.²⁰ The joint MIC for enrofloxacin/silver sulfadiazine was between 0.25/0.5 and 4/8 µg/mL; however, a MIC for silver

Pseudomonas MIC for topical antibiotics

sulfadiazine alone was not established. The MIC for silver sulfadiazine in this study is slightly higher than that reported in a previous study, suggesting a synergy between silver sulfadiazine and enrofloxacin against *P. aeruginosa*.²⁰ To further evaluate that hypothesis, further studies are needed, which compare the sole and combined efficacy of these two agents. Eighty percent of all isolates tested against silver sulfadiazine in this study had a mean MIC <10 µg/mL. Therefore, a 1% dilution of a silver sulfadiazine cream (Flammazine®, Sinclair Pharma GmbH; Frankfurt am Main, Germany) should be effective against these *P. aeruginosa* isolates *in vivo* as it would supply a concentration 156x greater than the highest MIC established in this study (64 µg/mL). Another benefit would be hastened re-epithelialization of ulcerated ear canals, because ulceration is often present with *P. aeruginosa*.¹⁴ Achieving an adequate in-ear concentration of silver sulfadiazine could be a challenge because the cream is not easily miscible in water and precipitation is possible if the mixture is stored for a longer period. Hence, it is advisable to shake the mixture well before applying it to the ear. It also is unknown if silver sulfadiazine can penetrate purulent debris and thus ear cleansing is indicated before its use for otitis externa. *In vivo* studies are needed to better establish the clinical efficacy of silver sulfadiazine against *P. aeruginosa*.

In conclusion, this study has shown that *P. aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa exhibits high levels of resistance against various antimicrobial agents, some of which are used in commercially available ear solutions. DDST testing is not always useful for treatment selection because it may underestimate susceptibility to concentrations of agents supplied in topical preparations, and because not all topical antibacterial agents are available for disc diffusion testing. When used according to product label information, all antimicrobial agents tested in this study including 1% silver sulfadiazine should achieve higher concentrations in the ear canal than necessary to inhibit bacterial growth.

Acknowledgements

The authors thank the Dermatology Service, Centre for Clinical Veterinary Medicine, LMU Munich and the Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Department of Veterinary Sciences, LMU Munich, for their support and Mareike Nadler for her assistance in specimen processing.

References

- Hill PB, Lo A, Edeh CA et al. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Vet Rec* 2006; 158: 533–539.
- Angus JC. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 411–424.
- Cole LK. Otitoscopic evaluation of the ear canal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 397–410.
- Rösser EJ Jr. Causes of otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 459–468.
- Lysková P, Vydralová M, Mazurová 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: 559–563.
- Pye CC, Yu AA, Weese JS. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility *in vitro*. *Vet Dermatol* 2013; 24: 446–449, e98–99.
- Harikiran H, McPhee L, Heaney S et al. Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can Vet J* 1995; 36: 166–168.
- Martín Barrasa JL, Lupiáñez Gómez P, González Lama Z et al. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2000; 47: 191–196.
- McKay L, Rose CD, Marousek JL et al. Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis. *J Am Anim Hosp Assoc* 2007; 43: 307–312.
- Mekić S, Matanović K, Seol B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet Rec* 2011; 169: 125.
- Penna B, Thome S, Martins R et al. *In vitro* antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol* 2011; 42: 1,434–1,436.
- Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol* 2005; 131: 164–172.
- Cabassi CS, Sala A, Santospirito D et al. Activity of AMP2041 against human and animal multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017; 16: 17.
- Morris DO. Medical therapy of otitis externa and otitis media. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 541–555.
- Nuttall T. Successful management of otitis externa. *In Practice* 2016; 38(Suppl 2): 17–21.
- Linek M. Otitis externa und media bei Hund und Katze. *Tierärztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2011; 39(K): 451–463.
- Gurjan K, Shobha C, Sheetal C et al. A comparative study of the effect of different topical agents on burn wound infections. *Indian J Plast Surg* 2012; 45: 374–378.
- Percival SL, Thomas J, Linton S et al. The antimicrobial efficacy of silver on antibiotic-resistant bacteria isolated from burn wounds. *Int J Wound J* 2012; 9: 488–493.
- Hoffmann S. Silver sulfadiazine: an antibacterial agent for topical use in burns. A review of the literature. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1984; 18: 119–126.
- Trott DJ, Moss SM, See AM et al. Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. *Aust Vet J* 2007; 85: 464–466.
- Lay JO. MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrom Rev* 2001; 20: 172–194.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard – 4th ed. CLSI Document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017.
- CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; second informational supplement. CLSI document VET01-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
- Moore RA, Chan L, Hancock RE. Evidence for two distinct mechanisms of resistance to polymyxin B in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 539–545.

Silva-Tarouca *et al.*

27. Seol B, Naglic T, Macic J *et al.* *In vitro* antimicrobial susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2002; 49: 188–192.
28. Wildermuth BE, Griffin CE, Rosenkrantz WS *et al.* Susceptibility of *Pseudomonas* isolates from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *J Am Anim Hosp Assoc* 2007; 43: 337–341.
29. Teresa Tejedor M, Martin JL, Navia M *et al.* Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Vet Microbiol* 2003; 94: 295–301.
30. Robson DG, Burton G, Bassett R. Correlation between topical antibiotic selection, *in vitro* bacterial antibiotic sensitivity and clinical response in 16 cases of canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Dermatol* 2010; 21: 314. (abstract).

Résumé

Contexte – L'otite externe est une présentation fréquente en pratique. Les infections auriculaires à *Pseudomonas aeruginosa* sont particulièrement problématiques en raison de leur haut niveau de résistance et de la capacité à endommager le tympan. Le traitement devrait être basé sur des tests de sensibilité bien que les concentrations minimales inhibitrices (MICs) ne soient pas disponibles pour toutes les options thérapeutiques. La sulfadiazine argentique a été utilisée dans les cas d'otites récurrentes à *P. aeruginosa* bien qu'une MIC pour la sulfadiazine argentique en tant qu'agent unique n'ait pas été déterminée.

Objectifs – Décrire les patrons de sensibilité pour les souches de *P. aeruginosa* isolées d'otite externe de chiens et déterminer la MIC pour la sulfadiazine argentique et d'autres topiques antimicrobiens.

Sujets – Trente-six souches de *P. aeruginosa* ont été collectées de chiens de propriétaires atteints d'otite externe.

Matériel et méthode – Les patrons de sensibilité ont été déterminés par des tests de sensibilité sur disque de diffusion contre 17 agents antimicrobiens. Pour la détermination des MIC, des souches sélectionnées ont été testées contre des concentrations augmentées de marbofloxacin, enrofloxacin, gentamycine, polymyxine B et sulfadiazine argentique à l'aide de microdilution en milieu liquide.

Résultats – Pour neuf des 17 agents antimicrobiens, une résistance complète a été observée pour toutes les souches testées par test de sensibilité sur disque de diffusion. Approximativement 94% et 96% des souches étaient respectivement sensibles à la gentamycine et à l'imipénème. Ces données étaient compatibles avec la dilution en milieu liquide pour laquelle toutes les souches étaient sensibles à la gentamycine. La résistance était plus élevée contre la polymyxine B et les fluoroquinolones. La sulfadiazine argentique était efficace *in vitro* avec une MIC allant de 1 à 64 µg/mL.

Conclusions et importance clinique – Comme la MIC de sulfadiazine argentique était plus basse que la concentration dans la préparation à 1%, un tel produit peut représenter potentiellement une option thérapeutique pour les chiens avec otite à *P. aeruginosa*.

Resumen

Introducción – la otitis externa es un problema de presentación frecuente en veterinaria. Las infecciones de oído por *Pseudomonas aeruginosa* son particularmente problemáticas debido al alto nivel de resistencia del organismo y la capacidad de dañar el tímpano. El tratamiento debe basarse en las pruebas de susceptibilidad, aunque las concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) no están disponibles para todas las opciones de tratamiento. La sulfadiazina de plata se ha utilizado en casos de otitis recurrente por *P. aeruginosa*, aunque no se ha establecido una MIC para la sulfadiazina de plata como agente único.

Objetivos – describir los patrones de susceptibilidad de *P. aeruginosa* en aislados de otitis externa canina y determinar el MIC para la sulfadiazina de plata y otros antimicrobianos tópicos.

Animales – se recogieron treinta y seis aislamientos de *P. aeruginosa* de perros de propietarios particulares que padecían otitis externa.

Métodos y materiales – se establecieron patrones de susceptibilidad utilizando pruebas de susceptibilidad a la difusión en disco frente a 17 agentes antimicrobianos. Para la determinación de la MIC, se probaron cepas seleccionadas contra concentraciones crecientes de marbofloxacin, enrofloxacin, gentamicina, polimixina B y sulfadiazina de plata usando técnica de microdilución en caldo.

Resultados – para nueve de los 17 agentes antimicrobianos probados, se observó resistencia completa de todos los aislamientos en las pruebas de susceptibilidad por difusión en disco. Aproximadamente el 94% y el 96% de los aislamientos fueron susceptibles a la gentamicina y el imipenem, respectivamente. Estos hallazgos fueron consistentes en la prueba de dilución en caldo, donde todas las cepas fueron susceptibles a la gentamicina. La resistencia fue mayor contra la polimixina B y las fluoroquinolonas. La sulfadiazina de plata fue efectiva *in vitro* con un MIC que osciló entre 1 y 64 µg/ml.

Conclusiones y significación clínica – como la MIC de la sulfadiazina de plata fue inferior a la concentración presente en una preparación del 1%, este producto representa potencialmente una opción de tratamiento para perros con otitis por *P. aeruginosa*.

Zusammenfassung

Hintergrund – Die Otitis externa ist ein häufiges Problem in der Praxis. Ohrinfektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* sind besonders problematisch, aufgrund des hohen Resistenzlevels des Organismus und

Pseudomonas MIC for topical antibiotics

seiner Fähigkeit das Trommelfell zu beschädigen. Eine Behandlung sollte auf Empfindlichkeitstests beruhen, obwohl die minimale Hemmstoffkonzentration (MICs) nicht für alle Therapieoptionen zur Verfügung steht. Silbersulfadiazin wurde in Fällen von wiederkehrender *P. aeruginosa* Otitis verwendet, obwohl eine MIC für Silbersulfadiazin als einzelner Wirkstoff noch nicht bestimmt wurde.

