



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria
Tesi di Laurea

**“Valutazione della suscettibilità agli antibiotici di
Staphylococcus intermedius”**

Candidato:

Rita, Maria Di Liberto

Relatore:

Prof. Luigi Intorre

Correlatore:

Prof.ssa Grazia Mengozzi

Anno Accademico 2005-2006

*La felicità non è una illusione,
non è un sogno non è un'utopia;
ma è cosa umana, che giustamente
dobbiamo mettere a scopo della nostra vita
e che con mezzi umani possiamo conseguire.*

Paolo Mantegazza

INDICE

RIASSUNTO	Pag. 4
SUMMARY	“ 5
1 - INTRODUZIONE	“ 6
L'antibiotico-resistenza	“ 6
La piodermite canina	“ 45
2 - SCOPO DELLA TESI	“ 74
3 - MATERIALI E METODI	“ 75
4 - RISULTATI	“ 84
5 - CONCLUSIONI	“ 88
6 - BIBLIOGRAFIA	“ 90

Riassunto

Staphylococcus intermedius è la causa più comune di piodermite canina, una patologia cutanea il cui trattamento può richiedere un esteso e prolungato uso di antibiotici. Ciò ha determinato l'aumento di fenomeni di resistenza verso farmaci come penicilline, macrolidi e lincosamidi. In questo studio è stata valutata la suscettibilità agli antibiotici di ceppi di *S. intermedius* isolati da cani con o senza lesioni muco-cutanee. 136 isolati di *S. intermedius* sono stati identificati su base biochimica con il sistema semi-automatizzato miniAPI mediante l'impiego della galleria ID 32 STAPH e sottoposti a test di suscettibilità a 19 antibiotici con il metodo della diffusione su piastra. I risultati hanno evidenziato un'elevata sensibilità sia verso farmaci normalmente impiegati nella terapia della piodermite, quali cefalosporine e fluorochinoloni, sia verso quelli generalmente efficaci nei confronti degli stafilococchi, come amikacina e acido fusidico. È stata osservata, inoltre, la presenza di ceppi resistenti verso macrolidi e lincosamidi.

Summary

Staphylococcus intermedius is the principal pathogenic bacterial species responsible for canine pyoderma, one of the most common causes of canine skin worldwide. Pyoderma can be controlled with antimicrobial therapy, however the control of *S. intermedius* infection is difficult because increasing resistance has been reported over the last decade. The purpose of the present study was to determine the antimicrobial sensitivity of *S. intermedius* strains isolated from healthy and diseased dogs. 136 Strains were identified with the semi-automated miniAPI system using the ID 32 STAPH strip. Susceptibility to a panel of 19 antimicrobial drugs was established with the disk diffusion method. The large majority of isolates retained high susceptibility to cephalosporins and fluoroquinolones, all currently used as first line agents against *S. intermedius*. Similarly, high percentage of sensitivity was observed for drugs also considered effective against staphylococci like fusidic acid and amikacin. The present study confirms the occurrence of resistance of *S. intermedius* to macrolides and lincosamides.

1 - INTRODUZIONE

ANTIBIOTICO-RESISTENZA

Col termine antibiotici si indica una categoria di farmaci, naturali o di sintesi, in grado di rallentare o fermare la proliferazione dei batteri. In origine si definivano antibiotici sostanze di origine naturale, prodotte di solito da batteri o da miceti, capaci di uccidere altri microrganismi. Gli antibiotici venivano perciò distinti dai chemioterapici, molecole di origine sintetica aventi gli stessi effetti su determinati microrganismi (Schwarz e Kehrenberg, 2001). Oggi non è possibile tracciare un limite ben definito tra i chemioterapici e gli antibiotici, in quanto molti antibiotici si possono ottenere per sintesi ed altri vengono modificati in laboratorio, agendo sul nucleo di origine naturale (composti “semi-sintetici”) (Normand *et al.*, 2000). Si utilizza, quindi, il termine antibiotico per indicare qualunque prodotto di natura biologica o sintetica impiegato nelle terapie antibatteriche.

Aspetti generali dell'antibiotico-resistenza

L'antibiotico-resistenza rappresenta la capacità da parte dei batteri di sopravvivere e replicarsi in presenza di un farmaco antimicrobico (Schwarz e Kehrenberg, 2001). Si tratta di un fenomeno frequente e particolarmente importante in quanto l'insensibilità dei batteri agli antibiotici è un fattore limitante nell'uso di tali farmaci negli animali e rappresenta oggi il maggior pericolo connesso con la chemioterapia antibiotica.

Negli ultimi decenni, il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è divenuto un problema sempre maggiore in quanto si comincia a prefigurare la possibilità che in breve tempo possano svilupparsi batteri resistenti a tutti gli antibiotici oggi disponibili. Un esempio è rappresentato dallo *Staphylococcus aureus* resistente alla vancomicina, isolato per la prima volta negli Stati Uniti nel 2002 (CDC, 2002). Inoltre, esistono ceppi di almeno tre specie batteriche (*Enterococcus faecalis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*) che sono già in grado di resistere a più di 100 antibiotici oggi a disposizione (Cohen, 1992; Martineau *et al.*, 2000). I motivi per cui sembra opportuno avviare con tempestività interventi di controllo in questo ambito sono molteplici:

- l'aumento del numero di microrganismi resistenti e, soprattutto, multiresistenti;
- la mortalità attribuibile alla resistenza antibiotica;
- la rapidità con cui i microrganismi resistenti possono diffondersi a livello mondiale;
- la riduzione nell'efficacia di molti farmaci antimicrobici disponibili.

Un batterio può essere considerato resistente nei confronti di un chemioantibiotico quando la concentrazione che il farmaco raggiunge nel sito di infezione non è in grado di inibire la replicazione del germe o di ucciderlo (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001). Ciò dimostra che la resistenza antimicrobica non è solamente un problema microbiologico ma include aspetti di tipo farmacologico, farmacocinetico e clinico.

L'antibiotico-resistenza può essere naturale o acquisita. La resistenza naturale, o "intrinseca", consiste nell'insensibilità costituzionale di un microrganismo verso un determinato antibiotico e può dipendere dal meccanismo d'azione del farmaco, dal tipo di strutture possedute dal microrganismo, dalla mancata penetrazione dell'antibiotico nella cellula batterica o dal mancato legame del farmaco con il sito bersaglio. Questo tipo di resistenza è riscontrabile nei diversi ceppi di una determinata specie batterica, è caratterizzata dalla trasmissione verticale e

rappresenta una proprietà fondamentale di quella specie, tale da permetterne l'identificazione tassonomica (Roberts, 1996; Strommenger *et al.*, 2003). Esempi di resistenza intrinseca sono quelli relativi dall'insensibilità dei batteri Gram-negativi nei confronti dei glicopeptidi e degli enterobatteri per la penicillina.

La resistenza acquisita risulta della selezione di una popolazione batterica grazie alla pressione esercitata dalla presenza dell'antibiotico. Questo tipo di resistenza rappresenta una proprietà ceppo-specifica e può essere dovuta a mutazioni cromosomiche di geni che agiscono da bersaglio per gli agenti antimicrobici o alla presenza di elementi genetici mobili contenenti uno o più geni di resistenza (figura 1). I meccanismi responsabili di tale fenomeno si possono distinguere perciò, a seconda dei casi, in cromosomiali ed extra-cromosomiali (Projan, 2000). La resistenza acquisita è contraddistinta, a differenza di quella naturale, dalla possibilità di essere trasmessa orizzontalmente tra batteri di specie e generi diversi tra loro, attraverso diversi meccanismi di scambio di materiale genetico quali trasduzione, trasformazione e coniugazione.

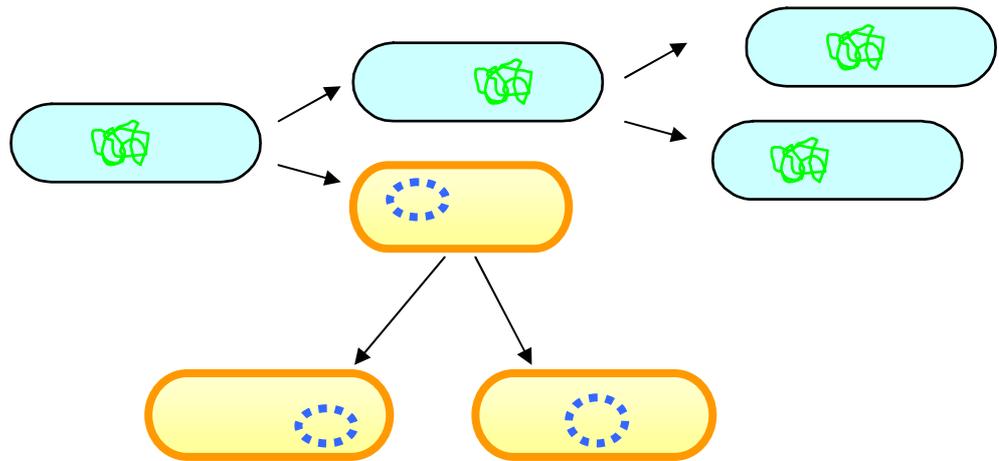


Figura 1. Diffusione della resistenza acquisita (clonale) basata su mutazioni di geni cromosomiali.

Basi genetiche dell'antibiotico-resistenza

La pressione determinata da un esteso impiego dei chemioantibiotici ha consentito ai batteri di sviluppare diversi meccanismi per evitare le attività inibitorie degli agenti antibatterici. Tali meccanismi sono sempre geneticamente trasmissibili e si distinguono in cromosomiali ed extracromosomiali (Projan, 2000).

Un meccanismo di tipo cromosomiale è rappresentato dalle mutazioni spontanee, che si realizzano tuttavia con una frequenza estremamente bassa, nell'ordine di 10^{-7} – 10^{-10} e non costituiscono, quindi, il meccanismo di resistenza più importante. Le mutazioni cromosomiali portano a modificazioni del DNA del cromosoma batterico e possono

determinare fenomeni di resistenza che, di solito, riguardano un singolo antibiotico. Esiste, tuttavia, la possibilità di resistenze crociate (*cross-resistance*) nel caso in cui microrganismi resistenti ad un certo antibiotico risultino resistenti ad altri farmaci che condividono lo stesso meccanismo d'azione: ciò avviene principalmente nel caso di molecole chimicamente affini o che hanno meccanismo d'azione o di legame simile (Alekshun e Levy, 2000). La trasmissione di questo tipo di resistenza avviene di solito in occasione del processo di divisione cellulare e, in ogni caso, tra microrganismi appartenenti alla stessa specie batterica.

I meccanismi di resistenza extracromosomiale sono molteplici ed avvengono con frequenza più elevata rispetto alle mutazioni. I determinanti genetici più importanti e frequenti dal punto di vista epidemiologico sono quelli localizzati su elementi genetici mobili come plasmidi, trasposoni e integroni (Roberts, 1996; Werckenthin *et al.*, 2001). Grazie a tali elementi mobili, la resistenza extracromosomiale può essere trasferita non solo tra microrganismi della stessa specie ma anche tra batteri di specie diverse, soprattutto tra i Gram-negativi. Il trasferimento della resistenza, inoltre, non riguarda un solo antibiotico, come nel caso delle mutazioni, ma più antibiotici simultaneamente per cui si parla, in questo caso, di resistenze multiple. A differenza della

resistenza cromosomiale, il livello di quelle extracromosomiali è piuttosto elevato sin dall'inizio per cui non è superabile con un aumento di dosaggio del farmaco (Bennett, 1995; Fey *et al.*, 2003).

Elementi coinvolti nel trasferimento dei geni di resistenza

La rapida diffusione dei geni di resistenza tra batteri di uguale o differente genere o specie è il risultato del trasferimento orizzontale di elementi genetici mobili che trasportano uno o più geni di resistenza. Tra questi, i plasmidi, i trasposoni e gli integroni giocano un ruolo fondamentale. Questi elementi sono composti da una molecola di DNA a doppia elica ma differiscono per dimensioni, struttura e proprietà biologiche.

I **plasmidi** sono molecole individuate in quasi tutti i generi batterici di importanza medica, umana e veterinaria, ma anche nei batteri che costituiscono la flora commensale della pelle e delle superfici mucose sia nell'uomo che nell'animale. Le loro dimensioni variano da meno di 2 kbp a più di 100 kbp e sono in grado di replicarsi in maniera indipendente dal DNA cromosomiale e di persistere nella cellula batterica per numerose generazioni (Robicsek *et al.*, 2006). Le proprietà conferite dai geni plasmidici non sono essenziali per la sopravvivenza

dei batteri in condizioni fisiologiche, ma possono rappresentare un vantaggio sotto specifiche condizioni in quanto possono conferire al germe la capacità di resistere ad agenti antimicrobici, disinfettanti, cationi di metalli pesanti, anioni ecc. (Stanisich, 1998).

Alcuni plasmidi di grandi dimensioni possono trasportare geni che li rendono capaci di spostarsi da una cellula ospite ad un'altra. Tali molecole, conosciute come "plasmidi di coniugazione", sono costituiti da DNA circolare a doppio filamento e posseggono le proprietà di un piccolo cromosoma in quanto contengono l'informazione genetica che controlla la loro replicazione, assicurando così, nella divisione cellulare la segregazione di una copia in ciascuna cellula figlia. Alcuni plasmidi possono integrarsi nel cromosoma batterico nella cosiddetta "forma episomiale". L'integrazione fa sì che il plasmide non sia più in grado di replicarsi in maniera autonoma bensì in sincronia con il cromosoma stesso. In ogni caso, un episoma può separarsi dal cromosoma dopo l'avvenuta integrazione e ricominciare a replicarsi autonomamente sotto forma di plasmide. Inoltre, molti plasmidi possono essere trasmessi da una cellula batterica ad un'altra durante il processo di coniugazione, quindi possono far acquisire nuovi caratteri al batterio ricevente (figura 2), (Robicsek *et al.*, 2006).

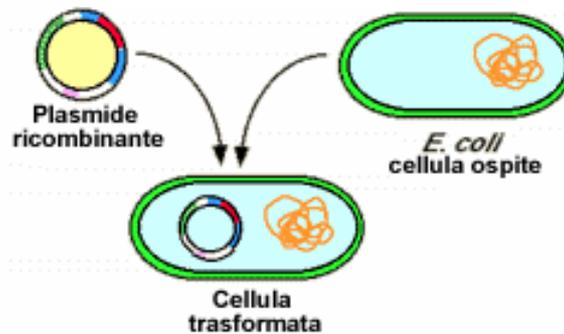


Figura 2. Plasmide di coniugazione.

Come abbiamo detto, i plasmidi possono fornire al batterio la capacità di sintetizzare prodotti non essenziali per la crescita; tuttavia, essi possono veicolare informazioni che consentono alla cellula batterica di produrre tossine o appendici adesive (ad es. pili), essenziali per i processi di colonizzazione, di produrre i pili sessuali necessari per la coniugazione batterica (*fattore F*) o di divenire resistente agli antibiotici. In quest'ultimo caso si parla di plasmidi di resistenza (*fattori R*), elementi facilmente trasmissibili attraverso il meccanismo della coniugazione e che possono trasportare uno o più geni di resistenza. I fattori R, inoltre, possono integrarsi con altri plasmidi e, in parte o *in toto*, nel DNA cromosomiale (Bennett, 1995; Fey *et al.*, 2003).

Un altro tipo di elementi genetici mobili è rappresentato dai **trasposoni**, sequenze di DNA di dimensioni variabili da 500 kbp a 10.000 kbp in grado di inserirsi in punti diversi del genoma batterico e di trasferire i

geni di resistenza da un cromosoma ad un plasmide e viceversa. A differenza dei plasmidi, i trasposoni non hanno sistemi di replicazione autonoma e devono integrarsi in vettori competenti, come il DNA cromosomiale o i plasmidi, al fine di mantenere la loro stabilità. Nei batteri, i trasposoni sono stati evidenziati sia nel cromosoma, sia nei fattori R e F (Alekhun e Levy, 2000). I trasposoni, soprattutto quelli di maggiori dimensioni, possono trasportare uno o più geni codificanti importanti funzioni quali la resistenza ad antibiotici e metalli pesanti o la produzione di esotossine. La scoperta della trasposizione nei batteri ha contribuito a chiarire meglio i meccanismi alla base della rapida diffusione dell'antibiotico-resistenza tra i batteri: la mobilità di queste porzioni geniche condiziona il loro facile inserimento nelle regioni di DNA che i batteri trasferiscono tra loro, mediante i noti fenomeni di coniugazione e traduzione (Bager e Helmuth, 2001).

