

**Vorkommen von Bakterien im unteren  
Respirationstrakt und deren  
Antibiotikaresistenz bei Hunden mit  
respiratorischen Symptomen**

von Markus Rafael Rheinwald

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

**Vorkommen von Bakterien im unteren Respirationstrakt  
und deren Antibiotikaresistenz  
bei Hunden mit respiratorischen Symptomen**

von Markus Rafael Rheinwald

aus Passau

München 2015

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

Lehrstuhl für Innere Medizin der kleinen Haustiere und Heimtiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

Mitbetreuung durch Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. Bianka Schulz

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

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin

**Tag der Promotion: 18. Juli 2015**

*Meiner Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Sekundäre bakterielle Infektionen der Atemwege beim Hund.....</b>	<b>2</b>
1.1.	Prädisponierende Faktoren .....	2
1.2.	Physiologische Mikroflora .....	5
1.3.	Opportunistische Bakterien .....	6
1.3.1.	Grampositive Spezies .....	7
1.3.1.1.	Streptokokken.....	7
1.3.1.2.	Staphylokokken .....	8
1.3.2.	Gramnegative Spezies .....	9
1.3.2.1.	Enterobakterien .....	9
1.3.2.2.	Pseudomonaden.....	10
1.3.2.3.	Pasteurellen .....	11
<b>2.</b>	<b>Diagnostik bakterieller Atemwegsinfektionen.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Probenentnahme aus den unteren Atemwegen.....	12
2.2.	Zytologische Diagnostik .....	15
2.3.	Mikrobiologische Diagnostik .....	16
2.3.1.	Erregerkultivierung .....	16
2.3.2.	Resistenztests .....	18
2.3.2.1.	Agardiffusionstest .....	19
2.3.2.2.	Mikrodilutionsmethode .....	20
<b>3.</b>	<b>Antibiotische Therapie bakterieller Atemwegsinfektionen.....</b>	<b>22</b>
3.1.	Antibiotische Wirkstoffe .....	25
3.1.1.	Tetrazykline und Chloramphenicol .....	26
3.1.2.	Beta-Laktam-Antibiotika .....	27
3.1.3.	Aminoglykoside .....	29
3.1.4.	Fluorchinolone .....	30
3.1.5.	Folsäurehemmer .....	31
3.2.	Allgemeine antibiotische Therapieempfehlungen.....	32
3.3.	Resistenzproblematik .....	34
<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>38</b>

---

<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>45</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>65</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>67</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>88</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
<i>B. bronchiseptica</i>	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit
BfT	Bundesverband für Tiergesundheit
CFU	koloniebildende Einheiten
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	Extended-Spektrum Beta-Laktamase
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
g	Gramm
GERM-Vet	Nationales Resistenzmonitoring für tierpathogene Bakterien
HHD	Hemmhofdurchmesser
ISCAID	International Society for Companion Animal Infectious Diseases
MHK	minimale Hemmkonzentration
ml	Milliliter
MRSP	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>P. multocida</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. zooepidemicus</i>	<i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>zooepidemicus</i>
spp.	<i>species pluralis</i> (mehrere Spezies einer Gattung)
WHO	World Health Organisation
z. B.	zum Beispiel



## I. EINLEITUNG

Infektionen der unteren Atemwege beim Hund stellen einen häufigen Vorstellungsgrund in der tierärztlichen Praxis dar. Neben primär pathogenen bakteriellen Erregern wie *Bordetella bronchiseptica* und *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (VIESON et al., 2012), kann eine Vielzahl an grampositiven und gramnegativen Bakterienspezies an Infektionen beteiligt sein (THAYER & ROBINSON, 1984; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; JOHNSON et al., 2013). Derartige opportunistische Infektionen werden durch verschiedene infektiöse und nicht-infektiöse prädisponierende Faktoren begünstigt (COHN & REINERO, 2007; VIESON et al., 2012).

Die adäquate Bekämpfung der bakteriellen Infektionen stellt einen wichtigen Teil der Therapie dar (VIESON et al., 2012; DEAR, 2014). Aus diesem Grund ist es von großer Bedeutung, die beteiligten Bakterienspezies zu identifizieren und antimikrobielle Therapeutika einzusetzen, die gegenüber den vorhandenen bakteriellen Erregern wirksam sind (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995). In Fällen jedoch, in denen eine Erregerkultivierung und antimikrobielle Sensibilitätsprüfung nicht durchgeführt werden kann oder für die initiale Therapie bis zum Vorliegen der mikrobiologischen Untersuchungsergebnisse, muss die Auswahl eines antibiotischen Wirkstoffes auf der Grundlage von empirischen Daten zur Bakterienprävalenz und antibiotischen Resistenzsituation erfolgen (EPSTEIN et al., 2010; DEAR, 2014; PROULX et al., 2014).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Vorkommen von Bakterien sowie deren Resistenzverhalten gegenüber gängigen antibiotischen Wirkstoffen bei einer großen Anzahl von Hunden mit Atemwegserkrankungen zu untersuchen. Hierzu wurden die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen und Agardiffusionstests von 502 Proben aus den unteren Atemwegen von Hunden mit respiratorischen Symptomen retrospektiv ausgewertet. Anhand der Ergebnisse sollten Erkenntnisse gewonnen werden, welche antibiotischen Wirkstoffe zur empirischen Therapie von bakteriellen Infektionen des caninen Respirationstrakts eingesetzt werden können.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Sekundäre bakterielle Infektionen der Atemwege beim Hund**

Bakterielle Infektionen der unteren Atemwege sind eine der häufigsten klinischen Diagnosen bei akuten oder chronischen Atemwegserkrankungen von Hunden (EPSTEIN et al., 2010; DEAR, 2014). Einerseits werden diese bakteriellen Infektionen bei Hunden durch Primärpathogene wie *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*), *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) und Mykoplasmen verursacht. Zum anderen ist häufig eine große Zahl an opportunistischen Bakterien beteiligt (COHN & REINERO, 2007; VIESON et al., 2012).

#### **1.1. Prädisponierende Faktoren**

Eine Vielzahl prädisponierender Faktoren kann eine bakterielle Infektion mit opportunistischen Keimen begünstigen. Derartige Sekundärinfektionen können auftreten, wenn in Folge einer Primärerkrankung die lokale oder systemische Infektionsabwehr beeinträchtigt ist (JAMESON et al., 1995; COHN & REINERO, 2007). Eine erworbene allgemeine Immunsuppression aufgrund einer schwerwiegenden Grunderkrankung (zum Beispiel (z. B.) Diabetes mellitus, Hyperadrenokortizismus, systemische Tumorerkrankung) oder aufgrund von immunsuppressiver medikamentöser Therapie (z. B. in Folge von immunmedierten Erkrankungen oder Chemotherapie) kann bakterielle Sekundärinfektionen ebenso begünstigen wie kongenitale immunologische Defekte (OLSEN, 2000; COHN & REINERO, 2007; DEAR, 2014). Aus diesem Grund sind häufig junge Tiere mit naivem Immunsystem oder geriatrische Patienten von bakteriellen Sekundärinfektionen betroffen (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; RADHAKRISHNAN et al., 2007; DEAR, 2014). Die lokalen Abwehrmechanismen der Atemwege können ebenfalls durch kongenitale oder erworbene Anomalien (z. B. ziliäre Dyskinesie, Bronchiektasie), primär nicht infektiöse Entzündungszustände (z. B. chronische Bronchitis, eosinophile Bronchopneumopathie, Inhalation von Schadgasen), parasitäre oder mykotische Infektionen des Respirationstrakts und neoplastische Erkrankungen (z. B. primäre Tumore der Atemwege oder Lungenmetastasen)

derart beeinträchtigt sein, dass es zu Sekundärinfektionen mit opportunistischen Keimen kommt (OLSEN, 2000; COHN & REINERO, 2007).

Besonders häufig treten bakterielle Sekundärinfektionen im Rahmen von Pneumonien auf, welche durch bakterielle oder virale Primärerreger (z. B. canines Staupevirus, bakterielle oder virale Pathogene aus dem Zwingerhustenkomplex, canines Influenzavirus, canines respiratorisches Coronavirus, *B. bronchiseptica* und andere) verursacht werden (BUONAVOGLIA & MARTELLA, 2007; RADHAKRISHNAN et al., 2007; FORD, 2012; PRIESTNALL et al., 2014). Hervorzuheben ist hierbei die Bedeutung von durch Kontakt erworbenen Pneumonien (community-acquired pneumonia) bei Junghunden, häufig hervorgerufen durch *B. bronchiseptica* in Verbindung mit verschiedenen bakteriellen Sekundärerregern (RADHAKRISHNAN et al., 2007; PROULX et al., 2014). Insbesondere Faktoren, die zu einer verminderten mukoziliären Clearance führen, prädisponieren für eine bakterielle Besiedelung der Atemwege (OLSEN, 2000; RANDELL & BOUCHER, 2006). So ist *B. bronchiseptica* mittels Adhäsinen in der Lage, sich auf dem respiratorischen Flimmerepithel festzusetzen und durch verschiedene Exotoxine den Untergang von Epithelzellen und eine Ziliostase herbeizuführen, was zu einer erworbenen sekundären ziliären Dyskinesie führt (KEIL & FENWICK, 1998; OLSEN, 2000; DATZ, 2003b; ANDERTON et al., 2004; COHN & REINERO, 2007). Durch die Störung der lokalen Abwehrmechanismen fungiert es als Wegbereiter für opportunistische Pathogene (COHN & REINERO, 2007; FORD, 2012).

Des Weiteren sind bakterielle Sekundärinfektionen eine häufige Komplikation bei Aspirationspneumonien, die entstehen, wenn Magensäure und/oder Ingesta in die Atemwege inhaliert werden (BARTON, 2004; TART et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012a; DEAR, 2014). Eine Aspiration kann als Folge einer Reihe von gastrointestinalen, ösophagealen oder neurologischen Grunderkrankungen entstehen, beispielsweise bei Patienten mit angeborenem oder erworbenem Megaösophagus (z. B. im Zusammenhang mit Myasthenia gravis), bei Patienten mit chronischem Erbrechen oder Regurgitieren, bei laryngealer oder pharyngealer Dysfunktion (z. B. Larynxparalyse) oder in Verbindung mit Anästhesie, Bewusstlosigkeit und Seitenlage (BARTON, 2004; KOGAN et al., 2008; TART et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012a; DEAR, 2014; PROULX et al., 2014). Eine Aspirationspneumonie entwickelt sich klassischerweise in drei

Phasen: Zunächst kommt es unmittelbar nach Aspiration zu einem Gewebeschaden durch saures oder irritierendes Material. Entzündungsmediatoren und Zytokine werden ausgeschüttet und bewirken den Untergang von Alveolarzellen, bronchiale Konstriktion, pulmonäre Hämorrhagie, erhöhte Schleimproduktion sowie vermehrte vaskuläre Permeabilität mit Austritt von Proteinen ins Lungenparenchym. Die Folge ist ein Lungenödem, alveolärer Kollaps und Atelektase. Im weiteren Verlauf infiltrieren neutrophile Granulozyten die Alveolen und das pulmonäre Interstitium. Es kommt zum fortgesetzten Austritt von Proteinen, einer Erweiterung des Lungenödems und zur Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen. Erst in der letzten Phase entsteht durch bakterielle Besiedelung der Atemwege und des Lungenparenchyms mit opportunistischen Keimen einschließlich anaerober Bakterien aus einem massiven Entzündungsgeschehen (chemische Pneumonitis) eine bakterielle Pneumonie oder Bronchopneumonie (BOOTHE, 1990; BARTON, 2004; SCHULZE & RAHILLY, 2012a).

Bronchiale Fremdkörper sind ebenfalls häufig mit fokalen bakteriellen Pneumonien vergesellschaftet (DEAR, 2014). In vielen Fällen handelt es sich bei dem Fremdmaterial um inhalierte Ähren von Getreidepflanzen oder Grannen von Gräsern, aber auch anorganisches Material ist möglich (BROWNLIE, 1990; VOLTA et al., 2007; TENWOLDE et al., 2010). Bronchiale Fremdkörper finden sich in der Mehrzahl der Fälle im rechten Stammbronchus oder seinen segmentalen Aufzweigungen (BROWNLIE, 1990; TENWOLDE et al., 2010; CERQUETELLA et al., 2013), obgleich auch andere Lokalisationen möglich sind (SCHULTZ & ZWINGENBERGER, 2008). Im besonderen Maße ist für die weitere Diagnostik und Therapie zu berücksichtigen, dass hierbei nicht selten anaerobe Infektionserreger beteiligt sind (TENWOLDE et al., 2010).

Einen Sonderfall stellen Ventilations-assoziierte Pneumonien bei Patienten dar, die einer andauernden Beatmung bedürfen (CLARE & HOPPER, 2005). Infolge der anhaltenden Intubation werden unter anderem die physiologischen Schutzmechanismen der oberen Atemwege umgangen, und es kann bei diesen kritisch kranken Patienten zu bakteriellen Sekundärinfektionen kommen (COHN & REINERO, 2007; EPSTEIN et al., 2010; DEAR, 2014). Derartige nosokomiale Pneumonien sind in der Humanmedizin mit einer erhöhten Mortalität assoziiert (CRAVEN & HJALMARSON, 2010). Mit zunehmender Anwendung der

mechanischen Ventilation in der Veterinärmedizin ist eine ansteigende Inzidenz von Ventilations-assoziierten Pneumonien künftig auch bei Tieren zu erwarten (LEE et al., 2005; HOPPER et al., 2007).

## 1.2. Physiologische Mikroflora

Entgegen früherer Annahmen sind die unteren Atemwege auch bei gesunden Hunden keinesfalls als steril anzusehen (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; LINDSEY & PIERCE, 1978). Eine Reihe von Untersuchungen konnte zeigen, dass auch bei klinisch gesunden Tieren häufig bakterielle Keime in den unteren Atemwegen nachgewiesen werden können. BAUER und Mitarbeiter (2003) verglichen das Keimspektrum von oberem und unterem Respirationstrakt bei 43 gesunden adulten Hunden. In 44 % der bakteriologischen Untersuchungen aus Bronchoalveolarlavage-Flüssigkeit (BALF) konnte ein Keimwachstum nachgewiesen werden, wobei es sich meist um Streptokokken, Staphylokokken oder Enterobakterien handelte. Bemerkenswert erscheint zudem, dass sich bei nahezu 70 % der Tiere die isolierten Bakterien aus den oberen und unteren Atemwegen vollständig unterschieden (BAUER et al., 2003). In einer älteren Studie wurden bei 33 gesunden Hunden Tupferproben aus dem Pharynx und der unteren Trachea bakteriologisch miteinander verglichen (MCKIERNAN et al., 1984). Auch hierbei konnte bei 36 % (12/33) der trachealen Proben ein bakterielles Wachstum nachgewiesen werden. Dabei handelte es sich um Bakterien der Gattungen *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Klebsiella* und *Corynebacterium*. In dieser Untersuchung war in 80 % (8/10) der Fälle, in denen aus beiden Lokalisationen Bakterien kultiviert werden konnten, das isolierte Bakterienspektrum aus oberen und unteren Atemwegen übereinstimmend. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass bei Hunden eine wiederkehrende Aspiration oder Inhalation von Bakterien aus dem oropharyngealen Raum in die unteren Atemwege stattfinden kann (MCKIERNAN et al., 1984). PECORA (1976) zeigte bei Transplantationsexperimenten an gesunden Hunden unterschiedlichen Alters ebenfalls, dass in vielen Fällen Keime in Lungenpunktaten, Lungenbiopsien und transtrachealen Aspiraten nachgewiesen werden konnten. Allerdings waren die Untersuchungsergebnisse bei den unterschiedlichen Methoden zur Probengewinnung nicht immer übereinstimmend. Neben klassischen opportunistischen Bakterien konnten auch *B. bronchiseptica*, Clostridien und Pilze isoliert werden (PECORA, 1976).

Obwohl *B. bronchiseptica* traditionell als primär pathogener Erreger im Rahmen von respiratorischen Erkrankungen bei Hunden angesehen wird, wurde das Bakterium in verschiedenen Studien auch bei klinisch unauffälligen Hunden nachgewiesen (CHALKER et al., 2003; SCHULZ et al., 2014). Dies lässt annehmen, dass eine Kolonisation der Atemwege klinisch gesunder Hunde mit *B. bronchiseptica* vorkommen kann und diese Hunde eine mögliche Infektionsquelle für andere Tiere darstellen könnten (SCHULZ et al., 2014). Hinzu kommt, dass dieser Erreger bei Hunden auch nach einer überstandenen Infektion mehrere Wochen in den Atemwegen persistieren kann, während die klinischen Symptome bereits abgeklungen sind (BEMIS et al., 1977).

LINDSEY und PIERCE (1978) untersuchten eine große Anzahl an Gewebeproben von Lungenparenchym und tiefen Trachealabschnitten von klinisch gesunden Hunden. Auch hierbei zeigte sich, dass eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien mikrobiologisch nachgewiesen werden konnte. In jeweils über 70 % stimmten die isolierten Bakterienspezies aus Lunge und Trachea mit denen aus Rachentupfern der entsprechenden Hunde überein. Histologische Untersuchungen der Lungengewebeproben zeigten hingegen keine ausgeprägten Entzündungsanzeichen, und bakteriologische Blutkulturen waren steril (LINDSEY & PIERCE, 1978). Die Ergebnisse der verschiedenen Studien legen nahe, dass auch bei gesunden Hunden eine bakterielle Besiedelung der unteren Atemwege vorkommen kann, mutmaßlich verursacht durch wiederkehrende geringfügige Aspiration oropharyngealer Keime und/oder Kontamination aus den oberen Atemwegen (LINDSEY & PIERCE, 1978; MCKIERNAN et al., 1984; PEETERS et al., 2000).

### 1.3. Opportunistische Bakterien

Als opportunistische Sekundärerreger der unteren Atemwege von Hunden kommen verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien in Betracht. Häufig werden polymikrobielle Infektionen mit mehr als einer Bakterienspezies beschrieben (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; TENWOLDE et al., 2010; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014). Unter adäquaten Bedingungen können opportunistische Keime und Vertreter der physiologisch vorhanden Mikroflora auf aerogenem Weg durch Inhalation aus den oberen Atemwegen, durch oropharyngeale oder gastroösophageale Aspiration, seltener auch durch

hämatogene Streuung die unteren Atemwege und das Lungenparenchym infizieren (COHN & REINERO, 2007; EPSTEIN et al., 2010; VIESON et al., 2012). Im Folgenden werden die am häufigsten beschriebenen Bakterienspezies aufgeführt.

### 1.3.1. Grampositive Spezies

Im Zusammenhang mit caninen Atemwegserkrankungen werden häufig grampositive Sekundärkeime isoliert. In der überwiegenden Mehrzahl handelt es sich hierbei um grampositive Kokken der Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; HARPSTER, 1981; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Andere grampositive Bakterien werden gelegentlich, wenn auch deutlich seltener, isoliert. Hierzu zählen coryneforme Bakterien (HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; JOHNSON et al., 2013) und Enterokokken (HARPSTER, 1981; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014) sowie *Actinomyces* spp. (ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; TENWOLDE et al., 2010; JOHNSON et al., 2013). Im Zusammenhang mit bronchialen Fremdkörpern und Aspirationspneumonien wurden neben gramnegativen Bakterien häufig *Streptococcus* spp. und *Staphylococcus* spp. nachgewiesen (TART et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012a; PROULX et al., 2014).

#### 1.3.1.1. Streptokokken

Bei Streptokokken handelt es sich um eine große heterogene Gruppe von grampositiven Kokken, die sowohl als Kommensalen als auch als potentielle Pathogene unter anderem die Haut und Schleimhaut von Menschen und Tieren besiedeln. Einige Vertreter treten auch als Krankheitserreger und Eitererreger in Erscheinung (CARTER & WISE, 2004). Streptokokken können auch in den Atemwegen gesunder Hunde nachgewiesen werden. Sowohl in den oberen Atemwegen als auch in BALF-Proben konnten in einer Studie bei klinisch gesunden Hunden alpha-hämolysierende Streptokokken nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden aus der Trachea auch beta- und anhämolysierende

Streptokokken isoliert (BAUER et al., 2003). Alpha- und beta-hämolyisierende Streptokokken wurden auch in transtrachealen Aspiraten gesunder Hunde detektiert (PECORA, 1976). Auch MCKIERNAN und Mitarbeiter (1984) wiesen in tiefen trachealen Abstrichen gesunder Hunde alpha- und anhämolyisierende Streptokokken nach.

Bei respiratorisch kranken Hunden wurden Streptokokken in verschiedenen Studien ebenfalls häufig (bis zu 30 % der Isolate) isoliert (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; JOHNSON & FALES, 2001; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014). Zur Gattung *Streptococcus* zählt neben opportunistischen Spezies auch *S. zooepidemicus*. Dieser hochpathogene Erreger kann bei Hunden schwere hämorrhagische Pneumonien hervorrufen, die mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen (PRIESTNALL & ERLES, 2011).

### 1.3.1.2. Staphylokokken

Grampositive Kokken der Gattung *Staphylococcus* besiedeln ebenfalls als Kommensalen Haut und Schleimhäute bei Tieren und Menschen, stellen allerdings auch potentiell pathogene Eitererreger dar (CARTER & WISE, 2004; BOND & LOEFFLER, 2012). BAUER und Mitarbeiter (2003) konnten Staphylokokken im Respirationstrakt von gesunden Hunden nachweisen. Aus Trachealtupfern konnten Vertreter der Spezies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus intermedius* isoliert werden. Vertreter der beiden letztgenannten Spezies konnten auch aus den BALF-Proben der untersuchten Hunde kultiviert werden (BAUER et al., 2003). *S. aureus* wurde ebenfalls in steril entnommenen Lungenbiopsaten von gesunden Versuchshunden nachgewiesen (LINDSEY & PIERCE, 1978). In transtrachealen Aspiraten und tiefen trachealen Tupferproben von klinisch unauffälligen Hunden fanden sich ebenso koagulasepositive und -negative Staphylokokken (PECORA, 1976; MCKIERNAN et al., 1984). Auch bei Hunden mit Infektionen der unteren Atemwege wurden in vielen Studien Staphylokokken aus respiratorischen Proben isoliert (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992; JAMESON et al., 1995; ANGUS et



al., 1997; PEETERS et al., 2000; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014). Von besonderer Bedeutung in dieser Bakteriengattung sind Isolate mit ausgeprägtem Resistenzverhalten, insbesondere Methicillin-resistente Stämme von *Staphylococcus (pseud)intermedius* und *S. aureus* (CLARKE, 2006; WEESE & VAN DUIJKEREN, 2010; VAN DUIJKEREN et al., 2011; BOND & LOEFFLER, 2012; PAPICH, 2013a, 2013b).

### 1.3.2. Gramnegative Spezies

An den meisten Fällen von bakteriellen Sekundärinfektionen des caninen Respirationstrakts sind gramnegative Stäbchenbakterien beteiligt. Diese überwiegen in der Regel prozentual die Isolate von grampositiven Spezies, obgleich Mischinfektionen häufig sind (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; THAYER & ROBINSON, 1984; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014). Die isolierten Spezies stammen hauptsächlich aus den Familien *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* oder *Pasteurellaceae* (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014). Deutlich seltener isoliert werden *Acinetobacter* spp. (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; JOHNSON & FALES, 2001; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010) und *Moraxella* spp. (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; JOHNSON & FALES, 2001). Insbesondere bei Aspirationspneumonien sind gramnegative Bakterien von großer Bedeutung (TART et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012a; PROULX et al., 2014), obgleich auch hier in vielen Fällen Mischinfektionen mit gramnegativen und grampositiven Bakterien vorliegen (TART et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012a).

#### 1.3.2.1. Enterobakterien

Bakterien der umfangreichen Familie *Enterobacteriaceae* finden sich als Teil der physiologischen Flora im Magen-Darm-Trakt von Menschen und Tieren. Neben einer großen Zahl apathogener existieren auch einige potentiell pathogene Spezies, die eine Rolle als opportunistische Krankheitserreger spielen können

(CARTER & WISE, 2004). Enterobakterien wurden in den oberen und unteren Atemwegen von klinisch gesunden Hunden nachgewiesen (PECORA, 1976; LINDSEY & PIERCE, 1978; MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003), sowie in Proben aus den unteren Atemwegen von respiratorisch kranken Hunden (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; JOHNSON & FALES, 2001; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014). Von besonderer Bedeutung in dieser Familie ist *Escherichia coli* (*E. coli*) mit einem Anteil von 12 bis 18 % der Isolate, wobei auch *Enterobacter* spp. und *Klebsiella* spp. in zahlreichen Studien bei Hunden mit Atemwegserkrankungen isoliert wurden (HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; PROULX et al., 2014). Die beiden letztgenannten Spezies sind besonders im Zusammenhang mit multiresistenten nosokomialen Infektionen bei veterinärmedizinischen Patienten von Bedeutung (PRESCOTT et al., 2002). Seltener nachgewiesen wurden *Serratia* spp. (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; ANGUS et al., 1997; TART et al., 2010), *Proteus* spp. (HARPSTER, 1981; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014) und *Citrobacter* spp. (ANGUS et al., 1997; JOHNSON & FALES, 2001; EPSTEIN et al., 2010). In einer Studie, die das Bakterienspektrum bei ventilationsbedürftigen Hunden und Katzen mit dem von Patienten mit unkomplizierten Atemwegserkrankungen verglich, wurden in der Gruppe mit Lungenversagen signifikant häufiger Enterobakterien isoliert als in der Vergleichsgruppe (EPSTEIN et al., 2010). Vertreter dieser Bakterienfamilie, insbesondere *E. coli*, zeigen nicht selten Resistenzen gegenüber routinemäßig eingesetzten Antibiotika (OLUOCH et al., 2001; CLARKE, 2006; OLIVARES et al., 2013; PAPICH, 2013a, 2013b). Zudem scheint sich die Resistenzsituation gegenüber antibiotischen Wirkstoffen, besonders für Isolate von *E. coli*, zunehmend zu verschärfen (AUTHIER et al., 2006; CLARKE, 2006; STEINFELD et al., 2012).

### 1.3.2.2. Pseudomonaden

Pseudomonaden werden ebenfalls häufig bei Hunden mit bakteriellen Bronchopneumonien isoliert (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; HARPSTER,

1981; THAYER & ROBINSON, 1984; PEETERS et al., 2000; RADHAKRISHNAN et al., 2007; JOHNSON et al., 2013). Einen bedeutenden Vertreter aus der Familie der *Pseudomonadaceae* im Zusammenhang mit respiratorischen Infektionen bei Hunden stellt *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) dar (ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; JOHNSON et al., 2013), aber auch *Stenotrophomonas maltophila* (früher: *Pseudomonas maltophila*) wurde bei Hunden mit Atemwegsinfektionen nachgewiesen (JOHNSON et al., 2013). *P. aeruginosa* findet sich natürlicherweise in der Umwelt, sowie auf der Haut, auf Schleimhäuten und in Faeces. Der Erreger spielt eine wichtige Rolle als opportunistisches Pathogen und Eitererreger und besitzt eine hohe Tenazität in der Umgebung (CARTER & WISE, 2004). In verschiedenen Studien konnten Pseudomonaden auch in respiratorischen Proben gesunder Hunde nachgewiesen werden (PECORA, 1976; BAUER et al., 2003). Kultivierte Isolate, insbesondere von *P. aeruginosa*, zeigen oft ein ausgeprägtes Resistenzverhalten gegenüber gängigen Antibiotika (HANCOCK & SPEERT, 2000; CLARKE, 2006; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013; OLIVARES et al., 2013; PAPICH, 2013a, 2013b).

