

*Zakład Diagnostyki Klinicznej i Dermatologii Weterynaryjnej Akademii Rolniczej w Lublinie

**Lecznica weterynaryjna, ul. Traugutta 1, 43-450 Ustroń

PIOTR WILKOŁEK*, MARCIN SZCZEPANIK*, ZBIGNIEW BLIMKE**,
MACIEJ NOWAK*, DOROTA POMORSKA*

*Identyfikacja bakterii z przypadków piodermii psów
i ocena ich wrażliwości na antybiotyki najczęściej używane
w dermatologii weterynaryjnej*

Identification of bacteria from canine pioderma and estimation of susceptibility
to the most commonly used antibiotics in veterinary dermatology

STRESZCZENIE

Celem badań była identyfikacja bakterii odpowiedzialnych za ropne zapalenia skóry psów oraz określenie ich wrażliwości w stosunku do najczęściej stosowanych w dermatologii weterynaryjnej antybiotyków (enrofloksacyny i amoksyliny z kwasem klawulanowym). Badania wykonano u 171 psów, u których stwierdzono ropne zapalenia skóry. Materiałem do badań były wymazy z ognisk ropnych. Następnie wykonywano posiewy na podłoża bakteriologiczne. Identyfikacji dokonano na podstawie cech morfologicznych wzrostu na poszczególnych podłożach oraz właściwości biochemicznych, dodatkowo korzystano z mikrotestu ID-32 STAPH, API 20E. Antybiotykowrażliwość drobnoustrojów oznaczono metodą dyfuzyjną z użyciem krążków bibułowych. Głównym izolowanym patogenem był *Staphylococcus intermedius* (86,1% przypadków), a 99,3% szczepów tej bakterii wykazywało wrażliwość w stosunku do enrofloksacyny i amoksyliny z kwasem klawulanowym. Dużą oporność w stosunku do ww. antybiotyków stwierdzano w przypadku *Pseudomonas aeruginosa*.

Słowa kluczowe: piodermie, psy, antybiotykowrażliwość, amoksylicyna, enrofloksacyna

WSTĘP

Ropne zapalenia skóry (piodermie) są jednymi z najczęstszych chorób skóry rozpoznawanych u psów [Griffin i in. 1993, Blimke 1999], gdyż towarzyszą one wielu innym problemom dermatologicznym, jako powikłanie choroby podstawowej, np. atopowego zapalenia skóry [Griffin i in. 1993, White 1996, Scott 2001]. Najczęściej izolowanym ze zmian ropnych patogenem jest G-dodatni *Staphylococcus intermedius*. Rzadziej izolowane są bakterie G-ujemne, takie jak *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Escherichia* spp. [Griffin i in. 1993, White 1996]. Bakterie te są główną przyczyną piodermii, ponieważ stanowią naturalną mikroflorę skóry psa. Większość autorów uważa, że można wyróżnić dwie grupy drobnoustrojów saprofitycznych: bakterie stale bytują-

ce na powierzchni skóry (rezydujące, ang. resident bacteria) oraz tzw. drobnoustroje przejściowe (ang. transient bacteria). Do pierwszej grupy zaliczyć można bakterie z rodzaju *Micrococcus* spp., koagulazoujemne gronkowce, np. *Staphylococcus epidermidis*, *S. xylosus*, α -hemolityczne paciorkowce, *Clostridium*, *Priopionibacterium acnes*, *Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp. oraz *Staphylococcus intermedius*. Do drugiej grupy natomiast zalicza się: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. [Mason i in. 1996, Scott 2001].

Niepowodzenia w leczeniu ropnych zapaleń skóry mogą być powodowane m.in. nieodpowiednim doбором antybiotyku, zbyt niską dawką (antybiotyki w dermatologii stosowane są zwykle w wysokich dawkach) lub też zbyt krótkim czasem leczenia lub opornością bakterii po pewnym okresie podawania antybiotyku [Lilenbaum i in. 2000]. W rutynowym postępowaniu podczas pierwszej wizyty (o ile nie stosowano wcześniej leczenia) wykonanie antybiotykoogramu jednak nie jest konieczne [Griffin i in. 1993, White 1996]. Badanie hodowlane i ocena wrażliwości powinny jednak być bezwzględnie wykonane w następujących przypadkach: stwierdzenia w badaniu cytologicznym drobnoustrojów G-ujemnych, głębokich ropnych zapaleń skóry i zmian atypowych, jak również gdy nie uzyskuje się zadowalającego efektu po zastosowaniu rutynowo używanych antybiotyków [Griffin i in. 1993].