Gli **integroni** sono elementi genetici a DNA formati da un sito di ricombinazione, in cui possono essere inseriti piccoli elementi mobili di meno di 2 kbp definiti "cassette geniche" e dal gene che codifica l'enzima integrasi, responsabile dell'inserzione sito specifica della cassetta genica stessa (Hernandez *et al.*, 2001). Le cassette geniche contengono solitamente un unico gene che, nella maggior parte dei casi, è un gene che conferisce resistenza antibatterica. Gli integroni

differiscono dai plasmidi per la carenza dei sistemi di replicazione, e dai trasposoni per la carenza dei sistemi di trasposizione (figura 3).

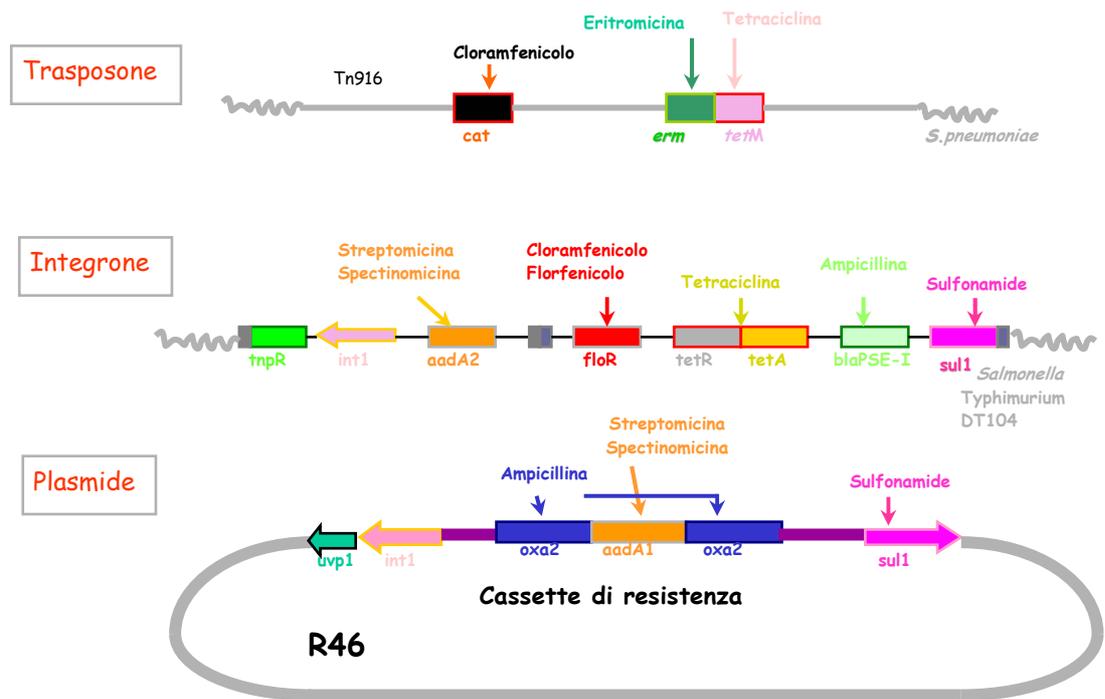


Figura 3. Elementi di resistenza.

Meccanismi di trasferimento dei geni di resistenza

I plasmidi, i trasposoni e gli integroni vengono trasmessi verticalmente dopo la divisione della cellula batterica ma possono anche essere trasferiti orizzontalmente tra batteri della stessa specie o di specie differenti tramite meccanismi di coniugazione, trasduzione, trasformazione e trasposizione (figura 4).

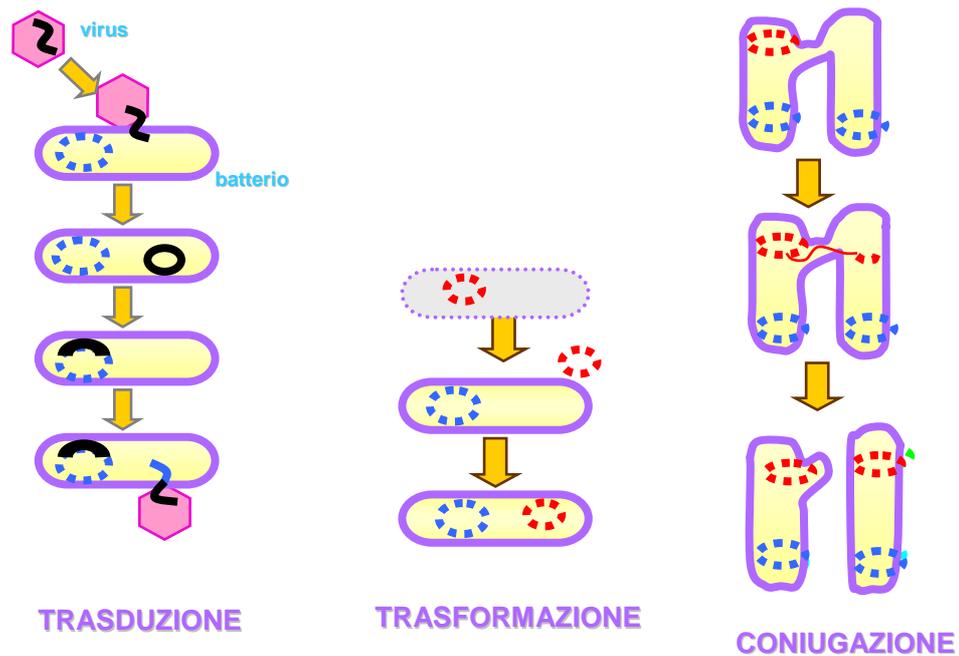


Figura 4. Acquisizione di geni di resistenza.

La **coniugazione** consiste nel trasferimento di un plasmide, definito di coniugazione, da una cellula donatrice ad una cellula ricevente; lo stretto contatto tra le due cellule è uno dei principali fattori richiesti per una coniugazione efficace. Il complesso dei geni i cui prodotti rappresentano i componenti dell'apparato di trasferimento varia in dimensioni da 15 kbp nei batteri Gram-positivi a 30 kbp nei batteri Gram-negativi (Carattoli, 2001). Per le loro dimensioni, quindi, tali complessi non possono essere localizzati nei piccoli plasmidi di resistenza prima descritti. La coniugazione è uno dei meccanismi principali per la diffusione dei geni di resistenza fra batteri di specie e generi differenti,

sia nell'uomo che negli animali. I plasmidi di coniugazione sono stati identificati sia nei batteri Gram-positivi che nei Gram-negativi.

La coniugazione è un evento abbastanza comune in natura, con una frequenza di 10^{-2} . Perché una cellula batterica possa comportarsi da donatrice, cioè da cellula maschile, deve possedere un particolare elemento chiamato fattore F. Tali cellule sono perciò chiamate F^+ , mentre le cellule riceventi, prive del fattore F, sono chiamate F^- (Clewell e Flannagan, 1993; Weese *et al.*, 2006). Il fattore F è rappresentato da una molecola circolare di DNA ed ha una struttura similcromosomica, contiene cioè l'informazione genetica sufficiente per la propria replicazione. Tale fattore può anche avere una localizzazione cromosomica, può cioè essere integrato nel cromosoma batterico nella forma episomiale: in questo caso, durante la coniugazione si realizza, insieme al trasferimento del fattore F, anche quello di parte del materiale cromosomico, con elevata frequenza di ricombinazione genetica.

Le cellule batteriche in cui il fattore F è integrato nel cromosoma sono chiamate Hfr (High Frequency of Recombination) per la frequenza elevata di ricombinazione (Salyers *et al.*, 1999). La trasmissione del fattore F da una cellula F^+ ad una cellula F^- si realizza grazie ad una particolare struttura posseduta solo dalle cellule F^+ e chiamata pilo F. Si tratta di un'appendice filamentosa costituita da due catene proteiche

parallele (ogni cellula F^+ possiede uno o due pili F) che funziona da ponte tra due cellule coniuganti; il fattore F può così iniziare il proprio trasferimento con la rottura della sua struttura circolare e la sua trasformazione in una struttura lineare. Lo stesso processo di trasformazione, dalla forma circolare a quella lineare, avviene nelle cellule Hfr a carico del cromosoma. La coniugazione rappresenta il meccanismo con il quale più frequentemente si realizzano scambi genetici riguardanti la resistenza ai chemioantibiotici.

La **trasduzione** è un meccanismo di trasferimento genetico con il quale un determinato carattere passa da un microrganismo all'altro veicolato da un batteriofago, un virus in grado di infettare i batteri inserendovi il proprio DNA (Telenti e Tenover, 2002). Nella nuova cellula ospite, il virus può dirigere l'espressione dei propri geni, la replicazione e l'impacchettamento del DNA fagico dentro nuove particelle virali che vengono poi rilasciate dalla cellula batterica attraverso un ciclo litico. In alcuni casi il DNA fagico può integrarsi nel DNA cromosomico della cellula ospite come *profago* e rimanere localizzato per lunghi periodi in uno stato inattivo. Fattori esterni come le radiazioni ultraviolette possono attivare il profago e determinare l'inizio di un nuovo ciclo litico. I geni di resistenza cromosomica che sono localizzati contigualmente ai siti di integrazione del profago possono diventare parte del genoma fagico

quando il profago viene escisso dal DNA cromosomico; in questo caso i geni di resistenza possono diffondere con le particelle fagiche ed essere trasmessi ad una nuova cellula ospite (Schwarz e Chaslus-Dancla, 2001). La diffusione dei geni di resistenza attraverso la trasduzione è fortemente influenzata da un limite dato dalla quantità del DNA impacchettato nel fago e dalla necessità di specifici recettori per l'adsorbimento del fago stesso sulla superficie delle nuove cellule. Per gli stafilococchi, ad esempio, è stato osservato che 45 kbp è il limite massimo di DNA che può essere trasdotto. Dal momento che soltanto le cellule ospiti filogeneticamente vicine tra loro presentano gli stessi recettori di attacco del fago, la trasduzione si osserva comunemente tra i batteri della stessa specie e raramente avviene tra batteri di generi o specie differenti. I batteriofagi di trasduzione sono stati identificati in una grande varietà di batteri (Kokjohn, 1989; Tenover *et al.*, 1995). Negli stafilococchi, dove manca la capacità di coniugazione a causa dell'assenza del fattore F, i plasmidi di resistenza possono essere trasmessi per trasduzione (Normand *et al.*, 2000).

La **trasformazione** è un meccanismo di trasferimento di DNA libero che si realizza attraverso l'assunzione, da parte di una cellula competente, di frammenti di DNA presenti nell'ambiente circostante e provenienti dalla lisi di un altro batterio (Bennett, 1995; Fey *et al.*, 2003). Si tratta della

principale via di introduzione dei plasmidi all'interno di nuovi batteri utilizzata *in vitro*, mentre *in vivo* ha un ruolo limitato in quanto il DNA libero che origina da batteri lisati viene rapidamente degradato dalle principali condizioni ambientali. Soltanto pochi batteri come *Streptococcus pneumoniae* o *Bacillus* spp. hanno una capacità naturale di prelevare il DNA dall'ambiente circostante. Questo fenomeno comporta, quindi, l'acquisizione di caratteri ereditari nuovi da parte di una cellula batterica trattata con DNA estratto da una cellula con diverso genotipo. L'estrazione del DNA dal corpo batterico risulta, solitamente, in frammenti equivalenti a circa 1/100 del cromosoma batterico, quindi di regola solo un gene del donatore può venire assunto dal ricevente; tuttavia, per caratteri strettamente vicini nella mappa cromosomica è possibile ottenere anche una doppia trasformazione (Quintiliani *et al.*, 1999). La frequenza della trasformazione batterica spontanea è piuttosto rara in natura e sembrano scarse le implicazioni pratiche di questo processo di trasferimento genetico nella trasmissione della resistenza.

In tempi più recenti è stato identificato un meccanismo di scambio genetico, definito **trasposizione**, attraverso il quale può avvenire il trasporto e la diffusione di geni di resistenza da un replicone all'altro, cioè tra singole unità in grado di replicarsi. Tale sistema coinvolge elementi chiamati trasposoni, unità genetiche molto semplici che

possono trasportare resistenze multiple. I trasposoni sono localizzati in frammenti di DNA delimitati, alle estremità, da particolari sequenze di inserzione che permettono l'inserimento del segmento di DNA in corrispondenza di omologhe sequenze, localizzate in repliconi indipendenti e possono migrare da un plasmide all'altro o da un plasmide ad un cromosoma (Schwarz e Noble, 1999).

Aspetti biochimici dell'antibiotico-resistenza

Come risultato dell'acquisizione della resistenza genotipica, indipendentemente dalla natura del meccanismo che l'ha determinata (mutazione, ricombinazione ecc.), il microorganismo divenuto resistente esprime fenotipicamente uno o più caratteri o proprietà mediante i quali si realizza la resistenza stessa. Numerosi sono, infatti, i bersagli strutturali e funzionali la cui modificazione determina l'insensibilità del microorganismo all'azione del farmaco (Martin e Maris, 1995; Lautz *et al.*, 2006). La resistenza di un microorganismo si può instaurare con uno dei seguenti meccanismi: 1) modificazione del sito di attacco dell'antibiotico su una struttura 'bersaglio' della cellula; 2) produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici; 3) modificazione della permeabilità

cellulare; 4) attivazione di una via metabolica alternativa (figura 5) (Projan, 2000).

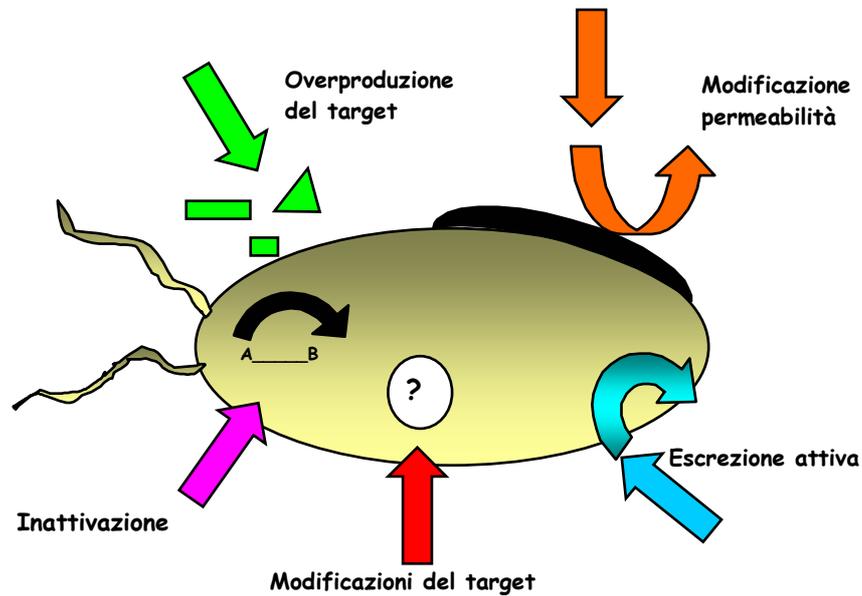


Figura 5. Meccanismi di antibiotico-resistenza batterica.

Modificazione del sito di attacco dell'antibiotico

Ciascun antibiotico presenta un sito di attacco specifico, definito “recettore”, all’interno della cellula batterica; una qualsiasi variazione a livello di tale sito impedisce la fissazione del farmaco rendendolo inadatto a svolgere la propria azione. Un meccanismo di tale tipo sembra essere responsabile della resistenza verso gli antibiotici β -lattamici (penicilline e cefalosporine), le tetracicline, i sulfonamidi e i fluorochinoloni etc. (tabella 1) (Putman *et al.*, 2000).

Tabella 1. Esempi di antibiotico-resistenze causate dalla modificazione del sito bersaglio.

Antibiotici	Bersaglio	Geni	Localizzazioni	Batteri resistenti
Tetracicline	ribosomi	tet	T, C	Gram ⁺ , Gram ⁻
Sulfonamidi	diidrofolato sintasi	sul	P, C	enterobatteri
β -lattamici	PBP	mecA	C	<i>Staphylococcus</i> spp.
Fluorochinoloni	DNA girasi, DNA topoisomerasi	Gyr, par	C	Gram ⁺ , Gram ⁻

T=trasposone, C=cromosoma, P=plasmide, I=integrone, PBP=Penicillin Binding Protein

Produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici

Tra i numerosi meccanismi attraverso i quali si può instaurare una resistenza, quello della produzione di enzimi inattivanti è il più importante in quanto può coinvolgere più antibiotici contemporaneamente ed è una proprietà che può essere facilmente trasmessa ad altri ceppi sensibili. Questi enzimi agiscono sulla molecola dell'antibiotico modificandone la struttura; in questo modo il farmaco perde le sue caratteristiche antibatteriche.

Tra gli enzimi i più importanti vi sono le fosfotransferasi, le acetiltransferasi e le adeniltransferasi, che agiscono sugli antibiotici aminoglicosidi, e le β -lattamasi (penicillinasi, cefalosporinasi ecc.) che

.inattivano gli antibiotici a nucleo β -lattamico (penicilline, cefalosporine) (tabella 2) (Greenwood, 2000).