### 1.3.2.3. Pasteurellen

Gramnegative Bakterien der Familie *Pasteurellaceae* konnten ebenfalls aus den oberen (Pharynx tupfer, oberer Trachealtupfer) wie unteren Atemwegen (BALF, tiefer Trachealtupfer) gesunder Hunde isoliert werden (MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003). Die meisten Arten stellen Kommensalen der Schleimhäute des oberen Respirationstrakts und Magen-Darmtrakts von Haus- und Wildtieren dar (CARTER & WISE, 2004). Vertreter dieser Bakterienfamilie wurden auch im Zusammenhang mit Fremdkörperpneumonien (TENWOLDE et al., 2010), Aspirationspneumonien (TART et al., 2010; PROULX et al., 2014), chronischer Bronchitis (PEETERS et al., 2000), Lungenversagen (EPSTEIN et al., 2010), ambulant erworbenen Pneumonien (community-acquired pneumonia) (RADHAKRISHNAN et al., 2007), Atemwegsinfektionen (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; PEETERS et al., 2000; JOHNSON et al., 2013) und unspezifizierten Atemwegserkrankungen (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012) isoliert. Von besonderem Interesse im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen beim Hund sind die Spezies

*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) und *Pasteurella canis* (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013). *P. multocida* konnte jedoch ebenfalls bei gesunden Hunden in Kulturen aus steril gewonnenen tiefen trachealen Abstrichen und aus Pharynx tupfern derselben Hunde nachgewiesen werden (MCKIERNAN et al., 1984). Pasteurellen zeigen bislang ein verhältnismäßig günstiges und stabiles Resistenzspektrum und sind gegenüber den meisten antibiotischen Wirkstoffen sensibel (ANGUS et al., 1997; PRESCOTT et al., 2002; AUTHIER et al., 2006; STEINFELD et al., 2012).

## **2. Diagnostik bakterieller Atemwegsinfektionen**

Die Diagnose einer bakteriellen Pneumonie beim Hund wird stets durch Berücksichtigung einer Kombination aus Vorbericht, klinischen und labordiagnostischen Befunden, bildgebenden Verfahren und zytologischen sowie mikrobiologischen Befunden gestellt (RHA & MAHONY, 1999; PEETERS et al., 2000; BRADY, 2004; DEAR, 2014; PROULX et al., 2014). Den Goldstandard stellt hierbei analog zur Humanmedizin die histologische Untersuchung von Lungengewebeproben dar, welche sich in der klinischen Praxis jedoch in der Regel nicht routinemäßig durchführen lässt (CORLEY et al., 1997; PEETERS et al., 2000; NORRIS et al., 2001). Nachdem die klinische Verdachtsdiagnose einer bakteriellen Pneumonie auf Grundlage von Vorbericht, klinischen Symptomen, Befunden der klinischen Untersuchung und thorakalen Röntgenuntersuchungen gestellt wurde, wird diese idealerweise durch eine gezielte Probenentnahme aus den unteren Atemwegen mit weiterführender mikrobiologischer und zytologischer Untersuchung bestätigt (RADHAKRISHNAN et al., 2007; PROULX et al., 2014).

### **2.1. Probenentnahme aus den unteren Atemwegen**

Für die mikrobiologische Untersuchung im Rahmen der Pneumoniediagnostik sollten Proben aus den unteren Atemwegen verwendet werden, da Proben aus den oberen Atemwegen eine abweichende Bakterienpopulation aufweisen (LINDSEY & PIERCE, 1978; MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003; SUMNER et al., 2011). Die Probenentnahme erfolgt in der Regel aus den unteren Abschnitten von Trachea, Bronchien oder tieferen Lungenbereichen mittels Spülungen. Verschiedene Methoden wurden beschrieben, um aussagekräftige Proben zu gewinnen. Als Spülflüssigkeit wird sterile isotonische Kochsalzlösung verwendet. Eine alternative Probengewinnung wird mittels Biopsiebürsten durchgeführt, die

endoskopisch oder blind durch einen endotrachealen Tubus an die zu beprobende Stelle platziert werden, um dort Zellen und Sekrete zur mikrobiologischen und zytologischen Diagnostik aufzunehmen (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; RHA & MAHONY, 1999; PADRID, 2000; JOHNSON & FALES, 2001; EPSTEIN et al., 2010). Des Weiteren wurden Methoden zur – mitunter sonografisch geführten – transthorakalen Feinnadelaspiration bei fokalen, nodulären oder diffusen Lungenveränderungen beschrieben (PECORA, 1976; MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; EPSTEIN et al., 2010; VIESON et al., 2012; PROULX et al., 2014).

Transtracheale Spülproben können häufig auch beim nicht anästhesierten oder leicht sedierten Patienten durchgeführt werden. Hierzu wird unter sterilen Kautelen ein Spülkatheter transkutan durch Punktion der Trachea eingeführt, vorgeschoben und die Spülflüssigkeit mittels Spritzen verabreicht und manuell zurückgewonnen (CREIGHTON & WILKINS, 1974a; HAWKINS et al., 1995; MCCULLOUGH & BRINSON, 1999). Die Probenentnahme erfolgt hierbei vor allem aus der unteren Trachea und den Stammbronchien (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999). Den Vorteil dieser Methode stellt die Umgehung der oberen Atemwege und somit der Ausschluss der damit verbundenen Kontaminationsmöglichkeit dar (CREIGHTON & WILKINS, 1974a; PADRID, 2000).

Endotracheale Spülungen erfolgen am anästhesierten und intubierten Tier mittels Spülkatheter, welcher durch einen sterilen endotrachealen Tubus eingeführt wird (HAWKINS et al., 1995). Alternativ kann bei kleinen Hunden auch ein Spritzenadapter auf einen endotrachealen Tubus aufgesetzt werden (ANDREASEN, 2003). Hierbei wird die Probe ebenfalls aus der unteren Trachea oder aus einem oder mehreren Stammbronchien gewonnen (HAWKINS et al., 1995). Tiefere Bereiche der Lunge werden nicht erreicht, weshalb die zytologischen Befunde aus trans- oder endotrachealen Spülproben nicht immer mit denen aus BALF-Proben übereinstimmen (HAWKINS et al., 1995).

Eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) wird in der Regel im Rahmen einer bronchoskopischen Untersuchung durchgeführt; es wurden allerdings auch Methoden zur blinden Durchführung beschrieben (MCCAULEY et al., 1998; HAWKINS & BERRY, 1999; PADRID, 2000). Die Bronchoskopie kann hierbei sowohl durch einen sterilen Tubus als auch am nicht intubierten Patienten

erfolgen (HAWKINS et al., 1990). Dabei ist besonders auf die Vermeidung oropharyngealer Kontaminationen zu achten (RHA & MAHONY, 1999; PEETERS et al., 2000; JOHNSON, 2001). Das Bronchoskop sollte steril aufbereitet sein und einen der Tiergröße angepassten Durchmesser besitzen. Die Spülung eines ausgewählten Bronchialabschnittes kann durch den Arbeitskanal des Bronchoskops erfolgen (BROWN et al., 1983; HAWKINS et al., 1990; HAWKINS et al., 1995; RHA & MAHONY, 1999; JOHNSON, 2001). Alternativ kann die Spülprobe mittels sterilen Spülkatheters gewonnen werden, der durch den Arbeitskanal vorgeschoben wird (JOHNSON, 2001; BAUER et al., 2003). Verschiedene Methoden zur Verwendung von kommerziell erhältlichen oder selbst gefertigten Spülkathetern wurden beschrieben (MCCAULEY et al., 1998; HAWKINS & BERRY, 1999; BAUER et al., 2003). Der Vorteil einer Spülung unter bronchoskopischer Kontrolle ist die Möglichkeit zur gezielten Auswahl der Lokalisation der Probenentnahme und makroskopischen Beurteilung etwaiger veränderter Bronchialabschnitte (RHA & MAHONY, 1999; PADRID, 2000). Die Spülflüssigkeit dringt bei einer BAL bis in die Alveolen des gespülten Bereichs vor und zeigt bei adäquater Rückgewinnung aufgrund des vorhandenen Surfactants einen schaumigen Anteil (HAWKINS et al., 1990; RHA & MAHONY, 1999; JOHNSON, 2001; ANDREASEN, 2003).

Verglichen mit Methoden zur trachealen Lavage weist die endoskopisch gestützte BAL eine höhere diagnostische Wertigkeit auf, bedarf jedoch einer umfangreicheren technischen Ausrüstung und spezifischer Kenntnisse und Erfahrung, während minimal-invasive tracheale Spülungen mittels endo- oder transtrachealer Technik sehr kosteneffektiv sind und ohne besondere Gerätschaften in jeder tierärztlichen Praxis einfach durchgeführt werden können (CREIGHTON & WILKINS, 1974a; HAWKINS et al., 1995; RHA & MAHONY, 1999; PADRID, 2000; JOHNSON, 2001; PROULX et al., 2014). Man nimmt an, dass im Zuge einer blinden Tracheallavage die kranioventralen Lungenareale nicht adäquat erreicht und beprobt werden, was insbesondere bei Verdacht auf eine Aspirationspneumonie geboten erscheint (PROULX et al., 2014).

Die genannten Methoden zur Gewinnung von Spülproben sind – abgesehen von einem allgemeinen Anästhesierisiko – beim Hund in der Regel mit großer Sicherheit durchführbar (HAWKINS et al., 1990; HAWKINS et al., 1995). Eine

Bronchoskopie ist kontraindiziert bei Patienten mit Koagulopathien, kardiovaskulärer Instabilität oder mangelnder Narkosefähigkeit (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; RHA & MAHONY, 1999; JOHNSON, 2001). Als mögliche Komplikationen können bei Patienten mit schweren Atemwegserkrankungen Hypoventilation, vermehrte Sekretansammlung und ein Kollaps der unteren Atemwege auftreten (RHA & MAHONY, 1999; JOHNSON, 2001; ANDREASEN, 2003). Insbesondere bei Risikopatienten mit insuffizienter Atmung und/oder eingeschränkter Lungenfunktion ist bei Durchführung einer BAL stets mittels entsprechender Überwachungsmaßnahmen auf eine ausreichende Oxygenierung zu achten, um eine Dekompensation frühzeitig zu detektieren und nötigenfalls einer Sauerstoffunterversorgung mittels Supplementierung entgegenwirken zu können (MCCAULEY et al., 1998; ANDREASEN, 2003). Verschiedene Autoren empfehlen aus diesem Grund generell eine Sauerstoffversorgung des Patienten vor, während und nach der BAL (HAWKINS et al., 1990; MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; PADRID, 2000).

## **2.2. Zytologische Diagnostik**

Unabhängig von der gewählten Methode kann die gewonnene Spülflüssigkeit sowohl zur mikrobiologischen als auch zur zytologischen Untersuchung verwandt werden (CREIGHTON & WILKINS, 1974a; MCCULLOUGH & BRINSON, 1999). Hierbei können bereits wichtige Hinweise für eine bakterielle Infektion der unteren Atemwege gewonnen werden, insbesondere wenn zytologisch Anzeichen auf eine septische suppurative Entzündung mit monomorphen intrazellulären Bakterien vorhanden sind (HAWKINS et al., 1990; HAWKINS et al., 1995; PEETERS et al., 2000; JOHNSON, 2001; ANDREASEN, 2003). Allerdings kann aufgrund des Fehlens von Bakterien in zytologischen Präparaten eine bakterielle Infektion nicht ausgeschlossen werden (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; THAYER & ROBINSON, 1984; JOHNSON et al., 2013). Dies gilt in besonderem Maße bei Tieren, die zum Zeitpunkt der Probengewinnung bereits antibiotische Therapie erhalten haben (ANDREASEN, 2003; JOHNSON et al., 2013).

Respiratorische Proben sollten innerhalb von 30 bis 60 Minuten nach Probengewinnung weiterverarbeitet und bis dahin gekühlt werden (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999). Zur Herstellung der Präparate werden Zytocentrifugen eingesetzt, die die Probenflüssigkeit konzentrieren und als

Monolayer auf einen Objektträger ausbringen. Alternativ kann eine zentrifugierte Probe auch direkt ausgestrichen werden (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; ANDREASEN, 2003). Proben, die mittels Biopsiebürsten gewonnen werden, können direkt auf Objektträger ausgestrichen werden (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; JOHNSON & FALES, 2001). Die Präparate werden mit herkömmlichen Methoden fixiert und gefärbt (z. B. Whright-Giemsa-Färbung, Färbung nach Romanowsky) (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; HAWKINS, 2004). Mittels Gramfärbung kann in Verbindung mit morphologischen Kriterien bereits eine erste Eingrenzung der beteiligten Bakterienspezies erfolgen (PEETERS et al., 2000; SCHULZE & RAHILLY, 2012b).

Die Zytologie kann auch Hinweise auf eine etwaige oropharyngeale Kontamination geben, wenn in erster Linie eine extrazelluläre gemischte Flora, insbesondere mit *Simonsiella* spp., und/oder Plattenepithelzellen in relevanter Anzahl festgestellt werden (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999; PEETERS et al., 2000; ANDREASEN, 2003). Differentialdiagnostisch ist bei zytologisch darstellbaren extrazellulären Bakterien und Futterpartikeln allerdings auch eine oropharyngeale oder gastroösophageale Aspiration in Erwägung zu ziehen (FORD, 2009b; COHN, 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012b; PROULX et al., 2014).

### **2.3. Mikrobiologische Diagnostik**

Die respiratorische Spülflüssigkeit wird in einem sterilen Probengefäß aufgefangen und umgehend zur weiteren mikrobiologischen Untersuchung verbracht. Alternativ ist auch die Beschickung eines bakteriologischen Untersuchungstupfers (mit Nährmedium) mit der Spülprobe möglich (BROWN et al., 1983; SYKES & RANKIN, 2014). Neben der bakteriologischen Erregeridentifizierung ist aufgrund zunehmender antimikrobieller Resistenzen stets die Erstellung eines Antibiogramms zu empfehlen (STEINFELD et al., 2012).

#### **2.3.1. Erregerkultivierung**

Zur Anzucht von Bakterien werden Agarplatten mit verschiedenen Nährmedien verwendet. Diese werden beimpft und unter standardisierten Bedingungen bebrütet (PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Neben Standardnährböden (z. B. Schafsblutagar) kommen verschiedene Selektiv- und



Differenzierungsnährböden (z. B. MacConkey-Agar) zum Einsatz (SYKES & RANKIN, 2014). Die Bebrütung erfolgt unter aeroben Bedingungen bei 35 bis 37 °C für mindestens zwei Tage (SYKES & RANKIN, 2014). Die Platten werden alle 20 bis 24 Stunden makroskopisch auf Wachstum beurteilt. Gegebenenfalls werden Subkulturen angesetzt (AMTSBERG & VERSPOHL, 2011). Weitere Nährmedien können zum selektiven Nachweis bestimmter Bakterienspezies, insbesondere primär pathogener Bakterien, verwendet werden. So wird Bordet-Gengou-Agar zur Anzucht von Bordetellen verwendet und verschiedene Spezialmedien (z. B. Hayflick-Agar, SP-4 Medium) zum Nachweis von Mykoplasmen (SELBITZ, 2007). Die gewonnenen Reinkulturen werden mikrobiologisch untersucht und die Spezies bestimmt. Hierzu werden die Kolonie-Morphologie, die mikroskopische Morphologie (Gram-Verhalten, Stäbchen- oder Kokkenform) sowie eine Reihe von phänotypischen Tests herangezogen. Grampositive aerobe Bakterien werden nach ihrem Hämolyseverhalten auf bluthaltigen Nährböden, einem Katalase-Test, sowie der Fähigkeit zur Produktion von Koagulase eingeordnet. Die Identifikation von gramnegativen aeroben Bakterien beruht auf der Fähigkeit zur Fermentation von Laktose, der Produktion von Indol, Oxidase und einer Reihe von weiteren Enzymen, sowie ihrem Hämolyseverhalten (SYKES & RANKIN, 2014). Eine weiterführende Differenzierung kann auf biochemischen Weg erfolgen, hierzu stehen kommerzielle Test-Kits zur Verfügung (sogenannte „Bunte Reihe“, z. B. Enterotubes<sup>®</sup>, API Strips<sup>®</sup>) (KRÜGER & SEIDLER, 2007). Gelegentlich wird zum Nachweis geringer Keimmengen vor der eigentlichen Bebrütung auf Agarplatten eine kulturelle Anreicherung in Nährlösung durchgeführt (PEETERS et al., 2000; JOHNSON & FALES, 2001; AMTSBERG & VERSPOHL, 2011).

Eine quantitative Kultivierung ermöglicht die Bestimmung der Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) pro Milliliter (ml) Probenflüssigkeit oder pro Gramm (g) Gewebe (LINDSEY & PIERCE, 1978; PEETERS et al., 2000). So kann bei Festlegung entsprechender Grenzwerte eine Besiedelung der Atemwege mit nicht pathogenen Bakterien von einer bakteriellen Infektion abgegrenzt werden (LINDSEY & PIERCE, 1978; PEETERS et al., 2000). LINDSEY und PIERCE (1978) kultivierten aerobe Bakterien bei 37 °C von 268 Lungengewebeproben von 19 klinisch und labordiagnostisch unauffälligen Versuchshunden, deren Lungenparenchym makroskopisch und histologisch

unverändert erschien, in einer medianen Konzentration von  $1,3 \times 10^2$  CFU/g Lungengewebe. PEETERS und Mitarbeiter (2000) untersuchten 48 BALF-Proben von Hunden mit infektiösen und nicht-infektiösen Erkrankungen der unteren Atemwege mittels quantitativer Kulturen. Als Kriterium für eine bakterielle Infektion in Abgrenzung zur Kolonisation schlugen die Autoren analog zur Humanmedizin den zytologischen Nachweis von intrazellulären Bakterien in gramgefärbten BALF-Ausstrichen in Verbindung mit einer kulturellen Keimzahl von über  $1,7 \times 10^3$  CFU/ml BALF vor und gaben hierfür eine Sensitivität von 87 % bei einer Spezifität von 97 % an (PEETERS et al., 2000).

In Verdachtsfällen, beispielsweise bei bronchialen Fremdkörpern, sollte auch eine anaerobe Kultivierung erwogen werden, da in diesen Fällen häufig anaerobe Bakterien als Infektionserreger beteiligt sind (ANGUS et al., 1997; EPSTEIN et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; JOHNSON et al., 2013; DEAR, 2014). Allerdings ist aufgrund des langsameren Wachstums von Anaerobiern ein endgültiges Ergebnis der Kultivierung erst nach sieben Tagen zu erwarten (SYKES & RANKIN, 2014).

Des Weiteren werden zunehmend molekulare Nachweisverfahren angewandt, unter anderem die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Die PCR dient zum Nachweis bestimmter Bakterien-Desoxyribonukleinsäure (DNA) und bietet dabei mitunter eine höhere Sensitivität als kulturelle Nachweismethoden (REIZENSTEIN et al., 1993; HOZBOR et al., 1999; KRÜGER & SEIDLER, 2007; SCHULZ et al., 2014).

Auch wenn der Nachweis spezifischer Erregerspezies in einer respiratorischen Probe wichtig für das weitere diagnostische Vorgehen und die nachfolgende Therapie ist, schließt ein negatives kulturelles Ergebnis eine bakterielle Infektion nicht mit Sicherheit aus (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; THAYER & ROBINSON, 1984; JOHNSON et al., 2013). Fehler bei der Probengewinnung, beim Transport, bei der Probenverarbeitung oder eine antimikrobielle Vorbehandlung des Patienten können zu falsch-negativen Ergebnissen in der bakteriologischen Untersuchung führen (CREIGHTON & WILKINS, 1974b; THAYER & ROBINSON, 1984; SYKES & RANKIN, 2014).

### **2.3.2. Resistenztests**

Zur Abschätzung der *in-vivo*-Sensibilität der kultivierten Bakterienspezies

kommen verschiedene Resistenztests zur Erstellung von Antibiogrammen zum Einsatz. Diese sollen bei der Auswahl eines geeigneten antibiotischen Wirkstoffes zur Behandlung einer vorliegenden bakteriellen Infektion helfen (PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Neben klassischen qualitativen Methoden wie dem Agardiffusionstest werden zunehmend auch quantitative Verfahren eingesetzt, die eine Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) antibiotischer Wirkstoffe mittels Dilutionsmethode ermöglichen (BROOKS et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003). Für eine Reihe von antibiotischen Wirkstoffen und bakteriellen Spezies existieren internationale Standards zur Durchführung und Auswertung von Resistenztests bei Tieren (Dilutions- und Diffusionsmethode), die von der gemeinnützigen Organisation „Clinical and Laboratory Standards Institute“ (CLSI; früher: „National Committee for Clinical Laboratory Standards“) erstellt, fortwährend aktualisiert und den mikrobiologischen Labors zur Verfügung gestellt werden (SCHWARZ et al., 2003; ORTEZ, 2005a; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010; PAPICH, 2013a). Wo keine veterinärspezifischen Grenzwerte (MHK oder Hemmhofdurchmesser (HHD)) zur Verfügung stehen, werden diese bislang aus der Humanmedizin übernommen (PAPICH, 2013a); teilweise wird auch auf nationale Standards und Durchführungsvorschriften des Deutschen Instituts für Normung zurückgegriffen (SCHWARZ et al., 2003). Für die therapeutische Anwendung eines antibiotischen Wirkstoffes in der Praxis sind des Weiteren pharmakologische Aspekte bezüglich der Verabreichung, der Verträglichkeit und der zu erwartenden Anreicherung im Zielgewebe zu berücksichtigen (OLSEN, 2000; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Nicht zuletzt sind ökonomische Aspekte und einschlägige Zulassungsvorschriften zu beachten (PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010).

#### **2.3.2.1. Agardiffusionstest**

Der Agardiffusionstest (Plättchen-Diffusionstest, Kirby-Bauer Methode) ist ein seit Jahrzehnten praktiziertes und weit verbreitetes Verfahren zur qualitativen Bestimmung der Empfindlichkeit von kultivierten Bakterienspezies gegenüber verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen (OLSEN, 2000; BROOKS et al., 2003; ORTEZ, 2005b; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Eine definierte Menge einer Bakteriensuspension, die in einem flüssigen Nährmedium (z. B. Mueller-Hinton-Bouillon) in Reinkultur bis zu einer festgelegten Konzentration angezüchtet wurde, wird auf Mueller-Hinton-Agar verbracht (ORTEZ, 2005b;

JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Anschließend werden Filterpapierplättchen, die mit einer definierten Menge eines antibiotischen Wirkstoffes imprägniert wurden, auf den beimpften Agar aufgetragen (OLSEN, 2000; ORTEZ, 2005b; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Eine Bebrütung erfolgt bei 35 °C für 16 bis 18 Stunden (ORTEZ, 2005b; JORGENSEN & FERRARO, 2009). Durch Diffusion dringt der antibiotische Wirkstoff in den das Plättchen umgebenden Agar ein und verhindert dort das Wachstum der Bakterien entlang eines Konzentrationsgradienten (OLSEN, 2000; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Der Durchmesser derart erzeugter Hemmhöfe kann nach aktuellen standardisierten Kriterien (z. B. CLSI Standards) abgelesen und die bakterielle Empfindlichkeit qualitativ bestimmt werden (ORTEZ, 2005b; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Der HHD korreliert mit der antimikrobiellen Aktivität des getesteten Wirkstoffes. Je größer der HHD ist, desto empfänglicher ist das kultivierte Isolat gegenüber dem applizierten Wirkstoff (PAPICH, 2013a). Auf diese Weise wird eine Bakterienspezies als „sensibel“, „intermediär sensibel“ oder „resistent“ gegenüber einem bestimmten antibiotischen Wirkstoff klassifiziert (OLSEN, 2000; ORTEZ, 2005b; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Ein Nachteil dieser qualitativen Methode besteht darin, dass die exakte Wirkstoffkonzentration, die benötigt wird, um bakterielles Wachstum *in vitro* zu inhibieren, nicht festgestellt werden kann (PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010).

#### **2.3.2.2. Mikrodilutionsmethode**

Der Agardiffusionstest ist ein qualitatives Verfahren, das näherungsweise mit der Wirkstoffkonzentration korreliert, die unter normalen Umständen im Blutserum des Patienten erreicht wird (OLSEN, 2000). Dagegen ermittelt die Mikrodilutionsmethode quantitative Werte im Sinne einer minimal benötigten Wirkstoffkonzentration (MHK in Mikrogramm ( $\mu\text{g}$ ) pro ml), die *in vitro* benötigt wird, um bakterielles Wachstum effektiv zu hemmen (OLSEN, 2000; SCHWARZ et al., 2003; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Zu diesem Zweck werden Verdünnungsreihen der zu testenden antibiotischen Wirkstoffe mit einer festgesetzten Menge an Nährlösung (meist Mueller-Hinton-Bouillon) angesetzt, die eine definierte Bakterienkonzentration in

Reinkultur enthält (OLSEN, 2000; RANKIN, 2005; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Im Anschluss an die Inkubation der angesetzten Röhrchen (16 bis 20 Stunden bei 35 °C) wird die Trübung der Flüssigkeit gemessen, welche mit den enthaltenden Bakterien korreliert (RANKIN, 2005; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Die MHK ist definiert als die geringste Konzentration an antibiotischem Wirkstoff, die gerade noch ein bakterielles Wachstum *in vitro* hemmt (RANKIN, 2005; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010; PAPICH, 2013a). Je niedriger die MHK, desto empfänglicher ist das bakterielle Isolat gegenüber dem getesteten Wirkstoff (PAPICH, 2013a). Durch Abgleich der MHK mit standardisierten Auswertungsvorschriften – sogenannten „Breakpoints“, entwickelt und zur Verfügung gestellt z. B. vom CLSI – erhält man die qualitative Information, ob ein bestimmter Wirkstoff eine *in-vitro*-Wirksamkeit gegenüber den getesteten Bakterienisolaten zeigt. Diese werden dementsprechend als „sensibel“, „intermediär sensibel“ oder „resistent“ klassifiziert (PAPICH, 2013a). Darüber hinaus gibt die MHK zusätzlich Hinweise auf die Wirkstoffkonzentration, die benötigt wird, um einen antibiotischen Effekt auf die getesteten Bakterienisolate zu erzielen (RANKIN, 2005; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Diese Informationen können in die klinischen Erwägungen zur Auswahl und Dosierung eines geeigneten Wirkstoffes einbezogen werden, von dem erwartet wird, dass er sich in ausreichendem Maße im Zielgewebe anreichert (OLSEN, 2000). Die Grenzwerte der MHK („Breakpoints“) beziehen sich in der Regel ebenfalls auf Wirkstoffkonzentrationen, die bei Dosierung und Anwendung eines Wirkstoffes nach Herstellerangaben im Blutplasma erreicht werden (PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010), während die Anreicherung eines Wirkstoffes im Zielgewebe zusätzlich von der Möglichkeit zur Überwindung der vorhandenen Diffusionsbarrieren bestimmt wird (OLSEN, 2000; PAPICH, 2013a). So limitiert beispielsweise die Blut-Bronchial-Barriere in vielen Fällen eine adäquate Wirkstoffanreicherung in den Atemwegen, während lipophile Substanzen leichter in Bronchialsekrete diffundieren und dort eine effektive Konzentration erreichen können (PAPICH, 2013a). Des Weiteren berücksichtigt die MHK auch nicht die Bedingungen im Zielgewebe, die die Wirksamkeit eines Antibiotikums *in vivo* beeinträchtigen oder verstärken können (OLSEN, 2000; PAPICH, 2013a). Mittlerweile sind auch kommerzielle Testsysteme zur schnellen und

automatisierten Durchführung der Mikrodilutionsmethode verfügbar (JORGENSEN & FERRARO, 2009).

