

Die Rolle gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen des Pferdes

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

¹ LABOKLIN GmbH & Co. KG, Bad Kissingen

² Klinik für kleine Haustiere, Ophthalmologie, Freie Universität Berlin

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

Schlüsselwörter: Pferd, Auge, Mikrobiologie, Konjunktiva, Cornea

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

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

Keywords: horse, eye, microbiology, conjunctiva, cornea

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

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

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

Einleitung

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

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

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

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

Material und Methoden

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

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

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

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

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

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

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

Statistische Auswertung

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

Ergebnisse

Patienten

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

Gramnegatives Keimspektrum

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

Zusammensetzung des gramnegativen Keimspektrums

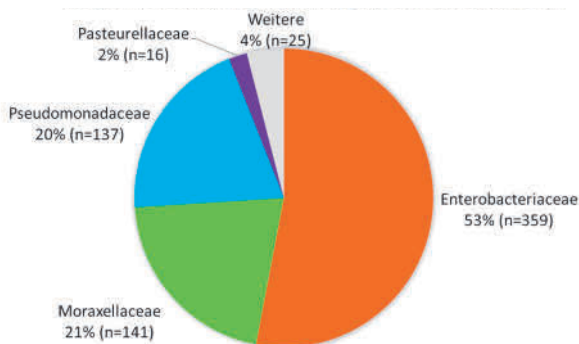


Abb. 1 Zugehörigkeit der aus Tupferproben erkrankter Pferdeaugen ($n = 844$) isolierten gramnegativen Keime ($n = 678$) zu ihren Familien. | Affiliation of the Gram-negative bacteria isolated from swab samples of diseased equine eyes ($n = 678$) to their families.

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

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

Mögliche Einflussfaktoren auf das Keimwachstum

Antibiotische Vorbehandlung

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

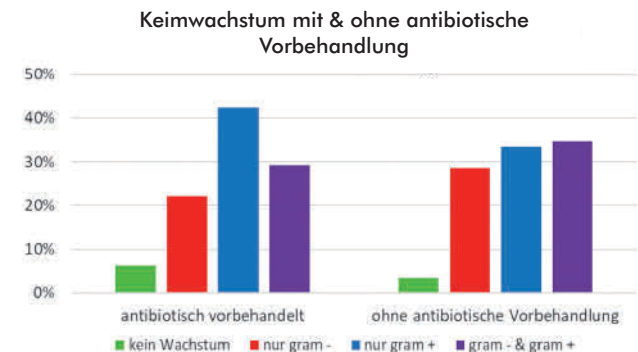


Abb. 2 Vergleich des Keimwachstums von Tupfern erkrankter Pferdeaugen, die nach erfolgter Antibiotikatherapie ($n = 113$) und zwischen Tupfern, die ohne vorausgegangene Antibiotikaapplikation ($n = 147$) entnommen worden sind. Nach antibiotischer Vorbehandlung zeigte sich bei 6,2% ($n = 7$) kein, bei 22,1% ($n = 25$) ausschließlich gramnegatives, bei 42,5% ($n = 48$) ausschließlich grampositives und bei 29,2% ($n = 33$) grampositives und -negatives Wachstum. Bei den Proben ohne Vorbehandlung wuchsen bei 3,4% ($n = 5$) keine Bakterien an. Bei 28,6% ($n = 42$) zeigte sich nur gramnegatives, bei 33,3% ($n = 49$) nur grampositives Wachstum. Eine Mischkultur aus grampositiven und gramnegativen Keimen konnte aus 34,7% ($n = 51$) der Tupfer isoliert werden. | Comparison of the bacterial growth of swabs from diseased equine eyes taken after antibiotic therapy ($n = 113$) and between swabs taken without previous antibiotic application ($n = 147$). After antibiotic pretreatment, 6.2% ($n = 7$) showed no growth, 22.1% ($n = 25$) showed exclusively Gram-negative growth, 42.5% ($n = 48$) showed exclusively Gram-positive growth, and 29.2% ($n = 33$) showed both Gram-positive and Gram-negative growth. In the samples without pretreatment, no bacteria grew in 3.4% ($n = 5$). Only Gram-negative growth was found in 28.6% ($n = 42$) and only Gram-positive growth in 33.3% ($n = 49$). A mixed culture of Gram-positive and Gram-negative bacteria could be isolated from 34.7% ($n = 51$) of the swabs.