Ziele – Die Beschreibung der Empfindlichkeitsmuster von *P. aeruginosa*, die von Hunden mit einer otitis externa isoliert worden waren und die Bestimmung der MIC für Silbersulfadiazin und andere topische Antibiotika.

Tiere – Sechsenddreißig *P. aeruginosa* Isolate wurden von Privathunden, die an einer Otitis externa litten, gesammelt.

Methoden und Material – Es wurden die Empfindlichkeitsmuster mittels Disk-Diffusionsempfindlichkeitstest gegenüber 17 antimikrobiellen Wirkstoffen bestimmt. Zur Bestimmung der MIC wurden ausgewählte Stämme gegenüber zunehmenden Konzentrationen von Marbofloxacin, Enrofloxacin, Gentamycin, Polymyxin B und Silbersulfadiazin mittels Mikrodilutionsbouillon getestet.

Ergebnisse – Für neun der 17 antimikrobiellen Wirkstoffe wurde eine vollständige Resistenz gegenüber allen Isolaten gesehen, die mittels Disk-Diffusionsempfindlichkeitstest geprüft wurden. Ungefähr 94% bzw. 96% der Isolate waren empfindlich auf Gentamicin bzw. Imipenem. Diese Ergebnisse waren im Einklang mit den Ergebnissen der Dilutionsbouillon, bei denen alle Stämme auf Gentamycin empfindlich waren. Die Resistenz gegenüber Polymyxin B und die Fluoroquinolone war höher. Silbersulfadiazin war *in vitro* bei einer MIC von 1 bis 64 µg/mL wirksam.

Schlussfolgerungen und klinische Bedeutung – Da die MIC von Silbersulfadiazin niedriger war als die Konzentrationen in einer 1%igen Präparation repräsentiert ein derartiges Produkt möglicherweise eine Behandlungsoption für Hunde mit einer *P. aeruginosa* Otitis.

要約

背景 – 外耳炎は、実際によく見られる疾患である。 *Pseudomonas aeruginosa*による耳感染症は、高水準の薬剤耐性と鼓膜損傷能を有するため、特に問題となっている。最小発育阻止濃度(MIC)は、全ての治療法の選択肢に利用できるわけではないが、治療は感受性試験に基づくべきである。スルファジアジン銀単剤のMIC値は確立されていないが、スルファジアジン銀は緑膿菌による再発性耳炎に使用されている。

目的 – 本研究の目的は、犬の外耳炎から分離した緑膿菌の感受性パターンを記述し、スルファジアジン銀および他の外用抗菌薬のMIC値を決定することである。

被験動物 – 外耳炎に罹患した飼育犬から収集した36の緑膿菌分離株。

材料と方法 – 感受性パターンは、17の抗菌薬に対するディスク拡散感受性試験を用いて確立した。MIC値を決定するため、微量液体希釈法により選択した株をマルボフロキサシン、エンロフロキサシン、ゲンタマイシン、ポリミキシンBおよびスルファジアジン銀の漸増濃度に対して試験した。

結果 – 17種類のうち9種類の抗菌薬について、ディスク拡散感受性試験で試験した全ての分離株において完全耐性を認めた。ゲンタマイシンおよびイミペネムに対し、分離株の約94%および96%がそれぞれ感受性であった。これらの知見は、全ての株がゲンタマイシン感受性であった液体希釈法結果と一致した。ポリミキシンBおよびフルオロキノロンに対する耐性は他の抗菌薬と比較して高かった。スルファジアジン銀は、*in vitro*において1–64 µg/mL範囲のMIC値で有効であった。

結論と臨床的意義 – スルファジアジン銀のMIC値は1%製剤中の濃度よりも低かったため、そのような製品は緑膿菌性耳炎の犬に対する治療法の選択肢となる可能性がある。

摘要

背景 – 外耳炎在临床上很常见,尤其是铜绿假单胞菌引起的耳道感染,因为这种微生物具有很高的耐药性和损伤鼓室的能力。治疗应基于药敏试验,尽管并非所有治疗方案选择都基于最小抑菌浓度(MIC),磺胺嘧啶银已用于复发性铜绿假单胞菌中耳炎,但磺胺嘧啶银作为单一药剂的MIC尚未确定。

目的 – 描述从犬外耳炎中分离的铜绿假单胞菌的药敏模式,并确定磺胺嘧啶银和其他外用抗菌药的MIC。

动物 – 从外耳炎患犬身上分离出三十六个铜绿假单胞菌菌株。

方法和材料 – 对17种抗菌药进行纸片扩散药敏试验,建立药敏模式。对所选菌株,采用肉汤微量稀释法,逐渐增加马波沙星,恩诺沙星,庆大霉素,多粘菌素B和磺胺嘧啶银的浓度,以测定MIC。

结果 – 对17种抗菌药物中有9种,经纸片扩散药敏试验,所有分离株均出现完全耐药。大约94%和96%的分离株分别对庆大霉素和亚胺培南敏感,这些发现与肉汤稀释一致,其中所有菌株都对庆大霉素敏感;对多粘菌素B和氟喹诺酮类药物的耐药性较高。磺胺嘧啶银在体外有效,MIC范围为1至64 µg/mL。

结论和临床意义 – 由于磺胺嘧啶银的MIC低于1%制剂中的浓度,这种产品可作为犬铜绿假单胞菌耳炎的治疗选择。

Resumo

Contexto – Otitis externa é uma queixa comum na rotina. Infecções de ouvido por *Pseudomonas aeruginosa* são particularmente problemáticas devido ao alto nível de resistência do microrganismo e da sua habilidade de lesionar o tímpano. O tratamento deve ser baseado em testes de susceptibilidade apesar de as concentrações inibitórias mínimas (MICs) não estarem disponíveis para todas as opções terapêuticas. A

Silva-Tarouca et al.

sulfadiazina de prata tem sido utilizada em casos de otite recorrente por *P. aeruginosa*, ainda que uma MIC para sulfadiazina de prata ainda não tenha sido estabelecido.

Objetivos – Descrever os padrões de suscetibilidade de *P. aeruginosa* isolada de otite externa canina e determinar a MIC para sulfadiazina de prata e outros agentes tópicos.

Animais – Trinta e seis isolados de *P. aeruginosa* foram coletados de cães de clientes, acometidos por otite externa.

Métodos e materiais – Os padrões de suscetibilidade foram estabelecidos utilizando o teste de difusão em disco contra 17 antimicrobianos. Para a determinação da MIC, cepas selecionadas foram testadas contra concentrações crescentes de marbofloxacina, enrofloxacin, gentamicina, polimixina B e sulfadiazina de prata, utilizando a microdiluição em caldo.

Resultados – Para nove dos 17 antimicrobianos, resistência completa foi observada em todos os isolados testados por difusão em disco. Aproximadamente 94% e 96% dos isolados foram suscetíveis à gentamicina e imipenem, respectivamente. Estes achados foram consistentes com a microdiluição em caldo, onde todas as cepas foram suscetíveis à gentamicina. A resistência foi mais elevada contra polimixina B e contra as fluoroquinolonas. A sulfadiazina de prata foi eficaz *in vitro* com uma MIC variando entre 1 e 64 µg/mL.

Conclusões e significância clínica – Como a MIC da sulfadiazina de prata foi menor que a concentração em uma formulação a 1%, este produto representa potencialmente uma opção terapêutica para cães com otite por *P. aeruginosa*.

IV DISKUSSION

1. Resistenzmuster von *Pseudomonas aeruginosa*

Die richtig durchgeführte topische Therapie und damit auch die Auswahl des richtigen Antibiotikums, ist der Schlüssel zum Erfolg einer Otitisbehandlung¹². Initial wird das Antibiotikum oft empirisch anhand klinischer oder zytologischer Befunde ausgewählt. Sind bei purulenten Otitiden Stäbchen in der Zytologie nachweisbar, liegt der Verdacht nahe, dass es sich um Pseudomonaden handelt. Ihre erhöhte Resistenzbereitschaft schränkt die Auswahl möglicher Therapeutika deutlich ein und erschwert eine empirische Herangehensweise⁸⁷. Nichtsdestotrotz kann eine empirische Therapie erforderlich sein, z.B., wenn aufgrund der schmerzhaften Ulzerationen keine Beprobung durch einen Tupfer möglich. In solchen Fällen sind Kenntnisse über typische Resistenzmuster von *P. aeruginosa* von Vorteil und können als Orientierungshilfe für die Auswahl eines geeigneten Antibiotikums herangezogen werden.

In dieser Studie wurden 36 Isolate von *P. aeruginosa*, die von Hunden mit Otitis externa stammen, mittels Plattendiffusionstest getestet und die Sensitivität der Isolate gegenüber 17 antibiotisch aktiven Substanzen bestimmt.