### **3. Antibiotische Therapie bakterieller Atemwegsinfektionen**

Neben der Behandlung einer möglicherweise zugrundeliegenden lokalen oder systemischen Erkrankung stützt sich die Therapie bakterieller Atemwegsinfektionen beim Hund auf die adäquate antibiotische Bekämpfung der beteiligten Pathogene (FORD, 2009b; VIESON et al., 2012). Zusätzlich kommen symptomatische Maßnahmen entsprechend der Schwere der Erkrankung zum Einsatz (DEAR, 2014).

Als zugrundeliegende prädisponierende respiratorische Erkrankungen kommen bei Hunden mit akuter oder chronischer Symptomatik unter anderem folgende Grundkrankheiten in Betracht: chronische Bronchitis, parasitäre Bronchitis, eosinophile Bronchopneumopathie, bronchiale Fremdkörper, Aspirationspneumonie, Bronchiektasien, Larynxparalyse, Trachealkollaps, Megaösophagus, Neoplasien sowie Mischformen aus mehreren zugrundeliegenden pathologischen Zuständen (HARPSTER, 1981; BROWNLIE, 1990; JAMESON et al., 1995; PEETERS et al., 2000). Zu den häufig mit bakteriellen Atemwegsinfektionen vergesellschafteten systemischen Erkrankungen zählen Hypothyreose, Hyperadrenokortizismus, Hypoadrenokortizismus, Diabetes mellitus und kongestives Herzversagen (JAMESON et al., 1995; DEAR, 2014).

Zusätzlich zur Antibiotikatherapie sollten therapeutisch auch symptomatische Maßnahmen zur Sekretolyse, Hydratation und Verbesserung des Gasaustausches zum Einsatz kommen (COURT et al., 1985; TART et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012b; DEAR, 2014). Hierzu zählen je nach Schwere der klinischen Symptome und Zustand des Patienten die intravenöse Infusionstherapie, die mehrmals tägliche Inhalation mit Coupage, die Applikation von mukolytischen Medikamenten (z. B. N-Acetylcystein) und die Supplementierung von Sauerstoff bei hypoxischen Patienten bis hin zur mechanischen Ventilation im Rahmen einer intensivmedizinischen Versorgung (STONE & POOK, 1992; BRADY, 2004; DEAR, 2014).

Aufgrund der Unvorhersehbarkeit des beteiligten Bakterienspektrums und der

antimikrobiellen Empfänglichkeit der kultivierten Isolate in Zeiten von zunehmenden (Multi-)Resistenzen ist in den meisten Fällen eine weiterführende mikrobielle Diagnostik mit Erregeridentifizierung und Resistenztest empfehlenswert, bevor eine adäquate antibiotische Therapie einer bakteriellen Atemwegsinfektion durchgeführt wird (HARPSTER, 1981; STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000; PEETERS et al., 2000; EPSTEIN et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012b). THAYER und ROBINSON (1984) konnten nachweisen, dass Hunde mit bakteriellen Bronchopneumonien eine schnellere klinische Besserung zeigten, wenn die Auswahl des Antibiotikums nicht empirisch erfolgte, sondern auf den Ergebnissen von Resistenztests beruhte. Allerdings ist zu beachten, dass eine *in-vitro*-Wirksamkeit eines antimikrobiellen Wirkstoffes nicht unbedingt eine klinische Wirksamkeit *in vivo* nach sich ziehen muss (HARPSTER, 1981; RICHTER et al., 2006; PIERCE-HENDRY & DENNIS, 2010). Diese ist abhängig von der komplexen Interaktion zwischen Organismus, Pathogen und Arzneimittel (OLSEN, 2000; PAPICH, 2013a).

Um ein befriedigendes Behandlungsergebnis zu erreichen, ist außerdem eine ausreichend lange Dauer der antibiotischen Therapie von Nöten. Diese sollte bei Bronchopneumonien über drei bis sechs Wochen erfolgen und ein bis zwei Wochen über die klinische und/oder radiologische Genesung hinaus durchgeführt werden (STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000; SCHULZE & RAHILLY, 2012b; DEAR, 2014). HARPSTER (1981) zeigte bei 25 Hunden mit respiratorischen Erkrankungen und positiven bakteriologischen Kulturen aus transtrachealen Aspiraten, dass eine Antibiotikatherapie im Mittel über 38 Tage, im Einzelfall sogar bis zu 88 Tage verabreicht werden musste, um eine klinische Heilung zu erzielen.

Idealerweise sollte die Auswahl eines antibiotischen Wirkstoffes auf Grundlage von bakterieller Kultivierung und Resistenztests erfolgen (OLSEN, 2000; SCHULZE & RAHILLY, 2012b; DEAR, 2014). In Fällen, in denen eine Erregeridentifizierung oder eine Probenentnahme zur mikrobiologischen Diagnostik nicht möglich ist, wird von verschiedenen Autoren der empirische Einsatz von Antibiotika auf Grundlage der mutmaßlich vorhandenen Pathogene und ihrer vermuteten Resistenzmuster je nach Schwere der klinischen Symptome und Zustand des Patienten empfohlen. Gründe für einen empirischen Einsatz von Antibiotika können eine fehlende Besitzer-Compliance, mangelnde klinische

Stabilität des Patienten für eine diagnostische Abklärung oder bei schwerkranken Tieren ein Behandlungsbeginn vor Erhalt der mikrobiologischen Befunde sein (STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000; BARTON, 2004; BRADY, 2004; DOWLING, 2009; FORD, 2009b; COHN, 2010; EPSTEIN et al., 2010; LEE-FOWLER & REINERO, 2012; SCHULZE & RAHILLY, 2012b; DEAR, 2014; SYKES, 2014c). PEETERS und Mitarbeiter (2000) empfehlen beim Hund, analog zur Humanmedizin, für eine frühe Diagnose von Infektionen der unteren Atemwege und für die Planung einer initialen antibiotischen Therapie bis zum Vorliegen von quantitativen Kulturen, die Anzahl intrazellulärer Bakterien in gramgefärbten BALF-Zytologieausstrichen zusammen mit morphologischen Kriterien heranzuziehen. Die Internationale Gesellschaft für Kleintierkrankheiten (International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID)) erstellt derzeit Richtlinien zur antibiotischen Therapie bei Atemwegsinfektionen (ISCAID; DEAR, 2014; SYKES, 2014a). Derartige Richtlinien auf Basis epidemiologischer Daten existieren bereits seit Längerem in der Humanmedizin für die empirische Wahl von Antibiotika bei bakteriellen Pneumonien und berücksichtigen die Prävalenz von Pathogenen, lokale Resistenzmuster, die Schwere der Erkrankung, gleichzeitig bestehende Grunderkrankungen und kürzlich verabreichte Antibiotika (MANDELL et al., 2007).

Ein positives kulturelles Ergebnis allein ist nicht als gesicherter Nachweis einer bakteriellen Infektion der unteren Atemwege beim Hund zu werten und kann zum ungerechtfertigten Einsatz von Antiinfektiva führen (PEETERS et al., 2000). Vielmehr ist der hohe Anteil positiver mikrobiologischer Kulturen in Proben aus den unteren Atemwegen sowohl bei gesunden Hunden (PECORA, 1976; LINDSEY & PIERCE, 1978; MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003) als auch bei Hunden mit respiratorischen Grunderkrankungen zu berücksichtigen, bei welchen zytologisch keine septische suppurative Entzündung vorliegt (PEETERS et al., 2000; JOHNSON & FALES, 2001; JOHNSON et al., 2013). JOHNSON und FALES (2001) konnten bei 24/29 Hunden mit bronchoskopisch verifiziertem Atemwegskollaps (Tracheal-/Bronchialkollaps) ein bakterielles Wachstum von *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., Enterobakterien und anderen potentiellen Sekundärerregern in steril gewonnen Proben nachweisen. Bei keinem der zytologisch untersuchten Hunde (13/29) waren Hinweise auf eine infektiöse Pneumonie vorhanden (JOHNSON & FALES,



2001). PEETERS und Mitarbeiter (2000) zeigten in 87 % der bakteriologischen BALF-Kulturen von Hunden mit chronischer Bronchitis ein positives Kulturresultat nach Anreicherung. Die quantitativen Keimzahlen blieben aber in allen Fällen unterhalb der von den Autoren definierten Grenze für eine bakterielle Infektion ( $1,7 \times 10^3$  CFU/ml) (PEETERS et al., 2000). Außerdem ist die nicht zu unterschätzende Kontaminationsgefahr während der Probengewinnung zu berücksichtigen und bei der Interpretation kultureller Befunde in Betracht zu ziehen (RHA & MAHONY, 1999). Von einer tatsächlichen bakteriellen Infektion der Atemwege ist demnach nur dann auszugehen, wenn neben der Kultivierung von potentiell pathogenen Bakterien in relevanter Keimzahl auch der zytologische Nachweis einer septischen suppurativen Entzündung mit intrazellulären Bakterien gelingt (HAWKINS et al., 1995; PEETERS et al., 2000; JOHNSON & FALES, 2001).

### **3.1. Antibiotische Wirkstoffe**

Eine Reihe verschiedener Antibiotika steht zur Therapie von bakteriellen Infektionen der Atemwege bei Hunden zur Verfügung. Gängige antibiotische Wirkstoffe entstammen den Klassen der Beta-Laktam-Antibiotika, Tetracykline, Aminoglykoside und Fluorchinolone. Außerdem werden nach wie vor Folsäurehemmer und Chloramphenicol zur Therapie eingesetzt (BOOTHE, 1997).

Bei der Auswahl eines antibiotischen Wirkstoffes zur Behandlung von Infektionen des Respirationstrakts sind neben der Empfänglichkeit der vorhandenen Pathogene verschiedene pharmakokinetische (Anreicherung und Verteilung im Respirationstrakt) und pharmakodynamische (antimikrobielle Aktivität am Ort des Infektionsgeschehens) Aspekte zu berücksichtigen (OLSEN, 2000; CLARKE, 2006). Die Wirksamkeit einer Therapie hängt in hohem Maße von der Möglichkeit ab, eine adäquate Wirkstoffkonzentration in respiratorischen Geweben und Sekreten zu erreichen und eine antimikrobielle Aktivität im Infektionsgebiet aufrechtzuerhalten (OLSEN, 2000). Des Weiteren ist in vielen Fällen von sekundären bakteriellen Pneumonien im Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung des Immunsystems eine bakterizide Therapie angezeigt, während in unkomplizierten Fällen mit einer funktionierenden immunologischen Abwehr eine bakteriostatische Therapie adäquat erscheinen mag (BOOTHE, 1997; OLSEN, 2000). Die meisten antibiotischen Wirkstoffe sind in der Lage, Wirkstoffkonzentrationen im Lungenparenchym zu erreichen, die mit den

Konzentrationen im Serum vergleichbar sind. Die Wirkstoffspiegel in den Atemwegen und Bronchialsekreten sind jedoch in der Regel bedeutend niedriger (OLSEN, 2000). Die ausschlaggebenden physikalisch-chemischen Faktoren für die Verteilungseigenschaften sind das Proteinbindungsverhalten eines antibiotischen Wirkstoffes, seine Molekülgröße und Lipidlöslichkeit (OLSEN, 2000). Die Permeabilität kann durch eine Schwächung der Diffusionsbarriere im entzündeten Gewebe begünstigt werden, sinkt jedoch in der Folge durch die Wirkung der Therapie (OLSEN, 2000). Die Fähigkeit zur intrazellulären Anreicherung in bestimmten Zellen der immunologischen Abwehr (z. B. bei Fluorchinolonen) begünstigt ebenfalls die Akkumulation eines Wirkstoffes im Zielgewebe (HAWKINS et al., 1998; OLSEN, 2000).

### 3.1.1. Tetrazykline und Chloramphenicol

Tetrazykline und Chloramphenicol wirken durch eine Störung der bakteriellen ribosomalen Proteinsynthese bakteriostatisch und sollten deshalb nur bei Patienten eingesetzt werden, deren Immunsystem nicht in hohem Maße beeinträchtigt ist (BOOTHE, 1997; MCCARTER, 2005). Tetrazykline respektive Doxycyclin werden als initiale oder empirische Therapie bei Tracheobronchitis oder unkomplizierten Pneumonien von verschiedenen Autoren empfohlen. Aufgrund ihrer intrazellulären Aktivität werden diese Wirkstoffe auch zur Behandlung von primären Infektionen durch *B. bronchiseptica* und obligat intrazelluläre Pathogene eingesetzt (STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000; FORD, 2009b; SYKES, 2014c). Ihre Lipophilie erleichtert ihnen die Überwindung der Blut-Alveolar-Schranke (OLSEN, 2000). Tetrazykline haben eine gute *in-vitro*-Wirksamkeit gegenüber einer Anzahl an respiratorisch relevanten grampositiven und gramnegativen aeroben Bakterien (STONE & POOK, 1992; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Es bestehen allerdings auch Defizite in der Wirksamkeit gegenüber einigen relevanten Bakterien, insbesondere gegen gramnegative Bakterien aus der Familie *Enterobacteriaceae* sowie gegenüber Pseudomonaden (STONE & POOK, 1992; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Viele anaerobe Bakterien zeigen ein ausgeprägtes Resistenzverhalten gegenüber Tetrazyklinen (BOOTHE, 1990; BRAZIER et al., 2003). Gelegentlich treten beim Einsatz von Doxycyclin bei Hunden gastrointestinale Nebenwirkungen sowie eine Erhöhung der hepatischen Enzymaktivitäten auf (SCHULZ et al., 2011).

Aufgrund der Gefahr von bleibenden Zahnschmelzdefekten wird alternativ bei Jungtieren gelegentlich das ebenfalls lipophile Chloramphenicol empfohlen (STONE & POOK, 1992; BOOTHE, 1997). Chloramphenicol besitzt eine gute *in-vitro*-Wirksamkeit vor allem gegen grampositive, aber auch gegen einige gramnegative Bakterien (STONE & POOK, 1992; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Zusätzlich werden auch Anaerobier und intrazelluläre Bakterien erreicht (BOOTHE, 1990; OLSEN, 2000; BRAZIER et al., 2003). Chloramphenicol und Tetrazykline zeigen in gewissem Maße eine Wirksamkeit bei Infektionen mit Methicillin-resistenten Staphylokokken (BOND & LOEFFLER, 2012; PAPICH, 2013b). Bei Beteiligung von zellwandlosen Mykoplasmen hat sich ebenfalls der Einsatz von Tetrazyklinen oder Chloramphenicol bewährt und wird von verschiedenen Autoren empfohlen (CHALKER, 2005; GREENE & CHALKER, 2012). Chloramphenicol kann eine schwere Knochenmarksuppression bei Menschen und Tieren bewirken, weshalb die Verabreichung mit besonderer Vorsicht erfolgen sollte (BOOTHE, 1990; STONE & POOK, 1992; PAPICH, 2013b).

Bei bakteriellen Isolaten von Hunden mit Atemwegserkrankungen konnte für Chloramphenicol in den meisten Fällen ein besseres Wirkspektrum (bis über 80 % sensible Isolate) als für Doxycyclin (bis 70 % sensible Isolate) nachgewiesen werden. Insbesondere gegenüber grampositiven Bakterienspezies erwies sich Chloramphenicol als effektiver (HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992). Lediglich gegenüber *B. bronchiseptica* zeigten sich beide Antibiotika hochwirksam (bis zu 100 % sensible Isolate) (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013).

### 3.1.2. Beta-Laktam-Antibiotika

Die in der Tiermedizin relevanten Beta-Laktam-Antibiotika umfassen Penizilline und Cephalosporine. Diese bakteriziden Wirkstoffe greifen in die Zellwandsynthese von Bakterien ein. Je nach Wirkstoff sind sie gegen unterschiedlich breite Bakterienspektren wirksam (BOOTHE, 1997). Als Reserveantibiotikum kommt gelegentlich auch Imipenem (in Verbindung mit Cilastatin) aus der Klasse der Carbapeneme zum Einsatz, das im Sinne einer „Vier-Quadranten-Antibiose“ ein sehr breites Spektrum an grampositiven und gramnegativen aeroben und anaeroben Bakterien abdeckt (BOOTHE, 1990;

OLSEN, 2000; PRESCOTT et al., 2002; COHN, 2010). Aufgrund arzneimittelrechtlicher Vorschriften, der potentiell schweren Nebenwirkungen (Nephrotoxizität) und hohen Kosten ist der Einsatz in der Veterinärmedizin limitiert (BOOTHE, 1990; OLSEN, 2000; PAPICH, 2013b). Resistenzen gegen Beta-Laktam-Antibiotika bestehen vor allem bei Beta-Laktamase (Penicillinase, Cephalosporinase, Carbapenemase) bildenden Spezies, die zunehmend Bedeutung als resistente Keime erlangen (THEURETZBACHER, 1998; WITTE & MIELKE, 2003; BOOTHE, 2006; SCHMID, 2014). Eine Gegenstrategie besteht darin, Beta-Laktam-Antibiotika mit Beta-Laktamase-Inhibitoren zu kombinieren, z. B. Amoxicillin mit Clavulansäure, um auf diese Weise ein erweitertes Wirkspektrum zu erlangen (BOOTHE, 1997; THEURETZBACHER, 1998; MEALEY, 2001; WITTE & MIELKE, 2003; SCHMID, 2014). Penizilline und Cephalosporine zeigen in der Regel eine gute Verträglichkeit; allergische Reaktionen, wie in der Humanmedizin gefürchtet, werden bei Tieren selten beobachtet (BOOTHE, 1990). Allerdings ist die Anreicherung dieser hydrophilen Substanzen im entzündeten respiratorischen Gewebe und Bronchialschleim nicht optimal (BRAGA, 1991; BOOTHE, 1997; OLSEN, 2000).

Cephalosporine besitzen – je nach Generation – ein mehr oder weniger breites Wirkspektrum gegen grampositive, gramnegative und anaerobe Bakterien (STONE & POOK, 1992). Mit fortschreitender Generation nimmt die Stabilität gegenüber Beta-Laktamase und die Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien zu, verbunden mit geringen Einbußen bei der Wirksamkeit im grampositiven und anaeroben Spektrum (BOOTHE, 1997; SYKES & PAPICH, 2014). Eine Untersuchung der *in-vitro*-Wirksamkeit von Cephalosporinen der ersten Generation bei 30 Hunden mit Pneumonien zeigte in nur 63 % (19/30) der Fälle eine Empfänglichkeit der beteiligten Bakterien (HARPSTER, 1981). Allerdings waren 86 % (12/14) der Fälle, in denen ausschließlich grampositive Bakterien isoliert wurden, *in vitro* empfänglich. Von diesen sprachen auch 83 % (10/12) klinisch auf eine Therapie mit Chephaloridin und Cefalexin an. Aufgrund der guten Wirksamkeit gegen grampositive Spezies empfehlen die Autoren Cephalosporine der ersten Generation für den initialen Einsatz bis zum Vorliegen der Ergebnisse von bakteriologischen Kulturen und Resistenztests, wenn in respiratorischen Spülproben zytologisch ausschließlich grampositive Bakterien nachgewiesen werden (HARPSTER, 1981). Andere Autoren konnten ähnliche

oder sogar höhere *in-vitro*-Resistenzen gegenüber Cephalosporinen der ersten und zweiten Generation bei einer Vielzahl gramnegativer Isolate bestätigen (THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Im Gegensatz dazu wurde für Cephalosporine der dritten Generation eine bessere Wirksamkeit bei gramnegativen Isolaten – mit Ausnahme von *B. bronchiseptica* – nachgewiesen (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013).

Von den Penizillinen kommen vor allem die halbsynthetischen Aminopenizilline Amoxicillin und Ampicillin einzeln oder in Verbindung mit dem Beta-Laktamase-Hemmer Clavulansäure bei Hunden mit Atemwegsinfektionen zur Anwendung und besitzen dementsprechend ein variabel breites Wirkspektrum. Insbesondere Beta-Laktamase bildende Bakterien zeigen in vielen Fällen eine Resistenz gegenüber Ampicillin, während Amoxicillin-Clavulansäure ein erweitertes Wirkspektrum aufweist (BOOTHE, 1997; MEALEY, 2001). Bei Isolaten von Hunden mit unkomplizierten Atemwegserkrankungen waren in verschiedenen Studien *in-vitro*-Resistenzen – insbesondere bei Beteiligung von gramnegativen Bakterien – gegenüber Ampicillin/Amoxicillin (bis zu 60 % resistente Isolate) weit verbreitet. Amoxicillin-Clavulansäure hingegen zeigte *in vitro* ein verhältnismäßig günstiges Wirkspektrum gegenüber den meisten (bis über 90 %) grampositiven wie auch gramnegativen Bakterien (HARPSTER, 1981; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Penizilline besitzen außerdem eine ausgeprägte Wirksamkeit gegenüber anaeroben Bakterien (BOOTHE, 1990; ANGUS et al., 1997; OLSEN, 2000; BRAZIER et al., 2003).

### 3.1.3. Aminoglykoside

Aminoglykoside inhibieren die bakterielle Proteinsynthese und sind im Allgemeinen gegenüber gramnegativen Enterobakterien und einigen grampositiven Spezies wirksam (BOOTHE, 1997; OLSEN, 2000; MCCARTER, 2005). Obligate Anaerobier zeigen eine Resistenz gegenüber Aminoglykosiden (BOOTHE, 1990; ANGUS et al., 1997; PAPICH, 2013a), während die meisten Wildtyp-Isolate von *P. aeruginosa* und Methicillin-resistente Staphylokokken empfänglich für Aminoglykoside sind, insbesondere für Amikacin (BOND & LOEFFLER, 2012; PAPICH, 2013b).

Die bakteriziden Aminoglykoside Gentamicin und Amikacin erreichen zwar eine bessere Anreicherung in respiratorischen Geweben als Beta-Laktam-Antibiotika (OLSEN, 2000), aufgrund der erforderlichen langen Behandlungsdauer bei Pneumonien besteht aber das Risiko von nephrotoxischen und ototoxischen Nebenwirkungen (STONE & POOK, 1992; BOOTHE, 2006; PAPICH, 2013b). Hinzu kommt, dass bronchialer Schleim, Eiter und Zelldebris Aminoglykoside deaktivieren können (BRAGA, 1991; BOOTHE, 2006; PAPICH, 2013b). Alternativ kann Gentamicin *per inhalationem* zur Unterstützung einer systemischen antibiotischen Therapie eingesetzt werden, da es seine Wirkung auch topisch entfalten kann und bei dieser Art der Verabreichung weniger systemische Nebenwirkungen zu erwarten sind (COURT et al., 1985; BOOTHE, 1997; OLSEN, 2000; DATZ, 2003a; VIESON et al., 2012). Amikacin sollte als intravenöses Reserveantibiotikum schweren Fällen von nosokomialen Infektionen oder beatmungsbedürftigen Patienten vorbehalten bleiben (STONE & POOK, 1992; PRESCOTT et al., 2002; EPSTEIN et al., 2010). Bei Hunden mit respiratorischen Erkrankungen wurde *in vitro* eine Empfänglichkeit gegenüber Gentamicin bei bis zu 97 % der untersuchten Fälle festgestellt (HARPSTER, 1981; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012). Gramnegative Enterobakterien und Pasteurellen zeigten in einer kürzlich veröffentlichten Studie bei weniger als 10 % der getesteten Isolate *in-vitro*-Resistenzen gegen Gentamicin. Gegenüber Amikacin erwiesen sich außerdem weniger als 10 % der aus BALF-Kulturen von Hunden mit Atemwegsinfektionen isolierten *Pseudomonas* spp. als resistent (JOHNSON et al., 2013).

#### **3.1.4. Fluorchinolone**

Gyrasehemmer aus der Klasse der Fluorchinolone gelten als Breitbandantibiotika mit sehr guter Wirksamkeit gegenüber gramnegativen und variabler Wirksamkeit gegenüber grampositiven Spezies (STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000). Sie greifen in die bakterielle DNA-Replikation ein und entfalten dadurch ihre bakterizide Wirkung (BOOTHE, 1997; MCCARTER, 2005). Fluorchinolone sind lipophil und zeigen intrazelluläre Aktivität in Alveolarmakrophagen und Leukozyten, was ihre Anreicherung im Zielgewebe bei Infektionen des Respirationstrakts begünstigt (HAWKINS et al., 1998; BOOTHE et al., 2005; BOOTHE et al., 2009). Allerdings besitzen sie nur eine begrenzte Wirksamkeit

gegen Anaerobier (BOOTHE, 1990; ANGUS et al., 1997), wobei neuere Vertreter dieser Klasse, wie Pradofloxacin, ein breiteres Wirkspektrum und eine bessere anaerobe Aktivität aufweisen (SILLEY et al., 2007; SCHINK et al., 2013). Fluorchinolone im oberen Dosierungsbereich sind in einigen Fällen wirksam gegenüber Infektionen mit *P. aeruginosa*, die Wirksamkeit gegen resistente Enterobakterien ist jedoch deutlich eingeschränkt (PAPICH, 2013b).

Bei Hunden mit Atemwegserkrankungen isolierte Bakterien zeigten in Studien meist ein günstiges Resistenzspektrum gegenüber Fluorchinolonen (meist Enrofloxacin getestet) mit bis über 95 % sensiblen Isolaten (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). *In-vitro*-Resistenzen wurden vor allem bei Beteiligung von Pseudomonaden oder Enterobakterien oder bei Hunden mit Lungenversagen beobachtet (EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Bei Beteiligung von Mykoplasmen an respiratorischen Infektionen zeigen Gyrasehemmer ebenfalls Wirksamkeit, da ihre Wirkung nicht gegen die bakterielle Zellwandsynthese gerichtet ist, sondern auf einer Hemmung der Nukleinsäuresynthese beruht (JONES, 2002; GREENE & CHALKER, 2012). In einer Studie konnte jedoch nachgewiesen werden, dass bei respiratorischen Mischinfektionen mit Mykoplasmenbeteiligung bei Hunden kein Zusammenhang zwischen einer klinischen Besserung der Patienten und dem Einsatz von Antibiotika bestand, die bekanntermaßen gegen Mykoplasmen wirksam sind (JAMESON et al., 1995).

Als Nebenwirkung einer Behandlung mit Fluorchinolonen können chondrotoxische Effekte an immaturren Gelenkknorpeln auftreten (STAHLMANN & LODE, 1999; LEES, 2013). Aus diesem Grund sollte ihr Einsatz bei jungen Hunden, vor allem bei Welpen großwüchsiger Rassen in der Wachstumsphase, und bei trächtigen Hündinnen vermieden werden (PLUMB, 2008).