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

Hornhautbeteiligung

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

Alter

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

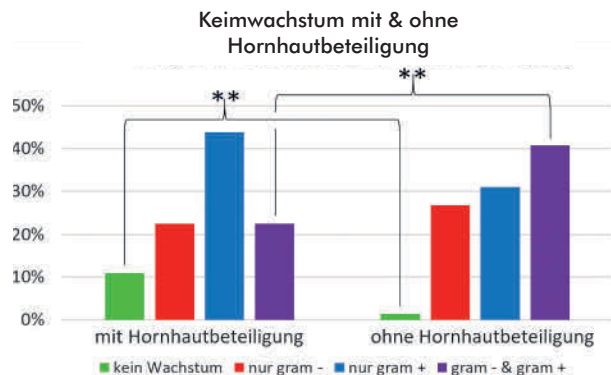


Abb. 3 Vergleich des bakteriellen Wachstums von Abstrichen erkrankter Pferdeaugen mit (n = 146) und ohne Hornhautbeteiligung (n = 142). Das Ergebnis der bakteriologischen Untersuchung war bei 11,0% (n = 16) der Tupfer von Augen mit Hornhautbeteiligung negativ. Ausschließlich gramnegative Keime konnten hier bei 22,6% (n = 33), ausschließlich grampositive bei 43,8% (n = 64) angezüchtet werden. Mischkulturen kamen bei 22,6% (n = 33) vor. Nur bei zwei Abstrichen (1,4%) von erkrankten Augen ohne Hornhautbeteiligung blieb ein bakterielles Wachstum aus. Weiterhin ließen sich bei 26,8% (n = 44) nur gramnegative und bei 31,0% (n = 44) nur grampositive Keime nachweisen. Bei 40,8% (n = 38) wuchsen Keime beider Gruppen. | Comparison of bacterial growth of swabs from diseased equine eyes with (n = 146) and without corneal involvement (n = 142). The result of the bacteriological examination was negative in 11.0% (n = 16) of the swabs from eyes with corneal involvement. Exclusively Gram-negative bacteria could be cultured in 22.6% (n = 33), exclusively Gram-positive in 43.8% (n = 64). Mixed cultures occurred in 22.6% (n = 33). Bacterial growth was absent in only two swabs (1.4%) from diseased eyes without corneal involvement. Furthermore, in 26.8% (n = 44) only Gram-negative and in 31.0% (n = 44) only Gram-positive bacteria could be detected. Bacteria from both groups grew in 40.8% (n = 38).

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

Vorkommen von Moraxella bovoculi im Wechsel der Jahreszeiten

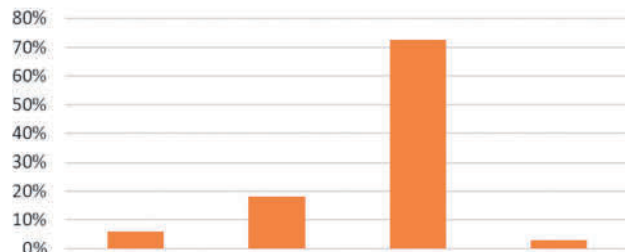


Abb. 4 73% (n = 24) aller aus erkrankten Pferdeaugen angezüchteten Moraxella bovoculi stammten aus Tupfern, die im Herbst entnommen worden sind. 18% (n = 6) waren es im Sommer – im Frühling nur 6% (n = 2) und im Winter nur noch 3% (n = 1). | 73% (n = 24) of all Moraxella bovoculi isolates cultured from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

