

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Ziel dieser Untersuchungen ist es:

1. Bakteriologische Befunde im Genitale gesunder Hündinnen zu erheben, also das sogenannte physiologische Keimspektrum im jeweiligen Zyklusstand zu bestimmen.
2. Bakteriologische Befunde im Genitale erkrankter Hündinnen zu erheben, um eventuelle Zusammenhänge zwischen klinischem und bakteriologischem Befund herzustellen.
3. Zu prüfen, ob der pH-Wert der Scheide Aussagen über den Gesundheitszustand des Genitales der Hündin zulässt.

3.1. MATERIAL UND METHODIK

3.1.1. TIERE

100 Hündinnen aus der eigenen Praxis sowie 279 Patienten der Tierklinik für Geburtshilfe und Fortpflanzungsstörungen der FU, Standort Mitte, wurden einer allgemeinen und gynäkologischen Untersuchung auch bei Folgeuntersuchungen unterzogen. Bei allen Tieren wurde der zytologische Befund des Zellabstriches sowie der gleichzeitig erhobene bakteriologische Befund ausgewertet. Das Patientengut war zum einen klinisch unauffällig und unterlag Kontrolluntersuchungen zur Bestimmung des gynäkologischen Status, die auch Deckterminbestimmungen und Trächtigkeitsuntersuchungen umfassten. Bei einigen Tieren konnten im Untersuchungsgang Puerperalstörungen festgestellt werden, die den Besitzern bis dato teilweise nicht aufgefallen waren.

Andere Tiere wurden wegen gynäkologischer Auffälligkeiten vorgestellt. Diese konnten in Verhaltensauffälligkeiten, hormonell bedingte Erkrankungen, bakteriel-

le Erkrankungen sowie pathologisch-anatomische Veränderungen differenziert werden. Unter dem Begriff der Verhaltensauffälligkeit ließen sich insbesondere Aggressionen vor der Läufigkeit sowie ein ausgeprägter Nestbautrieb subsumieren.

Innerhalb der vermutlich hormonell bedingten Erkrankungen ließen sich Anöstrie (elf Fälle), gesplitteter Östrus (in einem Fall), Lactatio falsa (acht), Ovarialtumore (zwei), Polyöstrus (drei), Uteruszysten in einem Fall sowie verlängerte Läufigkeiten (acht Fälle) unterscheiden. Bei den vermutlich bakteriell bedingten Erkrankungen handelte es sich um juvenile Vaginitiden (in 13 Fällen), Pyometra (drei), Pyometraverdacht (20), geschwollene und verklebte Schamlippen (16), vaginalen Fluor (26) sowie Vaginitiden (16). Darüber hinaus wurden zwei Zystitiden, eine Mastitis sowie eine Nephritis als Nebenfunde verifiziert. Zu den im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen pathologisch-anatomischen Befunden zählen Mammakarzinom (2), Vaginalspange und Vaginaltumor in jeweils einem Fall.

Das Altersspektrum der untersuchten Hündinnen reichte von juvenilen Tieren vor dem ersten Östrus bis hin zu vierzehn Jahre alten Hündinnen. Die meisten Tiere befanden sich im Alter bis zu vier Jahren, also in der bevorzugten Reproduktionsphase. Weitere Altersschwerpunkte lagen bei acht bis neun Jahren sowie bei sehr alten Tieren mit gynäkologischen Auffälligkeiten.

Tabelle 4: Alter des Patientengutes

<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
15	16	11	10	3	5	3	5	12	2	1	9	1	2	5

Es zeigt sich eine Häufung in der Anzahl der mit gynäkologischen Fragestellungen vorgestellten Hündinnen von der Pubertät bis zum dritten Lebensjahr und danach noch einmal ein Anstieg der Untersuchungszahlen um das achte Lebensjahr der Hündinnen.

Bei den klinisch auffälligen Hündinnen ist wie bei den unauffälligen Tieren eine Häufung der Untersuchungszahlen bis zu dritten Lebensjahr sowie um das achte Lebensjahr festzustellen. Relativ viele Untersuchungen im Hinblick auf die insgesamt geringen Fallzahlen ergeben sich bei den klinisch auffälligen Hündinnen aber auch im Alter.