Antybiotyk stosowany w dermatologii weterynaryjnej powinien cechować się: szerokim spektrum działania i wysoką skuteczność w stosunku do *S. intermedius*, osiąganiem wysokiego stężenia w skórze, działaniem bakteriobójczym, brakiem lub niewielkimi efektami ubocznymi, możliwością podawania co 12 lub 24 godziny, najlepiej doustnie. Amoksylicyna z kwasem klawulanowym oraz enrofloksacyna są antybiotykami, które spełniają te warunki i dlatego są jednymi z najczęściej stosowanych chemioterapeutyków w leczeniu ropnych dermatoz u psów [White 1996, Ganier i in. 2001, Scott i in. 2001].

Za cel badań przyjęto identyfikację bakterii odpowiedzialnych za ropne zapalenia skóry psów oraz określenie ich wrażliwości na najczęściej stosowane w dermatologii weterynaryjnej antybiotyki w związku z powszechną zmiennością tej wrażliwości.

MATERIAŁY I METODY

Badania wykonano na grupie liczącej 171 psów z rozpoznaniem ropnym zapaleniem skóry. Od zwierząt tych pobrano wymazy z ognisk ropnych, z czego 115 pochodziło ze skóry, a 56 z ucha zewnętrznego. Wymazy pobrano korzystając z bakteriologicznego zestawu transportowego nr 1 produkcji Wytwórnii Surowic i Szczepionek w Krakowie. Wszystkie wymazy posiewano na agar krwawy, podłoża MacConkeya, Chapmana (produkcji BioMarieux) i inkubowano w 37°C przez 18–24 godz. Wstępnego podziału na bakterie G-dodatnie i G-ujemne dokonywano na podstawie cech morfologicznych ich wzrostu na poszczególnych podłożach, badania mikroskopowego oraz barwienia metodą Grama. Gronkowce identyfikowano testem ID-32 STAPH (BioMarieux), do oznaczeń używano 24-godzinnych hodowli bakteryjnych na podłożu Chapmana, z których przygotowano zawiesinę w płynie fizjologicznym o gęstości odpowiadającej 0,5 wg skali McFarlanda. Zawiesiny bakteryjne wprowadzano do 26 mikropróbówek zestawu i inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Uzyskane wyniki odczytywano i interpretowano wg ulotki informacyjnej załączonej przez producenta oraz książki kodów. W wyizolowanych szczepach gronkowcowych określono również ich zdolności do wytwarzania koagulazy, katalazy oraz oznaczono tzw. koagulazę związaną – clumping factor. Identyfikację różnicową pałeczek G-ujemnych z podłoża MacConkeya przeprowadzono na podstawie ich wzrostu oraz cech biochemicznych. W diagnostyce pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* korzystano z tzw. krótkiego szeregu biochemicznego, określając metodą próbówkową typ fermentacji w odczynie z czerwieni metylową, wytwarzanie acetoiny w odczynie Voges-Proskauera, wytwarzanie urazy, indolu, siarkowodoru, rozkład cytrynianu, lakto-

zy i mannitolu. W pojedynczych przypadkach korzystano z mikrotestu API 20E (BioMarieux). Uzyskane wyniki odczytywano i interpretowano wg ulotki informacyjnej załączonej przez producenta oraz książki kodów.

Wrażliwość izolowanych bakterii oznaczono metodą dyfuzyjną z użyciem krążków bibułowych nasyconych 20 µg amoksycyliny i 10 µg kwasu klawulanowego (Mast Diagnostics) oraz 5 µg enrofloksacyny (Bayer AG). Badania przeprowadzono na 18-24-godzinnych bulionowych hodowlach czystego szczepu bakteryjnego, które rozcieńczano 0,9% roztworem chlorku sodowego. Pałeczki G-ujemne rozcieńczano w stosunku od 1:10 000 do 1:40 000, gronkowce od 1:1000 do 1:5000, paciorkowce od 1:10 do 1:100. Tak przygotowane zawiesiny rozlewano na podłoża Muellera Hinton 2 (BioMarieux) z dodatkiem 5% krwi baraniej. Następnie nakładano krążki i inkubowano 18–20 godz. w 37 °C. Po inkubacji określano stopień wrażliwości bakterii na podstawie strefy zahamowania i wzrostu wokół krążków. Wyniki uzyskane z krążkami nasyconymi amoksycyliną i kwasem klawulanowym interpretowano wg normy zawartej w Document M2-A5 NCCLS Vol. 13 No. 24, 1993. Natomiast w przypadku krążków z enrofloksacyną zastosowano się do zaleceń ich producenta (Bayer AG).