### **3.1.5. Folsäurehemmer**

Mit Trimethoprim potenzierte Sulfonamide besitzen eine gute Wirksamkeit gegenüber verschiedenen grampositiven und einigen gramnegativen Bakterien, eignen sich jedoch kaum zur Bekämpfung von anaeroben Infektionen (BOOTHE, 1990; STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000). Der Wirkmechanismus beider bakteriostatischer Wirkstoffe beruht auf der Hemmung des mikrobiellen

Folsäuremetabolismus (Vitamin B9) und wirkt in Kombination bakterizid (BOOTHE, 1997; MCCARTER, 2005). Die Anreicherung in respiratorischen Geweben ist unterschiedlich; während Trimethoprim gut in Bronchialsekrete diffundiert, ist die Anreicherung von Sulfonamiden aufgrund des ausgeprägten Protein-Bindungs-Verhaltens wesentlich geringer (OLSEN, 2000).

Die Wirksamkeit von potenzierten Sulfonamiden gegenüber den bei Hunden mit Erkrankungen der Atemwege isolierten Bakterien wurde in verschiedenen Studien als vergleichsweise gering angegeben. Hier bestanden *in-vitro*-Resistenzen bei bis zu einem Drittel der Isolate (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Eine geringe Wirksamkeit bestand überwiegend gegenüber gramnegativen Bakterien, darunter bis zu 80 % resistente Isolate von *B. bronchiseptica*, während grampositive Isolate in einigen Untersuchungen deutlich empfänglicher waren (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013).

### **3.2. Allgemeine antibiotische Therapieempfehlungen**

Empfehlungen zur initialen empirischen Therapie von bakteriellen Pneumonien bei Hunden finden sich bei verschiedenen Autoren. Bei Tracheobronchitis mit vermuteter bakterieller Beteiligung und bei unkomplizierten Pneumonien wird häufig eine Monotherapie mit Cephalosporinen oder Sulfonamid/Trimethoprim empfohlen (STONE & POOK, 1992; KING, 1997; BRADY, 2004; FORD, 2009b; COHN, 2010; LEE-FOWLER & REINERO, 2012). Alternativ können Doxycyclin, Amoxicillin-Clavulansäure oder Fluorchinolone eingesetzt werden (STONE & POOK, 1992; KING, 1997; BRADY, 2004; FORD, 2009b; COHN, 2010; FORD, 2012; LEE-FOWLER & REINERO, 2012; SYKES, 2014c). Bei Beteiligung von *B. bronchiseptica* wird häufig zur Gabe von Doxycyclin geraten (FORD, 2009a, 2012; SYKES, 2014b). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *B. bronchiseptica* allgemein ein günstiges Resistenzverhalten gegenüber gängigen antimikrobiellen Wirkstoffen wie Tetrazykline und Amoxicillin-Clavulansäure aufweist (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; SPEAKMAN et al., 2000; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Eine ähnlich hohe *in-vitro*-Wirksamkeit gegenüber *B. bronchiseptica* wird in einigen Studien für Enrofloxacin beschrieben (SPEAKMAN et al., 2000; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012), während andere



Autoren höhere Resistenzraten nachweisen konnten (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013).

Bei kritisch kranken Patienten oder Hunden mit Aspirationspneumonien erscheint eine empirische Therapie mit einer Kombination aus Antiinfektiva verschiedener Wirkstoffklassen zur Abdeckung eines breiten grampositiven und gramnegativen aeroben wie anaeroben Spektrums angezeigt (ROZANSKI & RONDEAU, 2002; TART et al., 2010). Grundsätzlich ist bei der Kombination von verschiedenen Wirkstoffen einerseits darauf zu achten, dass bakteriostatische nicht mit bakteriziden Wirkstoffen kombiniert werden (BOOTHE, 1990; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). Andererseits sollten die kombinierten Wirkstoffe unterschiedliche bakterielle Zielstrukturen aufweisen, um eine synergistische Wirkung zu ermöglichen (BOOTHE, 2006; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). In lebensbedrohlichen Fällen wird von verschiedenen Autoren der parenterale Einsatz einer Kombination aus Beta-Laktam-Antibiotika mit Fluorchinolonen oder Aminoglykosiden empfohlen (STONE & POOK, 1992; KING, 1997; BRADY, 2004; DOWLING, 2009; FORD, 2009b; COHN, 2010; LEE-FOWLER & REINERO, 2012; SYKES, 2014b, 2014c).

Sobald die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchungen (Erregeridentifizierung und Resistenztests) vorliegen, sollte die Therapie gegebenenfalls entsprechend angepasst und fortgeführt werden (STONE & POOK, 1992; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). Dies beinhaltet eine Anpassung der anfänglich begonnenen empirischen Therapie – mit in der Regel breitem Wirkspektrum – hin zu einer spezifischen Therapie mit einem nach *in-vitro*-Sensibilitätsprüfung möglichst schmal wirksamen Antibiotikum (SCHWARZ et al., 2001; SYKES, 2014c).

Liegt ein Verdacht auf oder ein Nachweis von einer Beteiligung anaerober Bakterien vor, hat sich der Einsatz von Amoxicillin-Clavulansäure, Ampicillin, Chloramphenicol, Clindamycin oder Metronidazol als Bestandteil einer kombinierten antibiotischen Therapie bewährt (BOOTHE, 1990; ANGUS et al., 1997; OLSEN, 2000). Da die Kultivierung von Anaerobiern aufwändig ist und Resistenztests nur in begrenztem Maße möglich sind, muss hierbei häufig auf empirische Empfehlungen im Rahmen einer „Vier-Quadranten-Antibiose“ zurückgegriffen werden (BOOTHE, 1990; OLSEN, 2000).

PROULX und Mitarbeiter (2014) zeigten bei 111 Hunden mit klinisch diagnostizierten bakteriellen Pneumonien, dass nach Probenentnahme mittels trachealer Spülung in 26 % der Fälle mindestens eines der kultivierten Isolate gegen die vorab nach empirischen Gesichtspunkten ausgewählten antibiotischen Wirkstoffe Resistenzen aufwies. Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, dass eine empirische Therapie mit Antibiotika in vielen Fällen nicht adäquat ist. Andererseits konnte in der Studie kein Zusammenhang zwischen empirisch ausgewählten Antibiotika und Länge des stationären Aufenthalts oder Mortalität nachgewiesen werden (PROULX et al., 2014). Dies lässt einen nachträglichen Wechsel zu anderen Wirkstoffen aufgrund der Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung bei klinischem Ansprechen des Patienten fraglich erscheinen, da sich eine *in-vitro*-Resistenz möglicherweise *in vivo* nicht bestätigt (RICHTER et al., 2006; PROULX et al., 2014).

### 3.3. Resistenzproblematik

Zunehmend auftretende Resistenzen bei bakteriellen Pathogenen betreffen sowohl die Human- als auch die Veterinärmedizin und sind als weltweites Problem anzusehen (SCHWARZ et al., 2001; AUTHIER et al., 2006; CLARKE, 2006; WEESE, 2008; HAWKEY & JONES, 2009; WORLD HEALTH ORGANISATION, 2012). Einen besonderen Stellenwert nehmen multiresistente Bakterien und Resistenzen bei Patienten mit nosokomialen Infektionen ein (OGEER-GYLES et al., 2006; BLACK et al., 2009; HAWKEY & JONES, 2009). Sowohl landwirtschaftliche Nutztiere als auch Haustiere können als Reservoir für resistente Bakterienstämme und bakterielle Resistenzgene fungieren und eine Quelle für humanmedizinisch bedeutsame Resistenzen darstellen (SCHWARZ et al., 2001; PRESCOTT et al., 2002; GUARDABASSI et al., 2004; MORLEY et al., 2005; CLARKE, 2006).

Antibiotikaresistenzen treten verstärkt dort auf, wo antimikrobielle Wirkstoffe ungezielt eingesetzt werden. Vor allem die prophylaktische Gabe von Antibiotika ist – von besonderen Ausnahmen abgesehen – abzulehnen (SCHWARZ et al., 2001; AUTHIER et al., 2006; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). Der steigende Einsatz von Antibiotika führt zu einem Selektionsdruck auf die residente Mikroflora, der in der zunehmenden Etablierung von resistenten Stämmen mündet (SCHWARZ et al., 2001; PRESCOTT et al., 2002; BOOTHE, 2006; CLARKE, 2006; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). Umgekehrt

scheint ein rückläufiger Einsatz von bestimmten Antiinfektiva zu einer Entspannung der Resistenzlage bezüglich dieser Wirkstoffe zu führen (PRESCOTT et al., 2002). Besonders bei unzureichend langer, wiederholter oder überlanger Verabreichung oder der Applikation von subtherapeutischen Dosen ist ein Auftreten von resistenten Erregern zu erwarten (BOOTHE, 2006; CLARKE, 2006; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). Eine antimikrobielle Therapie sollte demnach immer nach strenger Indikationsstellung und nur bei Vorhandensein einer bakteriellen Infektion (nicht Besiedelung) mit einem optimal dosierten Wirkstoff erfolgen, der ein für die vorliegende Indikation möglichst schmales aber ausreichend breites Spektrum abdeckt. Die Antibiotikagabe sollte so kurz wie möglich, aber ausreichend lange durchgeführt werden (PRESCOTT et al., 2002; CLARKE, 2006; BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010). Hierzu sind die Ergebnisse von bakteriologischen Untersuchungen und Resistenztests, idealerweise mit der Berücksichtigung von minimalen Hemmkonzentrationen, heranzuziehen (SCHWARZ et al., 2003; CLARKE, 2006).

Antibiogramme sind besonders hilfreich bei Bakterien, die einer zunehmenden Resistenzentwicklung unterliegen. Hierzu zählen viele der potentiell pathogenen Spezies im Respirationstrakt bei Hunden, darunter Vertreter von Enterobakterien, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. und *Enterococcus* spp. (AUTHIER et al., 2006; CLARKE, 2006; JORGENSEN & FERRARO, 2009; PAPICH, 2013a). Für eine adäquate empirische antibiotische Therapie ist es demnach nicht allein ausreichend, das am häufigsten im Respirationstrakt von veterinärmedizinischen Patienten nachweisbare Keimspektrum zu kennen. Vielmehr müssen auch Erkenntnisse über das Resistenzspektrum dieser Isolate beachtet werden (EPSTEIN et al., 2010). In besonderem Maße ist dies für gramnegative Spezies der Familien *Enterobacteriaceae* und *Pseudomonadaceae* von Nöten, die ein hohes Maß an intrinsischer Resistenz und eine Zunahme von multipel resistenten Isolaten aufweisen (HANCOCK & SPEERT, 2000; EPSTEIN et al., 2010; OLIVARES et al., 2013).

Für *E.-coli*-Isolate aus BALF von Hunden mit Atemwegserkrankungen, die im Zeitraum von 2004 bis 2009 in einem deutschen Universitätsklinikum gewonnen wurden, konnte eine Zunahme der *in-vitro*-Resistenz gegenüber mehreren Antibiotika verglichen mit den Jahren 1999/2000 nachgewiesen werden (STEINFELD et al., 2012). Eine zunehmende Verschärfung der

Resistenzsituation wurde in den letzten Jahren im Rahmen des nationalen Resistenzmonitorings für tierpathogene Bakterien (GERM-Vet) auch bei Bakterien, die von anderen Organsystemen und anderen Tierarten stammten, festgestellt (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2014).

Des Weiteren gelten zunehmend auftretende Methicillin-resistente Isolate von *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) als resistent gegenüber sämtlichen Penizillinen, Cephalosporinen und Carbapenemen sowie gegenüber Kombinationen aus Beta-Laktam-Antibiotika und Beta-Laktamase-Inhibitoren. Zudem zeigen viele MRSP-Isolate zusätzliche multiple Resistenzen gegenüber anderen Wirkstoffklassen (CLARKE, 2006; WEESE, 2008; BOND & LOEFFLER, 2012). Ähnlich verhält es sich mit Extended-Spektrum Beta-Laktamase (ESBL) bildenden Enterobakterien (THEURETZBACHER, 1998; WITTE & MIELKE, 2003; BRENNER-MICHAEL et al., 2014). JOHNSON und Mitarbeiter (2013) konnten bei 105 Hunden mit Infektionen der unteren Atemwege zwar keine MRSP-Isolate nachweisen, wohl aber multiresistente Isolate von *Pseudomonas* spp.. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen der BfT-GermVet Studie in den Jahren 2004 bis 2006 unter 57 Isolaten von *Staphylococcus* spp. aus dem Respirationstrakt von akut kranken Hunden und Katzen ein canines Isolat kulturell und mittels PCR als MRSP identifiziert (SCHWARZ et al., 2007a; SCHWARZ et al., 2008). In derselben Studie wurde unter 228 *E.-coli*-Isolaten auch ein ESBL bildendes Isolat aus dem Respirationstrakt eines Hundes mit Pneumonie isoliert (SCHINK et al., 2011; BRENNER-MICHAEL et al., 2014).

EPSTEIN und Mitarbeiter (2010) zeigten, dass Hunde und Katzen mit beatmungspflichtigem Lungenversagen ein anderes Keimspektrum und Resistenzverhalten aufweisen als Hunde mit unkomplizierten respiratorischen Erkrankungen. Die bakteriellen Isolate von respiratorischen Proben wiesen in der Gruppe mit ventilationsbedürftigen Patienten signifikant häufiger Resistenzen gegenüber routinemäßig eingesetzten Antibiotika auf. Lediglich die Reserveantibiotika Amikacin und Imipenem waren in den beiden verglichenen Patientengruppen bei über 90 % der Tiere wirksam (EPSTEIN et al., 2010). Patienten mit schwerwiegenden Lungenproblemen, die einer Beatmung bedurften, waren außerdem häufiger mit Antibiotika vorbehandelt als die Patienten der

Kontrollgruppe, was die Resistenzsituation der Patienten beeinflusst haben dürfte (EPSTEIN et al., 2010). Eine antimikrobielle Vorbehandlung zum Zeitpunkt der Probenentnahme scheint zwar die Isolation von Bakterien aus dem Respirationstrakt nicht prinzipiell unmöglich zu machen (PEETERS et al., 2000; EPSTEIN et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; SCHULZE & RAHILLY, 2012b), hat jedoch einen Einfluss auf die Empfänglichkeit der isolierten Bakterienspezies. PROULX und Mitarbeiter (2014) zeigten in einer kürzlich veröffentlichten Studie über die *in-vitro*-Resistenzen von Isolaten aus Trachealspülproben von 111 Hunden mit klinisch verifizierten bakteriellen Pneumonien, dass im Falle einer antibiotischen Vorbehandlung in über der Hälfte der Fälle bereits *in-vitro*-Resistenzen gegen die in einem Zeitraum von 4 Wochen vor Beprobung verabreichten Wirkstoffe nachweisbar waren. Die Autoren folgerten aus diesen Ergebnissen, dass diese vorab bereits verabreichten Wirkstoffe bei Hunden zur empirischen Behandlung von Pneumonien – wie auch in der Humanmedizin empfohlen (MANDELL et al., 2007) – vermieden werden sollten (PROULX et al., 2014).

### III. PUBLIKATION

#### ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY OF BACTERIAL ISOLATES FROM 502 DOGS WITH RESPIRATORY SIGNS

**M. Rheinwald**<sup>1</sup>,

**K. Hartmann**<sup>1</sup>, Professor, Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA

**M. Hähner**<sup>1</sup>,

**G. Wolf**<sup>2</sup>, Dr. med. vet.

**R. K. Straubinger**<sup>2</sup>, Professor, Dr. med. vet., Ph.D.

**B. Schulz**<sup>1</sup>, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich,  
Veterinärstraße 13, 80539 München, Germany

<sup>2</sup>Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig Maximilian University of  
Munich, Veterinärstraße 13, 80539 München, Germany

**Veterinary Record**, veröffentlicht Dezember 2014 (online)

Doi: 10.1136/vr.102694

## Paper

# Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from 502 dogs with respiratory signs

M. Rheinwald, K. Hartmann, M. Hähner, G. Wolf, R. K. Straubinger, B. Schulz

The aim of this study was to investigate the prevalence of bacterial species isolated from bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples taken from dogs with respiratory signs and to determine their antibiotic susceptibility. Clinical cases were included in the study if they showed signs of respiratory disease and data relating to bacterial culture and susceptibility of BALF samples were available. The medical records of 493 privately owned dogs that were presented between January 1989 and December 2011 were evaluated retrospectively. In 35 per cent of samples, no bacteria were cultured. Bacteria isolated from culture-positive samples included *Streptococcus* species (31 per cent of positive cultures), Enterobacteriaceae (30 per cent, including *Escherichia coli* (15 per cent)), *Staphylococcus* species (19 per cent), *Pasteurella* species (16 per cent) and *Pseudomonas* species (14 per cent). *Bordetella bronchiseptica* as a primary respiratory pathogen was isolated in 8 per cent of cases. Enrofloxacin showed the best susceptibility pattern; 86 per cent of all isolates and 87 per cent of Gram-negative bacteria were susceptible to this antibiotic. Amoxicillin/clavulanic acid yielded the best susceptibility pattern in Gram-positive bacteria (92 per cent). Therefore, these antibiotics can be recommended for empirical or first-line treatment in dogs with bacterial lower respiratory tract infections.

### Introduction

Infections of the lower respiratory tract are common in dogs presented to veterinary practices. Besides primary pathogenic bacteria such as *Bordetella bronchiseptica* and *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (Vieson and others 2012), many different bacterial species can cause secondary infections of the lower respiratory tract (Harpster 1981, Thayer and Robinson 1984, Jameson and others 1995, Peeters and others 2000). These opportunistic infections are induced by a range of factors, such as viral or parasitic infection, inflammation, trauma, aspiration, neoplasia, anomalies, systemic immunodeficiency or any other cause of impaired local defence mechanisms (Cohn and Reiner 2007, Vieson and others 2012).

Although treatment should aim to solve the underlying problem if possible, controlling the infectious component is an important part of therapy (Vieson and others 2012). It is therefore important to identify the bacterial species involved and use antimicrobials to which the microbes present are most likely

susceptible (Thayer and Robinson 1984, Lee-Fowler and Reiner 2012). However, in cases in which bacterial culture and susceptibility testing cannot be conducted or for first-line treatment in emergency situations, selection of antimicrobial agents must be based on empirical data on bacterial prevalence and antibiotic susceptibility (Ford 2009). In a previous study that looked at samples of transtracheal aspirates in dogs with respiratory signs, bacteria isolated most frequently were Enterobacteriaceae (Angus and others 1997); however, a more recent study investigating bacteria present in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of dogs with respiratory signs in Germany revealed *Pasteurella* species and *B. bronchiseptica* as the two predominant species (Steinfeld and others 2012). In contrast to that, a study analysing data from dogs with confirmed bacterial lower respiratory tract infection detected *Mycoplasma* species in almost one-third of bacterial cultures (Johnson and others 2013). Bacterial species for which there were a high proportion of resistant isolates identified in earlier studies include *Escherichia coli* and *Pseudomonas* species (Angus and others 1997, Steinfeld and others 2012, Johnson and others 2013). The severity of respiratory disease and the types of antimicrobials that have been administered recently should also be taken into account when considering empirical antibiotic treatment. Epstein and others (2010) showed that animals with severe respiratory disease needing positive pressure ventilation were more likely to be infected with Gram-negative enteric bacteria. Additionally, isolates from patients with respiratory failure were less susceptible to commonly used antibiotics in that study (Epstein and others 2010). A recent study by Proulx and others (2014) showed that dogs with bacterial pneumonia frequently harboured bacteria that were resistant to antimicrobials administered during a 4-week period before tracheal wash sampling.

There are currently few published studies investigating the bacteria involved in canine lower respiratory tract infection and

Veterinary Record (2014)

doi: 10.1136/vr.102694

**M. Rheinwald**, DVM,  
**K. Hartmann**, Professor, Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA,  
**M. Hähner**, DVM,  
**B. Schulz**, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA,  
 Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University of Munich, Veterinaerstrasse, 13, Muenchen 80539, Germany  
**G. Wolf**, Dr. med. vet.,  
**R. K. Straubinger**, Professor, Dr. med.

vet., Ph.D.,  
 Institute for Infectious Diseases and Zoonoses, Ludwig Maximilian University of Munich, Veterinaerstrasse, 13, Muenchen 80539, Germany  
 E-mail for correspondence: M.Rheinwald@medizinische-kleintierklinik.de  
 Provenance: not commissioned; externally peer reviewed  
 Accepted November 13, 2014



## Paper

their susceptibility to common antibiotics in a large cohort of dogs. Therefore, the aim of the present study was to describe the distribution of bacteria isolated from the lower airways of a large number of dogs with respiratory signs, as well as their antibiotic susceptibility.

### Materials and methods

#### Patient population

The medical records of 493 privately owned dogs that were presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the University of Munich, Germany, between January 1989 and December 2011 were evaluated retrospectively. Dogs were included in the study if they were presented with clinical signs indicating a respiratory problem, and if results of an aerobic bacterial culture obtained from BALF were available. For inclusion, patients had to display one or more of the following clinical signs: nasal discharge (89 dogs), coughing (350), dyspnoea/tachypnoea (132) or abnormal findings on auscultation of the lungs (250). Patients with suspected or confirmed heart failure, pleural effusion and neoplasia as potential causes of respiratory signs were excluded. No information about previously administered antibiotic drugs or cytology results of BALF samples was available in most cases. Cases in which BALF cytology results indicated oropharyngeal contamination by the presence of *Simonsiella* species or squamous epithelial cells were excluded.

The dogs were aged between eight weeks and 16 years (median six years, data from 497 cases available). Information about sex and breed was recorded for 498 patients. There were 252 male dogs (50.6 per cent) and 246 female dogs (49.4 per cent). Of the 108 different breeds represented, the most common were 113 crossbreed dogs (22.7 per cent), 46 dachshunds (9.2 per cent), 29 German shepherd dogs (5.8 per cent), 18 poodles (3.6 per cent) and 16 Yorkshire terriers (3.2 per cent).

#### Sample collection

Samples were collected endoscopically from the lower respiratory tract under general anaesthesia. Samples were obtained through the working channel of the endoscope. For bronchoscopic examination of the respiratory tract and sampling, different endoscope models with different diameters appropriate to the patient's size were used. For sampling 1–2 ml/kg sterile isotonic saline solution (0.9 per cent sodium chloride) were delivered through the working channel followed by immediate suction. Recovered BALF was collected in a sterile tube and submitted for microbiological examination.

#### Bacteriological examination

A total of 502 BALF samples from 493 patients (nine patients were presented and sampled twice) were submitted for microbiological examination and antibiotic susceptibility testing. Aerobic bacterial cultivation was performed on different nutrient agars. For detection of bacteria of the family Enterobacteriaceae, agar-agar, sheep blood agar and Gassner/Rambach agar (Rambach agar since 1994) were used. In addition, colistin–nalidixic acid agar was used for selective culturing of Gram-positive bacteria and Bordet–Gengou agar (since 2005) for the selective detection of *B bronchiseptica*. Plates were incubated at 37°C under aerobic conditions and examined after 24 and 48 hours, followed by biochemical differentiation if necessary. Colonies that needed subcultivation were excluded if contamination was suspected.

#### Susceptibility testing

The agar disc diffusion method was used to test antimicrobial susceptibility. Samples of isolated bacteria were placed onto Mueller–Hinton agar, and several discs impregnated with defined amounts of antibiotic agents were placed onto the nutrient agar. During incubation, antibiotics built zones of inhibition of bacterial growth that were measured and compared with standardised limits corresponding to current Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI). According to the diameter of the inhibitory zones, bacteria were classified as 'susceptible',

'intermediate' or 'resistant' to a certain antibiotic. For interpretation of antibiotic susceptibility, intermediate isolates were considered resistant. Susceptibility test panels varied because of the large timespan. For analysis, antibiotic agents that are commonly used in small animal practice (including enrofloxacin, gentamicin, first-generation cephalosporins, ampicillin/amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, sulphonamides with trimethoprim, cefotaxime and doxycycline) were selected and the antibiotic susceptibility of the most frequently isolated bacteria was evaluated for these antimicrobials.

#### Statistical analysis

A two-tailed Fisher's exact test was performed using QuickCalcs (GraphPad Software Inc, La Jolla, California, USA) for evaluation of antibiotic resistance.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

### Results

#### Bacterial isolates

Of the 493 dogs included in the study, culture results of 502 samples were available for analysis. In 176 samples, no bacteria were cultured (35.1 per cent). A single bacterial species was isolated in 172 samples (34.3 per cent); two or more bacterial species were isolated in 154 samples (30.7 per cent). Gram-negative and Gram-positive species were co-cultured in 32.2 per cent (105/326) of all positive samples; Gram-positive and Gram-negative species were cultured separately in 19.9 per cent (65/326) and 44.5 per cent (145/326) of all samples, respectively. All isolated bacterial species and their detection rates are displayed in Table 1.

TABLE 1: Bacterial isolates cultured from 502 lower respiratory tract samples (bronchoalveolar lavage fluid) of 493 dogs with respiratory signs

Bacterial species	Numbers of isolates	Percentage of all samples (n=502)	Percentage of positive samples (n=326)
Negative samples	176	35.1	
<i>Streptococcus</i> species	100	19.9	30.7
Enterobacteriaceae	97	19.3	29.8
<i>Escherichia coli</i>	48	9.6	14.7
<i>Klebsiella</i> species	15	3.0	4.6
<i>Enterobacter</i> species	11	2.2	3.4
<i>Proteus</i> species	3	0.6	0.9
<i>Serratia</i> species	2	0.4	0.6
<i>Citrobacter</i> species	2	0.4	0.6
Unspecified			
Enterobacteriaceae	16	3.2	4.9
<i>Staphylococcus</i> species	61	12.2	18.7
<i>Pasteurella</i> species	52	10.4	16.0
<i>Pseudomonas</i> species*	47	9.4	14.4
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	26	5.2	8.0
<i>Micrococcus</i> species	21	4.2	6.4
<i>Corynebacterium</i> species	18	3.6	5.5
<i>Acinetobacter</i> species	13	2.6	4.0
<i>Achromobacter</i> species	13	2.6	4.0
<i>Mycoplasma</i> species	11	2.2	3.4
Other bacteria†	18	3.6	5.5
Gram-negative bacteria (unclassified)‡	37	7.4	11.3
Gram-positive bacteria (unclassified)‡	27	5.4	8.3
Unclassified mixed bacteria‡	16	3.2	4.9

\* Contains 19 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*

† Includes 11 different species isolated three times or less: *Flavobacterium* species (3), *Moraxella* species (2), *Myroides* species (2), *Oligella urethralis* (2), *Sphingomonas paucimobilis* (2), *Neisseria* species (2), *Agrobacterium radiobacter* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (1), *Actinomyces* species (1), *Brevundimonas vesicularis* (1) and *Rhodococcus erythropolis* (1).

‡ Includes bacteria that were not further specified and that do not belong to one of the listed bacterial families



The most frequently isolated bacterial species were *Streptococcus* (30.7 per cent of all positive samples) and *Staphylococcus* (18.7 per cent), followed by *Pasteurella* (16.0 per cent) and *Pseudomonas* (14.4 per cent). *B. bronchiseptica* was detected in 8.0 per cent of all positive samples. Gram-negative rods of the family Enterobacteriaceae were detected in 29.8 per cent of positive samples, including 48 *E. coli* isolates (14.7 per cent of positive samples).