Tabella 2. Esempi di antibiotico-resistenze causate dall'inattivazione del farmaco.

Antibiotici	Via enzimatica	Geni	Localizzazioni	Batteri resistenti
tetracicline	ossido-riduzione	tet	T	Gram ⁺ , Gram ⁻
macrolidi	fosfo-transferasi	Mph (A-C)	P, T, C	<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.
β -lattamici	idrolitica	bla	P, T, C	Gram ⁺ , Gram ⁻
aminoglicosidi	acetil-, adenil-, fosfo-transferasi	aac, aad	P, T, C	Gram ⁺ , Gram ⁻
cloramfenicolo	acetil-transferasi	catA, catB	P, T, C	Gram ⁺ , Gram ⁻

T=trasposone, C=cromosoma, P=plasmide, I=integrone, PBP=Penicillin Binding Protein

Alcuni di questi enzimi, le *eso*- β -lattamasi, vengono escreti all'esterno della cellula batterica, per lo più solo in presenza dell'antibiotico induttore, ed estrinsecano la loro attività attraverso un processo di inattivazione extracellulare dell'antibiotico. Altri enzimi, le *endo*- β -lattamasi, manifestano l'azione inattivante all'interno della cellula batterica.

Modificazione della permeabilità cellulare

Per esercitare la propria azione, l'antibiotico deve poter penetrare nella cellula batterica. Tale ingresso può essere impedito da mutazioni che portano ad una modificazione della permeabilità cellulare, causando quindi un'alterazione a livello dei recettori superficiali per gli antibiotici, oppure a variazioni nel meccanismo di trasporto attivo a livello di membrana (Eady *et al.*, 1993; Katayama *et al.*, 2001). Ciò può realizzarsi mediante riduzione del numero e delle dimensioni dei canali di flusso di entrata e/o con l'incremento del pompaggio all'esterno delle molecole di antibiotico. I geni che codificano per proteine di efflusso associate alla membrana sono stati identificati in plasmidi, trasposoni e a livello delle cassette geniche. Questi sistemi di efflusso eliminano un stretto range di sostanze strutturalmente simili fra loro con un processo dipendente dal consumo di energia, ad esempio attraverso enzimi che utilizzano l'ATP come donatore di gruppi fosfato, e sono gli unici in grado di determinare elevati livelli di resistenza agli aminoglicosidi nei batteri (Putman *et al.*, 2000). Inoltre, vi è un ampio numero di trasportatori multi-farmaco, rilevati sia nei batteri Gram-positivi sia nei Gram-negativi, la maggior parte dei quali è in grado di eliminare dalla cellula batterica composti tossici strutturalmente eterogenei che comprendono gli agenti antimicrobici (tabella 3).

Tabella 3. Esempi di antibiotico-resistenze causate da modificazioni della permeabilità della cellula batterica.

Antibiotici	Meccanismo	Geni	Localizzazione	Batteri resistenti
tetracicline	Efflusso	tet	P, T, C	Gram ⁺ , Gram ⁻
macrolidi	Efflusso	metA	P, T, C	Gram ⁺
cloramfenicolo, fluorochinoloni	Efflusso (multidrug)	blt/norA	C	<i>Bacillus</i> spp., <i>Staphylococcus</i> spp.
cloramfenicolo, fluorochinoloni, β-lattamici, macrolidi, tetracicline	Efflusso (multidrug)	mexA, mexB, acrA, acrB, oprM, tolC	C	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>E. coli</i>

T=trasposone, C=cromosoma, P=plasmide, I=integrone, PBP=Penicillin Binding Protein

Attivazione di una via metabolica alternativa

Ci sono chemioantibiotici che agiscono interferendo con l'attività di alcuni enzimi batterici. Alcuni esempi sono rappresentati dai sulfamidici e dal trimethoprim. La resistenza genotipica verso tali farmaci viene acquisita dal microorganismo per mezzo di plasmidi capaci di codificare la sintesi di enzimi con struttura diversa ma funzione simile, per cui l'attività enzimatica non viene alterata dalla presenza di tali farmaci (tabella 4), (Felmingham e Brown, 2001).

Tabella 4. Esempi di antibiotico-resistenze causate dall'inattivazione enzimatica.

Antibiotici	Enzima	Geni	Localizzazione	Batteri resistenti
Macrolidi, Lincosamidi, Streptogramina	Esterasi	ereA, ereB	P	Enterobatter, <i>Staphylococcus haemolyticus</i>
Streptogramina	Acetil-trasferasi	vatA, vatE	P	Gram ⁺ , Gram ⁻
Lincosamidi	Nucleotid- trasferasi,	lnuA, lnuB	P	Gram ⁺ , Gram ⁻

T=trasposone, C=cromosoma, P=plasmide, I=integrone, PBP=Penicillin Binding Protein.

Le multiresistenze

Uno degli aspetti più importanti nell'ambito della farmacoresistenza batterica è quello delle multiresistenze che possono rendere un microrganismo potenzialmente refrattario ad un numero molto elevato di chemioantibiotici e che possono essere trasmesse da un microrganismo all'altro e da una specie batterica ad altra mediante il trasporto di materiale genetico extracromosomiale, i cosiddetti fattori R o plasmidi di resistenza (Projan, 2000). I fattori R hanno in comune con i già descritti fattori F la capacità di replicarsi rapidamente e di trasmettere il proprio materiale ad altre cellule batteriche; inoltre, hanno la proprietà di conferire resistenza a numerosi antibiotici (tetracicline, cloramfenicolo, aminoglicosidi, ecc.) e di trasmetterla ad altre cellule "contagiate".

Nell'ambito di un fattore R possiamo distinguere una parte nota come RTF (Resistance Transfer Factor), fattore trasmissibile o sessuale di resistenza, in grado di trasferirsi anche da solo da una cellula all'altra, ed una parte definita *R-determinant*, o fattore determinante la multiresistenza specifica. Quest'ultimo è costituito da una serie di geni ciascuno dei quali in grado di conferire resistenza ad un antibiotico; fino ad oggi sono stati riconosciuti geni capaci di indurre resistenza a penicilline, cefalosporine, aminoglicosidi, cloramfenicolo, tetracicline, sulfamidici, trimetoprim e acido fusidico (David, 2002).

Lo studio della biologia dei fattori R ha permesso di osservare che, in alcuni casi, la perdita dei fattori stessi può avvenire per soppressione spontanea, processo che si realizza con diversa frequenza nei vari microrganismi; esiste inoltre la possibilità di provocare artificialmente la perdita del fattore R attraverso l'azione dei raggi ultravioletti o di sostanze come l'acridina (Greenwood, 2000).

Controllo dell'antibiotico-resistenza

I problemi associati all'emergere della resistenza agli antibiotici possono essere affrontati in diversi modi (Humphrey, 2000). Un primo approccio si basa sulla continua introduzione sul mercato di nuovi farmaci

antibiotici verso i quali non si è ancora sviluppata resistenza. Un secondo modo di affrontare il problema è prevenire l'insorgenza di malattie infettive con la vaccinazione o trattandole con strumenti alternativi agli antibiotici. Il terzo approccio è controllare l'emergere e la diffusione delle resistenze assicurando un uso più prudente degli antibiotici disponibili e metodi efficaci di controllo della trasmissione di infezioni. Ciò dovrebbe comportare, soprattutto:

- l'attivazione di strategie per un uso più razionale degli antibiotici (programmi educativi, supporto organizzativo sottoforma di linee guida, politiche antibiotiche sia in ambito umano che veterinario);
- l'attivazione di sistemi di monitoraggio dell'uso di antibiotici e di sorveglianza della resistenza agli antibiotici in batteri isolati negli esseri umani e negli animali.

Metodi per valutare la suscettibilità batterica agli antibiotici

L'uso dei farmaci antibatterici nel trattamento delle infezioni è condizionato dal rapporto fra sensibilità del patogeno e la concentrazione che il farmaco raggiunge nella sede d'infezione (Lilenbaum *et al.*, 1998).

Per una corretta terapia antibatterica è necessario conoscere, oltre alla specie batterica isolata, anche la sua sensibilità agli antibiotici. Per questo motivo è importante, mediante l'esecuzione di un antibiogramma, valutare *in vitro* il profilo di suscettibilità agli antibiotici di un ceppo batterico per avere dati utili per la scelta dell'antibiotico più adeguato per la terapia. L'importanza dell'antibiogramma deriva dal principio per cui la sensibilità o la resistenza mostrate da un germe nei confronti di un antibiotico *in vitro* prefigurano l'efficacia o meno della terapia antibiotica *in vivo* (Gattringer *et al.*, 2002).

Da un punto di vista strettamente biologico, i termini resistente e sensibile possono essere usati per esprimere la capacità o meno di un microrganismo di moltiplicarsi in presenza di una data concentrazione di antibiotico. Nell'ambito della stessa popolazione batterica, tuttavia, alcuni batteri possono risultare resistenti all'antibiotico, mentre altri risultano sensibili alla stessa concentrazione. Un ceppo batterico può pertanto essere definito sensibile ad un antibiotico se la maggior parte della popolazione batterica è inibita da tale concentrazione (Felmingham e Brown, 2001).

Da un punto di vista clinico, un microrganismo può essere considerato sensibile ad un antibiotico se le indagini condotte *in vitro* suggeriscono che un paziente infettato da quel microrganismo ha la capacità di

rispondere in maniera favorevole a concentrazioni appropriate del farmaco.

Nella pratica, il grado di sensibilità di un germe nei confronti di un antibiotico viene spesso definito quantitativamente in termini di *Concentrazione Minima Inibente* (MIC) ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico, in un *range* di diluizioni, che permette la completa inibizione della crescita batterica (Greenwood, 2000; Gattlinger *et al.*, 2002). Generalmente, gli antibiotici inibiscono la replicazione batterica per un tempo abbastanza lungo così da permettere all'ospite di rimuovere il microrganismo infettante dalla sede d'infezione mediante i meccanismi naturali di difesa. Nel caso in cui tali meccanismi siano compromessi o non funzionino in maniera ottimale, ad esempio in soggetti immunodepressi, l'infezione potrebbe non essere influenzata dalla terapia o rispondere temporaneamente ma ricomparire dopo la sua sospensione. Se i meccanismi cellulari o umorali di difesa sono compromessi, infatti, anche infezioni sostenute da germi sensibili ad un antibiotico non rispondono in maniera efficace al trattamento. In questi casi è più opportuno valutare la *Concentrazione Minima Battericida* (MBC) ovvero la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di uccidere il 99,9% della popolazione batterica iniziale, quindi di sopperire

alle funzioni normalmente svolte dai meccanismi di difesa dell'ospite, in particolare dal sistema immunitario (Gattringer *et al.*, 2002).

Per una corretta valutazione della sensibilità di un antibiotico, oltre all'esecuzione dell'antibiogramma è necessario prendere in considerazione diversi fattori: 1) lo stato fisiopatologico del paziente (stato immunitario, sede e tipo di infezione); 2) le caratteristiche farmacocinetiche e farmacodinamiche dell'antibiotico (tossicità, legame con le proteine, assorbimento, eliminazione, ecc.); 3) la concentrazione raggiunta dal farmaco nella sede d'infezione; 4) la natura e la gravità dell'infezione. Questi ed altri fattori non possono essere valutati con l'antibiogramma ma devono essere presi in considerazione al momento della interpretazione dei risultati per la scelta della terapia farmacologia più appropriata.

Il metodo ideale per l'esecuzione di un antibiogramma dovrebbe avere alcuni requisiti:

- 1 essere applicabile a tutti i batteri e a tutti gli antibiotici;
- 2 essere di facile esecuzione;
- 3 consentire la lettura dei risultati in tempi brevi;
- 4 essere standardizzabile e riproducibile;
- 5 permette il rilevamento di eventuali batteri contaminati o di colture miste;

- 6 fornire un risultato quantitativo (MIC e MBC);
- 7 indicare se l'azione del farmaco è di tipo batteriostatico o battericida.

Nessuno dei metodi attualmente disponibili è in grado di soddisfare tutti questi requisiti e ogni tecnica presenta vantaggi e limiti. Quelli più largamente utilizzati sono il metodo delle diluizioni e il metodo della diffusione, entrambi condotti rispettando criteri standard definiti (Felmingham e Brown, 2001).

Metodo delle diluizioni

Questa tecnica può essere eseguita sia in terreni liquidi (brodo-diluizione) sia in terreni solidi (agar-diluizione). Nella brodo-diluizione (figura 6) vengono eseguite diluizioni scalari dell'antibiotico in esame in una batteria di brodocolture inoculate con una quantità standard di sospensione batterica. Dopo incubazione delle brodocolture a 37°C per 16–18 ore, la lettura dei risultati viene effettuata osservando la presenza o meno di intorbidimento, indice di replicazione batterica. La MIC viene definita come la più bassa concentrazione di antibiotico che determina l'inibizione della crescita batterica, valutata come assenza visibile di torbidità (De Oliveira *et al.*, 2000). Con questa tecnica, inoltre, è

possibile determinare la MCB, allestendo subcolture su terreni solidi a partire dalle brodocolture prive di crescita batterica. In questo caso la MBC è data dalla più bassa concentrazione di antibiotico che ha determinato la morte dei microrganismi in brodocoltura, testimoniata dalla mancanza di sviluppo di colonie batteriche nella corrispondente subcultura (figura 6).

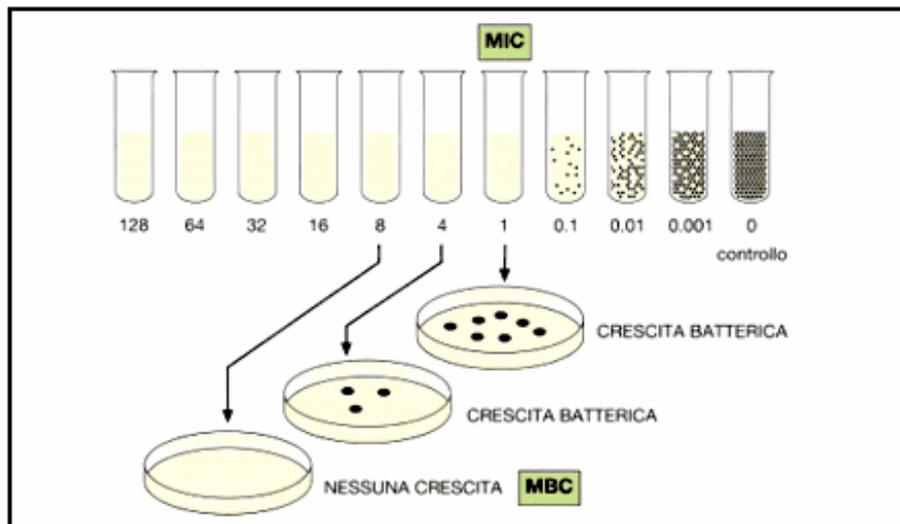


Figura 6. Valutazione di MIC e MBC con la tecnica delle diluizioni.

Il metodo dell'agar-diluizione si esegue piastrandone una quantità standard di batteri su terreni agarizzati contenenti concentrazioni scalari dell'antibiotico in esame e verificando lo sviluppo di colonie batteriche dopo 16–20 ore d'incubazione a 37°C (Katayama *et al.*, 2000). In questo caso la MIC viene definita come la più bassa concentrazione di

antibiotico in grado di inibire la replicazione del 99% delle cellule batteriche piastrate e valutate come numero di CFU (Unità Formanti Colonia), determinando di fatto l'assenza di colonie batteriche sulla piastra.

Metodo della diffusione

Questo metodo si basa sul principio per cui un antibiotico diffonde modo tridimensionale sulla superficie di un terreno solido seminato con un ceppo batterico creando una zona di agar in cui non si avrà sviluppo batterico ma un'area di inibizione. In tale area l'antibiotico raggiunge un gradiente di concentrazione superiore o uguale alla MIC, sufficiente quindi ad inibire la replicazione batterica (Aarestrup *et al.*, 2000).

La formazione dell'area di inibizione è, pertanto, la risultante di due eventi dinamici contemporanei: da una parte la diffusione dell'antibiotico nell'agar e dall'altra la crescita batterica. In base alla grandezza del diametro dell'alone di inibizione un ceppo batterico viene definito, rispetto ad un antibiotico, sensibile, moderatamente sensibile (intermedio), o resistente. Nel metodo della diffusione, l'antibiotico può essere posto in pozzetti scavati nello spessore dell'agar o, nella maggior parte dei casi, essere applicato sulla superficie dell'agar mediante dischetti di carta da filtro imbevuti con l'antibiotico (Brosnikoff *et al.*,

2002).E' importante tener presente che l'esito del test è fortemente influenzato da diversi fattori tra i quali:

- densità dell'innocuo; se l'inoculo batterico è troppo scarso occorrerà più tempo al ceppo batterico per raggiungere un livello critico per l'azione dell'antibiotico, determinando un alone di inibizione troppo ampio. Un inoculo iniziale troppo denso determinerà, al contrario, un alone di inibizione troppo piccolo. Per tali motivi, ceppi batterici sensibili possono non produrre alcun alone di inibizione con inoculi particolarmente densi, mentre ceppi relativamente resistenti possono determinare un alone di inibizione in presenza di inoculi scarsi.
- composizione e spessore del terreno; il terreno può influenzare la grandezza del diametro dell'alone di inibizione sia per azione diretta sull'attività dell'antibiotico, ostacolandone o favorendone la diffusibilità, sia influenzando la crescita del microorganismo in esame. Un elevato contenuto di timidina del terreno, ad esempio, inibisce l'azione dei sulfamidici mentre un'alta concentrazione di Ca^{2+} e Mg^{2+} inibisce l'attività di tetracicline e aminoglicosidi.