Aufgrund der natürlichen Resistenz von *P. aeruginosa*, die auf der geringen Permeabilität der äußeren Membran, dem Vorhandensein von Breitspektrum-Effluxsystemen und einer chromosomalen AmpC- β -Laktamase beruht, ist *P. aeruginosa* intrinsisch resistent gegenüber Aminopenicillinen, Cephalosporinen der 1. und 2. Generation, sowie der Generation 3a, Tetrazyklinen, Chloramphenicol, Makrolid-Antibiotika und Lincosamiden¹²⁵. Dies spiegelt sich auch in den Resultaten dieser Studie wieder, in der >97% der getesteten Isolate von *P. aeruginosa* eine Resistenz gegenüber Vertretern dieser Klassen zeigten. Testresultate der Fluorchinolone, der Aminoglykoside, bzw. von Imipenem und Colistin demonstrierten eine höhere Sensitivität. Allerdings waren nur 11% der getesteten Isolate auch gegenüber Enrofloxacin, welches vor allem bei multiresistenten Keimen als Reserveantibiotikum umgewidmet wird¹², sensibel. Interessanterweise waren die in dieser Studie getesteten Isolate sensibler gegenüber Marbofloxacin als Enrofloxacin. Marbofloxacin ist als Inhaltsstoff einiger Otologika kommerziell erhältlich, Enrofloxacin findet hingegen nur im

Therapienotstand Anwendung, indem eine Enrofloxacin-haltige Injektionslösung als Ohrtropfen benutzt wird. Dies wurde auch in anderen ähnlichen Studien beschrieben^{9, 156, 182} und ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Enrofloxacin aufgrund seiner höheren Lipophilie ein besseres Substrat für das MexAB-OprM Effluxsystem darstellt als Marbofloxacin¹⁸³. Von allen getesteten Substanzen im Plattendiffusionstest waren Gentamicin und Imipenem am wirksamsten gegen *P. aeruginosa* mit Empfindlichkeitsraten von 94% und 95%. Dies stimmt mit Resultaten anderer Studien überein, die eine günstige Resistenzlage von Gentamicin mit durchschnittlich 90% Sensitivität beschreiben^{9, 184, 185}. Ebenso konnte eine gute Wirksamkeit von Imipenem mit 96,7% bzw. 99% Sensitivität gegenüber caninen Isolaten gezeigt werden^{9, 185}.

Obwohl einige der Isolate resistent gegenüber mehr als 10 der 17 getesteten Antibiotika waren, erfüllte nur eines die durch das European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) und der Centers for Disease Control and Prevention (CDC) festgelegten Kriterien für Multiresistenz. In einem 2011 in dem *Journal of Clinical Microbiology and Infection* publizierten Artikel erarbeiteten internationale Experten unter Federführung des ECDC und des CDC eine international einheitliche Terminologie, um Resistenzprofile verschiedener Bakterien zu beschreiben. Dabei wurde Multiresistenz als erworbene Resistenz gegenüber mindestens einem Vertreter von mindestens drei verschiedenen Antibiotikaklassen definiert¹⁴⁵. Für die korrekte Anwendung dieser Klassifizierung sollten *P. aeruginosa* Isolate gegen alle Vertreter folgender Kategorien getestet werden: Aminoglykoside, antipseudomonale Carbapeneme, antipseudomonale Cephalosporine, antipseudomonale Fluorchinolone, antipseudomonale Penicilline und β -Lactamase-Inhibitoren, Monobactame, Epoxid-Antibiotika und Polymyxine. In dieser Studie wurden jedoch nur Aminoglykoside (Gentamicin, Amikacin, Streptomycin), Carbapeneme (Imipenem), Fluorchinolone (Enrofloxacin, Marbofloxacin, Pradofloxacin) und Polymyxine berücksichtigt. Die Empfehlungen des ECDC und des CDC basieren auf Dokumenten und Grenzwerten (Breakpoints) des CLSI, des EUCAST und der FDA, die aus der Humanmedizin stammen. Viele der dort erwähnten Antibiotika sind in der Veterinärmedizin nicht zugelassen oder der Einsatz ist beschränkt, da sie zu den sogenannten Reserveantibiotika gehören¹⁸⁶. Spezifische Breakpoints oder Klassifikationen für die Veterinärmedizin sind daher nicht verfügbar und

diese Substanzen werden in den Empfehlungen des CLSI für Routineuntersuchungen mikrobieller Sensitivität in veterinärmedizinischen Laboratorien nicht erwähnt¹⁸⁷. Auch die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention beim Robert Koch-Institut¹⁴⁶ basiert ihren Vorschlag der Klassifizierung auf Leitsubstanzen, die gegen *P. aeruginosa* in der Humanmedizin eingesetzt werden¹⁴⁷. Für die Veterinärmedizin existiert derzeit keine eigenständige Klassifikation, daher wurde in dieser Studie ein Isolat als multiresistent klassifiziert, bei dem nur eine der vier Antibiotikagruppen Aminoglykoside, Carbapeneme, Fluorchinolone und Polymyxine wirksam ist.

Das Isolat, welches gemäß diesen Kriterien als multiresistent definiert werden konnte, war im Plattendiffusionstest resistent gegenüber Enrofloxacin, Marbofloxacin, Imipenem und Colistin. Nur die Vertreter der Aminoglykoside, Gentamicin und Amikacin waren wirksam. Vier weitere Isolate waren unempfindlich gegenüber Substanzen aus zwei der vier Antibiotikaklassen, alle jedoch sensibel gegenüber Imipenem und Colistin bzw. Gentamicin. Nachdem jedoch nicht alle der geforderten Gruppen getestet wurden, ist es durchaus möglich, dass eines dieser Isolate gegenüber mehreren Vertretern dieser Gruppen resistent und somit als MDPA gemäß der Klassifikation des ECDC und CDC einzuordnen wäre.

2. Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration

Besteht eine Otitis länger und bessert sich trotz einer Behandlung mit einem empirisch ausgewählten Antibiotikum nicht, oder sind in der Zytologie Stäbchen erkennbar und damit die Gefahr resistenter Pseudomonaden gegeben, wird eine Kultur mit anschließendem Resistenztest empfohlen^{12, 26}. Dieser wird in der Regel als Plattendiffusionstest durchgeführt, in dem die Mikroorganismen auf einer Agarplatte einer festgelegten Konzentration von Testsubstanzen ausgesetzt werden. Sie werden meist in Form von wirkstoffgetränkten Filterpapier-Plättchen auf die beimpfte Agar-Platte gelegt und anschließend bebrütet. Nach der Inkubation wird das Bakterienwachstum um die Plättchen beurteilt. Wird das Wachstum des getesteten Erregers durch die Testsubstanz eingeschränkt, ist um das Plättchen ein kreisförmiger Hemmhof sichtbar, bei trübem Bewuchs der restlichen Agarplatte. Anschließend wird der Durchmesser des Hemmhofes mit festgelegten Grenzwerten für das Bakterium und die jeweilige Testsubstanz

verglichen und das jeweilige Isolat so als sensibel, intermediär oder resistent klassifiziert^{188, 189}. Obwohl diese Methode weit verbreitet und etabliert ist, ist die Aussagekraft der Testresultate für die Therapie einer Otitis externa beim Hund aus folgenden Gründen limitiert: die festgelegten Grenzwerte und Konzentrationen der Testsubstanzen beziehen sich auf die systemische Applikation des Wirkstoffes. Bei einer Otitis externa ist jedoch die topische Therapie Mittel der Wahl, bei der lokal eine viel höhere Konzentration erreicht werden kann, als dies mit der systemischen Applikation möglich wäre. Daher wird oftmals klinisch eine Wirksamkeit bestätigt, obwohl das verwendete Antibiotikum im Plattendiffusionstest als resistent klassifiziert wurde^{11, 12, 87}. Eine Bestimmung der Minimalen Hemm-Konzentration, die definiert ist als die niedrigste Konzentration eines Wirkstoffes, bei der das Wachstum eines Keimes mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden kann¹⁸⁹, ermöglicht die quantitative Messung der Wirksamkeit eines Stoffes *in vitro*¹⁸⁸. Der Vergleich der MHK eines Stoffes mit der tatsächlich erreichten Konzentration am Wirkort könnte somit eine bessere Prognose über einen tatsächlichen Therapieerfolg *in vivo* abgeben.

Zudem werden einige Substanzen, die als Therapieoption zur Behandlung resistenter Keime bei einer Otitis externa zur Verfügung stehen, nicht im Plattendiffusionstest berücksichtigt und es mangelt an speziesspezifischen Grenzwerten¹¹.

Um die MHK von *P. aeruginosa* bei Antibiotika zu bestimmen, die in der Therapie von Otitis externa in Deutschland typischerweise Anwendung finden, wurden 9 Isolate von Hunden mit Otitis externa ausgewählt. Diese wurden gemäß den Performance Standards des CLSI im Mikrodilutionstest aufsteigenden Konzentrationen von Marbofloxacin, Enrofloxacin, Gentamicin und Polymyxin B ausgesetzt. Da Silbersulfadiazin, welches als Therapieoption bei multiresistenten Pseudomonaden umgewidmet wird, nur schlecht in Wasser löslich ist, wurde zunächst mittels Makrodilution mit Kationen-adjustierter Mueller-Hinton-Bouillon eine Verdünnungsreihe hergestellt und diese anschließend auf die Mikrotiterplatte transferiert um die MHK Bestimmung durchzuführen.

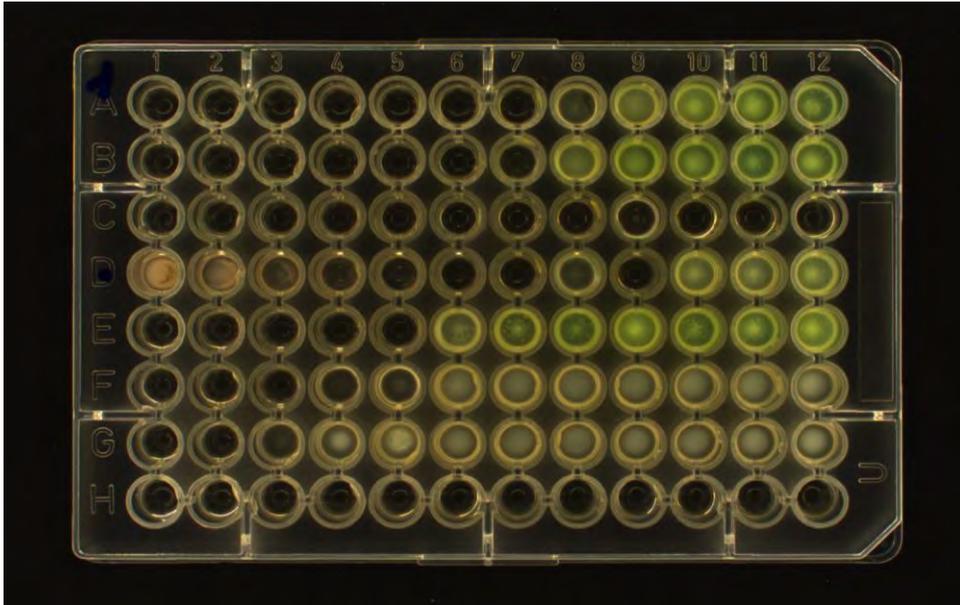


Abbildung 2: Mikrotiterplatte mit Bakterienwachstum (gelb oder trüb) und Hemmstoffen.