#### Bacterial susceptibility

Antibiotic susceptibilities of the most commonly isolated bacteria are displayed in Table 2. Most isolates (85.7 per cent) were susceptible to enrofloxacin, as well as 86.8 per cent of Gram-negative bacteria. However, only 82.6 per cent of Gram-positive isolates were susceptible to enrofloxacin. With 91.9 per cent and 85.9 per cent susceptible Gram-positive bacteria, amoxicillin/clavulanic acid and the first-generation cephalosporins showed a better susceptibility pattern concerning Gram-positive isolates, respectively. Because of the lower proportion of Gram-negative species susceptible to amoxicillin/clavulanic acid (59.0 per cent) and first-generation cephalosporins (60.0 per cent), only a moderate proportion of all isolates were susceptible to these antibiotics (68.0 per cent and 73.2 per cent, respectively). The third-generation cephalosporin cefotaxime was tested only three times against Gram-positive isolates; therefore, results for this antibiotic against Gram-positive bacteria cannot be interpreted. Furthermore, the proportion of isolates susceptible to a combination of the two most potent antimicrobials against Gram-positive and Gram-negative species were calculated. Of all isolates, 89.8 per cent were susceptible to enrofloxacin in combination with amoxicillin/clavulanic acid, whereas 93.0 per cent of Gram-positive isolates and 88.6 per cent of Gram-negative isolates were susceptible to this combination of antimicrobials.

The proportion of Gram-negative isolates susceptible to enrofloxacin, as well as the proportion of all cultured bacteria susceptible to enrofloxacin, were significantly higher than the corresponding proportions of isolates susceptible to amoxicillin/clavulanic acid ( $P < 0.0001$ ). No significant difference could be detected in the proportion of Gram-positive isolates susceptible to amoxicillin/clavulanic acid compared with enrofloxacin ( $P = 0.1431$ ). In addition, no significant differences were detected between the combination of enrofloxacin and amoxicillin/clavulanic acid and enrofloxacin alone if the proportions of all susceptible isolates were compared ( $P = 0.1200$ ) as well as if the proportions of susceptible Gram-positive ( $P = 0.0604$ ) or Gram-negative species ( $P = 0.5780$ ) were compared.

During the earlier years (1989–1999), there was a significantly higher proportion of bacterial species susceptible to enrofloxacin compared with the later years (2000–2011) ( $P = 0.0061$ ). There was also a significantly higher proportion of *E. coli* isolates that were resistant to enrofloxacin in the later years ( $P = 0.0144$ ). No significant changes could be detected for the proportion of all isolates susceptible to amoxicillin/clavulanic acid, as well as for the proportion of *E. coli* isolates susceptible to amoxicillin/clavulanic acid between the timeframes.

#### Discussion

This study investigated detection rates of bacterial isolates in BALF in a large number of dogs over a period of 23 years, as well as their antibiotic susceptibility. Bacterial species most frequently isolated were *Streptococcus* species and *Staphylococcus* species. In contrast to that, a recently published German study determined *Pasteurella* species and *B. bronchiseptica* as the most common bacterial isolates in BALF from 84 dogs with respiratory signs (Steinfeld and others 2012). In an older study, the most prevalent species were *E. coli*, *Pasteurella* species and *Streptococcus* species (Angus and others 1997). There are several explanations for the differences in the detection rates between the two previous studies and this one. First, there might be differences in the dog populations studied. Although all three studies included dogs with suspected lower respiratory disease, the two previous

studies included much fewer cases. Because inclusion of patients was based on clinical signs and all three studies were designed retrospectively, it is impossible to distinguish between primary infectious and underlying non-infectious respiratory diseases that could influence the prevalence of bacterial isolates in the different investigations. Secondly, differences in the microbiological spectrum of the isolates could also be influenced by the different timeframes and different geographical locations in which the studies were carried out. In addition, information about antimicrobial treatment of dogs before sampling was not available for all three studies, but might have influenced bacterial detection rates and their antibiotic susceptibility.

In a recent study of bacterial isolates in the BALF of 105 dogs with confirmed lower respiratory tract infections, the most prevalent isolates in this study were *Mycoplasma* species and *B. bronchiseptica*; but *Pasteurella* species, Enterobacteriaceae and *Streptococcus* species were isolated frequently as well. However, only dogs with cytologically confirmed septic inflammation with intracellular bacteria in BALF were evaluated in that study, therefore including a different patient population than in the present study (Johnson and others 2013).

In this study, *B. bronchiseptica* was detected in 8 per cent of all positive samples and represented the only isolated species that is considered a primary pathogen in the lower respiratory tract of dogs (Thompson and others 1976, Bemis and others 1977b, Keil and Fenwick 1998). In contrast, Steinfeld and others (2012) detected *B. bronchiseptica* in 20 per cent of positive samples. This difference cannot be explained by the use of specific culture media, since these were not used in the previous investigation, in contrast to the present study, in which Bordet–Gengou agar was used as a selective *Bordetella* culture medium (since 2003). Higher isolation rates of *B. bronchiseptica* are to be expected in shelter dogs or dogs kept in large groups (Bemis and others 1977a, Chalker and others 2003, Radhakrishnan and others 2007). Therefore, variations in patient populations between the two studies might also have influenced the differences in detection rates of *B. bronchiseptica*. In the study investigating bacterial isolates in the BALF of dogs with confirmed lower respiratory tract infection, *B. bronchiseptica* was detected in 22 per cent of samples (Johnson and others 2013).

Johnson and others (2013) revealed that 57 per cent of dogs infected with *B. bronchiseptica* were co-infected with additional bacteria, which represents a higher number of co-infections than in the present study (38 per cent). One reason for this difference could be the fact that additional bacteria in the previous study were frequently *Mycoplasma* species (69 per cent, 9/13) (Johnson and others 2013). In contrast to that, *Mycoplasma* species were only isolated from 3 per cent (11/326) of samples positive for bacterial growth in the present study, which can be attributed to the lack of specific selection media necessary for cultivation of this organism (Chalker 2005).

In the second part of the study, in vitro susceptibility of frequently isolated bacteria was evaluated. While enrofloxacin showed the best susceptibility pattern against *Pasteurella* species (100 per cent) and Enterobacteriaceae except for *E. coli* (88 per cent) as well as a good susceptibility pattern against *B. bronchiseptica* (91 per cent), only moderate proportions of *E. coli* (73 per cent) and *Pseudomonas* species (72 per cent) were susceptible to enrofloxacin. This is similar to the results of Johnson and others (2013) except for low proportions of susceptible *Pseudomonas* species (<20 per cent) and *B. bronchiseptica* (<70 per cent) in that study. In contrast to the findings of the present study, Steinfeld and others (2012) found out that all *Pseudomonas* species (100 per cent) but only a low proportion of *E. coli* (29 per cent) were susceptible to enrofloxacin. Angus and others (1997) found a high proportion of *E. coli* isolates that were susceptible to enrofloxacin (92 per cent). However, data in that study were obtained over the time period 1989–1995, potentially reflecting a more favourable resistance situation during earlier years. In the present study, *E. coli* isolates cultured in earlier years were significantly more likely to be susceptible to enrofloxacin, indicating increasing resistance rates over time for this species.

Paper

**TABLE 2: Proportions of all isolated bacteria and most commonly cultured species (%) from bronchoalveolar lavage fluid of dogs with respiratory signs that were susceptible to selected antibiotics**

Antibiotics	Bacteria									
	Proportion of all isolates susceptible	Gram-positive bacteria	Gram-negative bacteria	Staphylococcus species	Streptococcus species	Pasteurella species	Escherichia coli (E coli)	Enterobacteriaceae (excluding E coli)	Pseudomonas species	Bordetella bronchiseptica
Enrofloxacin	85.7 (321)	82.6 (86)	86.8 (235)	92.2 (51)	63.0 (27)	100 (41)	72.5 (40)	87.5 (40)	71.8 (39)	91.3 (23)
Gentamicin	78.5 (330)	78.7 (89)	78.4 (241)	86.8 (53)	71.4 (28)	79.1 (43)	70.0 (40)	81.0 (42)	71.8 (39)	90.9 (22)
First-generation cephalosporins*	73.2 (153)	85.9 (78)	60.0 (75)	93.5 (46)	80.0 (25)	95.0 (20)	50.0 (6)	54.5 (11)	22.2 (9)	53.8 (15)
Amoxicillin-clavulanic acid †	68.0 (228)	91.9 (62)	59.0 (166)	91.7 (36)	95.0 (20)	97.3 (37)	39.1 (23)	50.0 (24)	12.1 (33)	100.0 (17)
Sulphonamides †-trimethoprim	60.2 (329)	64.8 (88)	58.5 (241)	67.9 (53)	59.3 (27)	97.7 (43)	47.5 (40)	59.5 (42)	23.7 (38)	17.4 (23)
Cefotaxime ‡	59.5 (79)	100 (3)	57.9 (76)	100 (2)	100 (1)	88.9 (18)	80.0 (10)	66.7 (9)	11.1 (18)	0.0 (7)
Doxycycline	58.5 (328)	49.4 (87)	61.8 (241)	51.9 (52)	44.4 (27)	86.0 (43)	27.5 (40)	47.6 (42)	34.2 (38)	100.0 (23)
Ampicillin/amoxicillin	44.0 (257)	61.6 (73)	37.0 (184)	50.0 (44)	76.2 (21)	96.3 (27)	32.4 (34)	14.3 (55)	3.3 (30)	38.5 (13)

The numbers of isolates tested are given in parentheses  
 \*Cefalexin was tested from 1992 to 2006, then replaced by cefalotin  
 †Amoxicillin/clavulanic acid was tested since 1995  
 ‡Cefotaxime was tested from 1999 to 2006

Furthermore, case numbers of these previous studies were lower and data were obtained over a shorter time period, potentially explaining differences in susceptibility data for enrofloxacin.

More than 90 per cent of Gram-positive bacteria were susceptible to amoxicillin/clavulanic acid. Data are comparable with previously published studies (Steinfeld and others 2012, Johnson and others 2013), taking into account that both studies tested only low numbers of Gram-positive bacteria for this antibiotic combination. Based on the data of the present study, the use of amoxicillin/clavulanic acid cannot be recommended for the treatment of Gram-negative bacteria with the exception of *B bronchiseptica* and *Pasteurella* species. In contrast to the resistance pattern shown for amoxicillin/clavulanic acid, non-potentiated ampicillin/amoxicillin cannot even be recommended for the empirical use against Gram-positive bacteria, since only a low proportion of isolated *Staphylococcus* species (50 per cent) and a moderate proportion of cultured *Streptococcus* species (76 per cent) were susceptible to this antimicrobial.

If a broad antibiotic coverage is indicated in a severely sick dog with a suspected lower respiratory tract infection, and airway sampling for culture and susceptibility testing is not possible or results are pending, the use of a combination of different antibiotic agents is recommended by some authors (Rozanski and Rondeau 2002, Brady 2004, Ford 2009, Cohn 2010, Lee-Fowler and Reiner 2012). However, the combination of the two most potent antibiotics in the present study, enrofloxacin and amoxicillin/clavulanic acid, revealed only a slight increase in the proportion of isolates susceptible to this combination (90 per cent) compared with the proportion of isolates susceptible to enrofloxacin alone (86 per cent), which was not significant.

No anaerobic cultivation was performed in this study. Since several studies have shown a significant anaerobic population in lower respiratory tract cultures (Angus and others 1997, Johnson and others 2013), additional anaerobic cultivation of samples should be considered in cases in which anaerobic bacterial infection is suspected. A recent study by Tenwolde and others (2010) revealed obligate anaerobic isolates in 48 per cent of cultures from dogs and cats with foreign body pneumonia. Since enrofloxacin has poor activity against anaerobic bacteria (Boothe 1990), this agent should not be administered for suspected or confirmed anaerobic infections.

Among the most frequently isolated bacteria, *Pseudomonas* species and *E coli* were associated with a poor susceptibility to commonly used antibiotics, which is in agreement with similar results obtained in previous studies (Angus and others 1997, Steinfeld and others 2012, Johnson and others 2013). Less than 35 per cent of the isolated *Pseudomonas* species were susceptible to  $\beta$ -lactam antibiotics, potentiated sulphonamides or doxycycline, whereas less than 50 per cent of all *E coli* isolates were susceptible to doxycycline, ampicillin/amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid or potentiated sulphonamides. The lowest grade of resistance was found in enrofloxacin and gentamicin. However, only moderate proportions of isolated *E coli* (73 per cent and 70 per cent, respectively) and *Pseudomonas* species (72 per cent for each antibiotic) were susceptible to these two antimicrobial agents. In particular, *Pseudomonas aeruginosa* is considered to be intrinsically resistant to several antibiotics (Olivares and others 2013). These organisms also showed a high level of resistance in several other studies investigating the susceptibility patterns of bacteria isolated from different locations other than the respiratory tract in small animals (Oluoch and others 2001, Clarke 2006).

Interestingly, only a low proportion of the majority of cultured bacteria was susceptible to doxycycline—a frequently used antibiotic for canine respiratory tract infections (Ford 2009, Schulz and others 2011)—with the exception of *B bronchiseptica* (100 per cent of isolates susceptible). In contrast to that, Steinfeld and others (2012) revealed a moderate proportion of *Staphylococcus* species and a high proportion of *Streptococcus* species that were susceptible to doxycycline, but had a low proportion of Gram-negative bacteria that were susceptible to this drug. Based



on these results, doxycycline is not recommended as an empirical treatment option for dogs with respiratory tract infection.

This study has several limitations. Due to the retrospective nature of this study, only limited clinical data were available for the dogs included, and BALF cytology results could not be obtained for most cases. In addition, quantification of bacterial isolates and cultivation of obligate anaerobic bacteria were not performed. Furthermore, no standardised protocol was used for the sampling and the processing of sampling material. Since inclusion was solely based on the presence of clinical signs, it was impossible to differentiate between animals with bacterial infection of the lower respiratory tract and patients with other respiratory tract diseases with bacterial colonisation or oropharyngeal contamination during the sampling process. For that purpose, it would have been necessary to include information regarding quantitative bacterial cultures and/or cytology results confirming suppurative inflammation or detection of intracellular bacteria (Peeters and others 2000, Johnson and others 2013). Most bacterial isolates detected in the present study have also been found in lower respiratory tract samples from healthy dogs, indicating that they can be part of the physiological bacterial microflora of the lower airways (Lindsey and Pierce 1978, McKiernan and others 1984, Bauer and others 2003). Therefore, positive bacteriological results should be interpreted with caution and alongside with other diagnostic findings to differentiate between bacterial infection and colonisation.

Due to the fact that there was no antibiotic all isolated bacterial species were fully susceptible for, antimicrobial treatment should be guided by BALF culture results and susceptibility testing, if possible. In daily clinical practice, BALF cytology, and possibly Gram-staining (Peeters and others 2000), might help to differentiate between Gram-positive bacteria and Gram-negative bacteria, and therefore aid in the choice of a suitable antibiotic agent. Based on the data presented here, enrofloxacin can be recommended as a first-line treatment in patients with suspected lower respiratory tract infections because of Gram-negative or unknown aerobic bacterial pathogens as long as results of bacteriological examination and susceptibility testing are pending. Amoxicillin/clavulanic acid can be chosen if infection with Gram-positive bacteria is suspected.

**Correction notice** This article has been corrected since it was published Online First. The corresponding e-mail address has been changed to M.Rheinwald@medizinische-kleintierklinik.de.

## References

- ANGUS, J. C., JANG, S. S. & HIRSH, D. C. (1997) Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989–1995). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **210**, 55–58
- BAUER, N., MORITZ, A. & WEISS, R. (2005) Comparison of bacterial growth in the upper and lower respiratory tract of healthy dogs. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* **31**, 92–98
- BEMIS, D. A., CARMICHAEL, L. E. & APPEL, M. J. (1977a) Naturally occurring respiratory disease in a kennel caused by *Bordetella bronchiseptica*. *The Cornell Veterinarian* **67**, 282–293
- BEMIS, D. A., GREISEN, H. A. & APPEL, M. J. (1977b) Pathogenesis of canine bordetellosis. *The Journal of Infectious Diseases* **135**, 753–762
- BOOTHE, D. M. (1990) Anaerobic infections in small animals. *Problems in Veterinary Medicine* **2**, 330–347
- BRADY, C. A. (2004) Bacterial pneumonia in dogs and cats. In *Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats*. Ed L. G. KING, Saunders. pp 412–421
- CHALKER, V. J. (2005) Canine mycoplasmas. *Research in Veterinary Science* **79**, 1–8
- CHALKER, V. J., TOOMEY, C., OPPERMAN, S., BROOKS, H. W., IBUOYE, M. A., BROWNLEE, J. & RYCROFT, A. N. (2003) Respiratory disease in kennelled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **10**, 352–356
- CLARKE, C. R. (2006) Antimicrobial resistance. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **36**, 987–1001

- COHN, L. A. (2010) Pulmonary parenchymal disease. In *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th edn. Ed S. J. ETTINGER, E. C. FELDMAN. Saunders. pp 1096–1119
- COHN, L. A. & REINERO, C. R. (2007) Respiratory defenses in health and disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **37**, 845–860
- EPSTEIN, S. E., MELLEMA, M. S. & HOPPER, K. (2010) Airway microbial culture and susceptibility patterns in dogs and cats with respiratory disease of varying severity. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **20**, 587–594
- FORD, R. B. (2009) Bacterial pneumonia. In *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. 14th edn. Ed J. D. BONAGURA, D. C. TWEDT. Saunders. pp 658–662
- HARPSTER, N. K. (1981) The effectiveness of the cephalosporins in the treatment of bacterial pneumonias in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* **17**, 766–772
- JAMESON, P. H., KING, L. A., LAPPIN, M. R. & JONES, R. L. (1995) Comparison of clinical signs, diagnostic findings, organisms isolated, and clinical outcome in dogs with bacterial pneumonia: 93 cases (1986–1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **206**, 206–209
- JOHNSON, L. R., QUEEN, E. V., VERNAU, W., SYKES, J. E. & BYRNE, B. A. (2013) Microbiologic and cytologic assessment of bronchoalveolar lavage fluid from dogs with lower respiratory tract infection: 105 cases (2001–2011). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **27**, 259–267
- KEIL, D. J. & FENWICK, B. (1998) Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **212**, 200–207
- LEE-FOWLER, T. & REINERO, C. (2012) Bacterial respiratory infections. In *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th edn. Ed C. E. GREENE. Saunders. pp 956–950
- LINDSEY, J. O. & PIERCE, A. K. (1978) An examination of the microbiologic flora of normal lung of the dog. *The American Review of Respiratory Disease* **117**, 501–505
- MCKIERNAN, B. C., SMITH, A. R. & KISSIL, M. (1984) Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* **20**, 139–142
- OLIVARES, J., BERNARDINI, A., GARCIA-LEON, G., CORONA, E., SANCHEZ, M. B. & MARTINEZ, J. L. (2013) The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology* **4**, 103
- OLUJOCH, A. O., KIM, C. H., WEISIGER, R. M., KOO, H. Y., SIEGEL, A. M., CAMPBELL, K. L., BURKE, T. J., MCKIERNAN, B. C. & KAKOMA, I. (2001) Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990–1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **218**, 381–384
- PEETERS, D. E., MCKIERNAN, B. C., WEISIGER, R. M., SCHAEFFER, D. J. & CLERCX, C. (2000) Quantitative bacterial cultures and cytological examination of bronchoalveolar lavage specimens in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* **14**, 534–541
- PROULX, A., HUME, D. Z., DROBATZ, K. J. & REINEKE, E. L. (2014) In vitro bacterial isolate susceptibility to empirically selected antimicrobials in 111 dogs with bacterial pneumonia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* **24**, 194–200
- RADHAKRISHNAN, A., DROBATZ, K. J., CULP, W. T. N. & KING, L. G. (2007) Community-acquired infectious pneumonia in puppies: 65 cases (1993–2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association* **230**, 1493–1497
- ROZANSKI, E. A. & RONDEAU, M. P. (2002) Respiratory pharmacotherapy in emergency and critical care medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **32**, 1073–1086
- SCHULZ, B. S., HUPFAUER, S., AMMER, H., SAUTER-LOUIS, C. & HARTMANN, K. (2011) Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *Veterinary Record* **169**, 229
- STEINFELD, A., PRENGER-BERNINGHOFF, E., BAUER, N., WEISS, R. & MORITZ, A. (2012) Bakterienisolate aus dem unteren Respirationstrakt von erkrankten Hunden und deren aktuelle Resistenzsituation. *Tierärztliche Praxis Kleintiere* **40**, 309–317
- TENWOLDE, A. C., JOHNSON, L. R., HUNT, G. B., VERNAU, W. & ZWINGENBERGER, A. L. (2010) The role of bronchoscopy in foreign body removal in dogs and cats: 37 cases (2000–2008). *Journal of Veterinary Internal Medicine* **24**, 1063–1068
- THAYER, G. W. & ROBINSON, S. K. (1984) Bacterial bronchopneumonia in the dog - a review of 42 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* **20**, 731–735
- THOMPSON, H., MCCANDLISH, I. A. & WRIGHT, N. G. (1976) Experimental respiratory disease in dogs due to *Bordetella bronchiseptica*. *Research in Veterinary Science* **20**, 16–23
- VIESON, M. D., PIÑEYRO, P. & LEROITH, T. (2012) A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. *Veterinary Medicine* **3**, 25–39



Veterinary  
Record

## Antibiotic susceptibility of bacterial isolates from 502 dogs with respiratory signs

M. Rheinwald, K. Hartmann, M. Hähner, G. Wolf, R. K. Straubinger and B. Schulz

*Veterinary Record* 2015 176: 357 originally published online December 2, 2014  
doi: 10.1136/vr.102694

---

Updated information and services can be found at:  
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/14/357>

*These include:*

### References

This article cites 28 articles, 3 of which you can access for free at:  
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/14/357#BIBL>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

**Errata** An erratum has been published regarding this article. Please see [next page](#) or:  
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/15/383.full.pdf>

### Notes

---

To request permissions go to:  
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:  
<http://group.bmj.com/subscribe/>

## IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden retrospektiv die Daten zum Nachweis von Bakterien und deren antibiotischer Empfänglichkeit in Proben aus dem unteren Respirationstrakt von Hunden mit respiratorischen Symptomen im Zeitraum 1989 bis 2011 untersucht. Verschiedene vorangegangene Studien haben sich ebenfalls mit dem Bakterienvorkommen in den Atemwegen von respiratorisch kranken und auch gesunden Hunden beschäftigt (PECORA, 1976; LINDSEY & PIERCE, 1978; HARPSTER, 1981; MCKIERNAN et al., 1984; THAYER & ROBINSON, 1984; ANGUS et al., 1997; BAUER et al., 2003; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Abgesehen von großen Diskrepanzen in der Anzahl der untersuchten Patienten unterscheiden sich diese Untersuchungen mitunter erheblich hinsichtlich ihrer Ein- und Ausschlusskriterien sowie der Methodik zur Beprobung und bakteriologischen Untersuchung. Aufgrund der großen Unterschiede im Studienaufbau ist somit eine Vergleichbarkeit der genannten Studien sowohl untereinander als auch mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur bedingt gegeben. Dennoch lassen sich einige grundsätzliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede herausstellen. Keine der genannten Studien weist jedoch im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung eine ähnlich große Anzahl an eingeschlossenen Patienten auf. Aufgrund des langen Untersuchungszeitraumes sind zudem Unterschiede in den Detektionsraten einzelner Bakterien im zeitlichen Vergleich erfassbar.

Im Untersuchungszeitraum wurden die bakteriologischen Kulturen von 502 Proben aus den unteren Atemwegen von 493 Hunden mit respiratorischen Symptomen ausgewertet. In 35 % der Fälle (176/502) ergab die bakteriologische Untersuchung ein negatives Ergebnis, während bei 65 % der untersuchten Proben (326/502) ein bakterielles Wachstum nachgewiesen wurde. JOHNSON und Mitarbeiter (2013) konnten ebenfalls bei 266 von 510 bronchoskopisch untersuchten Hunden kein kulturelles Wachstum aus BALF-Proben nachweisen. In einer älteren Studie wurden in weniger als der Hälfte (116/264) der Kulturen aus transtrachealen Aspiraten von Hunden mit respiratorischen Symptomen Bakterien detektiert (ANGUS et al., 1997), während bei Hunden mit Aspirationspneumonien in 23 % (11/47) (TART et al., 2010) und bei Hunden mit bronchialen Fremdkörpern in 25 % (6/24) (TENWOLDE et al., 2010) der Fälle

keine aeroben Bakterien aus Spülproben der unteren Atemwege kultiviert wurden. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass auch bei gesunden Hunden die Atemwege nicht als steril anzusehen sind und Bakterien aus den unteren Atemwegen isoliert werden können (PECORA, 1976; LINDSEY & PIERCE, 1978; MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003). Allerdings ist zu beachten, dass auch ein negatives kulturelles Ergebnis aus Proben der unteren Atemwege eine bakterielle Infektion nicht mit Sicherheit ausschließen kann. Einige Pathogene benötigen spezielle Wachstumsbedingungen, die bei routinemäßig durchgeführten bakteriologischen Untersuchungen unter Umständen nicht immer Berücksichtigung finden. Daneben können Fehler bei der Probengewinnung, -lagerung und -transport sowohl zu falsch-negativen als auch falsch-positiven bakteriologischen Untersuchungsergebnissen führen (SYKES & RANKIN, 2014).

Zum Nachweis einer bakteriellen Atemwegsinfektion sollten stets die Befunde aus verschiedenen Untersuchungen im Zusammenhang gesehen werden (THAYER & ROBINSON, 1984). Insbesondere der zytologischen Untersuchung von Spülproben aus den unteren Atemwegen kommt eine entscheidende Rolle zu (HAWKINS et al., 1995). Neuere Untersuchungen stellen den diagnostischen Wert von quantitativen bakteriologischen und zytologischen Untersuchungen zur Abgrenzung von bakteriellen Infektionen und nicht-infektiösen bakteriellen Besiedelungen der Atemwege heraus (PEETERS et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte in 53 % der Fälle mit einem positiven bakteriologischen Kulturergebnis eine einzelne Bakterienspezies kultiviert werden. In den übrigen Proben wurde ein Wachstum von zwei oder mehr Spezies festgestellt. Insgesamt konnten 557 bakterielle Isolate aus 326 Proben mit kulturellem Bakterienwachstum erfasst werden. Das häufige Auftreten von polymikrobiellen bakteriologischen Kulturergebnissen wird von diversen vorangegangenen Untersuchungen bestätigt. So konnten ANGUS und Mitarbeiter (1997) in 43 % der transtrachealen Aspireate mit bakteriellem Wachstum mehr als eine Bakterienspezies identifizieren. JOHNSON und Mitarbeiter (2013) isolierten sogar in 56 % der Fälle mehrere Bakterienspezies aus BALF von Hunden mit Infektionen der unteren Atemwege. Eine Untersuchung, bei der quantitative Kulturen zur Diagnose von bakteriellen Bronchopneumonien herangezogen wurden, konnte in 31 % der Fälle Infektionen mit mehreren Bakterienspezies

nachweisen (PEETERS et al., 2000). In anderen Studien wurden ebenso in 36 bis 72 % der untersuchten Kulturen aus caninen Atemwegen mehr als eine Bakterienspezies identifiziert (HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; JOHNSON & FALES, 2001). Bei Hunden mit Fremdkörperpneumonien wurden ebenfalls in der Mehrzahl der Fälle mehrere Keime kultiviert (TENWOLDE et al., 2010), wie auch bei Hunden mit Aspirationspneumonien in 45 % (21/47) der Fälle (TART et al., 2010). In einer kürzlich veröffentlichten Studie aus Deutschland hingegen wurden nur in 8/84 caninen BALF-Proben polymikrobielle Kulturergebnisse nachgewiesen (STEINFELD et al., 2012).