Per ottenere risultati attendibili con il metodo della diffusione è necessario attenersi scrupolosamente alle metodiche standardizzate più

usate come la tecnica di *Kirby-Bauer* che prevede l'impiego di uno o più dischetti di antibiotico sulla superficie di un terreno agarizzato sul quale è stato seminato il microrganismo da studiare (figura 7) (Aarestrup, *et al.*, 2000). Dopo aver preparato una brodocoltura col germe in esame ed averla posta in incubazione a 37°C per circa 18 ore, l'inoculo batterico viene standardizzato a 0.5 MacFarland (circa 10^8 batteri/ml) e seminato sulla superficie di una piastra di Mueller Hinton Agar in maniera uniforme (NCCLS, 2004). Entro 15 minuti da tale operazione, sul terreno vengono applicati i dischetti di antibiotico mediante pinze sterili, assicurandosi che ci sia perfetta aderenza tra il disco e la superficie dell'agar.



Figura 7. Metodo della diffusione su terreno agarizzato.

I dischetti devono avere una distanza dai margini della piastra non inferiore a 25 mm e fra di loro non inferiore a 24 mm, in modo da consentire la lettura ottimale degli aloni di inibizione. Dopo incubazione delle piastre a 37°C per 16–18 ore si procede con la misurazione del diametro delle zone di inibizione e con l'interpretazione dei risultati in base ad uno schema di lettura.

Dal confronto dei diametri misurati con i valore di riferimento presenti negli schemi interpretativi, il microrganismo può essere definito sensibile, moderatamente sensibile (intermedio) o resistente nei confronti di un dato antibiotico (NCCLS 2004).

Rispetto alla tecnica delle diluizioni il metodo della diffusione offre il vantaggio della semplicità di esecuzione ed è pertanto quello più utilizzato nella routine di laboratorio. La principale limitazione è rappresentata dal fatto che tale metodica non fornisce direttamente risultati quantitativi e non consente di valutare direttamente la MIC e la MBC di un farmaco. In generale, però, le informazioni qualitative fornite da questo tipo di tecnica sono adeguate per una terapia guidata dell'infezione ed è sufficiente sapere se il microrganismo in esame è sensibile, moderatamente sensibile (intermedio) o resistente (Phillips e Williams, 1998). Ciò che viene determinato, infatti, non è la misurazione diretta della MIC ma una sua stima semiquantitativa data da due

concentrazioni di antibiotico, definite *breakpoint*, che consentono di individuare le tre categorie sopracitate. La scelta dei due breakpoint viene stabilita da comitati internazionali come l'NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) o il CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme, Société Française de Microbiologie) sulla base di criteri batteriologici, farmacocinetici e clinici aggiornati di anno in anno (tabella 5).

Tabella 5. Esempi di breakpoint e criteri interpretativi secondo il CA-SFM.

Antibiotico	Concentrazione (μg)	Breakpoint		Breakpoint diametri	
		MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		(mm)	
		S	R	S	R
Penicillina G	6 (10 UI)	$\leq 0,25$	> 16	≥ 29	< 8
Ampicillina	10	≤ 4	> 16	≥ 19	< 14
Amoxicillina	25	≤ 4	> 16	≥ 21	< 14
Amoxicillina/Ac. Clav.	20/10	≤ 4	> 16	≥ 21	< 14
Cefalotina	30	≤ 8	> 32	≥ 18	< 12
Cefoperazone	30	≤ 4	> 32	≥ 21	< 14
Amikacina	30	≤ 8	> 16	≥ 17	< 15
Spectinomicina	100	≤ 64	> 64	≥ 20	< 20
Tetraciclina	30 UI	≤ 4	> 8	≥ 19	< 17
Eritromicina	15 UI	≤ 1	> 4	≥ 22	< 17
Nitrofurantoina	300	≤ 32	> 128	≥ 17	< 14
Norfloxacin	5	$\leq 0,5$	> 1	≥ 25	< 22
Ciprofloxacina	5	$\leq 0,5$	> 1	≥ 25	< 22
Acido fusidico	10	≤ 2	> 16	≥ 22	< 15

La definizione proposta dall'NCCLS per le tre categorie considerate è la seguente:

- **Sensibile:** l'infezione causata dal ceppo batterico isolato, la cui importanza viene valutata sia dal clinico che dal microbiologo, può essere trattata con l'antibiotico in esame al dosaggio usuale raccomandato.

- **Intermedio:** l'infezione può essere trattata con l'antibiotico in esame ma ad un dosaggio più alto di quello usuale. Ciò implica che tale antibiotico venga usato in distretti anatomici in cui è in grado di raggiungere concentrazioni particolarmente elevate e solo se tale dosaggio non raggiunge livelli tossici.

- **Resistente:** i ceppi resistenti sono quelli non inibiti dalle concentrazioni sistemiche dell'antibiotico, né ai dosaggi normali né a dosaggi più elevati, per cui l'infezione non può essere trattata con l'antibiotico in esame.

Per stabilire i breakpoint vengono saggiati centinaia di ceppi batterici di una determinata specie con il metodo delle diluizioni in modo da calcolare la MIC 90 (la minima concentrazione del farmaco che inibisce la crescita del 90% dei ceppi), corrispondente al breakpoint più alto, e la MIC 60 (la minima concentrazione del farmaco che inibisce la crescita

del 60% dei ceppi) corrispondente al breakpoint più basso (Devriese *et al.*, 1997; Rich, 2005).

Un ceppo batterico può così essere classificato come sensibile nei confronti di un antibiotico solo se la MIC determinata risulta uguale o inferiore al breakpoint più basso. Se il ceppo batterico in esame risulta inibito solo dal breakpoint più alto o da concentrazioni superiori viene definito resistente mentre se è inibito da concentrazioni comprese tra i due breakpoint viene definito intermedio (NCCLS, 2004). Per mezzo di curve di regressione è possibile mettere in relazione i valori dei breakpoint ottenuti attraverso il metodo delle diluizioni con i diametri degli aloni ottenuti, per gli stessi ceppi, con il metodo della diffusione. Consultando gli schemi interpretativi disponibili è quindi possibile risalire all'eventuale sensibilità o resistenza del germe isolato verso un antibiotico sulla base dell'ampiezza del diametro rilevato con la tecnica della diffusione.

Dal momento che il numero di agenti antimicrobici è in continua crescita, è necessario che gli antibiotici da saggiare nella routine vengano selezionati in base alle varie situazioni operative. È opportuno, infatti, disporre di antibiotici che risultino potenzialmente attivi nei confronti di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, di patogeni d'isolamento urinario e dei batteri appartenenti del genere *Pseudomonas*. Inoltre, poiché gli

antibiotici che vengono eliminati ancora attivi per via renale raggiungono a livello urinario concentrazioni superiori a quelle ematiche, è consigliabile impiegare dischetti a concentrazione antibiotica più elevata per i batteri uropatogeni (Lilenbaum *et al.*, 1998). In mancanza di dischi ad alta concentrazione è opportuno modificare i criteri di lettura dei dischetti a concentrazione normale, la cui standardizzazione viene fatta in rapporto alle concentrazioni ematiche raggiunte dal farmaco (Devriese *et al.*, 1997; Rosato *et al.*, 2003).

Sistemi automatizzati

Negli ultimi anni c'è stata una sempre maggior diffusione di sistemi automatizzati o semi-automatizzati per l'esecuzione dell'antibiogramma. A causa della variabilità dei risultati ottenuti con i metodi manuali tradizionali, soprattutto con il metodo della diffusione, a partire dagli anni sessanta è diventata sempre più evidente l'esigenza di operare in condizioni standardizzate e di definire meglio i limiti di prestazione dei terreni di crescita e delle condizioni di incubazione, delle concentrazioni degli inoculi batterici e di quelle degli antibiotici presenti nei dischetti usati per i test di diffusione, delle concentrazioni di breakpoint e dei parametri per i controlli di qualità (Felmingham e Brown, 2001). Con gli anni c'è stato, quindi, un crescente interesse per l'uso di strumentazioni

in grado di leggere automaticamente i risultati degli antibiogrammi, sia per le prove di diffusione su piastra sia per la determinazione delle MIC nelle prove di diluizione. Ciò ha portato allo sviluppo di tecnologie sempre più sofisticate in grado di automatizzare i singoli passaggi, dalla preparazione degli inoculi batterici all'allestimento dei pannelli fino alla lettura e all'interpretazione dei risultati. Tra i sistemi automatizzati attualmente più impiegati vi sono il *MicroScan WalkAway System* (Dade MicroScan®), il *Vitek* (bioMerieux®) e il *miniAPI* (bioMerieux®). Tali sistemi offrono una maggior riproducibilità rispetto alle tecniche manuali tradizionali e presentano vantaggi soprattutto in termini di praticità di esecuzione, quindi di risparmio di tempo all'interno della routine di laboratorio. Alcuni, inoltre, possono essere interfacciati con i sistemi LIMS (Laboratory Information Management System) ed hanno la possibilità di fornire risultati nella stessa giornata in cui le analisi vengono effettuate. I pannelli di antibiotici utilizzati dai sistemi automatizzati includono un numero elevato di molecole e tendono generalmente a coprire le esigenze della maggior parte dei laboratori; ciò nonostante, la flessibilità di tali pannelli è abbastanza limitata e spesso non consente di aggiungere antibiotici diversi da quelli già presenti (Felmingham e Brown, 2001).

LA PIODERMITE CANINA

Col termine piodermite si indica una patologia cutanea a carattere infiammatorio molto diffusa nel cane, caratterizzata da un'espressione clinica variabile a seconda che siano interessati l'epidermide, il derma o l'ipoderma. Tale patologia è spesso limitata agli strati cutanei superficiali ed è caratterizzata dalla formazione di papule e pustole con arrossamento e presenza di essudato infiammatorio. In alcuni casi, spesso in presenza di immunodepressione, l'infezione può estendersi al derma e all'ipoderma e dare origine ad ascessi, fistole e ulcerazioni sanguinolente.

Eziologia

Nonostante le piodermiti siano infezioni comuni nel cane, i fattori che ne determinano l'insorgenza sono a tutt'oggi molto dibattuti e in parte oscuri. Si pensa che a favorire la proliferazione e la penetrazione dei batteri sia il pH cutaneo elevato (7,5) e l'assenza di un'adeguata funzione barriera, data dalla presenza di uno strato corneo sottile e dalla mancata occlusione degli osti follicolari da parte del film idrolipidico. Inoltre la presenza di malattie infiammatorie sottostanti, specie quelle allergiche, predispongono all'infezione. Le piodermiti avvengono

quando si hanno alterazioni dell'ecosistema di superficie, perdita dell'integrità cutanea (es. a causa di ferite penetranti o di malattie pruriginose) oppure più raramente *deficit* immunitari dell'ospite (Fabbrini, 2005).

L'ecosistema cutaneo è rappresentato da un micro-ambiente superficiale caratterizzato da diversi componenti fisici, chimici e biologici in stretta relazione ed equilibrio fra di loro. In condizioni di normalità, l'interazione fra l'ospite e la microflora di superficie, costituita da batteri, lieviti e acari (es. *Demodex*), è stabile, e serve a prevenire la colonizzazione della cute da parte di altri microrganismi patogeni.

I microrganismi che vengono isolati dalla cute del cane sono comunemente suddivisi in tre categorie:

1. batteri residenti; ripetutamente isolati da cute e mantello, di solito vivono in simbiosi con l'ospite senza causare una malattia clinica. Comprendono stafilococchi coagulasi-negativi (*S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri* etc.) e coagulasi-positivi (*S. intermedius*), *Micrococcus* spp., streptococchi α -emolitici e *Acinetobacter* spp (Frank *et al.*, 2003);
2. batteri transitori; solitamente non colonizzano la cute e il mantello del cane anche se, occasionalmente, possono diventare patogeni per invasione secondaria. Comprendono *Escherichia coli*, *Proteus*

mirabilis, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* Spp. (Frank *et al.*, 2003);

3. batteri patogeni; sono microrganismi in grado di invadere i tessuti e dare origine ad una patologia e comprendono stafilococchi coagulasi-positivi come *S. intermedius*, *S. aureus* e *S. schleiferi*) (Frank *et al.*, 2003).

Nel cane le piodermiti sono generalmente sostenute da stafilococchi, in particolare da *Staphylococcus intermedius*, mentre più raramente, in corso di piodermiti profonde, si possono isolare anche bastoncini gram negativi d'origine fecale come *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp. ed *E. coli*. Recentemente, inoltre, sono state descritte infezioni, a carico soprattutto dell'orecchio esterno, sostenute da *Staphylococcus schleiferi*, specie che condivide con *S. intermedius* molte caratteristiche biochimiche, tra cui la produzione di coagulasi (Zdovc *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005).

Caratteristiche generali degli stafilococchi

Il genere *Staphylococcus* appartiene alla famiglia delle *Staphylococcaceae* e comprende circa 40 specie batteriche, molte delle quali commensali della cute e delle superfici mucose dell'uomo ed altri mammiferi (Nagase *et al.*, 2002; Euzeby, 2004) . Gli stafilococchi sono batteri Gram-positivi, anaerobi facoltativi, immobili, asporigeni, catalasi positivi, di forma coccacea del diametro di 0,5-1,5 micron le cui cellule si possono ritrovare aggregate in ammassi “a grappolo” (figura 8).

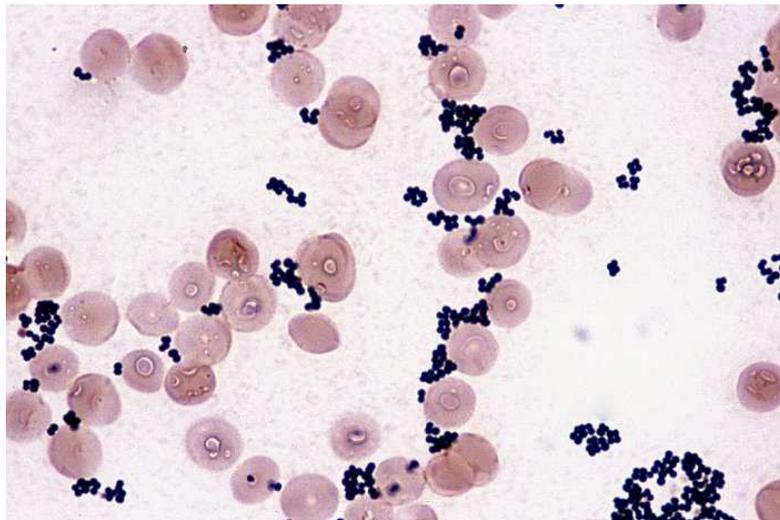


Figura 8. Stafilococchi osservati in un campione ematico (colorazione di Gram).

Crescono facilmente sui comuni terreni di coltura a base di peptoni ed estratto di carne, più velocemente in aerobiosi che in atmosfera contenente il 10% di CO₂, ad una temperatura compresa tra 18 e 40°C

con un optimum di 37°C. Inoltre, la maggior parte degli stafilococchi può crescere a valori di pH compresi tra 4,5 e 9,3, con un optimum tra 7,0 e 7,5 (Laurenti, 2003). Molti ceppi si sviluppano in terreni contenenti un'elevata concentrazione di NaCl (10-15%), caratteristica utilizzata nei terreni selettivi per l'isolamento degli stafilococchi in quanto tale concentrazione inibisce lo sviluppo della maggior parte delle altre specie batteriche.

Su terreni solidi quali l'Agar Sangue, dopo 24 ore di incubazione a 37°C, si osservano colonie rotonde, convesse, lisce, cremose, con margine interno e diametro di 1-3 mm che può arrivare fino a 7 mm dopo 48-72 ore (figure 9 e 10). Fanno eccezione alcuni ceppi di *Staphylococcus epidermidis* e le cosiddette 'colonie nane' di *S. aureus* che formano colonie piccole, a punta di spillo, molto simili a quelle degli streptococchi (Cirillo *et al.*, 2003). Gli stafilococchi sono microrganismi molto resistenti, nei materiali purulenti rimangono vitali per due o tre mesi mentre nelle colture in provette chiuse con paraffina possono sopravvivere anche per alcuni mesi (Simou *et al.*, 2005).