WYNIKI I OMÓWIENIE

Najczęściej stwierdzano zakażenia wywołane przez 2 różne drobnoustroje (60,2%). Zakażenia pojedynczym drobnoustrojem wykazano w 35,8% przypadków. Zakażenia trzema drobnoustrojami zanotowano w 3,5%, a czterema zaledwie w 0,6% przypadków.

Procentowy udział poszczególnych wyizolowanych drobnoustrojów przedstawiono w tabeli 1. Najczęściej izolowanym drobnoustrojem był *S. intermedius*. Bakteria ta była stwierdzana aż 86,1% badanych psów. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, wykazując jego obecność w 66 do 85% przypadków ropnych zapaleń skóry u psów [Mamine-Khodja i in. 1983, Paradis 2001, Horspool 2004]. Drugą bakterią pod względem częstości izolacji była *E. coli* (25,8% zwierząt), trzecią bakterie z rodzaju *Proteus* (7,1%), czwartą *S. aureus* (5,9%). W badaniach innych autorów drugim pod względem częstości izolowania drobnoustrojem był *S. aureus*, stwierdzany w 6% przypadków ropnych zapaleń skóry u psów, pozostałe drobnoustroje wykazywano jedynie sporadycznie. W badaniach własnych drobnoustroje z rodziny *Enterobacteriaceae* stwierdzano tylko wraz z innymi drobnoustrojami (infekcje mieszane), nigdy zaś jako jedyny rodzaj izolowanych bakterii. Również inni autorzy zwracali uwagę na występowanie bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* tylko w przypadkach infekcji mieszanych wraz z *S. intermedius* [Ihrke 1999].

Wyniki antybiotykowrażliwości wyizolowanych szczepów bakterii wobec enrofloksacyny i amoksycyliny z kwasem klawulanowym przedstawiono w tabeli 2. Spośród wszystkich wyizolowanych szczepów *S. intermedius* w 146 przypadkach były one wrażliwe na enrofloksacynę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym, co stanowi 99,3% całości badanych szczepów, oporność na każdy z antybiotyków wykazano tylko w dwu przypadkach (0,7%). Świadczy to o wysokiej skuteczności tych chemioterapeutyków wobec najczęściej izolowanego patogenu, stwierdzanego w przypadkach piodermii. Badania innych autorów potwierdzają wysoką skuteczność enrofloksacyny wobec tej bakterii, wrażliwość na ten antybiotyk wykazywało od 98 do ponad 99% izolowanych szczepów [Colombini i in. 2000, Lilenbaum i in. 2000, Paradis i in. 2001]. Wyniki badań własnych odnośnie wrażliwości *S. intermedius* na amoksycylinę z kwasem klawulano-

wym są zgodne z badaniami innych autorów. Pomorski i Sitkowski [1995], Pellerin i in. [1998] oraz Hoekstra i Paulton [2002] wykazali w 80–100% wrażliwość tej bakterii na antybiotyki. W przypadku *S. aureus* 90% szczepów okazało się wrażliwych na obydwa antybiotyki. Inni autorzy ocenili wrażliwość *S. aureus* na enrofloksacynę na 74 do 98%, a amoksycylinę z kwasem klawulanowym na 72 do 100% [Griffin i in. 1993, Pomorski i Sitkowski 1995]. Pozostałe wyizolowane szczepy gronkowców były wrażliwe na obydwa antybiotyki w 100%.

Tabela 1 Procentowy udział drobnoustrojów izolowanych z przypadków ropnych zapaleń skóry u psów
Table 1. Percentage of isolated microbes from dog pyodermais

Gatunek Species	Odsetek Percentage
<i>S. intermedius</i>	86,1
<i>S. aureus</i>	5,9
<i>S. xylosum</i>	4,1
<i>S. schleferi</i>	2,9
<i>S. lentus</i>	2,4
<i>S. hyicus</i>	2,4
<i>S. epidermidis</i>	1,2
<i>S. hominis</i>	0,6
<i>S. saprophyticus</i>	2,4
<i>Streptococcus</i> spp.	1,2
<i>Pseudomonas</i> spp.	2,4
<i>Shigella</i> spp.	0,6
<i>Proteus</i> spp.	12,3
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	1,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,8
<i>Escherichia coli</i>	25,8