Nach einer Kalibrierung bei der pro Isolat mehrere Hemmstoffe auf einer Mikrotiterplatte aufgebracht wurden, um die zu testenden Konzentrationen zu bestimmen, wurden jeweils sortenreine Platten pipettiert. Jeder Platte wurde eine Negativkontrolle in Form von unbeimpfter Mueller-Hinton-Bouillon und eine Positivkontrolle (*P. aeruginosa* Referenzstamm DSM 1117 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) beigefügt.

Da eine Empfindlichkeitsbestimmung von *P. aeruginosa* gegenüber Silbersulfadiazin bis dato nicht durchgeführt wurde und auch keine Empfehlungen des CLSI über Methodik und Testbereich vorliegen, wurde im Vorversuch ein Testbereich von 1 bis 2048 $\mu\text{g/ml}$ für Silbersulfadiazin festgelegt. Um eine homogene Verteilung des Wirkstoffes in jeder Kavität zu gewährleisten wurden die einzelnen Reagenzröhrchen der Makrodilution bei jedem Versuch gründlich mit dem Vortex-Mischer durchmischt, bevor sie auf die Mikrotiterplatte übertragen wurden.

Obwohl die höher konzentrierten Kavitäten durch das Silbersulfadiazin eingetrübt wurden, beeinträchtigte dies die Auswertung nicht.

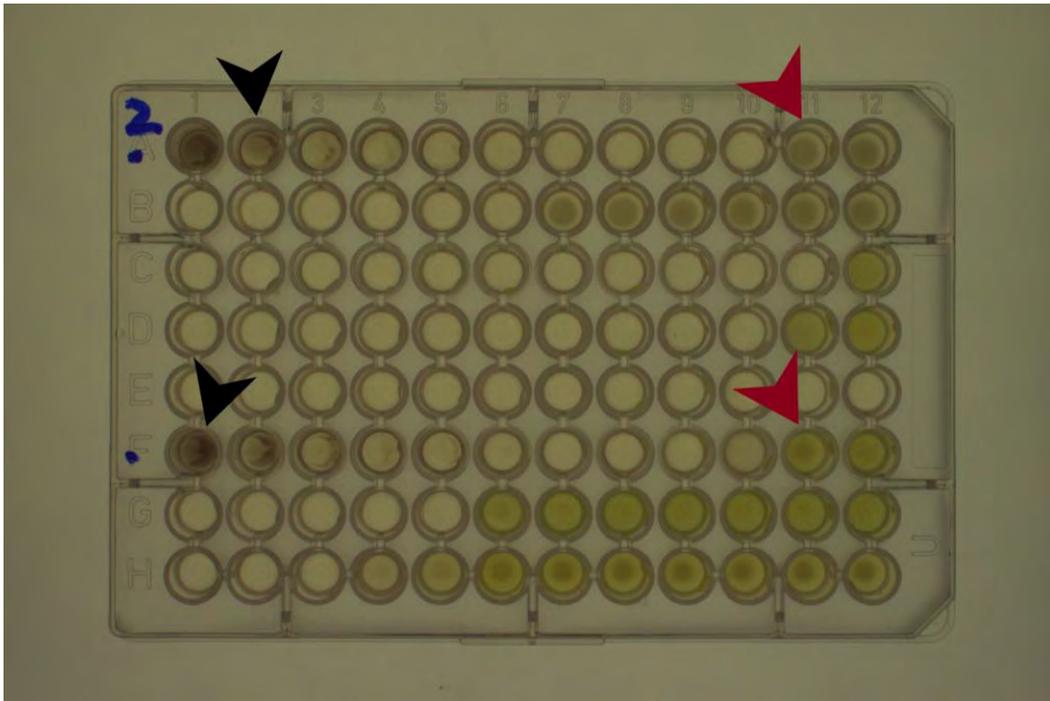


Abbildung 3: Mikrotiterplatte mit Trübung durch Silbersulfadiazin (schwarze Pfeilspitzen) und Trübung durch Bakterienwachstum (rote Pfeilspitzen)

Auf Basis des ersten Vorversuches wurde für Silbersulfadiazin dann ein Testbereich von 0,5 bis 64 $\mu\text{g/ml}$ für die Durchführung der MHK-Bestimmung bestimmt.

Bei der MHK-Bestimmung von Silbersulfadiazin zeigte sich, dass für die meisten Isolate eine minimale Hemmkonzentration von unter 10 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt werden konnte. Dies traf auch auf den Referenzstamm *P. aeruginosa* DSM 1117 zu, mit einer mittleren MHK von 9,2 $\mu\text{g/ml}$. Dies ist etwas höher als in der Studie von Trott et al., in der für den Kontrollstamm *P. aeruginosa* ATCC 27853 eine MHK von 4,0 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen wurde. Allerdings bestimmte Trott in der Studie nicht die MHK für Silbersulfadiazin als Einzelwirkstoff, sondern in der Kombination mit Enrofloxacin. Diese Kombination ist unter dem Namen Baytril[®] Otic in Ländern wie USA oder Australien zur Behandlung caniner Otitis externa zugelassen und enthält 5 mg/ml Enrofloxacin und 10 mg/ml Silbersulfadiazin¹⁹⁰. Trott verglich die MHK Werte, die für die Kombination der Wirkstoffe ermittelt wurden mit denen für Enrofloxacin als Einzelwirkstoff und konnte zeigen, dass die MHK Werte für Enrofloxacin in der Kombination mit Silbersulfadiazin zum Teil deutlich geringer waren als für Enrofloxacin alleine. Besonders deutlich war der Unterschied bei Isolaten mit hohen MHK Werten (> 64 mg/ml Einzel vs. 4,0

mg/ml Kombi). Er schlussfolgerte, dass Enrofloxacin und Silbersulfadiazin in der Kombination synergistisch wirken und so niedrigere MHK Werte erreicht werden können. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass für Silbersulfadiazin in dieser Studie höhere MHK Werte nachgewiesen wurden. Interessanterweise waren die beiden Stämme, die höhere MHKs gegenüber Silbersulfadiazin aufwiesen auch weniger empfindlich gegenüber anderen Testsubstanzen. Isolat Nummer 6, bei dem eine mittlere MHK von 32 µg/ml gegenüber Silbersulfadiazin ermittelt wurde, zeigte ebenfalls die höchsten MHK Werte gegenüber Polymyxin B und Gentamicin.

Die Ergebnisse der MHK Bestimmung der anderen Testsubstanzen zeigen eine starke Varianz der unterschiedlichen Stämme. Gegenüber Enrofloxacin schwankten die ermittelten MHK-Werte beispielsweise von 1,0 bis 1024 µg/ml. Besonders drei der getesteten Isolate zeigten hohe MHKs gegenüber den Fluorchinolonen (Nummer 2, 4 und 6). Alle drei waren auch im Plattendiffusionstest als resistent gegenüber Enrofloxacin und Marbofloxacin klassifiziert worden. Möglicherweise sind diese drei Isolate in der Lage, rasch einen Biofilm auszubilden, der zu einer erhöhten Toleranz gegenüber diversen Umwelteinflüssen und zu einer signifikant höheren MHK führen kann¹⁵⁸.

Biofilme bestehen aus Bakterienzellverbänden, die extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) wie Polysaccharide, Proteine und DNA ausscheiden. Sie bilden in Verbindung mit Wasser Hydrogele, so dass eine schleimartige Masse entsteht, die die Mikroorganismen umhüllt. Diese widerstandsfähigen Aggregate können überall dort entstehen, wo sich Grenzflächen (flüssige und gasförmige Phase oder feste und flüssige Phase) befinden. Mit dem Übergang von der planktonischen in die sessile Form ändert sich auch die Lebensweise der Bakterien. Einige von ihnen treten in eine Ruhephase ein, die durch einen extrem reduzierten Stoffwechsel charakterisiert ist. Diese sogenannten Persister können in diesem Dämmerzustand selbst bakterizide Antibiotika wie z.B. Fluorchinolone überleben. Gut geschützt durch den Biofilm verstecken sich die Persister auch vor der Immunabwehr und können nach dem Absetzen des Antibiotikums zu einem schnellen Rezidiv führen¹⁹¹.

Die Biofilm-Matrix erschwert zudem die Penetration von Wirkstoffen in das Innere der Kolonie und kann Enzyme, wie z.B. β-Lactamasen enthalten, die Antibiotika schnell metabolisieren.

Obwohl bei einigen Isolaten vergleichsweise hohe MHK-Werte bestimmt werden konnten, insbesondere gegenüber Enrofloxacin und Marbofloxacin, ist die Antibiotika-Konzentration, die bei einer topischen Therapie im äußeren Gehörgang erreicht wird, um ein vielfaches höher.

Gentamicin, welches in Easotic® (Virbac) kommerziell erhältlich ist, wird gemäß Herstellerangaben in einer Konzentration von 2,35 mg/ml im Ohr angewendet. Dies entspricht dem 588fachen der höchsten MHK, die in dieser Studie ermittelt werden konnte. Auch bei den anderen getesteten Wirkstoffen ist die Konzentration, die laut Fachinformation des jeweiligen Therapeutikums im Gehörgang erreicht wird, ein Vielfaches der höchsten MHK, welche für den jeweiligen Wirkstoff bestimmt wurde.