Figura 9. Colonie di *S. intermedius* su piastra di Agar Sanguie.



Figura 10. Colonie di *S. aureus* su piastra di Agar Sanguie.

Per quanto riguarda la resistenza al calore, la maggior parte dei ceppi è termostabile e i più resistenti vengono inattivati a 70°C in 15 minuti. Tutti sono sensibili ai comuni disinfettanti (composti fenolici, iodofori, cloro e derivati dell'ipoclorito di sodio, ammonio quaternario), tranne nei casi in cui sono protetti da sostanze organiche come pus, muco, siero e latte (Van Leeuwen *et al.*, 2005). Gli stafilococchi, inoltre, sono resistenti al lisozima e sensibili alla lisostafina; meno suscettibili all'azione di quest'ultima sono i ceppi che presentano, a livello della parete batterica, una maggior quantità di L-serina o L-alanina al posto della glicina (Boag *et al.*, 2004).

Gli stafilococchi sono microrganismi molto diffusi in natura: si trovano nel suolo, nell'acqua, nell'aria, nei reflui di origine umana ed animale e su una grande varietà di oggetti inanimati. Essi, inoltre, fanno parte della flora commensale dell'uomo e di molti altri mammiferi, localizzandosi sulla cute, sulle mucose delle prime vie respiratorie, nel tratto intestinale e nel tratto urogenitale inferiore. Alcuni stafilococchi, in particolare le specie che producono la coagulasi come *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius*, risultano molto spesso patogeni per l'uomo e altri animali. Nella pratica veterinaria, gli stafilococchi vengono frequentemente isolati dagli animali domestici, soprattutto cani e gatti, nei quali possono causare un'ampia varietà di infezioni e malattie. Nel cane, *S. intermedius*

rappresenta una delle principali specie coagulasi-positivo ed è normalmente presente come commensale, oltre che su cute e pelo, su quasi tutte le superfici mucose (nasale, buccale, anale, genitale) (Jones *et al.*, 2000). Soprattutto in presenza di fattori predisponenti quali scarsa igiene, processi allergici cutanei, patologie endocrine e disordini immunitari, *S. intermedius* è responsabile di processi infettivi purulenti a carico di congiuntiva, orecchio esterno, apparato urogenitale, ossa e articolazioni ed è la causa più comune di piodermite.

Uno studio effettuato in Inghilterra sulla diversità e stabilità della popolazione di *S.intermedius* su 3 cagne e loro cuccioli ha dimostrato che la flora di *S.intermedius* su ogni cagna era costituita principalmente da uno o due cloni dominanti e persistenti che venivano trasferiti dalla madre ai cuccioli subito dopo il parto. Un altro studio effettuato nello stesso ambito ha dimostrato la colonizzazione delle mucose (soprattutto nasale e buccale) e della cute di cuccioli neonati già 8 ore dopo la nascita (Saijonmaa-Koulumies *et al.*, 2002).

Classificazione delle piodermiti

Le piodermiti possono essere classificate, sulla base della profondità e della struttura cutanea coinvolta, in tre categorie: piodermiti di

superficie, piodermiti superficiali e piodermiti profonde. Questo sistema di classificazione è utile dal punto di vista clinico perché più il livello di infezione è profondo più è probabile che siano presenti cause sottostanti, e più aggressivo deve essere il clinico, sia dal punto di vista clinico che terapeutico (Lloyd *et al.*, 2000).

Piodermiti di superficie – L'infezione resta confinata allo strato corneo.

Si tratta di forme in cui il mutamento delle condizioni a livello della superficie cutanea determina un degrado della funzione di barriera superficiale e promuove la proliferazione batterica. Esistono diversi tipi di piodermiti di superficie:

1. Dermatite piotraumatica (dermatite umida acuta): è causata da un danno autoinflitto (es. morsicatura) ed è caratterizzata dalla comparsa di ampie aree eritematose, essudatizie, glabre dai bordi ben definiti in prossimità della sede del prurito o del dolore (Scott *et al.*, 2001).
2. Intertrigine (piodermite delle pieghe cutanee): causata dal continuo sfregamento nelle zone del corpo con superfici cutanee strettamente vicine. Gli stafilococchi patogeni tendono a

predominare, ma possono essere coinvolti anche batteri Gram-negativi e, comunemente, *Malassezia pachydermatis* (Scott *et al.*, 2001).

3. Piodermite mucocutanea: si osserva principalmente a livello delle labbra e della cute periorale. L'iniziale eritema labiale è seguito dalla formazione di croste che possono dar luogo a fessurazioni ed erosioni. Lesioni simili si possono ritrovare a livello di palpebre, narici, vulva, prepuzio e ano (Lloyd, 2000).

Piodermiti superficiali – L'infezione resta confinata all'epidermide o al lume dei follicoli piliferi e non si ha distruzione della membrana basale.

Si distinguono:

1. Impetigine: si tratta di una forma non contagiosa, spesso asintomatica, transitoria e auto risolutiva anche se può comunque richiedere una terapia minima con soluzioni antisettiche. L'impetigine è caratterizzata dalla presenza di piccole pustole non follicolari, primariamente in aree glabre ventrali quali addome e inguine (Lloyd, 2000).

2. Follicolite batterica superficiale: rappresenta la forma di piodermite più riscontrata a qualsiasi età ed è, di solito, secondaria ad altre dermatosi concomitanti. La follicolite compare quando la proliferazione batterica nei follicoli piliferi porta alla formazione di pustole all'interno dei follicoli stessi e dell'epidermide follicolare (Scott *et al.*, 2001).

3. Pioderma superficiale diffondente (*superficial spreading pyoderma*): di comune riscontro nel cane, è caratterizzata da macule eritematose multiple che si allargano in maniera centrifuga e creano delle espansioni anulari con bordi desquamati e ben delimitati (Harvey *et al.*, 2000).

Piodermite profonde – Le forme profonde di piodermite sono infezioni piuttosto gravi che interessano tessuti più profondi del follicolo pilifero. I microrganismi infettanti sono in grado non solo di invadere l'epidermide ma anche il derma e, in alcuni casi, il tessuto sottocutaneo. In genere, queste malattie sono una conseguenza dell'estensione della piodermite superficiale ma possono anche essere associate ad altre affezioni che causano un danno cutaneo o deprimono l'immunità. Possono causare segni sistemici di malattia e spesso guariscono con cicatrizzazione (Scott

et al., 2001). L'infezione che consegue a ferite penetranti, depressione del sistema immunitario, traumi o grave danno follicolare, si diffonde al derma (follicolite profonda e foruncolosi) e all'ipoderma (cellulite) propagandosi dalla membrana basale epidermica o dal follicolo distrutto. Nella maggior parte dei casi sono coinvolti frammenti di peli o cheratina follicolare che agiscono da corpi estranei promuovendo l'infezione ed inibendo l'attività antimicrobica da parte delle cellule ospiti. Anche altri agenti possono determinare questo effetto. La conseguenza è la formazione di un granuloma (Lloyd, 2000). Si distinguono:

1. Follicolite/foruncolosi del dorso del naso: la causa non è conosciuta e l'esordio è rapido con formazione di papule/pustole sul dorso del naso che, a seguito dell'autotraumatismo, si espandono diventando papulo-ulcerative-crostose o nodulari a interessare anche le aree limitrofe (Scott *et al.*, 2001).
2. Follicolite/foruncolosi del mento (acne canina): si tratta di un disordine infiammatorio cronico di mento e labbra caratterizzato da follicolite profonda e foruncolosi. Il coinvolgimento batterico è secondario, anche se la causa non è chiara, probabilmente un

trauma locale e una possibile predisposizione genetica (Scott *et al.*, 2001).

3. Follicolite/foruncolosi podale (piodermite interdigitale): colpisce le dita e gli spazi interdigitali di uno o più piedi. La causa è spesso sconosciuta e la patologia è complessa e caratterizzata da vari fattori predisponenti. L'infezione batterica è sempre secondaria ed i microrganismi chiamati in causa, oltre agli stafilococchi e ad alcuni Gram-negativi fecali, comprendono batteri presenti nel terreno quali micobatteri, *Actynomices* spp., *Nocardia* spp. ecc. (Scott *et al.*, 2001).
4. Pioderma dei calli e dei punti di pressione: questa patologia si sviluppa a livello delle callosità delle prominenze ossee o di altri punti di pressione come sequela di ripetuti traumi (Harvey *et al.*, 2000).
5. Follicolite e foruncolosi batterica profonda: è un'infezione follicolare che porta alla rottura del follicolo pilifero e quindi foruncolosi e cellulite. I batteri presenti, oltre a *S.intermedius*, possono comprendere *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., e *E. coli* (Scott *et al.*, 2001).

6. Piodermite profonda del Pastore Tedesco (follicolite/foruncolosi e cellulite): i soggetti colpiti presentano infezioni cutanee profonde che si risolvono lentamente e ricorrono frequentemente. Spesso non c'è una causa ben definita anche se è stata dimostrata una predisposizione genetica familiare, probabilmente di carattere autosomico recessivo. Lavori recenti hanno dimostrato la presenza di immunodeficienza in tutti i cani studiati, con aumento dei linfociti CD8+ e diminuzione di CD4+ e CD21+ (Scott *et al.*, 2001).

Trattamento delle piodermiti

La piodermite del cane non è una malattia primaria, quindi è sempre importante identificare i fattori sottostanti. Spesso si tratta di allergie, ma possono anche intervenire endocrinopatie, immunodeficienze, infestazioni ectoparassitarie, displasia follicolare e predisposizione di razza. La stragrande maggioranza delle piodermiti batteriche che si verificano per la prima volta sono causate da *Staphylococcus intermedius*, nonostante in alcuni casi sia stato dimostrato il ruolo eziologico di *S. schleiferi*, e spesso richiedono terapie antibiotiche prolungate o ripetute nel tempo (Frank *et al.*, 2003; Guardabassi *et al.*,

2004; May *et al.*, 2005). A causa dell'esteso e prolungato impiego di antibiotici nella terapia della piodermite, negli ultimi anni è stato riscontrato un progressivo aumento di fenomeni di farmacoresistenza in *S. intermedius*.

Farmaci che in passato sono stati abbondantemente impiegati, come le penicilline, i macrolidi e i lincosamidi, mostrano attualmente un'efficacia notevolmente ridotta per la presenza di ceppi resistenti. La resistenza ai β -lattamici, in particolare alle penicilline, è molto frequente negli stafilococchi (più del 50% degli isolati) ed è dovuta, nella maggior parte dei casi, alla produzione di β -lattamasi. In questi casi, l'impiego di β -lattamici quali l'amoxicillina associati ad inibitori delle β -lattamasi come l'acido clavulanico o il sulbactam assicura una maggiore attività nei confronti di ceppi altamente resistenti.

Macrolidi e lincosamidi mostrano generalmente una buona distribuzione tissutale e raggiungono elevate concentrazioni intracellulari per cui risultano efficaci nei confronti di *S. intermedius*. Attualmente l'impiego di tali farmaci è però consigliato limitatamente alle infezioni primarie per la frequente e rapida insorgenza di fenomeni di resistenza (Ganière *et al.*, 2005). Gli aminoglicosidi sono ampiamente utilizzati in medicina veterinaria e mostrano una buona attività nei confronti di *S. intermedius*, ma l'impiego di tali farmaci è spesso limitato dalla somministrazione

parenterale e dalla nefrotossicità (Boerlin *et al.*, 2001; Albarellos *et al.*, 2004). La rifampicina ha il vantaggio di una buona distribuzione tissutale e la capacità di concentrarsi in ambito intracellulare (Frank, 1990). Tali proprietà, unite ad una buona attività nei confronti degli stafilococchi anche a basse concentrazioni, fanno di questa molecola una possibile alternativa nel trattamento delle infezioni da *S. intermedius*. Ciò nonostante sono stati registrati numerosi casi di conseguenze quali nefriti e epatiti (Frank, 1990).

Tra i farmaci che mostrano una particolare efficacia nei confronti di *S. intermedius* e che attualmente vengono maggiormente utilizzati in terapia vi sono cefalosporine come la cefalexina, fluorochinoloni, alcune penicilline, in particolare l'oxacillina e l'associazione amoxicillina/acido clavulanico, e l'acido fusidico (Futagawa-Saito *et al.*, 2006). Data la bassa prevalenza di resistenza verso quest'ultimo, l'impiego dell'acido fusidico sembra appropriato per trattamenti topici della piodermite canina. Sebbene vi siano poche informazioni disponibili nella letteratura veterinaria riguardo l'efficacia comparata tra terapia topica e sistemica per le piodermiti superficiali, entrambi i regimi potrebbero rappresentare opzioni efficaci per la terapia (Pellerin *et al.*, 1998; Cobb *et al.*, 2005). La terapia topica potrebbe aiutare a ridurre o eliminare la popolazione batterica nella zona d'infezione e a rimuovere i detriti tessutali. Farmaci

come gli agenti antiseborroici, (benzoilperossido, clorexidina, etil-lattato) possono essere d'aiuto alla terapia antibiotica (De Jaham, 2003; Mulvey *et al.*, 2005). La rimozione dei detriti permette un diretto contatto del principio attivo con la cute e promuove il drenaggio.

Le tre componenti essenziali nel trattamento delle piodermiti comprendono la corretta selezione dell'antibiotico, l'appropriata dose e durata della terapia antibiotica ed il controllo delle dermatosi sottostanti (allergie, endocrinopatie, malattie autoimmuni, difetti della cheratinizzazione).

L'antibiotico selezionato viene di solito somministrato per almeno 21 giorni per eliminare l'infezione e permettere alla normale funzione antibatterica della cute di ristabilirsi. L'uso inappropriato di basse dosi di antibiotico o la breve durata della terapia, può alterare la popolazione di stafilococchi permettendo la selezione di ceppi antibiotico resistenti portando così a infezioni croniche/ricorrenti (Ungemach, 2000).

Ogni qual volta una terapia antibiotica, appropriatamente prescritta ed eseguita, non porta un miglioramento clinico si deve sospettare un'infezione mista e/o da stafilococchi resistenti. In questo caso si rende necessario un esame colturale ed un profilo di sensibilità antimicrobica per aiutare nella scelta dell'antibiotico. È estremamente importante in

questi pazienti usare la massima dose possibile dell'antibiotico con una durata di somministrazione che vada 2–3 settimane oltre la completa risoluzione.

Resistenza degli stafilococchi agli antibiotici

Fin dall'introduzione dell'uso degli antibiotici nella medicina umana, gli stafilococchi hanno mostrato un'elevata capacità di sviluppare rapidamente resistenza a questi agenti, particolarmente nell'ambito delle infezioni nosocomiali. Sebbene i dati presenti in letteratura differiscano per il numero di isolamenti delle differenti specie di stafilococchi, così come per la specie animale d'isolamento, lo stato clinico dell'animale e le informazioni disponibili su eventuali trattamenti antibiotici precedenti, in questi ultimi anni è stato osservato un notevole aumento della resistenza degli stafilococchi a numerosi antibiotici soprattutto penicilline e cefalosporine, tetracicline, eritromicina, lincomicina e kanamicina (Normand *et al.*, 2000). La sensibilità nei confronti della gentamicina è variabile ma anche per questo antibiotico la resistenza è in aumento, così come per le polimixine e i fluorochinoloni. Per contro, gli stafilococchi mostrano in genere una elevata sensibilità a vancomicina, teicoplanina e netilmicina (Normand *et al.*, 2000).

Nelle infezioni stafilococciche del cane e del gatto è comune l'isolamento di ceppi caratterizzati da un'elevata resistenza a molti agenti antibiotici. Questo è stato osservato in particolare per *Staphylococcus intermedius* (tabella 6).

Tabella 6. Antibiotico-resistenza di isolati canini di *S. intermedius* rilevata tra il 1986 ed il 1995*.

Antibiotici	Numero di ceppi resistenti (%)			
	USA 1986 (n=197)	UK 1992 (n=96)	USA/Germania 1992 (n=116)	Danimarca 1995 (n=50)
tetraciclina	104 (52,8)	50 (52,1)	35 (30,0)	10 (20,0)
penicillina	163 (82,7)	77 (80,2)	n.d	30 (60,0)
eritromicina	52 (26,4)	9 (9,4)	15 (12,5)	n.d.
lincomicina	49 (24,9)	n.d.	15 (12,5)	n.d.
streptomicina	n.d.	6 (6,3)	27 (23,3)	n.d.
gentamicina	0	n.d.	1 (0,9)	n.d.
cotrimoxazolo	17 (8,6)	n.d.	n.d.	0
enrofloxacina	n.d.	n.d.	n.d.	0
cloramfenicolo	21 (10,7)	n.d.	7 (6,0)	8 (16,0)

*Noble e Kent, 2000

n.d.=non determinato

In uno studio condotto negli Stati Uniti è stato valutato il tasso di farmacoresistenza in ceppi di *S. aureus* e *S. intermedius* isolati nel cane tra il 1977 ed il 1983 (Georgpapadakou *et al.*, 2002); il 60-70% dei ceppi isolati sono risultati sensibili alla streptomicina, alla tetraciclina e alla

polimixina B, mentre la resistenza nei confronti di penicillina, ampicillina e tetracicline è stata riscontrata nel 20% circa degli isolati.