W grupie *E. coli* nie wykazano szczepów opornych. Oporność zaś w stosunku do tych antybiotyków obserwowana była przez innych autorów, którzy stwierdzili 24% szczepów opornych wobec amoksycyliny z kwasem klawulanowym i 4% szczepów opornych wobec enrofloksacyny [Normand i in. 2000]. Pałeczki z rodzaju *Proteus* były wrażliwe na enrofloksacynę i amoksycylinę z kwasem klawulanowym w 100%. Wysoka skuteczność antybiotyków wobec pałeczek z rodzaju *Proteus* obserwowana była także przez innych badaczy: 94% wrażliwość wobec amoksycyliny z kwasem klawulanowym i 100% na enrofloksacynę stwierdzili Colombini i in. [2000]. Pałeczki *Pseudomonas* cechowała całkowita oporność na amoksycylinę, natomiast oporność wobec enrofloksacyny wykazywał 1 spośród 4 wyizolowanych szczepów, a 3 pozostałe okazały się wrażliwe. Oporność *P. aeruginosa* wobec enrofloksacyny była również stwierdzana przez innych autorów, obserwowali oni od 16 do 49% szczepów opornych, a wobec amoksycyliny z kwasem klawulanowym prawie wszystkie izolowane szczepy były odporne (97%) [Barrasa i in. 2000, Colombini i in. 2000, Šeol i in. 2002].

Tabela 2. Antybiotykowrażliwość na enrofloksacynę i amoksyicylinę z kwasem klawulanowym izolowanych drobnoustrojów
 Table 2. Antibiotic susceptibility to enrofloxacin and clavulanic acid-amoxicillin of isolated strains

Gatunek Species	Liczba szczepów Number of strains	Enrofloksacyna Enrofloxacin			Amoksyicylina z kwasem klawulanowym Clavulanic acid-amoxicillin		
		Wrażliwe Susceptible	Średnio wrażliwe Medium- -susceptible	Oporne Resistance	Wrażliwe Susceptible	Średnio wrażliwe Medium- -susceptible	Oporne Resistance
<i>S. intermedius</i>	147	99,3		0,7	99,3		0,7
<i>S. aureus</i>	10	90		10	90		10
<i>S. xylosum</i>	7	100			100		
<i>S. schleiferi</i>	5	100			100		
<i>S. lentus</i>	4	100			100		
<i>S. hyicus</i>	4	100			100		
<i>S. epidermidis</i>	2	100			100		
<i>S. hominis</i>	1	100			100		
<i>S. saprophyticus</i>	4	100			100		
<i>Streptococcus</i> spp.	2	100			100		
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	75		25			100
<i>Shigella</i> spp.	1	100			100		
<i>Proteus</i> spp.	21	95,2	4,8		95,2	4,8	
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	3	100			66,7	33,3	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	100			100		
<i>Escherichia coli</i>	44	93,2	6,8		86,4	13,6	

PODSUMOWANIE

Ze zdecydowanej większości ropnych zapaleń skóry u psów można wyizolować więcej niż jeden rodzaj bakterii. Prawdopodobnie związane jest to z występowaniem w większości przypadków zakażeń wtórnych. Nie stwierdzono przypadków, w których jedynym wyizolowanym drobnoustrojem były pałeczki *E. coli*. Głównym drobnoustrojem odpowiedzialnym za piodermie były gronkowce, z czego największy odsetek stanowił *S. intermedius*.

Rutynowo stosowane w dermatologii weterynaryjnej antybiotyki (amoksycylina z kwasem klawulanowym i enrofloksacyna) są ciągle skuteczne w stosunku do najczęściej izolowanych patogenów odpowiedzialnych za rozwój ropnych zapaleń skóry u psów. W przypadku pałeczek *Pseudomonas* amoksycylina z kwasem klawulanowym jest całkowicie nieskuteczna. Stwierdzono również częste występowanie oporności tej bakterii wobec enrofloksacyny. Dlatego tak ważne jest, by w przypadku stwierdzenia pałeczek już w badaniu cytologicznym, przed podjęciem leczenia wykonać badanie antybiotykowrażliwości. Zaniechanie tego badania może być przyczyną niepowodzeń leczenia.