3.1.1.1. Gesundheitszustand des Patientengutes

Von den 100 in eigener Praxis untersuchten Hündinnen waren 42 Prozent klinisch gesund, bei den Patienten der FU - Klinik für Geburtshilfe betrug der Prozentsatz der Gesunden 71 Prozent. Der andere Teil – das waren von der Gesamtzahl der Tiere (355) 131 Patienten oder 37,3 Prozent, davon 58 eigene und 73 Patienten der Klinik für Geburtshilfe – war klinisch auffällig. Diese Verteilung geht aus Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung des Patientengutes hervor:

Tabelle 5: Häufigkeitsverteilung des Patientengutes nach klinischem Befund

	Gesamtzahl	eigene	Klinik
klinisch unauffällig	212	42	170
klinisch auffällig	167	58	109
Gesamtzahl	379	100	279

3.1.2. METHODIK

3.1.2.1. Allgemeine und gynäkologische Untersuchung

Alle Hündinnen wurden einer eingehenden allgemeinen und gynäkologischen Untersuchung unterzogen. Die Anamnese – bei Hündinnen aus Zuchtbeständen auch eventuell die Befunderhebungen anderer Tiere des gleichen Bestandes – betraf die Erfassung von Allgemeinerkrankungen und gegenwärtigen oder auch zurückliegenden gynäkologischen Problemen sowie die Befunderhebung von anderen bisherigen Erkrankungen.

Es folgte die Adspektion der äußeren Genitalien auf Größe, Ödematisierungsgrad der Vulva, Farbe der Schleimhäute sowie Fluor (Farbe, Menge und Geruch). Die nähere und weitere Umgebung der Schamlippen wurde auf Spuren von angetrocknetem Sekret, Haut- oder Haarkleidveränderungen untersucht, Abdomen und Gesäuge auf Umfang und Füllung hin betrachtet.

Die Palpation erfolgte je nach Größe der Hündin seitlich neben oder hinter ihr

stehend. Bei Zwergrassen mit einer Hand, sonst bimanuell durch die Bauchdecke hindurch tastend wurde versucht, den Uterus bis zum Muttermund zu erfühlen. In entgegengesetzter Richtung wurden die Uterushörner palpirt. Die Ovarien waren nur bei einer unphysiologischen Abweichung, einem Ovarialtumor, palpabel. Dem Aussagewert der Palpation sind bei übergewichtigen Hunden Grenzen gesetzt.

Alle Tiere wurden einer vaginalen Inspektion unterzogen. Nach Spreizung und trockener Reinigung der Labien wurde ein den Größenverhältnissen der Hündin angepasstes sterilisiertes Röhrenvagoskop vorsichtig eingeführt und der Ödematisierungsgrad der Scheidenschleimhaut, ihre Farbe und Feuchtigkeit beurteilt.

3.1.2.2. Entnahme der zytologischen Proben

Bei allen 379 Hündinnen wurden zytologische und bakteriologische Untersuchungen der Vaginalschleimhaut durchgeführt. Zur Probengewinnung wurde die Vulva mit einem trockenen Zellstofftuch gereinigt. Es wurde ein sterilisiertes Scheidenspekulum mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtet. Danach wurde ein mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung getränkter Baumwolltupfer durch das Spekulum in craniodorsaler Richtung mehrere Zentimeter, je nach Rasse und individueller Größe der Hündin, ins dorsale Scheidengewölbe eingeführt. Der Baumwolltupfer wurde am dorsalen Scheidengewölbe abgestrichen und anschließend auf einem entfetteten Objektträger abgerollt. Die Ausstriche wurden mit Merckofix-Spray oder einem Äther-Alkohol-Gemisch fixiert.

3.1.2.3. Färbemethode

Die Abstriche wurden nach Papanicolau-Schorr gefärbt und durch die ansteigende und absteigende Alkoholreihe geführt und anschließend in Canadabalsam eingebettet.

3.1.2.4. Untersuchung und Auswertung der zytologischen Proben

Zur Auszählung gelangten je Abstrich maximal 100 Zellen. Diese wurden als Basalzellen, Parabasal-, Intermediär-, Superficialzellen und Schollen bezeichnet, analog der Klassifizierung der ersten vier Stufen nach Dore (1978b), wobei der Begriff Schollen synonym für kernlose Zellen benutzt wird. Eine Unterteilung der

Intermediärzellen durch ein willkürliches Raster in große und kleine Intermediärzellen wurde jedoch nicht übernommen.