Studi successivi hanno condotto a risultati simili, sebbene il tasso di resistenza alla penicillina raggiungesse anche valori superiori all'80%.

La resistenza nei confronti di cloramfenicolo, macrolidi e lincosamidi sembrava aumentare a seguito del loro impiego (Phillips e Williams, 1998). A causa dei frequenti fenomeni di resistenza, le tetracicline e le penicilline sono considerate inefficaci mentre l'associazione amoxicillina/acido clavulanico, le cefalosporine, l'eritromicina ed i fluorochinoloni sono di solito efficaci.

È stato osservato che l'impiego di un antibiotico a fini terapeutici può determinare la riduzione della suscettibilità da parte dei batteri, con l'insorgenza di una resistenza di tipo plasmidico; tale fenomeno, tuttavia, raramente è stato osservato in *S. intermedius* (Noble e Kent, 2000). Uno studio condotto da Greene e Schwarz negli Stati Uniti e in Germania ha confermato l'incremento della resistenza in *S. intermedius*, da ricondurre all'acquisizione di plasmidi di resistenza, con picchi del 70-90% per la tetraciclina, ma di livello inferiore per gli altri antibiotici. La resistenza alla penicillina e alla tetraciclina è frequente nei ceppi di *S. intermedius* isolati da cani di differenti origini geografiche; al contrario la resistenza alla maggior parte di antibiotici più recenti quali i fluorochinoloni è, ad

oggi, relativamente bassa (Lloyd *et al.*, 1999). Le infezioni croniche da *S. intermedius* sono generalmente da associare a trattamenti farmacologici ripetuti e/o inadeguati ed è frequente l'isolamento di ceppi multiresistenti aggiuntivi, come *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA). È stato osservato, infatti, il trasferimento di ceppi MRSA, di frequente isolamento umano, a cani con cui i soggetti vengono in contatto (Lilenbaum *et al.*, 1999).

Negli ultimi anni sono state messe a punto varie metodiche in grado di distinguere stafilococchi della stessa specie e sottospecie e di individuare ceppi farmacoresistenti. Tali metodiche includono saggi biochimici come l'elettroforesi enzimatica multilocus e tecniche molecolari come, ad esempio, analisi di macrorestrizione, ribotyping, e la RAPD-PCR (Witte, 2000). Tra queste metodiche, l'analisi di macrorestrizione utilizza gli enzimi di restrizione *SmaI* ed è considerata quella con il più alto potere di discriminazione. Alcuni tipi di PCR prendono in considerazione geni presenti esclusivamente in alcune specie stafilococciche, come *S. aureus*, e permettono di identificare il polimorfismo dei geni che codificano per la coagulasi o per la proteina A. Il cosiddetto “*profiling plasmidico*” è un metodo semplice di tipizzazione che, tuttavia, spesso non fornisce risultati stabili per la mobilità dei plasmidi stessi. Dal momento che negli stafilococchi la

farmacoresistenza è spesso associata ai plasmidi, l'analisi dei plasmidi può essere utile nello studio della sua trasferibilità, anche se non è una metodica ottimale per la differenziazione delle resistenze nei ceppi isolati (Witte, 2000).

Contrariamente alla medicina umana, dove la tipizzazione molecolare è ampiamente impiegata per seguire la diffusione dei cloni MRSA e di altri stafilococchi coinvolti nelle infezioni nosocomiali, in ambito veterinario questi metodi sono usati per casi particolari, ad esempio per differenziare ceppi di *S. aureus* isolati nelle mastiti bovine. Tuttavia, la differenziazione molecolare dei ceppi batterici isolati è fondamentale per gli studi di epidemiologia e per la valutazione del tasso di resistenza (John, *et al* 1996; Lange e Schwarz, 2000)

Aspetti molecolari della farmaco-resistenza negli stafilococchi

Le conoscenze molecolari della resistenza antimicrobica negli stafilococchi è notevolmente aumentata negli ultimi anni, sebbene la biologia molecolare della farmaco-resistenza dei ceppi d'isolamento veterinario sia ancora poco conosciuta rispetto agli isolati umani. I geni e le mutazioni coinvolte nella resistenza negli stafilococchi di origine animale sono stati identificati utilizzando sistemi molecolari quali la

PCR e il Southern blot. In alcuni casi, i geni di resistenza e le loro regioni di regolazione sono stati clonati e sequenziati (John *et al.*, 1996; Strommenger *et al.*, 2006).

I geni di resistenza riscontrati negli stafilococchi di origine veterinaria hanno spesso una localizzazione plasmidica. In molti casi, l'analisi strutturale dei plasmidi di resistenza ha permesso di approfondire le conoscenze sulla varietà strutturale degli elementi extracromosomiali associati alla resistenza antimicrobica (Greene e Schwarz, 1992; Strommenger *et al.*, 2006).

Resistenza alle tetracicline - Ad oggi, negli stafilococchi di origine animale sono stati identificati quattro differenti locus genici di resistenza alle tetracicline (geni *tet*), classificati come K, L, M e O. I geni *tet*(K), localizzati in piccoli plasmidi (da 4,3 a 4,7 kbp), sono strutturalmente simili fra loro; il prototipo di questi plasmidi, definito pT181, viene comunemente isolato in *S. aureus*. Plasmidi strettamente correlati al pT181 sono stati identificati in tutte le specie stafilococciche di origine animale (Schwarz *et al.*, 2000).

La presenza dei geni *tet*(L), originariamente identificati in *Bacillus*, sembra essere limitata a poche specie stafilococciche di origine animale, tra cui *S. hyicus*, *S. lentus*, e *S. xylosus*. Tali geni sono stati identificati

soprattutto in plasmidi di dimensioni variabili tra 4,3 kbp e 11,5 kbp, come conseguenza della formazione di co-integrati e della ricombinazione con altri plasmidi di resistenza, ma anche per l'integrazione di piccoli trasposoni. Alcuni di questi plasmidi, inoltre, contengono geni di resistenza nei confronti di kanamicina, neomicina, macrolidi, lincosamidi e streptomicina (Schwarz *et al.*, 2000).

I geni *tet(M)* sono localizzati su trasposoni di coniugazione di origine enterococcica, come ad esempio il Tn916 o Tn1545 (Roberts, 1996). Uno studio condotto su ceppi resistenti di stafilococchi isolati da varie specie animali ha identificato il traspostone 227Tc, contenente il gene *tet(M)*, come il secondo meccanismo responsabile di farmaco-resistenza negli stafilococchi di origine animale (Jensen, 1999). Ad oggi, i geni *tet(O)* sono stati identificati in *S. intermedius*; i prodotti genici di *tet(O)* rappresentano proteine di protezione ribosomiale che mediano la resistenza a tutte le tetracicline, minociclina compresa (Swenson e Tenover 2005).

Resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramine - La resistenza stafilococcica nei confronti di questi antibiotici è comunemente basata sulla modificazione del sito bersaglio, sull'efflusso attivo o sull'inattivazione enzimatica (Schwarz *et al.*, 1999). La modificazione

del sito di legame è il meccanismo di resistenza principale, e si verifica a seguito della demetilazione di un residuo adenilico a livello della porzione 23S dell'rRNA. Sono stati identificati fino ad oggi, negli stafilococchi di origine animale, quattro geni coinvolti in tale resistenza chiamati *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* ed *erm(F)*, (Chung *et al.*, 1999; Kwok *et al.*, 2000).

I geni *erm(A)* ed *erm(B)* sono comunemente riscontrati in piccoli trasposoni quali il Tn554 ed il Tn917/Tn551 (Werckenthin e Schwarz, 2001). I geni *erm(C)* sono localizzati in plasmidi presenti in molte *Staphylococcus* spp. (Eady *et al.*, 1993; Nawaz *et al.*, 1999). Studi sulla frequenza di distribuzione dei diversi geni *erm* negli stafilococchi isolati dagli animali mostrano una frequenza elevata di *erm(C)* in *S. hyicus* e in altri stafilococchi porcini ma anche in *Staphylococcus* spp. isolate da altre specie animali. Al contrario, i geni *erm(B)* sono quelli più diffusi negli isolati canini di *S. intermedius* (Jensen *et al.*, 1999).

Resistenza agli aminoglicosidi - La resistenza agli aminoglicosidi è dovuta principalmente a sequenze geniche, spesso associate a plasmidi e trasposoni, che inducono l'inattivazione dei farmaci da parte di acetil-, adenil- e fosfatidil-trasferasi (Alekhun e Levy, 2000). Negli stafilococchi animali sono stati identificati fino ad oggi quattro differenti

geni tra cui il gene *aadD*, che media la resistenza a kanamicina e neomicina, e il gene *aadA-aphD*, che media la resistenza a gentamicina, kanamicina e tobramicina (Giraud *et al.*, 2000).

Resistenza ai β -lattamici - La resistenza alla penicillina negli stafilococchi, umani ed animali, è documentata ormai da molti anni ed è ampiamente diffusa. La resistenza ai β -lattamici è generalmente dovuta alla produzione di β -lattamasi, enzimi che causano l'apertura dell'anello β -lattamico di tali molecole (Aleksun e Levy, 2000). Le β -lattamasi si differenziano, sulla base delle sequenze geniche, in quattro classi, dalla A alla D, definite *classi di Ambler*, mentre sulla base del fenotipo di resistenza sono state classificate in altri quattro gruppi, con ulteriori sottogruppi (schema di Bush). Un aspetto particolarmente importante della resistenza degli stafilococchi ai farmaci β -lattamici riguarda la sempre più diffusa refrattarietà alle metil-penicilline, in particolare alla meticillina. Le infezioni da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) rappresentano oggi una importante causa di infezioni in tutto il mondo (Duquette e Nuttall, 2004). Dal primo caso d'isolamento di MRSA, riportato in medicina umana in Inghilterra nel 1961, la meticillino-resistenza stafilococcica è diventata, soprattutto a partire dagli anni '80, un problema di sanità pubblica a livello mondiale sia nel

campo delle infezioni nosocomiali sia in quello delle infezioni acquisite in comunità (Zetola *et al.*, 2005). Si stima che l'incidenza di MRSA sia aumentata dall'1% degli anni '80 fino al 40% attuale, con una situazione variabile nei vari Paesi: la prevalenza varia da meno dell'1% nei paesi baltici fino al 40% di Grecia, Italia, e Inghilterra. I MRSA sono resistenti a tutti i β -lattamici e a numerosi antibiotici di altre classi quali aminoglicosidi, macrolidi, cloramfenicolo, tetraciline e fluorochinoloni, rendendo quindi le infezioni da essi sostenute molto difficili da trattare con conseguente aumento della morbilità, del costo dei trattamenti e della mortalità, comparato a quello delle infezioni sostenute da ceppi meticillino- sensibili. La resistenza alla meticillina negli stafilococchi è legata alla presenza del gene *MecA*, localizzato nella regione *mec* del cromosoma batterico, che codifica per una proteina definita PBP2a (Penicillin-Binding Protein 2a). Questa particolare forma della PBP2 mostra affinità ridotta per le penicilline e l'espressione del gene codificante *MecA* è controllata da due geni regolatori *mecI* e *mecR1*, anch'essi presenti nel *mec* DNA, che codificano rispettivamente per una proteina repressore ed una proteina di traduzione del segnale. Il gene *mecA* è presente su elementi genetici mobili denominati Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) di cui si conoscono almeno 5 tipi identificati con i numeri I-V. Le SCC di tipo I e IV contengono solo il

gene *mecA*, mentre le altre contengono geni determinanti la resistenza anche ad altre classi di antibiotici (Lyon e Skurray, 1987). La presenza del gene *MecA* è stata inoltre dimostrata in MRSA ed in stafilococchi coagulase-negativi (CNS) isolati da animali domestici (Yasuda *et al.*, 2002).

Resistenza ai fluorochinoloni - Il meccanismo d'azione dei fluorochinoloni nei batteri Gram positivi prevede l'interazione con enzimi batterici necessari per la replicazione del DNA: la DNA girasi, costituita dalle subunità *gyrA* e *gyrB*, e la DNA topoisomerasi IV, formata dalle subunità *parC* (definita *grlA* in *S.aureus*) e *parE* (Blondeau, 2004). La resistenza batterica ai fluorochinoloni si presenta di solito come conseguenza di mutazioni che comportano cambiamenti aminoacidici, specialmente nelle regioni delle subunità enzimatiche denominate Quinolone Resistance Determining Regions (QRDRs), che rendono gli enzimi meno sensibili ai fluorochinoloni (Heinen, 2005). Anche l'efflusso dei farmaci mediato da trasportatori può contribuire alla resistenza degli stafilococchi ai fluorochinoloni. Ad esempio, *NorA* è una pompa di efflusso appartenente alla classe delle *Major Facilitators* individuata in *S. aureus*. Questa pompa è codificata da un gene cromosomiale ed è responsabile di resistenza nei confronti di

fluorochinoloni idrofilici quali norfloxacin e ciprofloxacina (Lomovskaya e Watkins, 2001).

L'incremento dell'impiego dei fluorochinoloni registrato a partire dalla metà degli anni '90 ha condotto ad un aumento della resistenza in ceppi di *S. intermedius* di origine canina (Hooper, 2001). L'acquisizione della resistenza antimicrobica da parte di *S. intermedius* è spesso associata a trattamenti antibiotici ripetuti e può essere acquisita mediante trasferimento di plasmidi da altri stafilococchi presenti sulla cute del cane. Tuttavia, *S. intermedius* ha bassi livelli di trasporto plasmidico e la resistenza tende ad essere cromosomica; è possibile che questa caratteristica abbia prevenuto l'acquisizione di multiresistenze, come avvenuto invece per *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. schleiferi*.

2 - SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi, svolta presso la Sezione di Farmacologia e Tossicologia del Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa, è stato quello di determinare la suscettibilità agli antibiotici di ceppi di *S. intermedius* isolati da cani con o senza lesioni muco-cutanee.

3 - MATERIALI E METODI

Campionamento

Per questo studio sono stati sottoposti a campionamento 367 cani, con o senza lesioni muco-cutanee. Il campionamento è avvenuto tra Gennaio 2005 e Ottobre 2006. Per ciascun soggetto è stato eseguito un solo prelievo mediante tampone sterile. Ogni campione è stato inviato in laboratorio in apposito terreno di trasporto e quindi immediatamente analizzato.

Isolamento e identificazione dei ceppi batterici

Entro 24 ore dal momento del prelievo, ogni tampone è stato seminato su Agar Sale Mannite, terreno selettivo e differenziale indicato per l'isolamento degli stafilococchi e le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore. Terminata l'incubazione, le colonie di stafilococco sono state selezionate in base alle caratteristiche morfologiche macroscopiche (aspetto, dimensioni, forma, colore) e microscopiche (colorazione di Gram). Le singole colonie isolate sono state sottoposte a subcoltura su Trypticase Soy Agar addizionato con sangue di montone (5%) al fine di ottenere una coltura pura. Dopo una nuova incubazione di 24 ore a 37°C,

l'identificazione definitiva di *S. intermedius* è stata eseguita su base biochimica con il sistema semi-automatizzato miniAPI (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) mediante l'impiego della galleria ID 32 STAPH (figure 11, 12 e 13).