Resistenzen mit & ohne Vorbehandlung

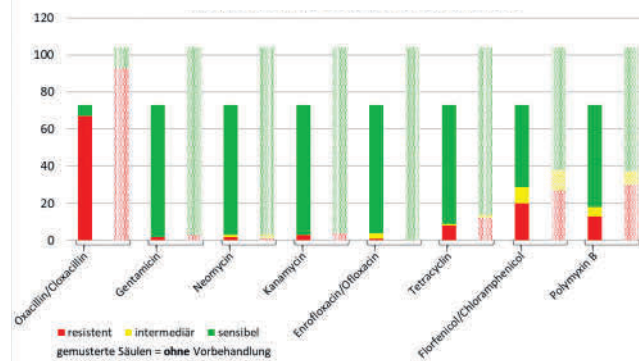


Abb. 5 Gefüllte Säulen: In-vitro Wirksamkeit einiger Antibiotika bei antibiotisch vorbehandelten Isolaten der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae und Moraxellaceae (n = 73) in absoluten Zahlen. Anteil sensibler Isolate: Oxacillin 8,2% (n = 6); Gentamicin 97,3% (n = 71); Neomycin 95,9% (n = 70); Kanamycin 95,9% (n = 70); Enrofloxacin 94,5% (n = 69); Tetracyclin 87,7% (n = 64); Florfenicol 60,3% (n = 44); Polymyxin B 75,3% (n = 55). Gemusterte Säulen: In-vitro Wirksamkeit einiger Antibiotika bei nicht-vorbehandelten Isolaten der Familien Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae und Moraxellaceae (n = 104) in absoluten Zahlen. Anteil sensibler Isolate: Oxacillin 10,6% (n = 11); Gentamicin 97,1% (n = 101); Neomycin 97,1% (n = 101); Kanamycin 96,2% (n = 100); Enrofloxacin 100% (n = 104); Tetracyclin 86,5% (n = 90); Florfenicol 63,5% (n = 66); Polymyxin B 64,4% (n = 67). | Filled columns: In vitro efficacy of some antibiotics in antibiotic-pretreated isolates of the families Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Moraxellaceae (n = 73). Percentage of sensitive isolates: oxacillin 8.2% (n = 6); gentamicin 97.3% (n = 71); neomycin 95.9% (n = 70); kanamycin 95.9% (n = 70); enrofloxacin 94.5% (n = 69); tetracycline 87.7% (n = 64); florfenicol 60.3% (n = 44); polymyxin B 75.3% (n = 55). Patterned columns: In vitro efficacy of some antibiotics in non-pretreated isolates of the families Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Moraxellaceae (n = 104). Percentage of sensitive isolates: oxacillin 10.6% (n = 11); gentamicin 97.1% (n = 101); neomycin 97.1% (n = 101); kanamycin 96.2% (n = 100); enrofloxacin 100% (n = 104); tetracycline 86.5% (n = 90); florfenicol 63.5% (n = 66); polymyxin B 64.4% (n = 67).

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

Vorkommen von *Moraxella bovoculi* im jahreszeitlichen Verlauf

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

Resistenzlage der gramnegativen Keime ohne und mit lokaler antibiotischer Vorbehandlung

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

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

Diskussion

Pantoea

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

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

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

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

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

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

Pseudomonas

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

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

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

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

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

Acinetobacter

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

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

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

Escherichia

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

Moraxella

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

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

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

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

* Das Resistenzverhalten gegenüber Gramicidin wurde nicht getestet

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

Resistenzentwicklungen gegenüber den eingesetzten Antibiotika waren nicht zu beobachten.

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

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

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

Auswirkungen antibiotischer Vorbehandlung auf das Keimwachstum

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

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

Vorkommen gramnegativer Keime bei infektiösen Augenerkrankungen mit Hornhautbeteiligung

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

Einfluss des Pferdealters auf das Keimwachstum

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

Resistenzlage nicht vorbehandelter versus Resistenzlage antibiotisch lokal vorbehandelter Keime