Darüber hinaus erfolgte in vielen Fällen eine Beurteilung des Ausstrichhintergrundes sowie die Ermittlung der Präsenz oder Absenz von Erythrozyten und Leukozyten. Anhand des zytologischen Gesamtbildes wurde die Zuordnung zu den vier Zyklusabschnitten vorgenommen, wobei wie unter Vermeidung der unter 2.3 genannten nomenklatorischen Probleme allein der Begriff Metöstrus statt Diöstrus benutzt wird.

3.1.2.5. pH-Wert-Bestimmung des Vaginalsekrets

Bei 100 Hündinnen erfolgte zusätzlich die Messung des pH-Wertes des Vaginalsekretes mittels eines Indikatorpapierstreifens der Firma Macherey-Nagel, Düren. Dazu wurde nach Spreizen der Schamlippen durch ein Vaginalspekulum hindurch ein etwa ein Quadratzentimeter großes Fähnchen des Indikatorpapiers in den Scheidenvorhof eingeführt und je nach Durchsaftungsgrad der Vagina nach maximal zwei Minuten entfernt. Anhand einer der Packung aufgedruckten Referenzskala wurde unmittelbar nach Entnahme des Indikatorpapierfähnchens aus dem Scheidenvorhof der mögliche Farbumschlag von gelb bis blau dem entsprechenden pH-Wert in 0,2er Schritten von 5,0 bis 8,6 zugeordnet.

3.1.2.6. Entnahme der bakteriologischen Proben

Parallel zur zytologischen Probennahme wurden bei jeder Hündin zwei Proben für die bakteriologische Untersuchung entnommen, die eine ebenfalls aus dem dorsalen Scheidengewölbe, die andere aus dem Scheidenvorhof beim Herausziehen des Spekulum. Diese Proben wurden in Amies Transportmedium verbracht (Hersteller: Engelbrecht, transport swab, Amies clear Größen 5-5 und 5).

Die Zeitdauer zwischen der Probenentnahme und der Auslieferung an das bakteriologische Labor des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin, Standort Mitte, betrug zwischen zwei Stunden und drei Tagen.

Das Untersuchungsspektrum umfasste:

- *Staphylokokken spp.*,
- *Streptokokken spp.* ,
- *Escherichia coli*,

- *Pasteurella spp.*,
- *Enterokokken*
- *Proteus mirabilis*,
- *Pseudomonas spp.*

3.1.2.7. Bebrütung der bakteriologischen Proben

Im Labor des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin, wurden die jeweils zwei Tupferproben pro Tier, deren Entnahme oben geschildert wurde, auf je einer Nähragarplatte mit

- fünf Prozent Hammelblut (Hammelblutplatte) und
- einer Wasserblau-Metachromgelb-Laktoseagar-Platte (Gassner-Platte) ausgestrichen
- und der verbleibende Tupfer in ein Röhrchen mit Nährbouillon mit zehn Prozent Pferdeserum verbracht.

Die Platten wurden 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Nach 18-24 Stunden und nach 48 Stunden erfolgte die Ablesung:

War der Nährboden nach 18-24 Stunden nicht bewachsen, wurde eine Öse aus der Serumbouillon auf eine Hammelblutplatte ausgestrichen und ebenfalls nach 18-24 Stunden und 48 Stunden ausgewertet.

3.1.2.8. Semiquantitative Keimzahlbestimmung

Das Bakterienwachstum wurde folgendermaßen bewertet:

- Negativ: kein Wachstum (0)
- ca. ein - 20 Kolonien: geringgradiger Gehalt (+) (bzw. nur über Anreicherung)
- ca. 21 - 100 Kolonien: mittelgradiger Gehalt (++)
- ca. > 100 Kolonien: hochgradiger Gehalt (+++)

3.1.2.9. Aerobe Keime

Im Bereich der aeroben Keimflora wurden die folgenden Keime als fakultativ pathogen klassifiziert:

- *Staphylokokken spp.* ,
- *Streptokokken spp.* ,
- *E. coli*,
- *Pasteurella spp.*,
- *Klebsiella spp.*,
- *Pseudomonas spp.*,
- *Proteus mirabilis*.