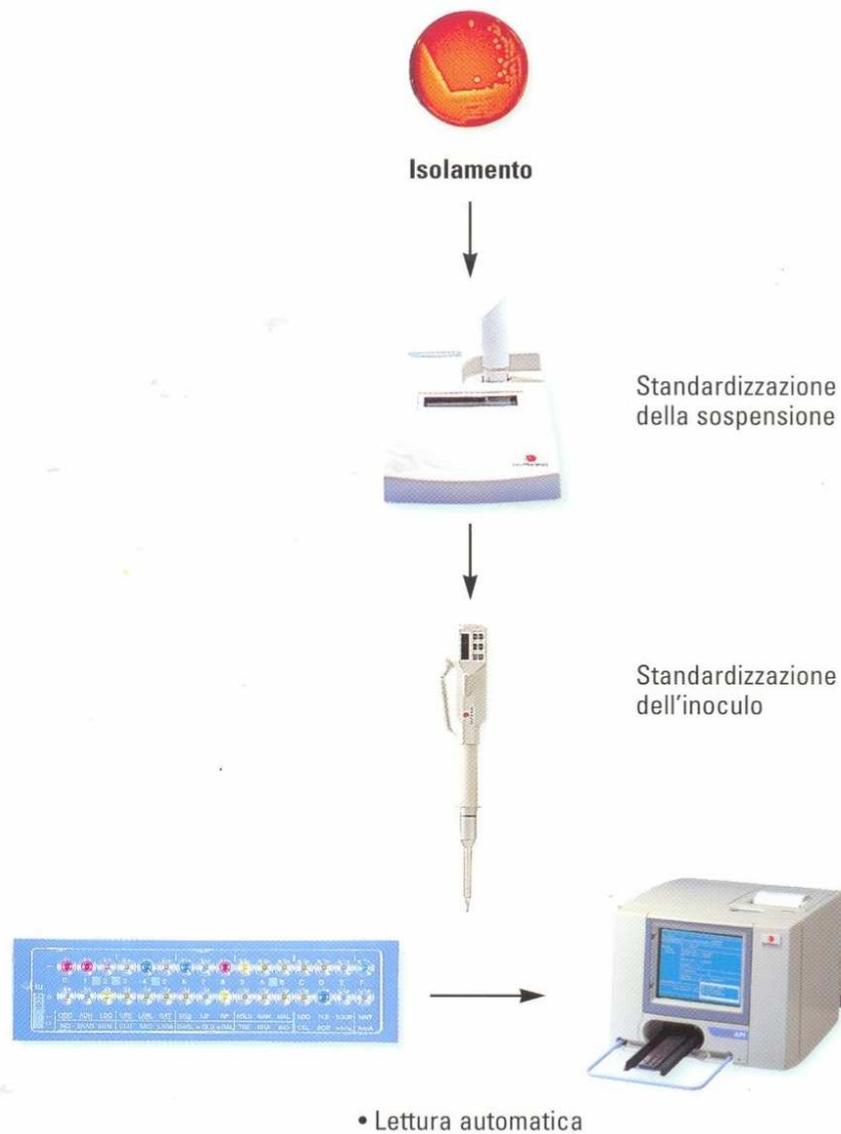


Figura 11. Procedura per l'identificazione automatica della galleria ID 32 STAPH.



Figura 12. Sistema semi-automatizzato “miniAPI”

```

Records: 27/07/05-1
      20-7 STAF
Sample origins: MIUR
Sample type T.cut
SPECIE: Cane

-----
Profile: 3 6 7 3 5 6 6 0 1
ID 32 STAPH      V2.0 : VERY GOOD IDENTIFICATION

Staph.intermedius      %id= 99.7 T= 0.99

NEXT CHOICE
Staph.chromogenes      %id= 0.2 T= 0.61
MAN 11/  BGAL 14/

Selected taxon: 1 Staph.intermedius 0
  
```

Figura 13. Risultato l'identificazione automatica della galleria ID 32 STAPH.



Figura 14. Galleria ID 32 STAPH.

Questa galleria è costituita da 32 pozzetti, di cui 26 contenenti un terreno di reazione disidratato, e rappresenta un sistema di identificazione di gran parte delle specie appartenenti al genere *Staphylococcus* mediante 26 test biochimici standardizzati e miniaturizzati ed un database specifico (figura 15). Dopo aver risospeso 3-5 colonie batteriche isolate in soluzione salina, la sospensione è stata standardizzata ad una torbidità equivalente a 0,5 McFarland (circa 10^8 batteri/ml) mediante un densitometro (Densimat, bioMerieux SA, Marcy l'Etoile, France) e distribuita nei pozzetti della galleria. Dopo aver incubato la galleria a 37°C per 24 ore, la lettura e l'interpretazione dei risultati sono stati effettuati in automatico dallo strumento, in grado di rilevare, all'interno di ogni pozzetto, le reazioni enzimatiche tradotte in viraggi cromatici spontanei o rivelati mediante l'aggiunta di reattivi (figura 16).

METHODOLOGIE / PROCEDURE / METHODIK / TECNICA / PROCEDIMENTO /
 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ / METOD / METODE/ METODYKA

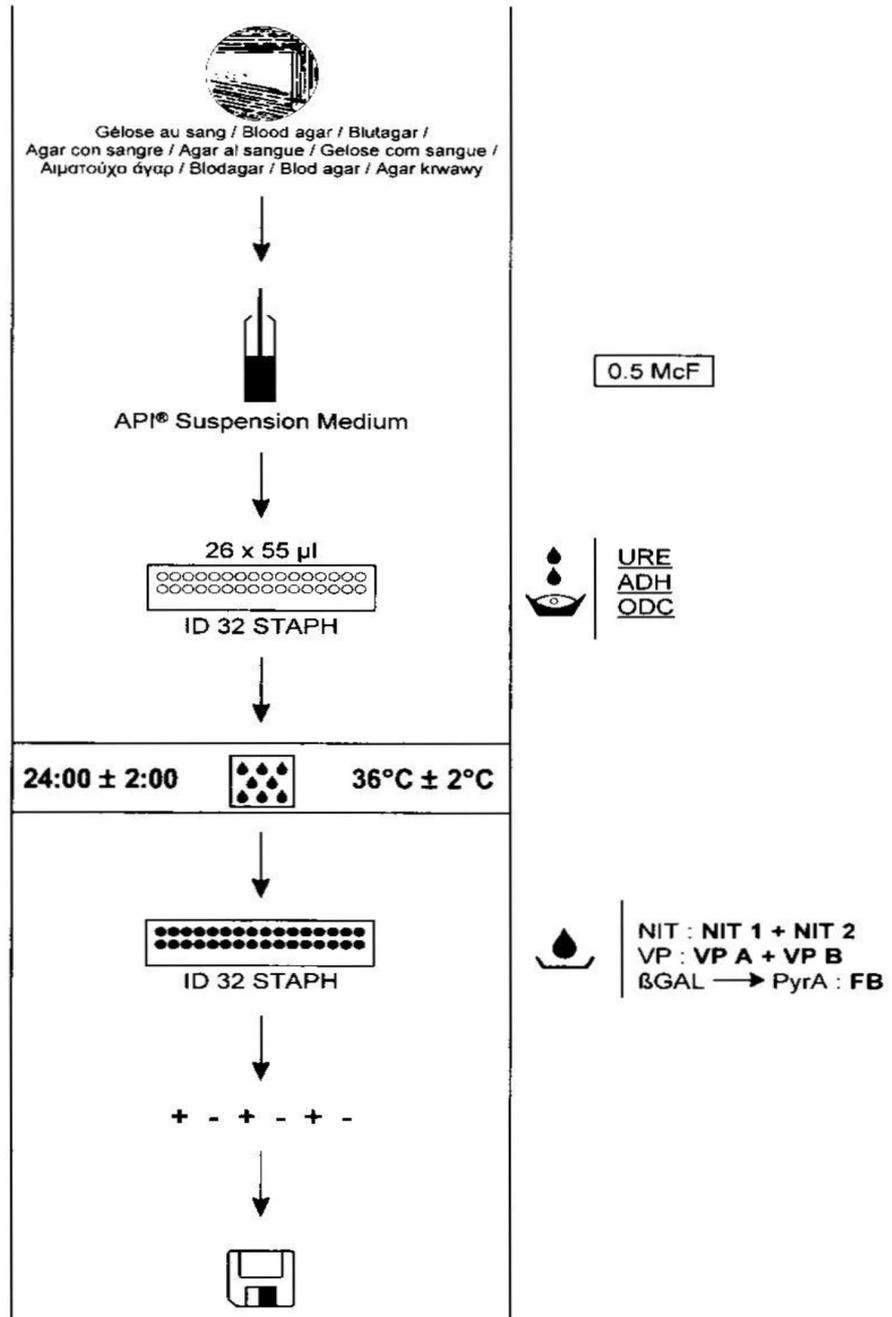


Figura 16. Procedura per l'allestimento della galleria ID 32 STAPH.

Con l'aiuto di un software specifico, l'identificazione a livello di specie dei ceppi batterici è fornita in base al calcolo di due parametri: la percentuale di identificazione (% ID), che valuta la vicinanza relativa del profilo osservato ai vari taxa presenti nel database, e l'indice T che esprime il carattere tipico del ceppo all'interno di un taxa (con valore che varia da 0 a 1). I taxa sono stati quindi classificati secondo i valori di questi parametri ed il risultato è stato fornito, a seconda dei casi, con vari gradi di attendibilità: eccellente ($\%ID \geq 99.9$, $T \geq 0.75$), ottima ($\%ID \geq 99.0$, $T \geq 0.5$), buona ($\%ID \geq 90.0$, $T \geq 0.25$) e accettabile ($\%ID \geq 80.0$, $T \geq 0$). I risultati al di sotto di questi livelli sono stati classificati come inaccettabili.

Dopo l'isolamento e l'identificazione, gli isolati di *Staphylococcus intermedius* sono stati conservati a -80°C fino al successivo utilizzo.

Valutazione della suscettibilità agli antibiotici

Per ogni isolato batterico è stata valutata la suscettibilità a 19 antibiotici selezionati tra quelli generalmente più efficaci nei confronti degli stafilococchi, in particolare di *S. intermedius* (tabella 7). I test di suscettibilità sono stati eseguiti con il metodo della diffusione su piastra

(tecnica di Kirby Bauer) secondo il protocollo del CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme, Société Française de Microbiologie)

Tabella 7. Antibiotici utilizzati nei test di suscettibilità

Antibiotico	Sigla	Concentrazione (µg)	Breakpoints (mm)		
			R	I	S
Acido Fusidico	FD	10	<15	15-21	≥22
Amikacina	AK	30	<15	15-16	≥17
Amoxicillina/Ac. Clavulanico	AMC	20/10	<14	14-20	≥21
Cefalessina	CL	30	<12	12-17	≥18
Cefoperazone	CPZ	30	<14	14-20	≥21
Cefoxitina	FOX	30	<25	25-26	≥27
Clindamicina	CM	2 IU	<15		≥15
Cloramfenicolo	C	30	<19	19-21	≥22
Cotrimoxazolo	TS	1,25/23,75	<10	10-15	≥16
Enrofloxacin	ENR	5	<17	17-21	≥22
Eritromicina	E	15 IU	<17	17-21	≥22
Fosfomicina	FOS	50	<14		≥14
Gentamicina	GM	15	<20		≥20
Latamoxef	MOX	30	<23	23	≥24
Lincomicina	L	15	<17	17-20	≥21
Marbofloxacin	MAR	5	<13	13-17	≥18
Oxacillina	OX	5	<20		≥20
Pristinamicina	PT	15	<19	19-21	≥22
Rifampicina	RP	30	<14	14-28	≥29

R=Resistente; I=Intermedio; S=Sensibile

Ogni ceppo di *S. intermedius* è stato scongelato e seminato su una piastra di Trypticase Soy Agar; dopo un'incubazione di 24 ore a 37°C, i batteri sono stati risospesi in soluzione salina. La densità della sospensione è stata standardizzata a 0.5 MacFarland e seminata in maniera uniforme sulla superficie di una piastra di Mueller Hinton Agar. Infine, sulla superficie della piastra sono stati posti, mediante pinze sterili, i dischi impregnati con una concentrazione standard dell'antibiotico (tabella 7). Le piastre sono state poste in incubazione a 37°C per 24 ore, terminate le quali per ciascun antibiotico è stato misurato il diametro dell'alone di inibizione, funzione della suscettibilità del microrganismo all'antibiotico in questione.

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti è stato fatto riferimento ai breakpoint indicati dalla Società Francese di Microbiologia (CA-SFM, 2006) che hanno permesso di classificare i ceppi batterici come sensibili, intermedi o resistenti agli antibiotico impiegati.

4 - RISULTATI

Nel corso dello studio sono stati isolati 136 ceppi di *S. intermedius* (tabella 8): 87 ceppi sono stati isolati dalla cute di soggetti apparentemente sani, (35 dall'orecchio esterno, 27 dal dorso, 13 dal piatto della coscia e 12 dallo spazio interdigitale); mentre 49 ceppi sono stati isolati da soggetti ammalati affetti da piodermite (39) o da otite esterna (10).

Tabella 8. Frequenza e distribuzione degli isolati di *S. intermedius*.

Sito anatomico	Cani ammalati		Cani sani		Totale	
	campioni isolati					
Cute del dorso	34	25	97	27	131	52
Orecchio esterno	15	10	93	35	108	45
Piatto della coscia	0	0	60	13	60	13
Area interdigitale	8	6	51	12	59	18
Addome	9	8	0	0	9	8
Totale	66	49	301	87	367	136

I risultati dei test di suscettibilità agli antibiotici eseguiti per i ceppi isolati sono riportati nella tabella 9. Tutti i ceppi sono risultati suscettibili ai seguenti antibiotici: acido fusidico, amikacina, amoxicillina-acido clavulanico, cefalexina, cefoperazone, pristinamicina e rifampicina. La grande maggioranza dei ceppi (90-99%) ha mostrato suscettibilità nei

confronti di cefoxitina, clindamicina, cotrimoxazolo, enrofloxacina, fosfomicina, gentamicina, latamoxef, marbofloxacina e oxacillina. Percentuali di sensibilità inferiori sono state registrate per cloramfenicolo (87%), lincomicina (87%) e eritromicina (82%). I profili di antibiotico-resistenza osservati sono riportati in tabella 10.

Tabella 9. Suscettibilità dei 136 isolati di *S.intermedius* agli antibiotici

Antibiotico	Ceppi sensibili (n)	Percentuale di suscettibilità (%)
Acido Fusidico	136	100
Amikacina	136	100
Amox/Ac. Clav.	136	100
Cefalessina	136	100
Cefoperazone	136	100
Pristinamicina	136	100
Rifampicina	136	100
Fosfomicina	135	99
Latamoxef	135	99
Gentamicina	134	98
Enrofloxacina	134	98
Cefoxitina	134	98
Marbofloxacina	134	98
Oxacillina	132	97
Cotrimoxazolo	131	96
Clindamicina	125	92
Lincomicina	118	87
Cloramfenicolo	119	87
Eritromicina	112	82

Tabella 10. Profili di antibiotico-resistenza rilevati nei 136 ceppi di *S. intermedius*.

Numero di antibiotici	Profili di resistenza	Numero di ceppi	%
0	<i>Nessuno (suscettibili a tutti gli antibiotici)</i>	105	77
1	<i>C</i>	1	0.7
1	<i>FOS</i>	1	0.7
1	<i>OX</i>	1	0.7
1	<i>TS</i>	2	1.5
2	<i>C, E</i>	8	6
2	<i>E, L</i>	4	3
3	<i>C, FOX, L</i>	1	0.7
3	<i>CM, E, L</i>	1	0.7
3	<i>E, L, TS</i>	1	0.7
4	<i>C, CM, E, L</i>	6	4.4
4	<i>CM, E, GM, L</i>	1	0.7
5	<i>C, FOX, L, MOX, OX</i>	1	0.7
5	<i>CM, E, GM, L, TS</i>	1	0.7
6	<i>CM, E, ENR, L, MAR, OX</i>	1	0.7
7	<i>CM, E, ENR, L, MAR, OX, TS</i>	1	0.7

La maggior parte dei ceppi saggiati (77%) si è rivelata suscettibile verso tutti gli antibiotici. Sono stati osservati quindici differenti profili di resistenza: 5 (3,7%), 12 (8,8%) e 3 (2,2%) ceppi sono risultati resistenti, rispettivamente, verso uno, due e tre antibiotici mentre 11 ceppi (8%) hanno mostrato resistenza nei confronti di un numero di antibiotici variabile da quattro a sette.

Per 13 ceppi (9.5%) è stata rilevata, inoltre, la presenza di multiresistenza, intesa come resistenza nei confronti di almeno tre diverse classi di antibiotici (tabella 11). In particolare, un isolato è risultato resistente a cinque classi di antibiotici (lincosamidi, sulfonamidi, macrolidi, β -lattamici e fluorochinoloni); 2 isolati sono

risultati resistenti a quattro classi di antibiotici, (lincosamidi, macrolidi, β -lattamici e fluorochinoloni; lincosamidi, macrolidi, sulfonamidi e aminoglicosidi). I restanti 10 ceppi hanno mostrato resistenze nei confronti di tre diverse classi di antibiotici ciascuno.

Tabella 11. Multiresistenze rilevate in 13 isolati di *S. intermedius*.