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Interessenkonflikt

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

Literatur

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

- Gemensky-Metzler A. J., Wilkie D. A., Kowalski J. J., Schmall L. M., Willis A. M., Yamagata M. (2005) Changes in bacterial and fungal ocular flora of clinically normal horses following experimental application of topical antimicrobial or antimicrobial-corticosteroid ophthalmic preparations. *Am. J. Vet. Res.* 66, 800–811
- Hampson E., Gibson J. S., Barot M., Shapter F. M., Greer R. M. (2018) Identification of bacteria and fungi sampled from the conjunctival surface of normal horses in South-East Queensland, Australia. *Vet. Ophthalmol.* 22, 265–275; DOI 10.1111/vop.12587
- Heesemann J. (2001) Die Familie der Enterobacteriaceae Medizinische Mikrobiologie (8 Aufl., S. 303–304). München: Urban & Fischer
- Henker L. C., Lorenzett M. P., Keller A., Siqueira F. M., Driemeier D., Pavarini S. P. (2020) Fibrinonecrotic placentitis and abortion associated with *Pantoea agglomerans* infection in a mare. *J. Equine. Vet. Sci.* 92, 103–156; DOI 10.1016/j.jevs.2020.103156
- Hong C. B., Donahue J. M., Giles R. C. Jr., Petrites-Murphy M. B., Poonacha K. B., Roberts A. W., Smith B. J., Tramontin R. R., Tuttle P. A., Swerczek T. W. (1993) Etiology and pathology of equine placentitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 5, 56–63; DOI 10.1177/104063879300500113
- Hughes D. E., Pugh G. W. Jr. (1970) Isolation and description of a *Moraxella* from horses with conjunctivitis. *Am. J. Vet. Res.* 31, 457–462
- Huntington P. J., Coloe P. J., Bryden J. D., Macdonald F. (1987) Isolation of a *Moraxella* sp from horses with conjunctivitis. *Aust. Vet. J.* 64, 118–119; DOI 10.1111/j.1751-0813.1987.tb09647.x
- Johns I. C., Baxter K., Booler H., Hicks C., Menzies-Gow N. (2011) Conjunctival bacterial and fungal flora in healthy horses in the UK. *Vet. Ophthalmol.* 14, 195–199; DOI 10.1111/j.1463-5224.2010.00867.x
- Keller R. L., Hendrix D. V. (2005) Bacterial isolates and antimicrobial susceptibilities in equine bacterial ulcerative keratitis (1993–2004). *Equine. Vet. J.* 37 (207–211); DOI 10.2746/0425164054530731
- Liu H., Yan J., Wang Y., Yan Q., Zhao L., Yan R., He H. (2014) Isolation of *Moraxella bovoculi* from racehorses with keratoconjunctivitis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 585–587; DOI 10.1177/1040638714535601
- Loy J. D., Brodersen B. W. (2014) *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 761–768; DOI 10.1177/1040638714551403
- McLaughlin S. A., Brightman A. H., Helper L. C., Manning J. P., Tomes J. E. (1983) Pathogenic bacteria and fungi associated with extraocular disease in the horse. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 241–242
- Miller D. (2017) Update on the epidemiology and antibiotic resistance of ocular infections. *Middle East Afr. J. Ophthalmol.* 24, 30–42; DOI 10.4103/meajo.MEAJO_276_16
- Moore C. P., Collins B. K., Fales W. H. (1995) Antibacterial susceptibility patterns for microbial isolates associated with infectious keratitis in horses: 63 cases (1986–1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 928–933
- Moore C. P., Fales W. H., Whittington P., Bauer L. (1983) Bacterial and fungal isolates from Equidae with ulcerative keratitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 182, 600–603
- Moore C. P., Heller N., Majors L. J., Whitley R. D., Burgess E. C., Weber J. (1988) Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. *Am. J. Vet. Res.* 49, 773–777
- Mustikka M. P., Grönthal T. S. C., Pietilä E. M. (2020) Equine infectious keratitis in Finland: Associated microbial isolates and susceptibility profiles. *Vet. Ophthalmol.* 23, 148–159; DOI 10.1111/vop.12701
- RobertKoch-Institut (2020) *Acinetobacter*spp. Abgerufen am 19.12.2021, 2021. Verfügbar unter https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/ThemenAZ/A/Info_Acinetobacter.html