Im Vaginalsekret der untersuchten Hündinnen befanden sich darüber hinaus die in Tabelle 6 aufgeführten Keime, die im Folgenden aber nicht mehr differenziert angegeben werden, weil sie nicht im Zusammenhang mit klinisch relevanten Befunden aufgetreten sind.

Solch ein unspezifisches Bakterienwachstum ohne Zusammenhang mit klinisch relevanten Befunden wurde vom Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der FU-Berlin, Standort Mitte, als „vermutlich keine pathogenen Keime nachgewiesen“ befundet

Mit dieser Auswahl sind die wesentlichen, auch von van Duijkeren (1992) zusammengetragenen aeroben Keime im Vaginalsekret der Hündin genannt. Sofern andere Keimarten bestimmbar waren, wurden auch diese, wie oben erwähnt, erfasst. Dazu zählen neben *Aeromonas* und *Alcaligenes faecium* auch *Bacillus spp.*, *Corynebakt. spp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Pantoeae agglomerans*, *Pasteurella canis* sowie α -hämolyisierende Streptokokken (siehe nachstehende Tabelle 6). Sie werden in der Auswertung aber nur bei klinisch auffälligen Befunden gesondert ausgewiesen.

Tabelle 6: vermutlich apathogene Keime

• <i>Aeromonas</i>	• <i>Klebsiella oxytoca</i>
• <i>Alcaligenes faecium</i>	• <i>Pantoeae agglomerans</i>
• <i>Bacillus species</i>	• <i>Pasteurella canis</i>
• <i>Corynebakterium species</i>	• <i>Streptokokken, α-hämolyisierend</i>

Unter den potentiell pathogenen Keimarten fanden sich neben (β -hämolisierenden) *E. coli* und Enterokokken (inklusive *S. faecalis*) auch *P. multocida*, *P. mirabilis* sowie *P. aeruginosa* und spp.. Darüber hinaus konnten Staphylokokkusarten (*aureus*, *intermedius* und *anhämolisierende*) sowie *Streptokokkus anginosus*, *Streptokokkus dysgalactiae* (mit *Subspecies equisimilis*) und *Streptokokkus canis* (*Lancefield-Gruppe G*) nachgewiesen werden.

Tabelle 7: potentiell pathogene Keime

• <i>E. coli</i>	• <i>S. aureus</i>
• <i>E. coli, β-hämolisierend</i>	• <i>S. intermedius</i>
• <i>Enterokokken, inklusive Streptococcus faecalis</i>	• <i>Staphylokokken, anhämolisierend</i>
• <i>P. multocida</i>	• <i>S. anginosus</i>
• <i>P. mirabilis</i>	• <i>S. dysgalactiae, Subspecies equisimilis</i>
• <i>P. aeruginosa</i>	• <i>S. canis, Lancefield-Gruppe G</i>
• <i>P. species</i>	

3.1.2.10. Differenzierung der Keime

Das routinemäßig eingehend untersuchte Keimspektrum umfasste Staphylokokken, Streptokokken, Enterobacteriaceae, Pasteurellen, Pseudomonaden sowie *Bordetella bronchiseptica*, die in dieser Untersuchungsreihe aber nicht auftraten. Die Differenzierung der Keime wird im Folgenden beschrieben:

Staphylokokken:

Es erfolgte die Differenzierung dieser Stämme durch Koloniemorphologie und Hämolyse sowie Koagulase-Bildung. Staph. aureus und Staph. intermedius wurden mittels Acetoinnachweis mit der Voges-Proskauer-Reaktion differenziert. Koagulase-negative Staphylokokken wie beispielsweise Staphylococcus epidermidis wurden gemäß AVID (Arbeitskreis für Veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik im Arbeitsgebiet Mikrobiologie, Parasitologie und Hygiene der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft) bestimmt. Ausgewählte Staphylokokken-Stämme wurden mit dem Identifizierungssystem ID 32 der Firma bioMérieux, Marcy, Frankreich bestimmt.

Streptokokken:

Die Differenzierung erfolgte anhand der Koloniemorphologie und Hämolyseform mit anschließender Feststellung der Serogruppe (A, B, C, D, F, G und andere) mit dem Streptococcol Grouping Kit Test der Firma Oxoid, Wesel im Latexagglutinationstest sowie, zur Feinbestimmung, mit biochemischen Reaktionen.