Tabelle 2: Vergleich von MHK Werten und erreichter therapeutischer Konzentration im Gehörgang

Wirkstoff	Höchste MHK	Konz. Ohr	Faktor
Gentamicin	4 µg/ml	2350 µg/ml	588
Polymyxin B	16 µg/ml	529,3 µg/ml	33
Enrofloxacin	1024 µg/ml	11250 µg/ml	11
Marbofloxacin	256 µg/ml	3000 µg/ml	12
Silbersulfadiazin	64 µg/ml	10000 µg/ml	156

Da Enrofloxacin in Deutschland nicht als zugelassene Ohrsuspension erhältlich ist und durch Verdünnen einer Injektionslösung umgewidmet wird, wurde bei Enrofloxacin von einer Dosis von 11,25 mg/ml ausgegangen. Diese Konzentration wird in der Praxis durch verdünnen einer 2,5% Injektionslösung (Baytril® 2,5%, ad us. Vet, Bayer Vital GmbH) mit NaCl und Hexadreson im Verhältnis 9:9:2 erreicht. Eine Publikation empfiehlt bei Pseudomonas-Otitiden lokal eine Konzentration von 22,7mg/ml Enrofloxacin zu verwenden, was dem 22fachen der höchsten ermittelten MHK entsprechen würde ⁸⁷.

Silbersulfadiazin wird ebenfalls umgewidmet. Dazu wird eine humanmedizinische Salbe (Flammazine®) mit NaCl zu einer 1%igen Lösung verdünnt und im Gehörgang angewendet ^{12, 87}.

Dies resultiert in einer zu erwartenden Dosis von 10 mg/ml.

Nimmt man an, dass die Wirksamkeit von Antibiotika davon abhängt, dass im Gehörgang mindestens ein zehnfaches der minimalen Hemmkonzentration

erreicht wird ⁸⁷, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass ein Therapieerfolg *in vivo* mit einem der getesteten Wirkstoffe erreicht worden wäre, selbst wenn das jeweilige Isolat sowohl im DDST als auch im Mikrodilutionstest als resistent gegenüber dem Wirkstoff klassifiziert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden nach einer Studie von Robson et al. im Rahmen des North American Veterinary Dermatology Forums 2010 präsentiert: 90% der Hunde mit *P. aeruginosa* Otitis sprachen auf die Behandlung mit einem empirisch ausgewählten Antibiotikum an, obwohl dieses im DDST als resistent klassifiziert worden war ¹⁹². Es stellt sich nach diesen Ergebnissen die Frage, ob ein Plattendiffusionstest, der nur in der Lage ist, festgelegte Konzentrationen von Wirkstoffen zu testen und auch nicht alle zur Verfügung stehenden Therapeutika umfasst, wirklich eine sinnvolle Orientierungshilfe darstellt oder ob eine empirisch ausgewählte Therapie, die auf zytologischen Ergebnissen und typischen Resistenzmustern basiert, nicht genauso erfolgsversprechend ist?

Eine Möglichkeit, den Therapieerfolg genauer vorherzusagen und alle relevanten Wirkstoffe zu berücksichtigen, wäre, spezifische Mikrotiterplattenlayouts zu verwenden, wie sie durch den DVG-Arbeitskreis „Antibiotikaresistenz“ für die Empfindlichkeitstestung von Infektionserregern bei Kleintieren, Großtieren und Mastitiden empfohlen werden ¹⁹³.

Ausgehend von den ermittelten MHKs in dieser Studie und den im Gehörgang erreichten Wirkstoffkonzentrationen, könnte folgendes spezifisches Plattenlayout für die Empfindlichkeitsbestimmung von *P. aeruginosa* bei Otitis Externa empfohlen werden:

In Abbildung 4 sind die beiden Konzentrationsstufen, zwischen denen sich jeweils ein Zehntel der erreichten Konzentrationen im externen Gehörgang befindet grün markiert. Da die klinische Wirksamkeit eines Antibiotikums maßgeblich durch die erreichte Konzentration am Wirkort beeinflusst wird, kann durch die Beurteilung der Wachstumshemmung an diesen Positionen eine Prognose über den Therapieerfolg abgegeben werden.

Mit der Änderung der Verordnung über tierärztliche Hausapotheken (TÄHAV), die am 01.03.2018 in Kraft getreten ist, wird erstmals eine Antibiotogrammpflicht auch bei Haustieren vorgeschrieben. So ist bei der Behandlung mit Arzneimitteln, die Cephalosporine der 3. oder 4. Generation oder Fluorchinolone enthalten, ein Antibiotogramm anzufertigen, selbst wenn der Wirkstoff zulassungskonform eingesetzt wird. Daher ist es zum einen wichtig, Alternativen zu diesen Wirkstoffen zu suchen, die bei *P. aeruginosa* Otitiden eingesetzt werden können, wie z.B. Silbersulfadiazin. Zum anderen ist es wichtig den Antibiotogramm-Befund auf Basis der lokalen Therapie der Wirkstoffe zu interpretieren. Bei allen Isolaten, die sowohl im DDST als auch im Mikrodilutionsverfahren als resistent gegenüber Enrofloxacin klassifiziert wurden, war Enrofloxacin in der Konzentration 7,5 mg/ml oder 11,25mg/ml die initiale Therapie. Diese wurde auch nach dem Ergebnis des DDST beibehalten und alle Hunde zeigten klinisch und zytologisch eine Besserung auf die Therapie. Nach Kontrolle der zugrundeliegenden Faktoren, waren drei der vier Hunde rezidivfrei. Bei einem der Hunde war der Gehörgang durch die chronische, einseitige Otitis bereits so verändert, dass nur eine Gehörgangsablation eine langfristige Besserung brachte.

Diese Studie bestätigt somit, dass die erreichte Wirkstoffkonzentration bei lokaler Therapie einer Otitis externa die MHKs von *P. aeruginosa* Isolaten gegenüber den verfügbaren Wirkstoffen um ein Vielfaches überschreitet. Des Weiteren konnte durch die MHK Bestimmung von Silbersulfadiazin *in vitro* eine Wirksamkeit gegenüber *P. aeruginosa* demonstriert und ein Richtwert für die Therapie einer Otitis externa mit Flammazine® generiert werden. Schlussfolgernd ist anzumerken, dass der Therapieerfolg einer Otitis externa neben der Empfindlichkeit der Erreger maßgeblich von einem multifaktoriellen Therapieansatz abhängt, der die Behandlung der zugrundeliegenden Faktoren, die Säuberung des Gehörgangs, eine unterstützende antientzündliche Therapie, sowie eine gute Besitzeraufklärung und Compliance einschließt.

V ZUSAMMENFASSUNG

Die Otitis externa ist ein häufiges Problem in der Praxis. Ohrinfektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* sind besonders problematisch, aufgrund der hohen Resistenzbereitschaft des Erregers und seiner Fähigkeit, das Trommelfell zu beschädigen. Die Auswahl geeigneter Wirkstoffe zur Therapie sollte auf Empfindlichkeitstests beruhen, die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) steht jedoch nicht für alle Therapieoptionen zur Verfügung. Silbersulfadiazin wird bei rezidivierenden *P. aeruginosa* Otitiden in der Praxis mit guten klinischen Erfolgen eingesetzt, eine MHK für Silbersulfadiazin als Monowirkstoff wurde aber bis dato noch nicht bestimmt.

Ziel dieser Studie war es, Resistenzmuster von *P. aeruginosa* Isolaten von Hunden mit Otitis externa aufzuzeigen und die MHK für Silbersulfadiazin und andere häufige Ohrtherapeutika zu ermitteln.

Die Empfindlichkeit von 36 *P. aeruginosa* Isolaten gegenüber 17 ausgewählten Antibiotika wurden mittels Plattendiffusionstest bestimmt. Zur Ermittlung der MHK wurden 9 der Stämme im Mikrodilutionsverfahren verschiedenen Konzentrationen von Marbofloxacin, Enrofloxacin, Gentamicin, Polymyxin B und Silbersulfadiazin ausgesetzt.

Im Plattendiffusionstest konnte gegenüber 9 der 17 antimikrobiellen Wirkstoffe eine vollständige Resistenz nachgewiesen werden. 94% bzw. 96% der Isolate waren empfindlich auf Gentamicin bzw. Imipenem. Diese Ergebnisse stimmten mit denen der Mikrodilution überein, bei der alle Stämme sensibel gegenüber Gentamicin waren. Gegenüber den Flouorchinolonen und Polymyxin B konnte ein höheres Maß an Resistenz beobachtet werden. Silbersulfadiazin war wirksam *in vitro* bei einer MHK von 1 bis 64 µg/ml.

Silbersulfadiazin wird in der Praxis als 1%ige Lösung topisch im Ohr appliziert. Obwohl der tatsächlich erreichte freie Anteil einer derartigen Lösung am Wirkort nicht untersucht wurde, war die MHK in dieser Studie um ein vielfaches niedriger als der angegebene Wirkstoffgehalt der zubereiteten Lösung und ein Behandlungserfolg ist wahrscheinlich. Somit kann Silbersulfadiazin als Behandlungsoption bei Hunden mit *P. aeruginosa* Otitis angesehen werden.

VI SUMMARY

Otitis externa is a common presenting complaint in practice. Ear infections with *Pseudomonas (P.) aeruginosa* are particularly problematic due to the organism's high level of resistance and ability to damage the tympanum. Treatment should be based on susceptibility testing, but minimum inhibitory concentrations (MICs) are not available for all treatment options. Silver sulfadiazine has been used in cases of recurrent *P. aeruginosa* otitis, but a MIC for silver sulfadiazine as a single agent has not been established.

The objective of the study was to describe susceptibility patterns of *P. aeruginosa* isolated from canine otitis externa and determine the MIC for silver sulfadiazine and other topical antimicrobials.

Thirty-six *P. aeruginosa* isolates were collected from client-owned dogs, suffering from otitis externa, and tested for susceptibility. Susceptibility patterns were established using disc diffusion susceptibility testing against 17 antimicrobials. For determination of the MIC, selected strains were tested against increasing concentrations of marbofloxacin, enrofloxacin, gentamicin, polymyxin B and silver sulfadiazine using broth microdilution.