In vielen Studien, in denen eine polymikrobielle Bakterienbeteiligung bei caninen Atemwegsinfektionen nachgewiesen wurde, waren Mykoplasmen als Infektionserreger beteiligt (JAMESON et al., 1995; TART et al., 2010; JOHNSON et al., 2013). Ein spezifischer Nachweis von Mykoplasmen auf Spezialnährböden wurde in der vorliegenden Untersuchung – im Gegensatz zu einigen vorgenannten Studien (JAMESON et al., 1995; JOHNSON et al., 2013) – jedoch nicht routinemäßig durchgeführt, weshalb wahrscheinlich nicht alle Fälle von Mykoplasmenbeteiligung erfasst wurden. Die Rolle von Mykoplasmen im Zusammenhang mit respiratorischen Erkrankungen bei Hunden ist bislang nicht vollständig geklärt (CHALKER, 2005), ein Nachweis mittels spezifischer Diagnostikmethoden wird jedoch von verschiedenen Autoren empfohlen (FORD, 2009b; TENWOLDE et al., 2010; SYKES, 2014c).

Die in der vorliegenden Untersuchung kultivierten Isolate konnten zu 41 % als grampositive (229/557) und zu 54 % als gramnegative Spezies (301/557) identifiziert werden. Grampositive Bakterien konnten in 52 % (170/326) und gramnegative Bakterien in 77 % (250/326) der Kulturen mit bakteriellem Wachstum detektiert werden. Bei 32 % (105/326) der positiven Kulturen konnten sowohl grampositive als auch gramnegative Isolate nachgewiesen werden. Ausschließlich grampositive Bakterien wurden bei 20 % (65/326), ausschließlich gramnegative Bakterien bei 45 % (145/326) der Proben mit positivem Kulturergebnis gesehen. Der hohe Anteil an gramnegativen Isolaten sowie das häufige Vorkommen von gemischten Infektionen mit grampositiven und gramnegativen Spezies werden von den meisten vergleichbaren Studien bestätigt. HARPSTER (1981) konnte bei 30 Hunden mit bakteriellen Pneumonien in

aeroben Kulturen aus transtrachealen Aspiraten bei über der Hälfte der Fälle (16/30) eine Beteiligung von gramnegativen Bakterien nachweisen und in einem Drittel der Fälle (9/30) ausschließlich gramnegative Spezies kultivieren. Eine gleichzeitige Kultivierung von gramnegativen und grampositiven Bakterien aus derselben Probe gelang in 23 % der Fälle (7/30). Allerdings wurden grampositive Bakterien insgesamt häufiger isoliert, entweder ausschließlich oder zusammen mit gramnegativen Spezies (21/30) (HARPSTER, 1981). Im Gegensatz dazu stehen die Untersuchungsergebnisse einer Studie, welche respiratorische Kulturen von 125 Hunden mit Aspirationspneumonien auswertete (TART et al., 2010). In 36 positiven Kulturen aus 47 Atemwegsproben zeigte sich eine Dominanz der gramnegativen Isolate (41/72). Aus sämtlichen Proben mit multiplen Isolaten (21/36) konnten entweder ausschließlich gramnegative (6/21) oder gramnegative zusammen mit grampositiven Bakterien (10/21) oder Mykoplasmen (5/21) isoliert werden (TART et al., 2010). Ähnliche Ergebnisse konnten in anderen Studien erzielt werden, in denen ebenfalls eine höhere Prävalenz von gramnegativen Stäbchenbakterien im Vergleich zu grampositiven Isolaten aus Proben des unteren Respirationstrakts von Hunden mit Erkrankungen der Atemwege nachgewiesen wurde (THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; JOHNSON et al., 2013; PROULX et al., 2014).

Bei den grampositiven Bakterien stellen Streptokokken und Staphylokokken mit einem Anteil von 31 % und 19 % an allen positiven Kulturen die häufigsten Isolate dar. Ihnen gegenüber steht die große heterogene Familie der gramnegativen *Enterobacteriaceae*, deren Vertreter mit vergleichbarer Häufigkeit (30 %) isoliert wurden. Herauszustellen sind hierbei die Isolate von *E. coli*, die innerhalb der Enterobakterien am häufigsten detektiert wurden und insgesamt bei 15 % der Hunde mit positiven bakteriologischen Kulturergebnissen nachweisbar waren. JOHNSON und Mitarbeiter (2013) konnten bei Hunden mit nachgewiesenen bakteriellen Infektionen der unteren Atemwege Enterobakterien in 20 % und *E. coli* in 17 % der Fälle nachweisen, Streptokokken aber nur in 12 % der Fälle detektieren. Darunter befanden sich auch zwei Isolate von *S. zooepidemicus*, einem in jüngerer Zeit wiederholt aufgetretenen Erreger von hämorrhagischen Pneumonien beim Hund (PRIESTNALL & ERLS, 2011; PRIESTNALL et al., 2014). Im Gegensatz dazu konnte im gesamten



Untersuchungszeitraum der vorliegenden Arbeit bei den eingeschlossenen Hunden kein Isolat von *S. zooepidemicus* nachgewiesen werden. Bislang sind in Deutschland noch keine Fälle von *S.-zooepidemicus*-induzierten Pneumonien publiziert worden. Grampositive Kokken und Enterobakterien wurden auch in anderen Studien bei Hunden mit Erkrankungen oder Infektionen des unteren Respirationstrakts, einschließlich Tieren mit bronchialen Fremdkörpern und Aspirationspneumonien, in großer Zahl isoliert (HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; EPSTEIN et al., 2010; TART et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; PROULX et al., 2014). In einer älteren Untersuchung von 264 transtracheal gewonnenen Aspiraten von Hunden mit vermuteten Atemwegsinfektionen wurden Enterobakterien, darunter in der Mehrzahl *E. coli*, aus beinahe der Hälfte der positiven Kulturen isoliert (53/116), wohingegen Streptokokken in einem Viertel und Staphylokokken nur in 10 % der Proben nachgewiesen wurden (ANGUS et al., 1997). EPSTEIN und Mitarbeiter (2010) untersuchten das Bakterienspektrum bei Hunden mit verschiedenen Schweregraden von Atemwegserkrankungen. Dabei wurden gramnegative Enterobakterien in 29 % der aeroben Isolate von insgesamt 103 positiven Kulturen von 156 Hunden detektiert. Bemerkenswert erschien den Autoren, dass bei Hunden mit Lungenversagen, die einer Ventilationsbeatmung bedurften, signifikant häufiger Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* isoliert wurden als bei Hunden mit weniger schwerwiegenden respiratorischen Erkrankungen. Die Rolle von Enterobakterien als klinisch relevante opportunistische Erreger konnte in einer anderen Studie bestätigt werden, welche Pneumonien bei Junghunden untersuchte (RADHAKRISHNAN et al., 2007). Neben einer großen Zahl an Infektionen mit *B. bronchiseptica*, stellten Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae* in dieser Untersuchung die am häufigsten isolierten Sekundärkeime dar (RADHAKRISHNAN et al., 2007).

Die unterschiedlichen Bakterienprävalenzen in den verschiedenen Studien lassen sich unter anderem durch abweichende Studienprotokolle und Patientenzahlen sowie durch Unterschiede in der Methodik zur Probengewinnung erklären. Streptokokken und Staphylokokken finden sich physiologischerweise auf der Haut, den Schleimhäuten und in der Maulhöhle von Hunden (CARTER & WISE, 2004; GREENE & MARKS, 2012). Enterobakterien, darunter auch *E. coli*,

können in großer Zahl in der Maulhöhle und im oropharyngealen Raum von Hunden nachgewiesen werden (LINDSEY & PIERCE, 1978; MCKIERNAN et al., 1984; GREENE & MARKS, 2012). Diese Bakterien stellen somit klassische Kontaminanten dar, insbesondere bei einer Probenentnahmetechnik, die eine oropharyngeale Passage des Probenmaterials erfordert. Eine oropharyngeale Kontamination kann auch in der vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Zwar wurden Fälle, deren medizinische Aufzeichnungen Hinweise auf eine oropharyngeale Kontamination enthielten, beispielsweise durch Befunde wie *Simonsiella* spp. oder große Mengen an Plattenepithelzellen in zytologischen Präparaten (MCCULLOUGH & BRINSON, 1999), von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Jedoch könnte die aus 5 % der positiven Kulturen isolierte bakterielle Mischflora ein Indiz für einen gewissen Anteil an bakteriellen Kontaminanten darstellen. ANGUS und Mitarbeiter (1997) isolierten Staphylokokken und Streptokokken im Vergleich zur vorliegenden Untersuchung seltener aus transtrachealen Aspiraten von Hunden mit Verdacht auf bakterielle Atemwegsinfektionen. Möglicherweise ist die Umgehung der oberen Atemwege durch transtracheale Probengewinnung geeignet, Kontaminationen, wie sie bei einer BAL entstehen können, zu vermeiden. Die strengen Auswahlkriterien und die konsequente Einbeziehung von zytologischen BALF-Präparaten zur Identifizierung von Kontaminationen haben möglicherweise dazu beigetragen, dass JOHNSON und Mitarbeiter (2013) in ihrem Patientengut nur aus 12 % der Proben Streptokokken und aus 5 % der Proben Staphylokokken kultivierten. Sowohl Enterobakterien als auch grampositive Staphylokokken oder Streptokokken wurden jedoch auch aus den oberen und unteren Atemwegen von gesunden Hunden isoliert und scheinen Teil der normalen Mikroflora zu sein (MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003). Die physiologisch vorhandenen bakteriellen Kommensalen könnten hierbei als Reservoir dienen, welches unter günstigen Bedingungen in der Lage ist, klinisch relevante Sekundärinfektionen hervorzurufen (COHN & REINERO, 2007).

Weitere in dieser und vorangegangenen Untersuchungen häufig isolierte bakterielle Spezies umfassten *Pasteurella* spp. (16 %) und *Pseudomonas* spp. (14 %), wobei diese Bakterien ebenfalls aus respiratorischen Proben von gesunden Hunden kultiviert wurden (PECORA, 1976; MCKIERNAN et al., 1984; BAUER et al., 2003). In anderen Studien wurden Bakterien dieser Gattungen bei

erkrankten Hunden mit vergleichbarer Häufigkeit isoliert, wobei die Detektionsraten von *Pasteurella* spp. höher lagen als die von *Pseudomonas* spp. (ANGUS et al., 1997; EPSTEIN et al., 2010; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). *P. multocida* und *Pasteurella canis* sowie *P. aeruginosa* waren hier – vergleichbar zur vorliegenden Untersuchung – die am häufigsten nachgewiesenen Spezies (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013). Deutlich höhere Prävalenzen von *Pseudomonas* spp. wurden in älteren Untersuchungen mit erheblich geringeren Fallzahlen von Hunden mit bakteriellen Pneumonien (THAYER & ROBINSON, 1984; PEETERS et al., 2000) oder bei Hunden mit Atemwegskollaps nachgewiesen (JOHNSON & FALES, 2001). Beide gramnegative Bakteriengattungen scheinen somit ebenfalls eine wichtige Rolle als opportunistische Erreger bei caninen Atemwegserkrankungen zu spielen.

*B. bronchiseptica* konnte in der vorliegenden Untersuchung bei 8 % der Tiere mit positiven bakteriologischen Kulturergebnissen isoliert werden. Andere Untersuchungen ergaben bei Hunden mit Atemwegserkrankungen oder Infektionen des Respirationstrakts für diesen Erreger Prävalenzen bis zu 22 % (STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013), wobei in vielen anderen Studien auch deutlich geringere Isolationsraten von 3 bis 12 % ermittelt wurden (HARPSTER, 1981; THAYER & ROBINSON, 1984; JAMESON et al., 1995; ANGUS et al., 1997; JOHNSON & FALES, 2001; EPSTEIN et al., 2010). Hunde mit Aspirationspneumonien oder bronchialen Fremdkörpern wiesen hingegen keine Infektionen mit *B. bronchiseptica* auf (TART et al., 2010; TENWOLDE et al., 2010; PROULX et al., 2014). RADHAKRISHNAN und Mitarbeiter (2007) untersuchten das Bakterienvorkommen bei 65 Hunden unter einem Jahr mit Pneumonien. In der Hälfte der Fälle konnte *B. bronchiseptica* bei dieser Altersgruppe in trachealen Spülproben nachgewiesen werden. Diese Tiere waren signifikant jünger, schwerwiegender erkrankt und stammten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit aus Zoofachgeschäften als Hunde, bei denen andere bakterielle Isolate kultiviert wurden (RADHAKRISHNAN et al., 2007). PROULX und Mitarbeiter (2014) konnten *B. bronchiseptica* ebenfalls bei 71 % der Hunde mit infektiösen Pneumonien nachweisen, nicht jedoch bei Patienten mit Aspirationspneumonien oder Pneumonien aufgrund anderer Ursachen. Die Hunde mit infektiösen Pneumonien waren im Vergleich zu den Patienten mit Pneumonien anderer Ursache ebenfalls wesentlich jünger (Altersmedian

0,4 Jahre) (PROULX et al., 2014). Höhere Detektionsraten von *B. bronchiseptica* sind demnach bei jüngeren Tieren und Hunden mit einem entsprechenden Expositionsvorbericht zu erwarten.

Daten zu Infektionsquellen oder zum Impfstatus der Tiere standen bei den in der vorliegenden Untersuchung ausgewerteten Fällen nicht zur Verfügung und wurden auch für die meisten vorhergegangenen Studien nicht angegeben. Der Altersmedian aller in die Studie eingeschlossenen Tiere liegt mit sechs Jahren (acht Wochen bis 16 Jahren) in einem ähnlichen Bereich wie in vergleichbaren Studien von ANGUS und Mitarbeitern (1997) (sieben Jahre) und STEINFELD und Mitarbeitern (2012) (sechs Jahre). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von JOHNSON und Mitarbeitern (2013). Die in diese Studie eingeschlossenen 105 Hunde mit nachgewiesenen bakteriellen Infektionen der unteren Atemwege wiesen einen Altersmedian von drei Jahren auf, wobei Tiere mit Infektionen durch *B. bronchiseptica* oder *Mycoplasma* spp. signifikant jünger waren als Tiere mit anderen bakteriellen Erregern (JOHNSON et al., 2013).

Höhere Detektionsraten von *B. bronchiseptica* können auch bei der Verwendung von Spezialmedien für die Kultivierung dieser Bakterien erwartet werden. Hierfür wird häufig Bordet-Gengou-Agar verwendet, um *B. bronchiseptica* selektiv anzuzüchten, wobei der Erreger auch auf Standardnährböden kultivierbar ist (SELBITZ, 2007). Bordet-Gengou-Agar wurde in der vorliegenden Untersuchung seit dem Jahr 2003 routinemäßig für die mikrobiologische Untersuchung von BALF-Proben verwendet. In keiner der vorangegangenen Studien wurden jedoch Spezialnährböden zur selektiven Anzucht von *B. bronchiseptica* eingesetzt. Somit scheinen sich höhere Prävalenzen des Erregers in anderen Studien nicht durch mikrobiologische Verfahren erklären zu lassen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die antibiotische *in-vitro*-Sensibilität der aus dem Respirationstrakt von Hunden mit Atemwegserkrankungen gewonnenen Bakterien mittels Agardiffusionstest bestimmt. Der Agardiffusionstest als qualitatives Verfahren dient in erster Linie dazu, Wirkstoffe, gegenüber denen ein Isolat keine oder nur eine geringe *in-vitro*-Sensibilität aufweist, von der Therapieentscheidung auszuschließen (RICHTER et al., 2006).

Grampositive Bakterien, bei denen es sich zum größten Teil um grampositive

Kokken der Gattungen *Streptococcus* und *Staphylococcus* handelte, wiesen in der vorliegenden Studie im Allgemeinen eine höhere *in-vitro*-Sensibilität auf als gramnegative Bakterien. Lediglich für die Wirksamkeit der Antibiotika Enrofloxacin und Doxycyclin konnte ein höherer Anteil an sensiblen gramnegativen im Vergleich zu grampositiven Isolaten nachgewiesen werden. Für Gentamicin lag der Anteil sensibler Isolate bei grampositiven und gramnegativen Bakterien mit rund je 80 % in einem vergleichbaren Bereich. Der größte Anteil an sensiblen grampositiven Isolaten konnte für Amoxicillin-Clavulansäure (über 90 % sensible Isolate) gezeigt werden. Grampositive Isolate wurden jedoch insgesamt deutlich seltener getestet, weshalb die Aussagekraft der durchschnittlichen *in-vitro*-Empfänglichkeiten für einige Wirkstoffe vorsichtig zu interpretieren ist. So wurde Cefotaxim als Antibiotikum aus der Gruppe der Cephalosporine der dritten Generation nur gegenüber drei grampositiven Isolaten getestet und nur für eine begrenzte Zeit in den Antibiogrammen verwendet. Als Vertreter der Cephalosporine der ersten Generation wurden in verschiedenen Zeitperioden Cefalexin und Cefalotin verwendet. In der vorliegenden Untersuchung waren über 85 % der getesteten grampositiven Bakterien sensibel gegenüber Cephalosporinen der ersten Generation, während gramnegative Spezies einen großen Anteil resistenter Isolate gegenüber Cephalosporinen der ersten wie dritten Generation aufwiesen (40 bis 42 %). HARPSTER und Mitarbeiter (1981) konnten ebenfalls zeigen, dass Cephalosporine der ersten Generation nicht als empirische Therapie ohne vorhergehende Empfindlichkeitsprüfung bei Hunden mit bakteriellen Pneumonien geeignet sind, da viele gramnegative Isolate Resistenzen gegen diese Wirkstoffgruppe aufweisen. Auch in anderen Studien konnte ein hoher Anteil Cephalosporin-resistenter Isolate, insbesondere unter den gramnegativen Bakterien einschließlich *B. bronchiseptica*, ermittelt werden (THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Cephalosporine können demnach nicht zur alleinigen empirischen Therapie von Infektionen des Respirationstrakts empfohlen werden, da viele der gramnegativen Bakterienspezies Resistenzen aufweisen und Infektionen mit ausschließlich grampositiven Bakterien vergleichsweise selten vorkommen.

Die in dieser Untersuchung detektierten gramnegativen Bakterien wiesen eine wesentlich höhere Diversität in Bezug auf ihre phylogenetische Zugehörigkeit zu

verschiedenen bakteriellen Spezies auf als die grampositiven Isolate. In Folge dessen zeigte sich auch ein breiteres Spektrum an antimikrobiellen Resistenzen in dieser Bakteriengruppe. Aus den ermittelten Daten lässt sich ableiten, dass das Resistenzspektrum gramnegativer Bakterien ohne Durchführung einer Empfindlichkeitsprüfung im Allgemeinen nur schwer vorhersehbar ist. Lediglich der Wirkstoff Enrofloxacin wies eine relativ hohe Wirksamkeit von über 85 % gegenüber allen gramnegativen Bakterien auf, während sich gleichzeitig über 80 % der grampositiven Isolate sensibel zeigten. Das breite Wirkspektrum von Fluorchinolonen gegenüber einer Vielzahl an grampositiven und -negativen Bakterien, die bei Kleintieren aus dem Respirationstrakt oder aus anderen Organen isoliert wurden, konnte in verschiedenen Studien bestätigt werden (WALKER et al., 2000; SCHULZ et al., 2006; GREINER et al., 2007b; MÜLLER & HOM, 2009; BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT et al., 2014). Fluorchinolone erfahren eine exzellente Anreicherung im Respirationstrakt aufgrund ihrer intrazellulären Akkumulation in Leukozyten in entzündeten Geweben und bieten sich daher zum effektiven Einsatz bei bakteriellen Bronchopneumonien an (HAWKINS et al., 1998; BOOTHE et al., 2005; BOOTHE et al., 2009). Allerdings wurden in verschiedenen Studien auch Resistenzen gegenüber Enrofloxacin bei einzelnen Bakterienspezies aus den Atemwegen von Hunden mit respiratorischen Infektionen festgestellt (ANGUS et al., 1997; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Im Verlauf des Untersuchungszeitraumes konnte auch in der vorliegenden Studie ein signifikanter Anstieg des Anteils Enrofloxacin-resistenter Bakterien festgestellt werden. Während in der ersten Hälfte des untersuchten Zeitraums (1989 bis 1999) noch 91 % aller Isolate eine Sensibilität gegenüber Enrofloxacin aufwiesen, stellte sich in späteren Jahren (2000 bis 2011) eine deutlich geringere *in-vitro*-Gesamtwirksamkeit dar (79 %). Ein Anstieg Enrofloxacin-resistenter Isolate wurde auch in einer vorangegangenen Studie aus Deutschland dokumentiert (STEINFELD et al., 2012). Daneben haben verschiedene Studien generell eine Zunahme von Enrofloxacin-resistenten Isolaten aus unterschiedlichen Organsystemen bei Kleintieren nachweisen können (WALKER et al., 2000; PRESCOTT et al., 2002; HALL et al., 2013). Der zunehmende Einsatz von Fluorchinolonen scheint zur Resistenzbildung beizutragen (SCHWARZ & CHASLUS-DANCLA, 2001; PRESCOTT et al., 2002; BOOTHE, 2006; PAPICH, 2013b). Aufgrund ihres Status als Antibiotika

von wichtiger Bedeutung für die Humanmedizin ist der routinemäßige empirische Einsatz von Fluorchinolonen bei Tieren als kritisch zu betrachten (WORLD HEALTH ORGANISATION, 2012). Auf Grundlage von *in-vitro*-Resistenztests könnten bei vielen caninen Infektionen möglicherweise auch Antibiotika mit schmalerem Wirkspektrum eingesetzt werden.

*B. bronchiseptica* ist ein gramnegatives Bakterium, das besonders bei jungen Hunden mit naivem Immunsystem durch aerogene Übertragung von anderen Tieren eine Infektion der Atemwege verursachen kann und diese für weitere Sekundärinfektionen prädisponiert (FORD, 2009a). *B. bronchiseptica* zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung als hochsensibel gegenüber Enrofloxacin, Gentamicin, Amoxicillin-Clavulansäure und Doxycyclin mit einem Anteil von über 90 % sensiblen Isolaten. STEINFELD und Mitarbeiter (2012) konnten für diese Wirkstoffe ebenfalls Wirksamkeiten gegenüber mindestens 90 % der *B.-bronchiseptica*-Isolate nachweisen. Dagegen zeigte sich etwa die Hälfte der Isolate resistent gegenüber Ampicillin, und 80 % der Isolate waren resistent gegenüber potenzierten Sulfonamiden, was ebenfalls vergleichbar ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie. In einer älteren Studie konnte eine absolute Sensibilität aller Isolate von *B. bronchiseptica* für Amoxicillin-Clavulansäure, Tetracyclin und Gentamicin gezeigt werden, jedoch waren nur etwas mehr als die Hälfte der Isolate sensibel gegenüber Enrofloxacin, Ampicillin und Sulfonamid/Trimethoprim (ANGUS et al., 1997). JOHNSON und Mitarbeiter (2013) ermittelten ebenfalls geringe Resistenzraten (unter 10 %) des Erregers gegenüber Gentamicin, Amoxicillin-Clavulansäure und Doxycyclin, allerdings zeigten sich nur 70 % der Isolate sensibel für Enrofloxacin. Im Gegensatz dazu konnte in einer Untersuchung von Junghunden eine sehr hohe *in-vitro*-Wirksamkeit von über 95 % für Enrofloxacin gegenüber Isolaten von *B. bronchiseptica* festgestellt werden (RADHAKRISHNAN et al., 2007). Prinzipielle Unterschiede in der Methodik zur Erstellung von *in-vitro*-Resistenztests könnten eine mögliche Erklärung für abweichende Ergebnisse sein. Die beiden vorgenannten amerikanischen Studien bedienten sich der Mikrodilutionsmethode zur Sensibilitätsprüfung (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013), während STEINFELD und Mitarbeiter (2012) gleich der vorliegenden Untersuchung die Ergebnisse von Agardiffusionstests auswerteten. ANGUS und Mitarbeiter (1997) gaben für ihre Untersuchung einen Grenzwert für

die MHK von *B. bronchiseptica* bei Enrofloxacin von unter 0,25 µg/ml an. In einer in Deutschland durchgeführten Studie im Rahmen des zum nationalen Resistenzmonitoring komplementären Programms BfT-GermVet wurde zur Empfindlichkeitsprüfung mittels Mikrodilutionsmethode in den Jahren 2004 bis 2006 ein Grenzwert von 0,5 µg/ml für die *in-vitro*-Wirksamkeit von Enrofloxacin gegenüber Isolaten von *B. bronchiseptica* aus dem Respirationstrakt erkrankter Hunde verwendet. Hierbei blieben 98 % der 42 getesteten Isolate unter dem nach internationalen Standards und Herstellerangaben festgesetzten Grenzwert, wobei fast die Hälfte der getesteten sensiblen Isolate eine MHK im Bereich zwischen 0,25 und 0,5 µg/ml aufwies (SCHWARZ et al., 2007b). Nicht zuletzt sind geografische Unterschiede in der Verteilung von einzelnen resistenten Stämmen möglich, da die Untersuchungen mit dem höheren Anteil Enrofloxacin-resistenter Isolate von *B. bronchiseptica* beide aus Kalifornien stammen (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013), während die Untersuchungen mit hoher Enrofloxacin-Wirksamkeit bei *B. bronchiseptica* – einschließlich der vorliegenden Untersuchung – Isolate von Hunden aus Deutschland umfassen (SCHWARZ et al., 2007b; STEINFELD et al., 2012). Im letzten offiziellen Bericht im Rahmen des nationalen Resistenzmonitorings zur Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien (2014) wurden die Resistenzdaten von 30 *B.-bronchiseptica*-Isolaten von Hunden und Katzen mit respiratorischen Erkrankungen aus den Jahren 2010/2011 ausgewertet und mit den Ergebnissen der Jahre 2008/2009 (26 Isolate) und 2006/2007 (34 Isolate) verglichen. Für die Wirkstoffe Amoxicillin-Clavulansäure, Gentamicin und Doxycyclin wurden keine resistenten Isolate nachgewiesen. Gegenüber Enrofloxacin wiesen ebenfalls über 90 % der Isolate eine MHK von unter 0,5 µg/ml auf, allerdings wurden auch Hinweise auf eine beginnende Fluorchinolon-Resistenz festgestellt, was sich anhand der hohen MHK-Werte für Nalidixinsäure abzeichnete (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2014).

Hohe Resistenzraten von *B. bronchiseptica* wurden in der vorliegenden Studie gegenüber Cephalosporinen, potenzierten Sulfonamiden und Ampicillin nachgewiesen. Vergleichbare Studien bestätigten die hohen Resistenzraten bei diesen Wirkstoffen (THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Die verminderte Wirksamkeit von nicht-protectierten



Beta-Laktam-Antibiotika und Sulfonamid/Trimethoprim gegenüber *B. bronchiseptica* wurde gleichfalls im nationalen Resistenzmonitoring bestätigt (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2014).