Enterobacteriaceae:

Die Auswertung der Kolonie erfolgte auf der Gassner-Platte. Die weitere Differenzierung wurde mittels der Bunten Reihe (BR) durchgeführt. Schwer bestimmbare Stämme wurden mit dem API-System (api 20e) der Firma bioMérieux, Marcy, Frankreich, weiter bearbeitet.

Pasteurella species:

Die Differenzierung erfolgte nach Bakterienmorphologie und gemäß AVID.

Pseudomonas species:

Typische Koloniekriterien auf dem Plattenansatz wurden gewertet. Der Nachweis der Oxidasebildung erfolgte in Bunter Reihe, teilweise wurde api 20e benutzt.

Bordetella bronchiseptica:

Die Differenzierung erfolgte durch Nutzung der Kolonиеigenschaften auf dem Plattensatz, zusätzlich wurden die Oxidasebildung, das Harnstoffspaltungsvermögen, Bunte Reihe sowie eine Objektträgerschnellagglutination mit im Institut hergestelltem Serum geprüft .

3.1.2.11. Resistenzprüfung

Die Prüfung der Bakterienstämme auf Antibiotika-Empfindlichkeit erfolgte nach der „Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien“ gemäß AVID (1994). Die Leitlinien zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika sind in den deutschen Normen DIN 58940 und DIN 58944 niedergelegt. Die Prüfung erfolgte im Agardiffusionstest auf Mueller-Hinton-Agar der Firma SIFIN, Berlin.

Als Antibiotika-Träger wurden die Testringe TRG8 Vet 1 und TRG9 Vet 2 der Firma Mast-Diagnostika, Reinfeld benutzt. Für Enrofloxacin wurde das 5µg Test-

plättchen der Firma Bayer AG, Leverkusen und für Amoxicillin plus Clävulansäure ein 30µg Testplättchen der Firma Oxoid, Wesel eingesetzt.

Die Hemmhofgröße wurde in Millimetern gemessen und im Resistogramm als

- sensibel (empfindlich) = e,
- intermediär (vermindert empfindlich) = v e und
- resistent = r angegeben.

3.1.2.12. Gewichtung der potentiell pathogenen Keime

Zur Hervorhebung eventuell vorhandener statistisch relevanter Ergebnisse im Bereich der semiquantitativen Keimzahlbestimmungen wurden die folgenden Keimarten aus den vorhandenen bakteriologischen Befunden des Anhangs mit einer Nummernkennung versehen:

1 = keine Keime nachgewiesen	5 = Pasteurellen
2 = Enterokokken	6 = Proteus
3 = Streptokokken	7 = E. coli
4 = Staphylokokken	8 = Pseudomonas.

Diese Nummernkennungen wurden nun mit dem Faktor der semiquantitativen Bestimmungen multipliziert (+ = 1, ++ = 2, +++ = 3), um einen Anhalt für die Besiedlungsintensität zu erhalten. Bei mehrfachem Keimbesatz wurden diese Werte pro Tier addiert.

Als Beispiel sei genannt: Tier 51 ist klinisch gesund und hat einen mittelgradigen (++) Befall mit *P. multocida*, sowie einen geringgradigen (+) *E. coli* Befall. Aus (2 x 5) + (1 x 7) ergibt sich der numerische Wert von 17 für Tier Nr. 51.

3.1.2.13. Biostatistische Bewertung

Da weder annähernd konkrete Angaben über die gesamte Hundepopulation, oder auch nur die der Berliner Hunde vorlagen, noch anhand des Versuchsansatzes Kontrollgruppen außerhalb des astochastischen Patientengutes der Tierklinik für Fortpflanzung und auch der eigenen Praxis erhoben werden konnten, ist die biomathematische Auswertung bei diesen vorselektierten Daten nur begrenzt möglich. In der vorliegenden Untersuchung wurden daher nur statistischen Kennziffern N = absolute Anzahl der Hündinnen sowie die prozentuale Häufigkeitsverteilung und das arithmetische Mittel gewertet. Zusätzlich wurde bei der Auswertung der pH-Werte der χ^2 -Test zur Überprüfung der Normalverteilung angewandt.