For nine out of 17 antimicrobial agents complete resistance was seen in all the isolates tested via disk diffusion susceptibility testing. Gentamicin and imipenem showed the highest susceptibility with 94% and 96% susceptible strains. About 94% and 96% isolates were susceptible against gentamicin and imipenem, respectively. These findings were consistent with broth dilution, where all strains were susceptible to gentamicin. Resistance was higher against polymyxin B and the fluoroquinolones. Silver sulfadiazine was effective *in vitro* with an MIC ranging from 1 - 64 µg/ml.

Silver sulfadiazine is used as a 1% topical solution in practice, when treating otitis. Although the proportion of free silver sulfadiazine at the site of action has not been investigated in this study, the MIC was lower, than the expected concentration in the otic solution and thus a treatment success is probable. Considering this, silver sulfadiazine represents a treatment option for dogs with *P. aeruginosa* otitis.

VII LITERATURVERZEICHNIS

1. Porter R. The Greatest Benefit to Mankind: A Medical History of Humanity (The Norton History of Science): WW Norton & Company; 1999.
2. Upshur R. Ethics and infectious disease. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(8):654-.
3. 2015 G. Antibiotikaresistenzen und Verbrauch. *Antiinfectives Intelligence, Rheinbach*. 2016.
4. Fleming A. Penicillin. Nobel lecture, December 11, 1945
5. Böttner A, Fehr M, Feßler AT, *et al.* Anwendung von Antibiotika bei Klein- und Heimtieren. *Prakt Tierarzt*. 2016;4(97):300-28.
6. Hillier A, Alcorn JR, Cole LK, *et al.* Pyoderma caused by *Pseudomonas aeruginosa* infection in dogs: 20 cases. *Vet Dermatol*. 2006;17(6):432-9.
7. Martin Barrasa JL, Lupiola Gomez P, Gonzalez Lama Z, *et al.* Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2000;47(3):191-6.
8. Wildermuth BE, Griffin CE, Rosenkrantz WS, *et al.* Susceptibility of *Pseudomonas isolates* from the ears and skin of dogs to enrofloxacin, marbofloxacin, and ciprofloxacin. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2007;43(6):337-41.
9. Rubin J, Walker RD, Blickenstaff K, *et al.* Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infections. *Vet Microbiol*. 2008;131(1-2):164-72.
10. Percival SL, Thomas J, Linton S, *et al.* The antimicrobial efficacy of silver on antibiotic-resistant bacteria isolated from burn wounds. *Int Wound J*. 2012;9(5):488-93.

11. Morris DO. Medical therapy of otitis externa and otitis media. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(2):541-55, vii-viii.
12. Linek M. Otitis externa und media bei Hund und Katze. *Tierärztl Pract.* 2011;39 (K)(6):451-63.
13. Papich MG. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2013;43(5):1091-107.
14. Mann S. Über den Geruchsstoff von *Pseudomonas aeruginosa*. *Archiv für Mikrobiologie.* 1966;54(2):184-90.
15. Sabra W, Kim E-J, Zeng A-P. Physiological responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to oxidative stress in controlled microaerobic and aerobic cultures. *Microbiology.* 2002;148(10):3195-202.
16. Bhawsar MNA, Singh M. Isolation And Characterization Of *Pseudomonas aeruginosa* From Waste Soybean Oil As Biosurfactants Which Enhances Biodegradation Of Industrial Waste With Special Reference To Kosmi Dam, Betul District,(MP). *International Journal.* 2014;2(6):778-83.
17. Favero M, Carson L, Bond W, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. *Science.* 1971;173(3999):836-8.
18. Eschbach M, Schreiber K, Trunk K, *et al.* Long-term anaerobic survival of the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* via pyruvate fermentation. *Journal of bacteriology.* 2004;186(14):4596-604.
19. Dalhoff A. Opportunistic infections caused by *pseudomonas aeruginosa*. *Infection.* 1987;15(1):69-72.
20. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, *et al.* Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 1983;5(2):279-313.

21. Nuttall T, Cole LK. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. *Vet Dermatol.* 2007;18(2):69-77.
22. Gaynes R, Edwards JR. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis.* 2005;41(6):848-54.
23. Fujitani S, Moffett KS, Victor LY. *Pseudomonas aeruginosa*.
24. Petersen AD, Walker RD, Bowman MM, *et al.* 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). *Journal of the American Animal Hospital Association.* 2002;38(5):407-13.
25. Guaguère ÉAM, Prelaud P, Craig J. A practical guide to canine dermatology: Kalianxis; 2008.
26. Harvey RG, Harari J, Delauche AJ. Ohrkrankheiten bei Hund und Katze: Grundlagen-Diagnostik-Behandlung; mit 18 Tabellen: Schattauer Verlag; 2003.
27. Angus JC. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(2):411-24.
28. Logas DB. Diseases of the ear canal. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 1994;24(5):905-19.
29. Hill PB, Lo A, Eden CA, *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Vet Rec.* 2006;158(16):533-9.
30. 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.

31. 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(2):120-6.

32. Kiss G, Radványi S, Szigeti G. New combination for the therapy of canine otitis externa I Microbiology of otitis externa. *Journal of Small Animal Practice.* 1997;38(2):51-6.

33. Carlotti D, Taillieu-LeRoy S. L'otite externe chez le chien: etiologie et clinique, revue bibliographique et etude retrospective portant sur 752 cas. *Prat Méd Chir Anim Comp.* 1997;32:243.

34. Little C, Lane J, Pearson G. Inflammatory middle ear disease of the dog: the pathology of otitis media. *The Veterinary Record.* 1991;128(13):293-6.

35. Cole L, Kwochka K, Kowalski J, *et al.* Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1998;212(4):534-8.

36. Gotthelf LN. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(2):469-87.

37. Thelen A. Die kanine Otitis externa: Ursachen, Diagnostik und Therapie. *Kleintiermedizin.* 2016;2:84-6.

38. August JR. Otitis externa: a disease of multifactorial etiology. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 1988;18(4):731-42.

39. Griffin CE. Otitis externa and otitis media. *Current Veterinary Dermatology, Mosby, St Louis, USA.* 1993:245-62.

40. Rosser EJ, Jr. Causes of otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(2):459-68.
41. Bensignor E. Dermatite féline à *Otodectes cynotis*. *Point vétérinaire.* 1996;28(175):85-7.
42. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL, *et al.* Muller and Kirk's Small Animal Dermatology7: Muller and Kirk's Small Animal Dermatology: Elsevier Health Sciences; 2013.
43. Paterson S, editor A review of 200 cases of otitis externa in the dog. *Proceedings of the 18th Annual Congress of the European Society of Veterinary Dermatology-European College of Veterinary Dermatology, Nice, France; 2002.*
44. Zur G, Lifshitz B, Bdolah-Abram T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. *Journal of Small Animal Practice.* 2011;52(5):254-8.
45. Rosser Jr E. Diagnosis of food allergy in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1993;203(2):259-62.
46. Griffin C, DeBoer D. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology.* 2001;81(3):255-69.
47. Paterson S. Discovering the causes of otitis externa. *In Practice.* 2016;38(Suppl 2):7-11.
48. Jacobson LS. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *J S Afr Vet Assoc.* 2002;73(4):162-70.
49. 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.

50. Crespo M, Abarca M, Cabanes F. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis externa. *Medical mycology.* 2002;40(2):115-21.

51. Shokri H, Khosravi A, Rad M, *et al.* Occurrence of *Malassezia* species in Persian and domestic short hair cats with and without otitis externa. *Journal of Veterinary Medical Science.* 2010;72(3):293-6.

52. Fernando S. A histological and histochemical study of the glands of the external auditory canal of the dog. *Research in veterinary science.* 1966;7(1):116.

53. Baxter M, Lawler D. The incidence and microbiology of otitis externa of dogs and cats in New Zealand. *New Zealand veterinary journal.* 1972;20(3):29-32.

54. Stout-Graham M, Kainer R, Whalen L, *et al.* Morphologic measurements of the external horizontal ear canal of dogs. *American journal of veterinary research.* 1990;51(7):990-4.

55. Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, *et al.* Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol.* 2007;18(5):341-7.

56. Pope E, editor Feline inflammatory polyps. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*; 1995.

57. Harvey C, Goldschmidt M. Inflammatory polypoid growths in the ear canal of cats. *Journal of Small Animal Practice.* 1978;19(1-12):669-77.

58. London CA, Dubilzeig RR, Vail DM, *et al.* Evaluation of dogs and cats with tumors of the ear canal: 145 cases (1978-1992). *Journal-American Veterinary Medical Association.* 1996;208:1413-8.

59. Hayes Jr H, Pickle L, Wilson G. Effects of ear type and weather on the hospital prevalence of canine otitis externa. *Research in veterinary science*. 1987;42(3):294-8.
60. Grono L, Frost A. Otitis externa in the dog: the microbiology of the normal and affected external ear canal. *Australian veterinary journal*. 1969;45(9):420-2.
61. Spreull J. Treatment of otitis media in the dog. *Journal of Small Animal Practice*. 1964;5(2):107-22.
62. Neer T, Howard P. Otitis media. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1982;4(5):410-6.
63. Rusbridge C. Primary secretory otitis media in Cavalier King Charles spaniels. *The Journal of small animal practice*. 2004;45(4):222; author reply
64. Stern-Sertholtz W, Sjöström L, Hårkanson NW. Primary secretory otitis media in the Cavalier King Charles spaniel: a review of 61 cases. *Journal of small animal practice*. 2003;44(6):253-6.
65. Rosychuk RA. Management of otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1994;24(5):921-52.
66. Carlotti DN. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*. 1991;32(8):394-400.
67. Little C. A Clinician's approach to the investigation of otitis externa. *In Practice*. 1996;18(1):9-16.
68. Ouschan C. Management der Otitis externa beim Hund - Was gibt es zu verbessern? *Kompendium Kleintier* 2016:12 - 22.