Der Einsatz von Fluorchinolonen bei im Wachstum befindlichen Hunden ist aufgrund von möglichen chondrotoxischen Nebenwirkungen limitiert (STAHLMANN & LODE, 1999). Somit muss bei der Behandlung von Infektionen der Atemwege bei Junghunden, die durch *B. bronchiseptica* und opportunistische Sekundärerreger ausgelöst werden, auf andere Wirkstoffklassen zurückgegriffen werden. Eine gute Wirksamkeit gegenüber *B. bronchiseptica* konnte in der vorliegenden Studie auch für Gentamicin und Amoxicillin-Clavulansäure bei über 90 % der kultivierten Isolate gezeigt werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus anderen Studien überein (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; RADHAKRISHNAN et al., 2007; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Amoxicillin-Clavulansäure zeigte außerdem eine ausgezeichnete Wirksamkeit gegenüber mehr als 90 % der isolierten grampositiven Bakterien, wobei jedoch mehr als 40 % der gramnegativen Isolate Resistenzen aufwiesen. Gentamicin zeigte eine gleichwertige Wirksamkeit gegenüber nahezu 80 % aller grampositiven und gramnegativen Isolate, wies damit aber eine geringere Wirksamkeit auf als Enrofloxacin. Zusätzlich zeigten sich mehr grampositive Isolate resistent gegenüber diesem Wirkstoff als für Amoxicillin-Clavulansäure. Aufgrund von möglichen nephrotoxischen Nebenwirkungen ist eine längerfristige Gentamicin-Therapie bei Hunden mit bakteriellen Pneumonien jedoch problematisch (OLSEN, 2000). Weiterhin muss bedacht werden, dass potentiell an respiratorischen Infektionen beteiligte anaerobe Bakterien eine inhärente Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und Enrofloxacin aufweisen (ANGUS et al., 1997), wohingegen Amoxicillin-Clavulansäure eine gute Wirksamkeit gegenüber den meisten Anaerobiern zeigt (BOOTHE, 1990).

Doxycyclin wird häufig zur empirischen Therapie bei unkomplizierten Atemwegsinfektionen im Rahmen des Zwingerhustenkomplexes mit oder ohne Beteiligung von *B. bronchiseptica* empfohlen und angewandt (STONE & POOK, 1992; OLSEN, 2000; DOWLING, 2009; FORD, 2009a, 2009b, 2012; FENWICK, 2013; SYKES, 2014c). Allerdings zeigte Doxycyclin in der vorliegenden Untersuchung für die am häufigsten kultivierten grampositiven und

gramnegativen bakteriellen Sekundärpathogene insgesamt eine geringe *in-vitro*-Wirksamkeit gegenüber weniger als 60 % aller Isolate. Etwa die Hälfte der grampositiven Bakterien, darunter vor allem grampositive Kokken, war resistent gegenüber diesem Wirkstoff. Abgesehen von einer hohen Wirksamkeit gegenüber *Pasteurella* spp. (86 % sensible Isolate) und allen getesteten Isolaten von *B. bronchiseptica*, zeigte nur ein geringer Anteil der gramnegativen Bakterien eine Empfänglichkeit gegenüber Doxycyclin. Vorangegangene Untersuchungen konnten die unvorhersehbare *in-vitro*-Wirksamkeit von Doxycyclin gegenüber gramnegativen Bakterien, die von Hunden mit Erkrankungen des Respirationstrakts isoliert wurden, bestätigen. Hier wiesen ebenso lediglich *Pasteurella* spp. wenige Resistenzen auf (ANGUS et al., 1997; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). STEINFELD und Mitarbeiter (2012) stellten zwar eine hohe Empfänglichkeit für Isolate von *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. gegenüber Doxycyclin fest, allerdings wurden nur wenige Bakterien beider Spezies in dieser Studie isoliert und getestet. Vergleichbares gilt für die Untersuchung von JOHNSON und Mitarbeitern (2013), deren gute Wirksamkeit von Tetrazyklinen ebenfalls auf den Testergebnissen von nur wenigen Streptokokken-Isolaten beruht. Eine geringe Doxycyclin-Sensibilität bei *Staphylococcus* spp. konnte allerdings auch in dieser Studie bestätigt werden (JOHNSON et al., 2013). Mehr als die Hälfte der bakteriellen Keime außer *B. bronchiseptica*, die von jungen Hunden mit Pneumonien isoliert wurden, zeigten in einer anderen Untersuchung eine Resistenz gegenüber Doxycyclin (RADHAKRISHNAN et al., 2007). Der hohe Anteil an Tetrazyklin-resistenten Isolaten – abgesehen von *B. bronchiseptica* und *Pasteurella* spp. – konnte bereits in älteren Untersuchungen bei Hunden mit bakteriellen Pneumonien nachgewiesen werden (THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992). Auf Grundlage dieser und den in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Ergebnisse, kann Doxycyclin zum alleinigen empirischen Einsatz bei Hunden mit respiratorischen Infektionen ohne Durchführung von bakteriologischen Untersuchungen und Resistenztests nicht empfohlen werden.

Eine allgemein schlechte Resistenzsituation konnte auch für Ampicillin nachgewiesen werden. Mehr als die Hälfte aller isolierten Bakterien zeigte in der vorliegenden Studie keine Empfänglichkeit gegenüber diesem Beta-Laktam-Antibiotikum. Die höchsten Resistenzraten wurden für gramnegative Bakterien

festgestellt (über 60 %), mit Ausnahme von über 95 % sensiblen *Pasteurella*-spp.-Isolaten. Dies steht im Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen, in denen lediglich die meisten *Pasteurella*-spp.- und *Streptococcus*-spp.-Isolate eine *in-vitro*-Empfindlichkeit für Ampicillin aufwiesen, während alle übrigen Bakterien, vor allem gramnegative Spezies einschließlich *B. bronchiseptica*, meist resistent waren (THAYER & ROBINSON, 1984; STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Ampicillin wird in der Regel aufgrund der vorhersehbaren und zu erwartenden Kreuzresistenzen als Vertretersubstanz für alle Aminopenizilline bei tierpathogenen Bakterien verwendet. Die Ergebnisse aus *in-vitro*-Resistenztests für Ampicillin können demnach auch auf Amoxicillin übertragen werden (WERCKENTHIN et al., 2005; WERCKENTHIN et al., 2008). Der am weitesten verbreitete Resistenzmechanismus gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika besteht in der Bildung von Beta-Laktamasen durch grampositive und gramnegative Bakterien (THEURETZBACHER, 1998; MEALEY, 2001). Die Kombination eines Beta-Laktam-Antibiotikums mit einem Beta-Laktamase-Inhibitor kann deshalb die antimikrobielle Wirksamkeit bedeutend steigern (MEALEY, 2001). So konnte in der vorliegenden Untersuchung eine deutlich bessere *in-vitro*-Wirksamkeit von Amoxicillin-Clavulansäure im Vergleich zu nicht-potenziertem Amoxicillin gegenüber sämtlichen bakteriellen Isolaten gezeigt werden. Vergleichbare Ergebnisse liefern auch andere Studien (SCHULZ et al., 2006; GREINER et al., 2007a, 2007b; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Amoxicillin sollte aus diesem Grund nicht als empirische antibiotische Therapie bei bakteriellen Infektionen des caninen Respirationstrakts eingesetzt werden, solange nicht mittels Resistenztest eine Empfänglichkeit der beteiligten Bakterien bestätigt wurde.

Von den am häufigsten im Zusammenhang mit caninen respiratorischen Sekundärinfektionen isolierten Bakterien zeigten *Pasteurella* spp. in der vorliegenden Untersuchung das günstigste Resistenzspektrum. Über 85 % der getesteten Isolate waren empfänglich für die Wirkstoffe Cefotaxim und Doxycyclin sowie über 95 % der Isolate sensibel gegenüber Cephalosporinen der ersten Generation, Amoxicillin-Clavulansäure, Sulfonamid/Trimethoprim und Ampicillin. Kein Isolat von *Pasteurella* spp. wies eine *in-vitro*-Resistenz gegenüber Enrofloxacin auf. Lediglich für Gentamicin konnte nur bei rund 80 %

der Isolate eine Empfänglichkeit gezeigt werden. Die hohe Sensibilität von Pasteurellen aus dem caninen Respirationstrakt gegenüber den meisten Antibiotika konnte auch in sämtlichen vorangegangenen Studien gezeigt werden (STONE & POOK, 1992; ANGUS et al., 1997; STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). Allerdings wurden *Pasteurella* spp. nur in wenigen Fällen in Reinkultur isoliert (JOHNSON et al., 2013), so dass sich eine antibiotische Therapie nach dem Resistenzverhalten der übrigen an einer Mischinfektion beteiligten Keime ausrichten sollte.

Besonders einige gramnegative Bakterienspezies wiesen ein ausgeprägtes Resistenzverhalten gegenüber tiermedizinisch eingesetzten antibiotischen Wirkstoffen auf. Isolate aus der Familie *Enterobacteriaceae* zeigten in der vorliegenden Untersuchung ausgedehnte Resistenzen. Insbesondere *E. coli* war gegenüber einer Vielzahl von Wirkstoffen resistent. Weniger als die Hälfte der *E.-coli*-Isolate war sensibel gegenüber den Wirkstoffen Amoxicillin-Clavulansäure, Sulfonamid/Trimethoprim, Doxycyclin und Ampicillin. Lediglich für die Wirkstoffe Enrofloxacin, Gentamicin und Cefotaxim konnte eine moderate *in-vitro*-Wirksamkeit mit Resistenzen bei 20 bis 30 % der Isolate nachgewiesen werden. Ein vergleichbar hoher Anteil an resistenten *E.-coli*-Isolaten wird von STEINFELD und Mitarbeitern (2012) sowie ANGUS und Mitarbeitern (1997) gegenüber Amoxicillin, Tetracyclin, Sulfonamid/Trimethoprim und Amoxicillin-Clavulansäure bestätigt. Geringere Resistenzen mit einem Anteil von über 80 % an sensiblen Isolaten konnten JOHNSON und Mitarbeiter (2013) für Amoxicillin-Clavulansäure zeigen, während die Empfindlichkeiten gegenüber Ampicillin (56 %), Gentamicin (89 %), Tetracyclin (65 %), Enrofloxacin (78 %) und Sulfonamid/Trimethoprim (72 %) höher lagen als in der vorliegenden Untersuchung. ANGUS und Mitarbeiter (1997) konnten ebenfalls eine höhere *in-vitro*-Wirksamkeit für Enrofloxacin (92 %) und Gentamicin (97 %) gegenüber Isolaten von *E. coli* feststellen. Die höheren Anteile an sensiblen Isolaten von *E. coli* im Vergleich zu den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung lassen sich wahrscheinlich auch durch Unterschiede in der Methodik und Studienpopulation erklären. Während in der vorliegenden Untersuchung Empfindlichkeitsprüfungen mittels Agardiffusionstest erstellt wurden, verwendeten beide vorangegangenen Studien die Mikrodilutionsmethode zur Prüfung der *in-vitro*-Sensibilität. Beide Methoden stimmen nicht immer überein.

Insbesondere im Agardiffusionstest als „intermediär sensibel“ klassifizierte Isolate könnten im Mikrodilutionstest als „sensibel“ eingeordnet werden, was einem „geringfügigen Irrtum“ („minor error“) entspricht (SCHWARZ et al., 2003). Isolate, die in der vorliegenden Untersuchung als „intermediär sensibel“ klassifiziert wurden, wurden zu Zwecken der Auswertung als resistent eingeordnet. In der Studie von JOHNSON und Mitarbeitern (2013) wurden mit 18 Isolaten deutlich weniger als in der vorliegenden Arbeit untersucht. Beide vorangegangenen Studien stammen aus Kalifornien, wodurch geografisch bedingte Unterschiede im Resistenzmuster einzelner Bakterienstämme denkbar sind (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013). Nicht zuletzt stammen die Daten der vorliegenden Untersuchung aus einem Zeitraum von 23 Jahren. Die beiden vorangegangenen Studien erhoben Daten aus den Zeiträumen 1989 bis 1995 (ANGUS et al., 1997) und 2001 bis 2011 (JOHNSON et al., 2013). Im Vergleich beider am selben Institut durchgeführten Studien untereinander scheinen sich zunehmende Resistenzen bei *E. coli*, besonders gegenüber Enrofloxacin und Gentamicin, abzuzeichnen (ANGUS et al., 1997; JOHNSON et al., 2013). Eine Studie aus Deutschland konnte für *E. coli* ebenfalls eine signifikante Zunahme an Resistenzen im Vergleich der Zeiträume 1999/2000 und 2004 bis 2009 nachweisen (STEINFELD et al., 2012). Ein signifikanter Anstieg der gegenüber Enrofloxacin resistenten Isolate von *E. coli* konnte auch in der vorliegenden Untersuchung dokumentiert werden. Im Rahmen des nationalen Resistenzmonitorings von tierpathogenen Bakterien konnten zuletzt ebenfalls ansteigende Resistenzraten von *E. coli* aus diversen Organlokalisationen bei verschiedenen Tierarten festgestellt werden, wobei sich die Resistenzsituation bei Kleintieren im Vergleich zum Nutztierbereich noch etwas günstiger darstellte (BUNDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT, 2014).

Die höchsten Resistenzraten konnten in der vorliegenden Untersuchung für Isolate von *Pseudomonas* spp. gezeigt werden. Weniger als ein Viertel der Isolate wiesen eine *in-vitro*-Empfänglichkeit für die meisten antibiotischen Wirkstoffe auf, darunter alle getesteten Cephalosporine, Amoxicillin-Clavulansäure, Sulfonamid/Trimethoprim und Ampicillin. Lediglich die Wirkstoffe Enrofloxacin und Gentamicin zeigten eine moderate Wirksamkeit gegenüber einem Großteil der isolierten Pseudomonaden (je 72 %). Diese Ergebnisse bestätigen die hohen

Resistenzraten gegenüber einer Vielzahl von antibiotischen Wirkstoffen, wie sie bereits in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen wurden (STEINFELD et al., 2012; JOHNSON et al., 2013). STEINFELD und Mitarbeiter (2012) konnten jedoch eine hohe Wirksamkeit von Gentamicin und Enrofloxacin gegenüber allen *Pseudomonas*-spp.-Isolaten zeigen, was im Gegensatz zur Untersuchung von JOHNSON und Mitarbeitern (2013) steht, die hohe Resistenzraten auch gegenüber Enrofloxacin nachwies. In beiden Studien wurde jedoch nur eine geringe Anzahl an Isolaten gegenüber diesen Wirkstoffen getestet. Als einziger Wirkstoff mit voller Wirksamkeit gegenüber Pseudomonaden zeigte sich in letztgenannter Untersuchung das Aminoglykosid-Antibiotikum Amikacin, wobei die Wirksamkeit von Gentamicin gegenüber diesen multiresistenten Bakterien nicht getestet wurde (JOHNSON et al., 2013). Als Teil der Normalflora bei Tieren sind Pseudomonaden durch einen übermäßigen Einsatz von Antibiotika einem starken Selektionsdruck ausgesetzt, der die Entwicklung zusätzlicher Resistenzen induzieren kann (HANCOCK & SPEERT, 2000; BOOTHE, 2006). Die Fähigkeit zur Bildung von Biofilmen trägt weiterhin dazu bei, dass Infektionen mit diesen Bakterien oft schwer zu therapieren sind (BOOTHE, 2006; OLIVARES et al., 2013). MÜLLER und HOM (2009) konnten bei einer großangelegten Vergleichsstudie ausgedehnte Resistenzen für *Pseudomonas* spp., insbesondere *P. aeruginosa*, gegenüber Fluorchinolonen feststellen. Nur 65 % der 363 aus dem Respirationstrakt und anderen Lokalisationen von Hunden stammenden *Pseudomonas*-spp.-Isolate und nur 43 % der 288 *P. aeruginosa*-Isolate waren gegenüber Enrofloxacin sensibel (MÜLLER & HOM, 2009). Noch höhere Resistenzen wurden im Rahmen der BfT-GermVet Monitoringstudie 2004 bis 2006 bei *P. aeruginosa* detektiert. Weniger als ein Drittel der Isolate aus verschiedenen nicht-respiratorischen Geweben von Hunden und Katzen war sensibel gegenüber Enrofloxacin, weniger als die Hälfte sensibel gegenüber Gentamicin und beinahe alle Isolate resistent gegenüber gängigen Beta-Laktam-Antibiotika (WERCKENTHIN et al., 2007). Pseudomonaden kommt somit neben *E. coli* eine große Bedeutung als multiresistente Problemkeime in der Veterinärmedizin zu, auch bei respiratorischen Infektionen (WEESE, 2008).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung legen nahe, dass Primärpathogene wie *B. bronchiseptica* oder *Mycoplasma* spp. ein vergleichsweise vorhersehbares

Resistenzspektrum aufweisen, insgesamt jedoch eine eher untergeordnete Rolle bei Hunden mit bakteriellen Infektionen des Respirationstrakts darstellen. In bestimmten klinischen Situationen (Expositionsvorbericht, Jungtiere) können diese Pathogene allerdings eine wichtige Bedeutung erlangen. Aufgrund der großen Bandbreite an möglichen Sekundärkeimen, die an respiratorischen Infektionen beteiligt sein können, der häufigen Beteiligung von gramnegativen Bakterien sowie des regelmäßigen Auftretens von Mischinfektionen mit mehreren Keimen, ist das Vorkommen und Resistenzverhalten der meisten Bakterien nicht vorhersagbar. Kein antibiotischer Wirkstoff zeigte in der vorliegenden und in vorangegangenen Untersuchungen eine *in-vitro*-Wirksamkeit gegenüber allen aus dem Respirationstrakt von Hunden isolierten Bakterien. Enrofloxacin und Gentamicin zeigten in der vorliegenden Untersuchung von allen getesteten Wirkstoffen die geringsten Resistenzraten und waren gegenüber einem breiten Spektrum an Bakterien mit einer durchschnittlichen *in-vitro*-Wirksamkeit von 79 bis 86 % effektiv. Im Idealfall erfolgt die Absicherung der Diagnose bei Verdacht auf eine bakterielle Infektion des Respirationstrakts auf einer breiten Basis von erhobenen Befunden. Insbesondere zytologische und mikrobiologische Untersuchungen von BALF-Proben sind zur Identifikation der Ätiologie heranzuziehen. Ein antimikrobieller *in-vitro*-Resistenztest gegenüber gängigen und neueren Antibiotika sollte für alle kultivierten Isolate gemäß standardisierten und aktuellen Durchführungsvorschriften erstellt werden. In Abhängigkeit vom Zustand des Patienten, der Schwere der klinischen Symptome und einer möglicherweise zugrunde liegenden Erkrankung, muss eine Therapie in manchen Fällen bereits begonnen werden, bevor die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung vorliegen. Eine schnelle klinische Einschätzung, ob eine bakterielle Infektion vorliegt und welche Spezies hauptsächlich beteiligt sind, können vorab zytologische Untersuchungen von BALF-Proben und Gram-gefärbte Ausstriche bieten (ANGUS et al., 1997; PEETERS et al., 2000). Auf Grundlage der in dieser Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse scheint in den meisten Fällen die Verabreichung eines Breitbandantibiotikums zur initialen Therapie angezeigt. Bei Vorhandensein einer ausschließlich grampositiven Bakterienpopulation oder beim Verdacht auf eine Beteiligung obligater Anaerobier – wie sie häufig bei Fremdkörper- oder Aspirationspneumonien vorkommt – kann Amoxicillin-Clavulansäure empfohlen werden, sowie auch bei im Wachstum befindlichen Junghunden. Bakterielle Infektionen, ausgelöst durch gramnegative oder nicht

bekannte Bakterien einschließlich Mykoplasmen, lassen sich am ehesten mit Enrofloxacin oder anderen Gyrasehemmern anbehandeln. Nachdem die Ergebnisse von bakteriologischer Untersuchung und Resistenztest vorliegen, sollte die weitere Therapie unter Berücksichtigung des klinischen Ansprechens des Patienten auf die bereits erfolgte empirische Medikation angepasst werden. Aufgrund des verhältnismäßig langen Zeitraums, über den Antibiotika bei bakteriellen Pneumonien verabreicht werden müssen, und dem damit verbundenen allgemein erhöhten Risiko zur Entstehung von antimikrobiellen Resistenzen, sollte auf Grundlage des Antibiogrammes ein Wirkstoff mit möglichst schmalen Wirkspektrum ausgewählt werden, der eine hohe Anreicherung im Respirationstrakt erlangt und eine große therapeutische Breite aufweist (BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2010; DEAR, 2014).



## V. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen von Bakterien im unteren Respirationstrakt von Hunden mit Atemwegserkrankungen und deren Resistenzverhalten gegenüber klinisch relevanten Antibiotika untersucht. Hierfür wurden die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen und Resistenztests von 502 Proben von 493 Hunden retrospektiv ausgewertet, die im Zeitraum von 1989 bis 2011 an der Medizinischen Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mit respiratorischen Symptomen vorgestellt wurden.

Aerobe Bakterien wurden aus 65 % der Proben isoliert, wobei in 47 % der positiven Kulturen mehrere Isolate nachgewiesen wurden. Grampositive Bakterien wurden aus 52 % und gramnegative Bakterien aus 77 % der Proben mit bakteriellem Wachstum kultiviert. Die häufigsten Isolate umfassten Spezies der Gattungen *Streptococcus* (31 %), *Staphylococcus* (19 %), *Pasteurella* (16 %) und *Pseudomonas* (14 %). Weiterhin konnten Enterobakterien in 30 % der positiven Proben nachgewiesen werden, bei denen es sich in der Hälfte der Fälle um *Escherichia coli* (15 %) handelte. *Bordetella bronchiseptica* als primär pathogenes Bakterium wurde in 8 % der positiven Fälle vergleichsweise selten isoliert.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde anhand der Ergebnisse des Agardiffusionstests die *in-vitro*-Sensibilität der häufigsten bakteriellen Isolate gegenüber den antibiotischen Wirkstoffen Enrofloxacin, Gentamicin, Cefalexin/Cefalotin, Amoxicillin-Clavulansäure, Sulfonamid/Trimethoprim, Cefotaxim, Doxycyclin und Ampicillin ausgewertet. Enrofloxacin zeigte die höchste Gesamtwirksamkeit aller getesteten antibiotischen Wirkstoffe gegenüber 86 % aller Keime, darunter 87 % der gramnegativen Isolate. Hochwirksam gegenüber grampositiven Bakterien erwiesen sich Amoxicillin-Clavulansäure (92 %) und Cephalosporine der ersten Generation (86 %), wobei 40 % der gramnegativen Isolate resistent gegenüber diesen Wirkstoffen waren. Ausgedehnte Resistenzen zeigten sich vor allem unter gramnegativen Spezies gegenüber Beta-Laktam-Antibiotika, potenzierten Sulfonamiden und Doxycyclin. Sehr hohe Resistenzraten wurden für *Escherichia coli* und *Pseudomonas* spp. nachgewiesen. Lediglich Enrofloxacin und Gentamicin wiesen eine Wirksamkeit gegenüber 70 bis 73 % dieser Isolate

auf. Am empfänglichsten zeigten sich *Pasteurella* spp. mit weniger als 15 % Resistenzen gegenüber den meisten Antibiotika. Eine günstige Resistenzlage konnte auch für *Bordetella bronchiseptica* nachgewiesen werden. Hier lagen über 90 % sensible Isolate gegenüber Enrofloxacin, Gentamicin, Amoxicillin-Clavulansäure und Doxycyclin vor. Im Verlauf des Studienzeitraums konnte eine signifikante Abnahme der *in-vitro*-Wirksamkeit von Enrofloxacin gezeigt werden. Insbesondere für *Escherichia coli* konnte in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraums ein signifikanter Anstieg des Anteils Enrofloxacin-resistenter Isolate nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung unterstreichen aufgrund des nicht exakt vorhersehbaren Resistenzverhaltens der isolierten Bakterien die Notwendigkeit zur routinemäßigen Durchführung von bakteriologischen Untersuchungen und antibiotischen Resistenztests bei Hunden mit bakteriellen Atemwegsinfektionen. Anhand der erhobenen Daten kann Enrofloxacin zur empirischen antibiotischen Behandlung oder zur initialen Therapie bis zum Vorliegen der Ergebnisse aus Erregerkultivierung und Resistenztests bei Infektionen mit gramnegativen oder unbekanntem Erregern eingesetzt werden, während Amoxicillin-Clavulansäure zur Behandlung von Infektionen mit grampositiven Bakterien geeignet erscheint.

## VI. SUMMARY

Aim of the study was to describe the distribution of bacteria isolated from the lower airways of dogs with respiratory diseases and their susceptibility to commonly used antibiotics. For that purpose, results of bacterial cultures and sensitivity tests from 502 lower respiratory tract samples obtained from 493 privately owned dogs were evaluated retrospectively. All patients had been presented with respiratory signs to the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig Maximilian University Munich between 1989 and 2011.

Aerobic bacteria were isolated from 65 % of samples, and more than one bacterial isolate was detected in 47 % of positive cultures. Gram-positive and gram-negative species were cultured from 52 % and 77 % of samples with bacterial growth, respectively. The most frequently isolated bacterial species were *Streptococcus* spp. (31 %), *Staphylococcus* spp. (19 %), *Pasteurella* spp. (16 %) and *Pseudomonas* spp. (14 %). Furthermore, gram-negative rods of the family *Enterobacteriaceae* were detected in 30 % of positive samples, including *Escherichia coli* in half of the cases (15 %). However, *Bordetella bronchiseptica*, which is considered a primary bacterial pathogen in dogs, was isolated from only 8 % of cases with bacterial growth.

In the second part of the study the *in-vitro*-susceptibility of the most frequently isolated bacteria was evaluated. Results of agar disc diffusion tests were included for the following antimicrobials: enrofloxacin, gentamicin, cefalexin/cefalotin, amoxicillin/clavulanic acid, sulphonamides with trimethoprim, cefotaxime, doxycycline, and ampicillin. Enrofloxacin showed the best efficacy of all antimicrobials tested with an overall efficacy against 86 % of all bacteria and 87 % of gram-negative bacteria. The highest proportion of susceptible gram-positive isolates was shown for amoxicillin/clavulanic acid (92 %) and first-generation cephalosporins (86 %), whereas 40 % of gram-negative isolates were resistant to these antibiotics. Concerning gram-negative species, high proportions of resistant bacteria were demonstrated for beta-lactam-antibiotics, potentiated sulphonamides, and doxycycline. Among the most frequently isolated bacteria, *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp. were associated with a poor susceptibility to commonly used antibiotics. Only 70 % to 73 % of these isolates were

susceptible to enrofloxacin and gentamicin. High susceptibility rates were shown for *Pasteurella* spp. with less than 15 % resistant isolates against most antimicrobial agents. A favourable resistance situation was also demonstrated for *Bordetella bronchiseptica*. Over 90 % of isolates were susceptible to enrofloxacin, gentamicin, amoxicillin/clavulanic acid, and doxycycline. The overall efficacy of enrofloxacin showed a significant decrease in the course of the time span. Particularly the proportion of *Escherichia-coli*-isolates that were resistant to enrofloxacin, revealed a significant increase during the second half of the study.