PIŚMIENNICTWO

- Barrasa M.J.L., Gomez L.P., Lama G.Z., Junco M.T.T. 2000. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. *J. Vet. Med.* s. D, 47, 191–196.
- Blimke Z. 1999. Wybrane aspekty kliniczne i epidemiologiczne ropnych zmian skórnych u psów. Praca dokt. Wydz. Med. Wet. Lublin.
- Colombini S., S.R. Merchant, Hosgood G. 2000. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with *otitis media*. *Vet. Dermatol.* 11, 235–239.
- Ganier J.P., Medaille C., Limet A., Ruvoen N., Genevieve A.F. 2001. Antimicrobial activity of enrofloxacin against *Staphylococcus intermedius* strains isolated from canine piodermas? *Vet. Dermatol.* 12, 171–175.
- Griffin C.E., Kwoiczka K.W., MacDonald J.M. 1993. *Current Veterinary Dermatology*. Mosby Year Book.
- Hoekstra K.A., Paulton R.J.L. 2002. Clinical and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dog. *J. App. Microbiol.* 93, 406–413.
- Horspool L.J.I., Laar P., Bos R., Mawhinney I. 2004. Treatment of canine pyoderma with ibafloxacin and marbofloxacin – fluoroquinolones with different pharmacokinetic profiles. *J. Vet. Pharmacol. Therapeut.* 27, 147–153.
- Ihrke P.J., Papich M.G., DeManuelle T.C. 1999. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Vet. Dermatol.* 10, 193–204.
- Kędzia W. 1990. Diagnostyka mikrobiologiczna w medycynie. PZWL, Warszawa.
- Lilenbaum W., Veras M., Blum E., Souza G. N. 2000. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from *otitis externa* in dogs. *Let. Appl. Microbiol.* 31, 42–45.
- Llyod D. H., Lamport A.I., Noble W. C., Howell S.A. 1999. Fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus intermedius*. *Vet. Dermatol.* 10, 249–251.
- Mamine-Khodja C.A., Pederin J.L., Chantal J., Milon A. 1983. Antybiogram in pyoderma and suppurated *otitis* of the dog. Note 2: The results of bacterial examinations carried in the National Veterinary School in Toulouse from 1975–1979. *Rev. Meg. Vet.* 134, 533–40.

- Mason I.S., Mason K. V. Lloyd D.H. 1996. A review of biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis*, *Malassezia pachydermatis*. Vet. Dermatol. 7, 119–132.
- Normand E.H., Gibson N.R., Reid S.W.J., Carmichael S., Taylor D.J. 2000. Antimicrobial- resistance trends in bacterial isolates from companion-animal community practice in the UK. Prec. Vet. Med. 46, 267–278.
- Paradis M., Abbey L., Baker B., Coyne M., Hannigan M., Joffe D., Pukay B., Trettien A., Waisglass S., Wellington J. 2001. Evaluation of the clinical efficacy of marbofloxacin (Zeniquin) tablets for the treatment of canine pyoderma: an open clinical trial. Vet. Dermatol. 12, 163–169.
- Pellerin J.L., Bourdeau P., Sebbag H., Person J.M. 1998. Epidermiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. Comp. Immunol. Microbiol. Inf. Diseases. 21, 115–133.
- Pomorski Z.J.H., Sitkowski W. 1995. Skuteczność amoksycyliny z kwasem klawulanowym (prep. Amoksiklaw Lek-Polska) w leczeniu piodermitów u psów oraz kotów. Mag. Wet. 4, 548.
- Scott D. W., Miller W.H., Griffin C.E. 2001. Small Animal Dermatology, ed. 6. W. B Saunders Company.
- Šeol B., Naglič T., Madić J., Bedrković M. 2002. *In vitro* antimicrobial susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents. J. Vet. Med. 49, 188–192.
- White D.S. 1996. Systemic treatment of bacterial skin infections of dogs and cats. Vet. Dermatol. 7, 133–143.

SUMMARY

The aim of the study was identification of bacteria responsible for canine pyodermias and estimation of susceptibility to the most commonly used antibiotics in veterinary dermatology (enrofloxacin and clavulanic acid-amoxicillin). The study was conducted on 171 dogs with pyodermias. The materials were swabs from skin lesions. Other cultures were prepared on bacteriological media. The identification was made on the basis of colony and biochemical characteristics. Additionally, we used microtest ID-32 STAPH, API 20E. Antimicrobial susceptibility was estimated by disc agar diffusion. The main pathogen was *Staphylococcus intermedius* (86.1% cases) and 99.3 percent of bacteria strains showed susceptibility to enrofloxacin and clavulanic acid-amoxicillin. *Pseudomonas aeruginosa* strains showed high resistance to these antibiotics.

Key words: pyodermias, dogs, antibiotic susceptibility, amoxicillin, enrofloxacin