69. Little C. Medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *In Practice*. 1996;18(2):66-71.
70. Osthold W, Wagner R. Otitis externa bei Hund und Katze. *Kleintiermedizin*. 2009;9(10):262-75.
71. Eger CE, Lindsay P. Effects of otitis on hearing in dogs characterised by brainstem auditory evoked response testing. *Journal of Small Animal Practice*. 1997;38(9):380-6.
72. Cole LK. Ooscopic evaluation of the ear canal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2004;34(2):397-410.
73. Cole LK. Anatomy and physiology of the canine ear. *Vet Dermatol*. 2010;21(2):221-31.
74. Miller ME, Witter R. Applied anatomy of the external ear of the dog. *Cornell Vet*. 1942;32:64-86.
75. Huang HP, Little CJ, McNeil PE. Histological changes in the external ear canal of dogs with otitis externa. *Vet Dermatol*. 2009;20(5-6):422-8.
76. Little CJ, Lane JG. An evaluation of tympanometry, otoscopy and palpation for assessment of the canine tympanic membrane. *Vet Rec*. 1989;124(1):5-8.
77. Cole L, Kwochka K, Podell M, *et al*. Evaluation of radiography, otoscopy, pneumotoscopy, impedance audiometry and endoscopy for the diagnosis of otitis media. *Advances in veterinary dermatology*. 2002;4:49-55.
78. Bouassiba C, Osthold W, Mueller RS. [In-vivo efficacy of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. A randomised, placebo-controlled, double-blinded comparative trial]. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere*

Heimtieresil. 2012;40(3):161-70.

79. Chickering WR. Cytologic evaluation of otic exudates. *Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice.* 1988;18(4):773-82.

80. Bugden DL. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. *Aust Vet J.* 2013;91(1-2):43-6.

81. (BTK) B. Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln *Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt.* 2015;03.

82. Oliveira LC, Leite CA, Brillhante RS, *et al.* Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Can Vet J.* 2008;49(8):785-8.

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

84. Löscher W, Richter A, Potschka H. Pharmakotherapie bei Haus-und Nutztieren: Enke Verlag; 2016.

85. Pietschmann S, Meyer M, Voget M, *et al.* The joint in vitro action of polymyxin B and miconazole against pathogens associated with canine otitis externa from three European countries. *Vet Dermatol.* 2013;24(4):439-e97.

86. Landman D, Georgescu C, Martin DA, *et al.* Polymyxins Revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):449-65.

87. Nuttall T. Successful management of otitis externa. *In Practice.* 2016;38(Suppl 2):17-21.

88. Emmerich IU. Neue Arzneimittel für Kleintiere 2015. *Tierärztliche Praxis Kleintiere.* 2016;44(3):171-8.

89. ONSURNIA F. Ohrenigel für Hunde - Terbinafin/Florfenicol/Betamethasonacetat
https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140731129105/anx_129105_de.pdf: Novartis Tiergesundheit
2014 [
90. Wefstaedt P, Behrens B-A, Nolte I, *et al.* Finite element modelling of the canine and feline outer ear canal: benefits for local drug delivery? *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. 2010;124(1-2):78-82.
91. Brummett RE, Harris RF, Lindgren JA. Detection of ototoxicity from drugs applied topically to the middle ear space. *Laryngoscope*. 1976;86(8):1177-87.
92. Strain GM, Merchant SR, Neer TM, *et al.* Ototoxicity assessment of a gentamicin sulfate otic preparation in dogs. *American journal of veterinary research*. 1995;56(4):532-8.
93. Russell PT, Church CA, Jinn TH, *et al.* Effects of common topical otic preparations on the morphology of isolated cochlear outer hair cells. *Acta otolaryngologica*. 2001;121(2):135-9.
94. Bagger-Sjöbäck D, Lundman L, Nilsson-Ehle I. Ciprofloxacin and the inner ear-a morphological and round window membrane permeability study. *ORL*. 1992;54(1):5-9.
95. Claes J, Govaerts P, Van de Heyning P, *et al.* Lack of ciprofloxacin ototoxicity after repeated ototopical application. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991;35(5):1014-6.
96. Özagar A, Koç A, Çıprut A, *et al.* Effects of topical otic preparations on hearing in chronic otitis media. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery*. 1997;117(4):405-8.

97. Ford MM, Dubielzig RR, Giuliano EA, *et al.* Ocular and systemic manifestations after oral administration of a high dose of enrofloxacin in cats. *Am J Vet Res.* 2007;68(2):190-202.
98. McKeever PJ, Torres SM. Ear disease and its management. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice.* 1997;27(6):1523-36.
99. Fourie L, Kok D, Heine J. Evaluation of the efficacy of an imidacloprid 10%/moxidectin 1% spot-on against *Otodectes cynotis* in cats. *Parasitology research.* 2003;90(3):S112-S3.
100. Blot C, Kodjo A, Reynaud M-C, *et al.* Efficacy of selamectin administered topically in the treatment of feline otocariosis. *Veterinary parasitology.* 2003;112(3):241-7.
101. Beugnet F, Bouhsira É, Halos L, *et al.* Preventive efficacy of a topical combination of fipronil–(S)-methoprene–eprinomectin–praziquantel against ear mite (*Otodectes cynotis*) infestation of cats through a natural infestation model. *Parasite.* 2014;21.
102. Taenzler J, de Vos C, Roepke RK, *et al.* Efficacy of fluralaner against *Otodectes cynotis* infestations in dogs and cats. *Parasites & vectors.* 2017;10(1):30.
103. Six RH, Becskei C, Mazaleski MM, *et al.* Efficacy of sarolaner, a novel oral isoxazoline, against two common mite infestations in dogs: *Demodex* spp. and *Otodectes cynotis*. *Veterinary parasitology.* 2016;222:62-6.
104. Beugnet F, de Vos C, Liebenberg J, *et al.* Efficacy of afoxolaner in a clinical field study in dogs naturally infested with *Sarcoptes scabiei*. *Parasite.* 2016;23.
105. Carithers D, Crawford J, de Vos C, *et al.* Assessment of afoxolaner

efficacy against *Otodectes cynotis* infestations of dogs. *Parasites & Vectors*. 2016;9(1):635.

106. Bethlehem S, Bexley J, Mueller RS. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2012;145(3):582-9.

107. Jeffers J, Shanley K, Meyer E. Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1991;198(2):245-50.

108. DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001;81(3-4):271-6.

109. Bousquet J, Lockey R, Malling H-J. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1998;102(4):558-62.

110. Olivry T, Sousa CA. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001;81(3):311-6.

111. Nelson RW, Couto CG. Small animal internal medicine: Elsevier Health Sciences; 2014.

112. Nuttall T, Cole LK. Ear cleaning: the UK and US perspective. *Veterinary dermatology*. 2004;15(2):127-36.

113. Nuttall TJ. Use of ticarcillin in the management of canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Small Anim Pract*. 1998;39(4):165-8.

114. Guardabassi L, Courvalin P. Modes of Antimicrobial Action and

Mechanisms of Bacterial Resistance. *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*: American Society of Microbiology; 2006.

115. Schwarz S, Noble WC. Aspects of bacterial resistance to antimicrobials used in veterinary dermatological practice. *Veterinary Dermatology*. 1999;10(3):163-76.

116. Rolle M, Mayr A. Medizinische Mikrobiologie, Infektions-und Seuchenmedizin. 7. Auflage Stuttgart: Enke Verlag. 2002.

117. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, *et al.* Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e34953.

118. D'costa VM, King CE, Kalan L, *et al.* Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011;477(7365):457.

119. Hancock REW. The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology*. 1997;5(1):37-42.

120. Angus BL, Carey AM, Caron DA, *et al.* Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic-supersusceptible mutant. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1982;21(2):299-309.

121. Yoshimura F, Nikaido H. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *Journal of bacteriology*. 1982;152(2):636-42.

122. Li Y, Mima T, Komori Y, *et al.* A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(4):572-5.

123. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*.

2000;3(4):247-55.

124. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2001;3(2):255-64.

125. Theuretzbacher U. Beta-Lactamasen und Beta-LactamaseInhibitoren. *Chemotherapie Journal*. 1998;7(4):136-42.

126. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamasen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.

127. Witte W, Mielke M. β -Laktamasen mit breitem Wirkspektrum. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2003;10(46):881-90.

128. Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Veterinary Dermatology*. 2017;28(1):82-e19.

129. Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical infectious diseases*. 2002;34(5):634-40.

130. Juan C, Maciá MD, Gutiérrez O, *et al*. Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(11):4733-8.

131. Vahaboglu H, Oztürk R, Aygün G, *et al*. Widespread detection of PER-1-type extended-spectrum beta-lactamasen among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: a nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1997;41(10):2265-9.

132. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, *et al.* Metallo- β -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clinical Microbiology Reviews*. 2005;18(2):306-25.
133. Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2002;95(Suppl 41):22-6.
134. Pechère JC, Köhler T. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical microbiology and infection*. 1999;5(S1).
135. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, *et al.* Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(4):1347-51.
136. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(6):560-78.
137. Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res*. 2001;32(3-4):201-25.
138. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, *et al.* Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*. 2003;362(9399):1888-93.
139. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, *et al.* Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase RmtD and Metallo- β -Lactamase SPM-1 in a Panresistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(3):852-6.
140. Hirsch EB. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. 2010;10(4):441-51.

141. Lebensmittelsicherheit BfrVu. Berichte Zur Resistenzmonitoringstudie: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien 2012/2013: BVL-Report 10.5; 2016.
142. Kluytmans–VandenBergh MFQ, Kluytmans JAJW, Voss A. Dutch Guideline for Preventing Nosocomial Transmission of Highly Resistant Microorganisms (HRMO). *Infection*. 2005;33(5):309-13.
143. Pop-Vicas AE, D'Agata EMC. The Rising Influx of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli into a Tertiary Care Hospital. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;40(12):1792-8.
144. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, *et al*. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. *American journal of infection control*. 2007;35(10):S165-S93.
145. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, *et al*. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(3):268-81.
146. beim Robert IK. Prävention von Infektionen, die von Gefäßkathetern ausgehen. *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz*. 2017;2:171.
147. von Baum H, Kaase M, Meyer E, *et al*. Definition der Multiresistenz gegenüber Antibiotika bei gramnegativen Stäbchen im Hinblick auf Maßnahmen zur Vermeidung der Weiterverbreitung. 2011.
148. Fluit AC, van der Bruggen JT, Aarestrup FM, *et al*. Priorities for antibiotic resistance surveillance in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*.12(5):410-7.