These results emphasize the need for routine bacteriological examinations and antibiotic susceptibility testing in dogs with lower respiratory tract infections, since resistance rates cannot be predicted for most of the isolated bacterial species. Based on the present data, enrofloxacin can be recommended for empirical use or as first-line treatment as long as results of bacterial cultures and susceptibility tests are pending in patients with suspected gram-negative or unknown aerobic bacterial pathogens. Amoxicillin/clavulanic acid would be the preferred choice, if infection with gram-positive bacteria is suspected.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Amtsberg G, Verspohl J. Direkter Erregernachweis bei Bakterien- und Pilzinfektionen. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 9th edn. Selbitz HJ, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke 2011: 51-61.

Anderton TL, Maskell DJ, Preston A. Ciliostasis is a key early event during colonization of canine tracheal tissue by *Bordetella bronchiseptica*. Microbiology 2004; 150: 2843-55.

Andreasen CB. Bronchoalveolar lavage. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2003; 33: 69-88.

Angus JC, Jang SS, Hirsh DC. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). J Am Vet Med Assoc 1997; 210: 55-8.

Authier S, Paquette D, Labrecque O, Messier S. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. Can Vet J 2006; 47: 774-8.

Barton L. Aspiration Pneumonia. In: Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats. King LG, ed. St. Louis: Saunders 2004: 422-30.

Bauer N, Moritz A, Weiss R. Vergleich der Keimflora im oberen und unteren Respirationstrakt gesunder Hunde. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere 2003; 31: 92-8.

Bemis DA, Greisen HA, Appel MJ. Pathogenesis of canine bordetellosis. J Infect Dis 1977; 135: 753-62.

Black DM, Rankin SC, King LG. Antimicrobial therapy and aerobic bacteriologic culture patterns in canine intensive care unit patients: 74 dogs (January-June 2006). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19: 489-95.

Bond R, Loeffler A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. *J Small Anim Pract* 2012; 53: 147-54.

Boothe DM. Anaerobic infections in small animals. *Probl Vet Med* 1990; 2: 330-47.

Boothe DM. Drug Therapy of Respiratory Bacterial Infections. In: *Bacterial Infections of the Respiratory Tract in Dogs and Cats*. King LG, ed. Trenton: Veterinary Learning Systems 1997: 65-87.

Boothe DM. Principles of antimicrobial therapy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 1003-47.

Boothe DM, Boeckh A, Boothe HW. Evaluation of the distribution of enrofloxacin by circulating leukocytes to sites of inflammation in dogs. *Am J Vet Res* 2009; 70: 16-22.

Boothe HW, Jones SA, Wilkie WS, Boeckh A, Stenstrom KK, Boothe DM. Evaluation of the concentration of marbofloxacin in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid after administration in dogs. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1770-4.

Brady CA. Bacterial Pneumonia in Dogs and Cats. In: *Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats*. King LG, ed. St. Louis, Missouri: Saunders 2004: 412-21.

Braga PC. Antibiotic penetrability into bronchial mucus: pharmacokinetics and clinical considerations. *Curr Ther Res* 1991; 49: 300-27.

Brazier JS, Hall V, Morris TE, Gal M, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of Gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study in England and Wales. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 224-8.

Brenner-Michael G, Schink A-K, Schwarz S, Kadlec K. Extended-Spektrum  $\beta$ -Lactamasen mit erweitertem Wirkungsspektrum (ESBLs) und Carbapenemasen bei *Escherichia coli* von Tieren in Deutschland. In: GERMAP 2012. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Infektiologie Freiburg, eds. Rheinbach: Antiinfectives Intelligence 2014: 126-8.

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

Brown NO, Noone KE, Kurzman ID. Alveolar lavage in dogs. *Am J Vet Res* 1983; 44: 335-7.

Brownlie SE. A retrospective study of diagnosis in 109 cases of canine lower respiratory disease. *J Small Anim Pract* 1990; 31: 371-6.

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2014) Berichte zur Resistenzmonitoringstudie 2010/2011: Resistenzsituation bei klinisch wichtigen tierpathogenen Bakterien. Springer International Publishing, Cham

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., Infektiologie Freiburg (2014) GERMAP 2012. Antibiotika-Resistenz und -Verbrauch. Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland. Antiinfectives Intelligence, Rheinbach

Bundestierärztekammer (2010) Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln, Beilage zum Deutschen Tierärzteblatt 10/2010. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover

Buonavoglia C, Martella V. Canine respiratory viruses. *Vet Res* 2007; 38: 355-73.

Carter GR, Wise DJ (2004) *Essentials of Veterinary Bacteriology and Mycology*, 6th edn. Iowa State Press, Ames

Cerquetella M, Laus F, Paggi E, Zuccari T, Spaterna A, Tesei B. Bronchial vegetal foreign bodies in the dog - localization in 47 cases. *J Vet Med Sci* 2013; 75: 959-62.

Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. Respiratory disease in kennelled dogs: serological responses to *Bordetella bronchiseptica* lipopolysaccharide do not correlate with bacterial isolation or clinical respiratory symptoms. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10: 352-6.

Chalker VJ. Canine mycoplasmas. *Res Vet Sci* 2005; 79: 1-8.

Clare M, Hopper K. Mechanical ventilation: ventilator settings, patient management, and nursing care. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2005; 27: 256-69.

Clarke CR. Antimicrobial resistance. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36: 987-1001.

Cohn LA, Reinero CR. Respiratory defenses in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 845-60.



Cohn LA. Pulmonary Parenchymal Disease. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 7th edn. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders 2010: 1096-119.

Corley DE, Kirtland SH, Winterbauer RH, Hammar SP, Dail DH, Bauermeister DE, Bolen JW. Reproducibility of the histologic diagnosis of pneumonia among a panel of four pathologists: analysis of a gold standard. Chest 1997; 112: 458-65.

Court MH, Dodman NH, Seeler DC. Inhalation therapy. Oxygen administration, humidification, and aerosol therapy. Vet Clin North Am Small Anim Pract 1985; 15: 1041-59.

Craven DE, Hjalmarson KI. Ventilator-associated tracheobronchitis and pneumonia: thinking outside the box. Clin Infect Dis 2010; 51 Suppl 1: S59-66.

Creighton S, Wilkins R. Transtracheal Aspiration Biopsy: Technique and Cytologic Evaluation. J Am Anim Hosp Assoc 1974a; 10: 219-26.

Creighton S, Wilkins R. Bacteriologic and cytologic evaluation of animals with lower respiratory tract disease using transtracheal aspiration biopsy. J Am Anim Hosp Assoc 1974b; 10: 227-32.

Datz C. *Bordetella* infections in dogs and cats: Treatment and prevention. Compend Contin Educ Pract Vet 2003a; 25: 902-14.

Datz C. *Bordetella* infections in dogs and cats: Pathogenesis, clinical signs, and diagnosis. Compend Contin Educ Pract Vet 2003b; 25: 896-901.

Dear JD. Bacterial pneumonia in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2014; 44: 143-59.

Dowling PM. Rational Empiric Antimicrobial Therapy. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV, 14th edn. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis: Saunders 2009: 1225-9.

Epstein SE, Mellema MS, Hopper K. Airway microbial culture and susceptibility patterns in dogs and cats with respiratory disease of varying severity. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2010; 20: 587-94.

Fenwick BW. *Bordetella*. In: Veterinary Microbiology, 3rd edn. McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM, eds. Ames: Wiley-Blackwell 2013: 120-6.

Ford RB. *Bordetella bronchiseptica*: Beyond Kennel Cough. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV, 14th edn. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis: Saunders 2009a: 646-9.

Ford RB. Bacterial Pneumonia. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV, 14th edn. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis: Saunders 2009b: 658-62.

Ford RB. Canine Infectious Respiratory Disease. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th edn. Greene CE, ed. St. Louis, Missouri: Saunders 2012: 55-65.

Greene CE, Chalker VJ. Nonhemotropic Mycoplasmal, Ureoplasmal and L-Form Infections. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th edn. Greene CE, ed. St. Louis: Saunders 2012: 319-25.

Greene CE, Marks SL. Gastrointestinal and Intra-Abdominal Infections. In: Infectious Diseases of the Dog and Cat, 4th edn. Greene CE, ed. St. Louis: Saunders 2012: 950-81.

Greiner M, Wolf G, Hartmann K. Bacteraemia in 66 cats and antimicrobial susceptibility of the isolates (1995-2004). J Feline Med Surg 2007a; 9: 404-10.

Greiner M, Wolf G, Hartmann K. Bacteraemia and antimicrobial susceptibility in dogs. *Vet Rec* 2007b; 160: 529-30.

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

Hall JL, Holmes MA, Baines SJ. Prevalence and antimicrobial resistance of canine urinary tract pathogens. *Vet Rec* 2013; 173: 549.

Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 2000; 3: 247-55.

Harpster NK. The effectiveness of the cephalosporins in the treatment of bacterial pneumonias in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 1981; 17: 766-72.

Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64 Suppl 1: i3-10.

Hawkins EC, DeNicola DB, Kuehn NF. Bronchoalveolar lavage in the evaluation of pulmonary disease in the dog and cat. State of the art. *J Vet Intern Med* 1990; 4: 267-74.

Hawkins EC, DeNicola DB, Plier ML. Cytological analysis of bronchoalveolar lavage fluid in the diagnosis of spontaneous respiratory tract disease in dogs: a retrospective study. *J Vet Intern Med* 1995; 9: 386-92.

Hawkins EC, Boothe DM, Guinn A, Aucoin DP, Ngyuen J. Concentration of enrofloxacin and its active metabolite in alveolar macrophages and pulmonary epithelial lining fluid of dogs. *J Vet Pharmacol Ther* 1998; 21: 18-23.

Hawkins EC, Berry CR. Use of a modified stomach tube for bronchoalveolar lavage in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1999; 215: 1635-9.

Hawkins EC. Bronchoalveolar Lavage. In: Textbook of Respiratory Disease in Dogs and Cats. King LG, ed. St. Louis: Saunders 2004: 118-28.

Hopper K, Haskins SC, Kass PH, Rezende ML, Aldrich J. Indications, management, and outcome of long-term positive-pressure ventilation in dogs and cats: 148 cases (1990-2001). J Am Vet Med Assoc 2007; 230: 64-75.

Hozbor D, Fouque F, Guiso N. Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction. Res Microbiol 1999; 150: 333-41.

ISCAID Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases: Antimicrobial use guidelines for treatment of respiratory tract disease in dogs and cats. In preparation. International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID), <http://www.iscaid.org>

Jameson PH, King LA, Lappin MR, Jones RL. Comparison of clinical signs, diagnostic findings, organisms isolated, and clinical outcome in dogs with bacterial pneumonia: 93 cases (1986-1991). J Am Vet Med Assoc 1995; 206: 206-9.

Johnson L. Small animal bronchoscopy. Vet Clin North Am Small Anim Pract 2001; 31: 691-705.

Johnson LR, Fales WH. Clinical and microbiologic findings in dogs with bronchoscopically diagnosed tracheal collapse: 37 cases (1990-1995). J Am Vet Med Assoc 2001; 219: 1247-50.

Johnson LR, Queen EV, Vernau W, Sykes JE, Byrne BA. Microbiologic and cytologic assessment of bronchoalveolar lavage fluid from dogs with lower respiratory tract infection: 105 cases (2001-2011). J Vet Intern Med 2013; 27: 259-67.

Jones RN. Microbiology of newer fluoroquinolones: focus on respiratory pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 44: 213-20.

Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 1749-55.

Keil DJ, Fenwick B. Role of *Bordetella bronchiseptica* in infectious tracheobronchitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1998; 212: 200-7.

King LG. Approach to Specific Syndromes. In: *Bacterial Infections of the Respiratory Tract in Dogs and Cats*. King LG, ed. Trenton: Veterinary Learning Systems 1997: 97-100.

Kogan DA, Johnson LR, Sturges BK, Jandrey KE, Pollard RE. Etiology and clinical outcome in dogs with aspiration pneumonia: 88 cases (2004-2006). *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 1748-55.

Krüger M, Seidler T. Allgemeine Bakteriologie. In: *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*, 8th edn. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke 2007: 344-92.

Lee-Fowler T, Reinero C. Bacterial Respiratory Infections. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 4th edn. Greene CE, ed. St. Louis: Saunders 2012: 936-50.

Lee JA, Drobatz KJ, Koch MW, King LG. Indications for and outcome of positive-pressure ventilation in cats: 53 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 924-31.

Lees P. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and therapeutics of pradofloxacin in the dog and cat. *J Vet Pharmacol Ther* 2013; 36: 209-21.

Lindsey JO, Pierce AK. An examination of the microbiologic flora of normal lung of the dog. *Am Rev Respir Dis* 1978; 117: 501-5.

Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, Dowell SF, File TM Jr, Musher DM, Niederman MS, Torres A, Whitney CG. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis* 2007; 44 Suppl 2: S27-72.

McCarter YS. Antimicrobial Modes of Action. In: *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Coyle MB, ed. Washington, DC: American Society for Microbiology 2005: 3-14.

McCauley M, Atwell RB, Sutton RH, Lumsden JS. Unguided bronchoalveolar lavage techniques and residual effects in dogs. *Aust Vet J* 1998; 76: 161-5.

McCullough S, Brinson J. Collection and interpretation of respiratory cytology. *Clin Tech Small Anim Pract* 1999; 14: 220-6.

McKiernan BC, Smith AR, Kissil M. Bacterial isolates from the lower trachea of clinically healthy dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1984; 20: 139-42.

Mealey KL. Penicillins and beta-lactamase inhibitor combinations. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1893-6.

Morley PS, Apley MD, Besser TE, Burney DP, Fedorka-Cray PJ, Papich MG, Traub-Dargatz JL, Weese JS, American College of Veterinary Internal Medicine. Antimicrobial drug use in veterinary medicine. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 617-29.

Müller E, Hom S. Wirksamkeit von Enrofloxacin und Marbofloxacin gegen Bakterienisolate von Hund und Katze - *in vitro* Studie zur Resistenzlage. *Prakt Tierarzt* 2009; 90: 512-21.

Norris CR, Griffey SM, Samii VF, Christopher MM, Mellema MS. Comparison of results of thoracic radiography, cytologic evaluation of bronchoalveolar lavage fluid, and histologic evaluation of lung specimens in dogs with respiratory tract disease: 16 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 1456-61.

Ogeer-Gyles JS, Mathews KA, Boerlin P. Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2006; 16: 1-18.

Olivares J, Bernardini A, Garcia-Leon G, Corona F, Sanchez MB, Martinez JL. The intrinsic resistome of bacterial pathogens. *Front Microbiol* 2013; 4 Article 103: 1-15.

Olsen JD. Rational antibiotic therapy for respiratory disorders in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30: 1337-55.

Oluoch AO, Kim CH, Weisiger RM, Koo HY, Siegel AM, Campbell KL, Burke TJ, McKiernan BC, Kakoma I. Nonenteric *Escherichia coli* isolates from dogs: 674 cases (1990-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218: 381-4.

Ortez JH. A Guide to Using the NCCLS Documents. In: *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Coyle MB, ed. Washington, DC: American Society for Microbiology 2005a: 25-38.

Ortez JH. Disk Diffusion Testing. In: *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Coyle MB, ed. Washington, DC: American Society for Microbiology 2005b: 39-52.

Padrid P. Pulmonary diagnostics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2000; 30: 1187-206.

Papich MG. Antimicrobials, susceptibility testing, and minimum inhibitory concentrations (MIC) in veterinary infection treatment. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013a; 43: 1079-89.

Papich MG. Antibiotic treatment of resistant infections in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013b; 43: 1091-107.

Pecora DV. Bacteriologic cultural examination of the lower respiratory tract of laboratory dogs. *Am J Vet Res* 1976; 37: 1511-3.

Peeters DE, McKiernan BC, Weisiger RM, Schaeffer DJ, Clercx C. Quantitative bacterial cultures and cytological examination of bronchoalveolar lavage specimens in dogs. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 534-41.

Pierce-Hendry SA, Dennis J. Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. *Compend Contin Educ Vet* 2010; 32: E1-5.

Plumb DC (2008) *Plumb's Veterinary Drug Handbook*, 6th edn. Wiley-Blackwell, Ames. 342-5.

Prescott JF, Hanna WJ, Reid-Smith R, Drost K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can Vet J* 2002; 43: 107-16.

Priestnall S, Erles K. *Streptococcus zooepidemicus*: an emerging canine pathogen. *Vet J* 2011; 188: 142-8.

Priestnall SL, Mitchell JA, Walker CA, Erles K, Brownlie J. New and emerging pathogens in canine infectious respiratory disease. *Vet Pathol* 2014; 51: 492-504.

Proulx A, Hume DZ, Drobatz KJ, Reineke EL. *In vitro* bacterial isolate susceptibility to empirically selected antimicrobials in 111 dogs with bacterial pneumonia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24: 194-200.



Radhakrishnan A, Drobatz KJ, Culp WTN, King LG. Community-acquired infectious pneumonia in puppies: 65 cases (1993-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2007; 230: 1493-7.

Randell SH, Boucher RC. Effective mucus clearance is essential for respiratory health. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 35: 20-8.

Rankin ID. MIC Testing. In: *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. Coyle MB, ed. Washington, DC: American Society for Microbiology 2005: 54-62.

Reizenstein E, Johansson B, Mardin L, Abens J, Mollby R, Hallander HO. Diagnostic evaluation of polymerase chain reaction discriminative for *Bordetella pertussis*, *B. parapertussis*, and *B. bronchiseptica*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1993; 17: 185-91.

Rha JY, Mahony O. Bronchoscopy in small animal medicine: indications, instrumentation, and techniques. *Clin Tech Small Anim Pract* 1999; 14: 207-12.

Richter A, Böttner A, Goossens L, Hafez HM, Hartmann K, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Luhofer G, Schulz B, Schwarz S, Sigge C, Waldmann K-H, Wallmann J, Werckenthin C, Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. Mögliche Gründe für das Versagen einer antibakteriellen Therapie in der tierärztlichen Praxis. *Prakt Tierarzt* 2006; 87: 624-31.

Rozanski EA, Rondeau MP. Respiratory pharmacotherapy in emergency and critical care medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 1073-86.

Schink AK, Kadlec K, Schwarz S. Analysis of *bla*(CTX-M)-carrying plasmids from *Escherichia coli* isolates collected in the BfT-GermVet study. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 7142-6.

Schink AK, Kadlec K, Hauschild T, Brenner Michael G, Dorner JC, Ludwig C, Werckenthin C, Hehnen HR, Stephan B, Schwarz S. Susceptibility of canine and feline bacterial pathogens to pradofloxacin and comparison with other fluoroquinolones approved for companion animals. *Vet Microbiol* 2013; 162: 119-26.

Schmid P. Die Suche nach neuen Antibiotika – mögliche Strategien und aktuelle Ansätze. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2014; 127: 498-512.

Schultz RM, Zwingenberger A. Radiographic, computed tomographic, and ultrasonographic findings with migrating intrathoracic grass awns in dogs and cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2008; 49: 249-55.

Schulz BS, Wolf G, Hartmann K. Bacteriological and antibiotic sensitivity test results in 271 cats with respiratory tract infections. *Vet Rec* 2006; 158: 269-70.

Schulz BS, Hupfauer S, Ammer H, Sauter-Louis C, Hartmann K. Suspected side effects of doxycycline use in dogs - a retrospective study of 386 cases. *Vet Rec* 2011; 169: 229.

Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer HJ, Hartmann K. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet J* 2014; 201: 365-9.

Schulze HM, Rahilly LJ. Aspiration pneumonia in dogs: pathophysiology, prevention, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet* 2012a; 34: E1-7.

Schulze HM, Rahilly LJ. Aspiration pneumonia in dogs: treatment, monitoring, and prognosis. *Compend Contin Educ Vet* 2012b; 34: E1-5.

Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 431-7.

Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Vet Res* 2001; 32: 201-25.

Schwarz S, Böttner A, Hafez HM, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Luhofer G, Richter A, Traeder W, Waldmann K-H, Wallmann J, Werckenthin C, Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2003; 116: 353-61.

Schwarz S, Alesik E, Werckenthin C, Grobbel M, Lübke-Becker A, Wieler LH, Wallmann J. Antimicrobial susceptibility of coagulase-positive and coagulase-variable *Staphylococci* from various indications of swine, dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007a; 120: 372-9.

Schwarz S, Alesik E, Grobbel M, Lübke-Becker A, Werckenthin C, Wieler LH, Wallmann J. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* from dogs and cats as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007b; 120: 423-30.

Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004-2006 in Germany. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 282-5.

Selbitz HJ. Bakterielle Krankheiten der Tiere. In: Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 8th edn. Mayr A, ed. Stuttgart: Enke 2007: 393-558.

Silley P, Stephan B, Greife HA, Pridmore A. Comparative activity of pradofloxacin against anaerobic bacteria isolated from dogs and cats. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 999-1003.

Speakman AJ, Dawson S, Corkill JE, Binns SH, Hart CA, Gaskell RM. Antibiotic susceptibility of canine *Bordetella bronchiseptica* isolates. *Vet Microbiol* 2000; 71: 193-200.

Stahlmann R, Lode H. Toxicity of quinolones. *Drugs* 1999; 58 Suppl. 2: 37-42.

Steinfeld A, Prenger-Berninghoff E, Bauer N, Weiss R, Moritz A. Bakterienisolate aus dem unteren Respirationstrakt von erkrankten Hunden und deren aktuelle Resistenzsituation. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 2012; 40: 309-17.

Stone MS, Pook H. Lung infections and infestations. Therapeutic considerations. *Probl Vet Med* 1992; 4: 279-90.

Sumner CM, Rozanski EA, Sharp CR, Shaw SP. The use of deep oral swabs as a surrogate for transoral tracheal wash to obtain bacterial cultures in dogs with pneumonia. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011; 21: 515-20.

Sykes JE (2014a) ISCAID Antimicrobial Use Guidelines. 39th World Small Animal Veterinary Association Congress. Cape Town. 346-9.

Sykes JE, Rankin SC. Isolation and Identification of Aerobic and Anaerobic Bacteria. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Sykes JE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders 2014: 17-28.

Sykes JE, Papich MG. Antibacterial Drugs. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. Sykes JE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders 2014: 66-86.

Sykes JE. Canine Viral Respiratory Infections. In: Canine and Feline Infectious Diseases. Sykes JE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders 2014b: 170-81.

Sykes JE. Bacterial Bronchopneumonia and Pyothorax. In: Canine and Feline Infectious Diseases. Sykes JE, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders 2014c: 847-58.

Tart KM, Babski DM, Lee JA. Potential risks, prognostic indicators, and diagnostic and treatment modalities affecting survival in dogs with presumptive aspiration pneumonia: 125 cases (2005-2008). J Vet Emerg Crit Care (San Antonio) 2010; 20: 319-29.

Tenwolde AC, Johnson LR, Hunt GB, Vernau W, Zwingenberger AL. The role of bronchoscopy in foreign body removal in dogs and cats: 37 cases (2000-2008). J Vet Intern Med 2010; 24: 1063-8.

Thayer GW, Robinson SK. Bacterial bronchopneumonia in the dog - a review of 42 cases. J Am Anim Hosp Assoc 1984; 20: 731-5.

Theuretzbacher U. Beta-Lactamasen und Beta-Lactamase-Inhibitoren. CTJ 1998; 7: 139-42.

Van Duijkeren E, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyorala S, Ruzauskas M, Sanders P, Threlfall EJ, Torren-Edo J, Torneke K, Scientific Advisory Group on Antimicrobials (SAGAM). Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J Antimicrob Chemother 2011; 66: 2705-14.

Vieson MD, Piñeyro P, LeRoith T. A review of the pathology and treatment of canine respiratory infections. Vet Med Res Rep 2012; 3: 25-39.

Volta A, Piccionello AP, Bonazzi M, Gnudi G, Bertoni G. What is your diagnosis? Bronchial foreign body. J Am Vet Med Assoc 2007; 230: 191-2.

Walker AL, Jang SS, Hirsh DC. Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 98 cases (1989-1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216: 359-63.

Weese JS. Antimicrobial resistance in companion animals. *Anim Health Res Rev* 2008; 9: 169-76.

Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol* 2010; 140: 418-29.

Werckenthin C, Böttner A, Hafez HM, Hartmann K, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Luhofer G, Richter A, Schulz B, Schwarz S, Sigge C, Traeder W, Waldmann K-H, Wallmann J, Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. Kreuzresistenzen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Veterinärmedizin: Molekulare Grundlagen und praktische Bedeutung für die Empfindlichkeitsprüfung. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2005; 118: 471-80.

Werckenthin C, Alesik E, Grobbel M, Lübke-Becker A, Schwarz S, Wieler LH, Wallmann J. 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. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2007; 120: 412-22.

Werckenthin C, Luhofer G, Böttner A, Gangl A, Goossens L, Hafez HM, Hartmann K, Kaske M, Kehrenberg C, Kietzmann M, Klarmann D, Klein G, Krabisch P, Kühn T, Richter A, Schulz B, Schwarz S, Sigge C, Traeder W, Waldmann K-H, Wallmann J, Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenz" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen in der Routinediagnostik: Vorschlag für ein Layout für Mikrotiterplatten zur Testung von Bakterien von Hunden und Katzen. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2008; 121: 19-26.

---

Witte W, Mielke M.  $\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum. Bundesgesundheitsbl 2003; 46: 881-90.

World Health Organisation (2012) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine - 3rd Revision 2011. WHO Press, World Health Organisation, Geneva

## VIII. DANKSAGUNG

Ich danke allen Personen, die mich fachlich und persönlich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt **Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann** für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Anfertigung einer Dissertation an ihrem Lehrstuhl. Die Zeit der internistischen Ausbildung in der Medizinischen Kleintierklinik war für mich sehr lehrreich und legte einen Grundstein für meine weitere klinische Tätigkeit.

In besonderem Maße danke ich meiner Betreuerin, **Frau Dr. Bianka Schulz**, für ihre fachliche Anleitung, ihre unermüdliche Geduld und Begleitung bei der Umsetzung dieses Projekts. Ohne ihre stete Ermutigung und Unterstützung bei der Erstellung der Publikation, ihre zahlreichen Korrekturlesungen und ihren großartigen Einsatz insbesondere in der Endphase wäre der Abschluss dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

Ebenso bedanke ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Reinhard Straubinger** und **Herrn Dr. Georg Wolf** für die Beratung in mikrobiologischen Fragen.

Ich möchte auch allen **Oberärzten, Residents, Interns, Doktoranden und sämtlichen Mitarbeitern** für die gemeinsame Zeit an der Medizinischen Kleintierklinik danken.

Von ganzem Herzen danke ich **meinen Eltern**, die mir nicht nur das tiermedizinische Studium, sondern auch die Zeit meiner klinischen Tätigkeit an der Medizinischen Kleintierklinik und die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht und finanziert haben. Sie haben alle Rückschläge und Verzögerungen mitgetragen, besonders dann, wenn der Zeitplan mal (wieder) ins Stocken kam.

Nicht zuletzt danke ich besonders herzlich meiner Freundin **Verena** für ihre Leidenschaft, Toleranz und Fürsorge während meiner gesamten Doktorandenzeit.