- Sandmeyer L. S., Bauer B. S., Mohaghegh Poor S. M., Feng C. X., Chirino-Trejo M. (2017) Alterations in conjunctival bacteria and antimicrobial susceptibility during topical administration of ofloxacin after cataract surgery in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 78, 207–214; DOI 10.2460/ajvr.78.2.207
- Sauer P., Andrew S. E., Lassaline M., Gelatt K. N., Denis H. M. (2003) Changes in antibiotic resistance in equine bacterial ulcerative keratitis (1991–2000): 65 horses. *Vet. Ophthalmol.* 6, 309–313; DOI 10.1111/j.1463-5224.2003.00312.x
- Schieder A.-K., Müller E., Heusinger A., Eule J. C. (2021). Studie zur aktuellen Resistenzlage der okulären Mikroflora des Pferdes – Geeignete Antibiotika zur Erstversorgung bei Konjunktivitis und Keratitis des Pferdes. *Pferdeheilkunde* 37, 292–301; DOI 10.21836/PEM20210311
- Schoch C., Ciuffo S., Domrachev M., Hotton C. L., Kannan S., Khovanskaya R., Leipe D., McVeigh R., O'Neill K., Robbertse B., Sharma S., Soussov V., Sullivan J. P., Sum L., Turner S., Karsch-Mizrachi I. (2020) NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford). Abgerufen am 08.12.2021, 2021. Verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=info&id=549>
- Scott E. M., Arnold C., Dowell S., Suchodolski J. S. (2019) Evaluation of the bacterial ocular surface microbiome in clinically normal horses before and after treatment with topical neomycin-polymyxin-bacitracin. *PLoS One* 14, e0214877; DOI 10.1371/journal.pone.0214877
- Seeger M. G., Corrêa L. F. D., Clothier K. A., Loy J. D., Cargnelutti J. F. (2021) Isolation of *Moraxella* spp. from horses with conjunctivitis in Southern Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 52, 1643–1648; DOI 10.1007/s42770-021-00507-1
- Songer J. G., Post K. W. (2005) The genera *Moraxella* and *Neisseria* Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease. Elsevier Saunders, 169–173
- Songer J. G., Post K. W. (2005) The genera *Pseudomonas* and *Burkholderia* in: Veterinary Microbiology. Bacterial and fungal agents of animal disease. Elsevier Saunders, 154–162
- Sudhalkar A., Majji A. B., Chhablani J., Manderwad G. (2014) *Pantoea agglomerans* endophthalmitis: clinical features and outcomes. *Retina* 34, 1702–1706; DOI 10.1097/iae.0000000000000127
- Sweeney C. R., Irby N. L. (1996) Topical treatment of *Pseudomonas* sp-infected corneal ulcers in horses: 70 cases (1977–1994). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 209, 954–957
- van der Kolk J. H., Endimiani A., Graubner C., Gerber V., Perreten V. (2019) *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16, 59–71; DOI 10.1016/j.jgar.2018.08.011
- Venincasa V. D., Kuriyan A. E., Flynn H. W. Jr., Sridhar J., Miller D. (2015) Endophthalmitis caused by *Pantoea agglomerans*: clinical features, antibiotic sensitivities, and outcomes. *Clin. Ophthalmol.* 9, 1203–1207; DOI 10.21147/ophth.S80748
- Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung Toxikologie und Arzneimittelrecht Universität Leipzig (2022). VETIDATA. Abgerufen am 27.11.2022. Verfügbar unter <https://vetidata.de/public/search/paeparat.php?params=113,74,65,74,139,131,74,70,74,50,131,117,113,130,115,120,50,75,131,74,65,74,50,65,50,75,141>
- Walterson A. M., Stavrinos J. (2015) *Pantoea*: insights into a highly versatile and diverse genus within the Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 968–984; DOI 10.1093/femsre/fuv027
- Zak A., Siwinska N., Slowikowska M., Borowicz H., Ploneczka-Janeczko K., Chorbinski P., Niedzwiedz A. (2018) Conjunctival aerobic bacterial flora in healthy Silesian foals and adult horses in Poland. *BMC Vet. Res.* 14, 261; DOI 10.1186/s12917-018-1598-6
- Zheng W., Porter E., Noll L., Stoy C., Lu N., Wang Y., Liu X., Purvis T., Peddireddi L., Lubbers B., Hanzlicek G., Henningson J., Liu Z., Bai J. (2019) A multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of five bovine pinkeye pathogens. *J. Microbiol. Methods.* 160, 87–92; DOI 10.1016/j.mimet.2019.03.024
- Zubrod C. J., Farnsworth K. D., Oaks J. L. (2004) Evaluation of arthrocentesis site bacterial flora before and after 4 methods of preparation in horses with and without evidence of skin contamination. *Vet. Surg.* 33, 525–530; DOI 10.1111/j.1532-950X.2004.04074.x