149. Silley P, de Jong A, Simjee S, *et al.* Harmonisation of resistance monitoring programmes in veterinary medicine: an urgent need in the EU? *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(6):504-12.
150. 2008 G. Antibiotika-Resistenz und Verbrauch. *Antiinfectives Intelligence, Rheinbach.* 2008.
151. Schwarz S, Alesík E, Grobbel M, *et al.* The BfT-GermVet monitoring program--aims and basics. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift.* 2006;120(9-10):357-62.
152. Werckenthin C, Alesík E, Grobbel M, *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from dogs and cats as well as *Arcanobacterium pyogenes* from cattle and swine as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift.* 2007;120(9-10):412-22.
153. Wölms C. Otitis externa - Keimverteilung und Resistenzverhalten der nachgewiesenen Isolate in Tupferproben aus dem Jahr 2011. *Kleintierpraxis.* 2014;59(6):297-312.
154. Penna B, Thome S, Martins R, *et al.* *In vitro* antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2011;42(4):1434-6.
155. Arais LR, Barbosa AV, Carvalho CA, *et al.* Antimicrobial resistance, integron carriage, and *gyrA* and *gyrB* mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. *Vet Dermatol.* 2016;27(2):113-7e31.
156. McKay L, Rose CD, Matousek JL, *et al.* Antimicrobial testing of selected fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2007;43(6):307-12.

157. Mekic S, Matanovic K, Seol B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet Rec.* 2011;169(5):125.
158. Pye CC, Yu AA, Weese JS. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Vet Dermatol.* 2013;24(4):446-9, e98-9.
159. Fieser L, Fieser M. Lehrbuch der organischen Chemie: Verlag Chemie, Weinheim a. d. Bergstraße; 1954.
160. AB NM. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1939 Nobelprize.org2014 [Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1939/].
161. Convention TUSP. Sulfonamides www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/sulfonamides.pdf: American Academy of Veterinary Pharmacology and Therapeutics; 2007 [
162. Limited AP. Fachinformation Flammazine(R) Creme. Rote Liste Service GmbH; 2016.
163. Modak SM, Fox Jr CL. Binding of silver sulfadiazine to the cellular components of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemical pharmacology.* 1973;22(19):2391-404.
164. Carr HS, Wlodkowski TJ, Rosenkranz HS. Silver sulfadiazine: in vitro antibacterial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 1973;4(5):585-7.
165. George N, Faoagali J, Muller M. Silvazine (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries.* 1997;23(6):493-5.

166. Gunjan K, Shobha C, Sheetal C, *et al.* A comparative study of the effect of different topical agents on burn wound infections. *Indian J Plast Surg.* 2012;45(2):374-8.
167. Pharma S. Flammazine - Fachinformation Rote Liste Service GmbH 2015.
168. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns.* 2000;26(2):117-30.
169. Fox CL, Jr. Silver sulfadiazine—a new topical therapy for pseudomonas in burns: Therapy of pseudomonas infection in burns. *Archives of Surgery.* 1968;96(2):184-8.
170. Heyneman A, Hoeksema H, Vandekerckhove D, *et al.* The role of silver sulphadiazine in the conservative treatment of partial thickness burn wounds: A systematic review. *Burns.* 2016;42(7):1377-86.
171. Kjolseth D, Frank JM, Barker JH, *et al.* Comparison of the effects of commonly used wound agents on epithelialization and neovascularization. *Journal of the American College of Surgeons.* 1994;179(3):305-12.
172. McGee DC, Gould MK. Preventing complications of central venous catheterization. *N Engl J Med.* 2003;348(12):1123-33.
173. Lorente L. Antimicrobial-impregnated catheters for the prevention of catheter-related bloodstream infections. *World J Crit Care Med.* 2016;5(2):137-42.
174. Wang H, Tong H, Liu H, *et al.* Effectiveness of antimicrobial-coated central venous catheters for preventing catheter-related blood-stream infections with the implementation of bundles: a systematic review and network meta-analysis. *Ann Intensive Care.* 2018;8(1):71.

175. Veenstra DL, Saint S, Saha S, *et al.* Efficacy of antiseptic-impregnated central venous catheters in preventing catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. *Jama*. 1999;281(3):261-7.
176. Choi YJ, Lim JK, Park JJ, *et al.* Chlorhexidine and silver sulfadiazine coating on central venous catheters is not sufficient for protection against catheter-related infection: Simulation-based laboratory research with clinical validation. *J Int Med Res*. 2017;45(3):1042-53.
177. O'Grady NP, Alexander M, Burns LA, *et al.* Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-related Infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011;52(9):e162-e93.
178. Mueller RS, Bergvall K, Bensignor E, *et al.* A review of topical therapy for skin infections with bacteria and yeast. *Vet Dermatol*. 2012;23(4):330-41, e62.
179. Marone P, Monzillo V, Perversi L, *et al.* Comparative in vitro activity of silver sulfadiazine, alone and in combination with cerium nitrate, against staphylococci and gram-negative bacteria. *J Chemother*. 1998;10(1):17-21.
180. Trott DJ, Moss SM, See AM, *et al.* Evaluation of disc diffusion and MIC testing for determining susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates to topical enrofloxacin/silver sulfadiazine. *Aust Vet J*. 2007;85(11):464-6.
181. Betbeze CM, Wu CC, Krohne SG, *et al.* In vitro fungistatic and fungicidal activities of silver sulfadiazine and natamycin on pathogenic fungi isolated from horses with keratomycosis. 2006;67(10):1788-93.
182. Vingopoulou EI, Delis GA, Batzias GC, *et al.* Prevalence and mechanisms of resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolates recovered from dogs suffering from otitis in Greece. *Veterinary Microbiology*. 2018;213:102-7.

183. Teresa Tejedor M, Martin JL, Navia M, *et al.* Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine infections. *Vet Microbiol.* 2003;94(4):295-301.
184. Hariharan H, McPhee L, Heaney S, *et al.* Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can Vet J.* 1995;36(3):166-8.
185. Seol B, Naglic T, Madic J, *et al.* *In Vitro* Antimicrobial Susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated from Dogs to Selected Antipseudomonal Agents. *Journal of Veterinary Medicine, Series B.* 2002;49(4):188-92.
186. Organization WH. WHO model list of essential medicines, 20th list (March 2017, amended August 2017). 2017.
187. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Second Informational Supplement.* CLSI document VET01-S2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
188. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Fourth Edition.* . CLSI Document VET01-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
189. Matuschek E, Brown DF, Kahlmeter GJCM, *et al.* Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. 2014;20(4):O255-O66.
190. Bayer Healthcare L. Baytril(R) Otic Fachinformation. <https://bayercvpservice.com/product/view/basic/10400102017>.
191. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas*

aeruginosa have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001;183(23):6746-51.

192. Robson DG BG, Bassett R, editor Correlation between topical antibiotic selection, *in vitro* bacterial antibiotic sensitivity and clinical response in 16 cases of canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. *North Am Vet Dermatol Forum*; 2010.

193. Feßler AT, Böttner A, Fehr M, *et al.* Mikrotiterplattenlayouts für Kleintiere, Großtiere und Mastitis.

VIII DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an

Univ.-Prof. Dr. Ralf S. Müller, meinen Doktorvater, dafür, dass ich diese Doktorarbeit bei ihm anfertigen durfte und für die Unterstützung in allen Lebenslagen. Lieber Ralf danke für deine Geduld, dein Vertrauen in mich und für alles, was Du mich gelehrt hast. Durch dich wird die Derma immer einen Platz in meinem Herzen haben.

Vielen Dank auch an Dr. med. vet. Akad. Direktor Georg Wolf, dass er mir, dem Kliniker, mit viel Muße und Geduld die mikrobiologischen Untersuchungen nähergebracht hat. Lieber Schorsch, vielen Dank für deine Unterstützung beim Studienprotokoll, für deine Hilfe beim Milligramm-genauen Einwiegen der Testsubstanzen und bei der Auswertung der Testresultate.

Danken möchte ich auch Mareike Nadler, die trotz parallelem Tagesgeschäft immer für mich da war, und sich nie aus der Ruhe bringen ließ und Andreas Lange und Eva Daldrup für Ihre Unterstützung beim Versuch.

Ein herzliches Dankeschön auch an Prof. Dr. med. vet. Ph.D. Reinhard K. Straubinger, dass er mir einen Arbeitsplatz im Labor zur Verfügung gestellt und diese Publikation mit seinem Team unterstützt hat.

Ohne das Team der Dermatologie wäre diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Dafür und noch für so viel mehr: eure Freundschaft, eure Inspiration, dafür, dass wir zusammen Tränen lachen konnten und vielen Patienten geholfen haben –Danke an Cornelia, Stefan, Janine, Flo, Mai-Rose, Chris, Susanne, Martina, Iris, Vroni, Tanja, Berret, Steffi und Theresa. Herzlichen Dank auch an Amelie, ohne die in der Derma nichts funktionieren würde

Meinen Eltern und meinen Geschwistern vielen Dank für alles, was ihr täglich für mich tut. Mami und Papi, danke, dass ihr mich zu einem wissbegierigen Menschen erzogen habt und dass ich durch euch die Möglichkeit hatte zu studieren und zu forschen. Ihr seid meine Vorbilder jeden Tag!

Danke auch an meinen Mann Ben, ohne den diese Dissertation sicher einige Kommafehler mehr hätte. Danke dass es dich gibt ohne dich wäre ich nicht dort,

wo ich jetzt bin!

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Pseudomonaden bedanken. Danke, dass ihr auch nach einigen Jahren bei -80 Grad noch so bereitwillig gewachsen seid und dass ihr mir ermöglicht habt euch genauer zu studieren. Ich werde euch fast ein wenig vermissen.