Classi di antibiotici	Numero di ceppi
- Lincosamidi, macrolidi, β -lattamici, sulfonamidi, fluorochinoloni	1
- Lincosamidi, macrolidi, β -lattamici, fluorochinoloni	1
- Lincosamidi, macrolidi, sulfonamidi, aminoglicosidi	1
-Lincosamidi, macrolidi, cloramfenicolo	6
- Lincosamidi, macrolidi, aminoglicosidi	1
- Lincosamidi, β -lattamici, cloramfenicolo	1
- Lincosamidi, macrolidi, sulfonamidi	1
- Lincosamidi, β -lattamici, cloramfenicolo	1

5 - CONCLUSIONI

In conclusione, i risultati ottenuti nella presente tesi indicano che:

- *Staphylococcus intermedius* rappresenta una specie batterica di frequente isolamento nel cane, sia in soggetti apparentemente sani (prevalenza = 29%), sia in soggetti con infezioni muco-cutanee (prevalenza = 74,2%).
- Gli isolati di *S. intermedius* mostrano un'elevata sensibilità nei confronti di antibiotici attualmente impiegati nel trattamento delle infezioni sostenute da questo batterio (cefalosporine, amoxicillina/acido clavulanico, cotrimoxazolo, fosfomicina, fluoroquinoloni) così come verso farmaci considerati efficaci contro gli stafilococchi (acido fusidico, amikacina, pristinamicina e rifampicina).
- Nonostante l'elevato grado di suscettibilità di *S. intermedius* nei confronti degli antibiotici, il 23% dei ceppi ha mostrato resistenza nei confronti di almeno un antibiotico, rivelando quindici profili di resistenza diversi.

- La presenza di fenomeni di multiresistenza (resistenza nei confronti di almeno tre diverse classi di antibiotici) è risultata limitata: solo il 9,5% dei ceppi hanno mostrato multiresistenze, soprattutto verso lincosamidi e macrolidi nei confronti dei quali è ampiamente documentata in letteratura una elevata frequenza di fenomeni di resistenza.

6 - BIBLIOGRAFIA

Aarestrup F.M., Agers Y., Ahrens P., Jorgensen J.C., Madsen M. e Jensen L.B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. (2000) *Vet. Microbiol.* **74**: 353-364.

Albares G., Montoya L., Ambros L., Kreil V., Hallu R. e Rebuelto M. Multiple once-daily dose pharmacokinetics and renal safety of gentamicin in dogs. (2004) *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **27**: 21-25.

Alekshun M.N. e Levy S.B. Bacterial drug resistance: response to survival threats. In: Bacterial stress responses. ASM Press, Washington D.C. USA (2000) 323-366.

Bager F. e Helmuth R. Epidemiology of quinolone resistance in *Salmonella*. (2001) *Vet. Res.* **32 (3-4)**: 285-290.

Bennett P.M. The spread of drug resistance, in: Baumberg S., Young J.P.W., Wellington E.M.H. e Saunders J.R.(Eds.), Population Genetics in Bacteria. University Press, Cambridge UK (1995) 317-344.

Blondeau J.M. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. (2004) *Surv. Ophthalmol.* **49 (suppl. 2)**: S73-78.

- Boag A., Loeffler A. e Lloyd DH. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from companion animals. (2004) *Vet. Rec.* **154**: 411.
- Boerlin P., Burnens A.P., Frey J., Kuhnert P. e Nicolet J. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. (2001) *Vet. Microbiol.* **79**: 155-169.
- Brosnikoff C., Kastner P., Rennie R. e Turnbull L. Side by side by side evaluation of Dade Microscan Walkaway 96, BD Phoenix and bioMérieux Vitek 2 for antimicrobial susceptibility testing of a challenge set of clinical strains. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City, Utah, USA (2002) 725-727.
- Carattoli A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. (2001) *Vet. Res.* **32**: 243-259.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin. (2002) *MMWR.* **51**: 565-567.
- Chung W.O., Werckenthin C., Schwarz S. e Roberts M.C. Host range of the *ermF* rRNA methylase gene in bacteria of human and animal origin. (1999) *J. Antimicrob. Chemother.* **43**: 5-14.

Cirillo G, Biserni R.C. e Guernaccini K. L'identificazione di *Staphylococcus aureus* nella pratica di Laboratorio di Microbiologia applicata: lo stato dell'arte. In *Atti della Conferenza Nazionale. La sicurezza microbiologica nella produzione di alimenti per il 21° secolo. Stafilococchi aurei e loro tossine nella catena alimentare: patologie, prevenzione, ricerche analitiche*. Bologna, Italia (2003) pagg. 43-48.

Clewell D.B. e Flannagan S.E. The conjugative transposons of gram-positive bacteria. In: *Bacterial conjugation*. Plenum Press, New York, USA (1993) 369-393.

Cobb M.A., Edwards H.J., Jagger T.D., Marshall J. e Bowker K.E. Topical fusidic acid/betamethasone-containing gel compared to systemic therapy in the treatment of canine acute moist dermatitis. (2005) *Vet J.* **169**: 276-80.

Cohen M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. (1992) *Science.* **257**: 1050-1055.

De Jaham C. Effects of an ethyl lactate shampoo in conjunction with a systemic antibiotic in the treatment of canine superficial bacterial pyoderma in an open-label, nonplacebo-controlled study. (2003) *Vet Ther.* **4**: 94-100.

- David C. Hooper. Target Modification as a Mechanism of Antimicrobial Resistance. In: Bacterial Resistance to Antimicrobials. Lewis K., Salyers A.A., Taber H.W. e Wax R.G. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York (2002) 161-192.
- De Oliveira A.P., Watts J.L., Salmon S.A. e Aarestrup F.M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. (2000) *J. Dairy Sci.* **83**: 855-862.
- Devriese L.A., Haesebrouck F., Hommez J. e Vandermeesch R. A 25-year survey of antibiotic susceptibility testing in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis in Belgium, with special reference to penicillinase. (1997) *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* **66**: 170-173.
- Duquette R.A. e Nuttall T.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? (2004) *J. Small Anim. Pract.* **45**: 591-597.
- Eady E.A., Ross J.I., Tipper J.L., Walters C.E., Cove J.H. e Noble W.C. Distribution of genes encoding erythromycin ribosomal methylases and an erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. (1993) *J. Antimicrob. Chemother.* **31**: 211-217.
- Edmund J. e Rosser Jr. Pustole e Papule. In: Clinica medica veterinaria (malattie del cane e del gatto). Ettinger S.J. e Feldman E.C. (Eds.) Antonio Delfino, Roma (2001) 43-51.

Euzeby J.P. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. Approved list. (2004) (<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>)

Fabbrini F. Piodermi: classificazione, iter diagnostico e protocolli terapeutici. In: *Proceedings of the 50th National Congress SCIVAC*, Rimini, Italia (2005) 103-107.

Felmingham D. e Brown D.F.J. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. (2001) *J. Antimicrob. Chemother.* **48 (Suppl. 1)**: 81-85.

Fey PD., Said-Salim B., Rupp M.E., Hinrichs S.H., Boxrud D.J., Davis C.C., Kreiswirth B.N. e Schlievert P.M. Comparative molecular analysis of community- or hospital-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (2003) *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**: 196-203.

Frank LA. Clinical pharmacology of rifampin. (1990) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **197**: 114-117.

Frank L.A., Kania S.A., Hnilica K.A., Wilkes R.P. e Bemis D.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. (2003) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **222**: 451-454.

- Futagawa-Saito K., Ba-Thein W., Sacurai N. e Fukuyasu T., Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. (2006) *Vet. Res.* **26**: 1-5.
- Ganière J.P., Médaille C. e Mangion C. Antimicrobial drug susceptibility of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. (2005) *J. Vet. Med. B.* **52**: 25-31.
- Gattringer R., Niks M., Ostertag R., Schwarz K., Medvedovic H., Graninger W. e Georgopoulos A. Evaluation of MIDITECH automated colimetric MIC reading for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* (2002) **49**: 651-659.
- Georgopadakou N.H. Antibiotic resistance in enterobacteria. In *Bacterial resistance to antimicrobials*. Eds. Lewis K., Salyers A.A., Taber H.A. e Wax R.G. Marcel Dekker, Inc., New York. (2002) 405-426.
- Giraud E., Cloeckert A., Kerboeuf D. e Chaslus-Dancla E. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1223-1228.
- Greene R.T. e Schwarz S. Small antibiotic resistance plasmids in *Staphylococcus intermedius*. (1992) *Zentralbl. Bakteriolog.* **276**: 380-389.

- Greenwood D. Detection of antibiotic resistance in vitro. (2000) *Int. J. Antimicrob. Agents*. **14**: 303-306.
- Guardabassi L., Loeber M.E. e Jacobson A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dog affected by deep pyoderma and their owners. (2004) *Vet. Microbiol.* **98**: 23-27.
- Harvey R.G., Marples R.R. e Noble, W.C. Nasal carriage of *Staphylococcus intermedius* in humans in contact with dogs. (2000) *Microb. Ecol. Health Dis.* **7**: 225–227.
- Heinen E. Comparative serum pharmacokinetics of the fluoroquinolones enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin, and orbifloxacin in dogs after single oral administration. (2005) *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **25**: 1-5.
- Hernandez J.L., Calvo J., Sota R., Aquero J., Garcia-Palomo J.D. e Farinas M.C.. Clinical and microbiological characteristics of 28 patients with *Staphylococcus schleiferi* infection. (2001) *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **20**: 153–158.
- Hendricks A., Schuberth H.J., Schueler K. E Lloyd D.H.: Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus intermedius* isolate from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dog. (2000) *Vet. Science.* **73**: 237-277

- Holm B.R., Rest J.R., Seewald W. A prospective study of the clinical findings, treatment and histopathology of 44 cases of pyotraumatic dermatitis. (2004) *Vet. Dermatol.* **15**: 369-376.
- Hooper D.C. Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones. (2001) *Clin. Infect. Dis.* **32** (suppl. 1): S9-S15.
- Humphrey C. Antibiotic resistance: an exemplary case of medical nemesis. (2000) *Crit Public Health.* **10**: 353-358.
- Jensen L.B., Frimodt-Moller N. e Aarestrup F.M. Presence of *erm* gene classes in gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. (1999) *FEMS Microbiol. Lett.* **170**: 151-158.
- John J., Hesselbarth J. e Schwarz S. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus sciuri*. (1996) *Med. Microbiol.* **4**: 346-353.
- Jones M.E., Sahn D.F., Martin N., Scheuring S., Heisig P., Thornsberry C., Köhrer K., Schmitz F.J. Prevalence of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997–1998 respiratory season. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 462-466.

Katayama Y., Ito T., Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 1549-1555.

Katayama Y., Ito T. e Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion on expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. (2001) *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1955–1963.

Kokjohn T.A. Transduction: Mechanism and potential for gene transfer in the environment. In: *Gene transfer in the environment*. McGraw-Hill, New York, USA (1989) 73-97.

Kwok, A.Y.C., Su S.C., Reynolds R.P., Bay S.J., Av-Gay Y., Dovichi N.J. e Chow A.W. Species identification and phylogenetic relationships based on partial HSP60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. (2000) *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**: 1181–1192.

Lange C. e Schwarz S. Molecular characterization of the *aacA/aphD* resistance gene region on plasmids from animal staphylococci. In: *Proceedings of the 9th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections*. Kolding, Denmark (2000) Session C, P-9, 51.

Laurenti P.eziopatogenesi dell'infezione stafilococcica. In: Atti della Conferenza Nazionale. La sicurezza microbiologica nella produzione di alimenti per il 21° secolo. Stafilococchi aurei e loro tossine nella catena alimentare: patologie, prevenzione, ricerche analitiche. Bologna, Italia (2003) 9-15.

Lautz S., Kanbar T., Alber J., Lammler C., Weiss R., Prenger-Berninghoff E. e Zschock M. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. (2006) *J. Vet. Med.* **53** (9): 434-438.

Lilenbaum W., Nunes E.L. e Azeredo M.A. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from the skin surface of clinically normal cats. (1998) *Lett. Appl. Microbiol.* **27**: 224-228.

Lilenbaum W., Esteves A.L. e Souza G.N. Prevalence and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from saliva of clinically normal cats. (1999) *Lett. Appl. Microbiol.* **28**: 448-452.

Lloyd D.H., Lamport A.I., Noble W.C. e Howell S.A. Fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus intermedius*. (1999) *Vet. Dermatol.* **10**: 249-252.

Lloyd D.H., Lamport A.I. e Feeney C. Sensitivity to antibiotics amongst cutaneous and mucosal isolates of canine pathogenic staphylococci in the UK, 1980–1996. (2000) *Vet. Dermatol.* **7**: 171-175.

Lomovskaya O. e Watkins W.J. Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. (2001) *Curr. Med. Chem.* **8**: 1699-1711.

Lyon B.R. e Skurray R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. (1987) *Microbiol. Rev.* **51**: 88-134.

Martin H. e Maris P. Antiseptic and antibiotic resistance of 310 gram-positive strains isolated from udders after use of post-milking teat germicides. (1995) *Vet. Res.* **26**: 43-56.

Martineau F., Picard F.J., Grenier L., Roy P.H., Ouellette M. e Bergeron M.G. Multiplex PCR assays for detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. (2000) *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 527-534.

May E.R., Hnilica K.A., Frank L.A., Jones R.D. e Bemis, D.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. (2005) *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **227**: 928-931.

- Mulvey M.R., Reid-Smith R., Prescott J.F., Bonnett B., Poppe C., Boerlin P. e Weese J.S. Occurrence of antimicrobial resistant bacteria in healthy dogs and cats presented to private veterinary clinics in southern Ontario. (2005) *J. Vet. Int. Med.* **19**, 284
- Nagase N., Sasaki A., Yamashita K., Shimizu A., Wakita Y., Kitai S. e Kawano J. Isolation and species distribution of staphylococci from animal and human skin. (2002) *J. Vet. Med. Sci.* **64**: 245-250.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Informational supplement. NCCLS document M31-S1. (2004).
- Nawaz M.S., Khan A.A., Khan S.A., Paine D.D., Pothuluri J.V. e Cerniglia C.E. Biochemical and molecular characterization of erythromycin-resistant avian *Staphylococcus* spp. isolated from chickens. (1999) *Poult. Sci.* **78**: 1191-1197.
- Noble W.C. e Kent L. Antibiotic resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from cases of pyoderma in the dog. (2000) *Vet. Dermatol.* **3**: 71-74.
- Normand E.H., Gibson N.R., Reid S.W., Carmichael S. e Taylor D.J. Antimicrobial-resistance trends in bacterial isolates from companion animal community practice in the UK. (2000) *Prev. Vet. Med.* **46**: 267-278.

- Pellerin J.L., Bourdeau P., Sebbag H. e Person J.M. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. (1998) *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **21**: 115-133.
- Phillips W.E. Jr. e Williams B.J. Antimicrobial susceptibility patterns of canine *Staphylococcus intermedius* isolates from veterinary clinical specimens. (1998) *Am. J. Vet. Res.* **45**: 2376-2379.
- Projan S.J. Antibiotic resistance in the staphylococci. In: *Gram-positive pathogens*. American Society for Microbiology, Washington D.C. USA (2000) 463-470.
- Putman M., van Veen H.W. e Konings W.N. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 672-693.
- Quintiliani R. Jr., Sahm D.F. e Courvalin P. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. in: *Manual of Clinical Microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington D.C. USA (1999) 1505-1525.
- Rich M. Staphylococci in animals: prevalence, identification and antimicrobial susceptibility, with an emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. (2005) *Br. J. Biomed. Sci.* **62**: 98-105.

- Roberts M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. (1996) *FEMS Microbiol. Rev.* **19**: 1-24.
- Robicsek A., Jacoby G.A. e Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. (2006) *Lancet Infect. Dis.* **6**: 629-640.
- Rosato A.E., Craig W.A. e Archer G.L. Quantitation of *mecA* transcription in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. (2003) *J. Bacteriol.* **185**: 3446–3452.
- Saijonmaa-Koulumies L.E. e Lloyd D.H. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. (2002) *Vet. Dermatol.* **13**: 123-130.
- Salyers A.A., Shoemaker N.B., Stevens A.M. e Li L.Y. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. (1999) *Microbiol. Rev.* **59**: 579-590.
- Sasaki A., Shimizu A., Kawano J., Wakita Y., Hayashi T. e Ootsuki S. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. (2005) *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 103-106.

- Schwarz S. e Noble W.C. Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. (1999) *Vet. Dermatol.* **10**: 163-176.
- Schwarz S., Wegener H.C. e Blobel H. Plasmid-encoded resistance to macrolides and lincosamides in *Staphylococcus hyicus*. (1999) *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 845-849.
- Schwarz S., Cardoso M. e Wegener H.C. Nucleotide sequence and phylogeny of the *tet(L)* tetracycline resistance determinant encoded by plasmid pSTE1 from *Staphylococcus hyicus*. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**: 580-588.
- Schwarz S. e Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. (2001) *Vet. Res.* **32**: 201-225.
- Schwarz S., Kehrenberg C. e Walsh T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. (2001) *Int. J. Antimicrob. Agents.* **17**: 431-437.
- Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. Bacterial Skin Disease. In: Muller and Kirk's Small Animal dermatology. 6th edn. Philadelphia, PA: W.B. Saunders (2001) 274-335.

- Simou C., Hill P.B., Forsythe P.J. e Thoday K.L. Species specificity in the adherence of staphylococci to canine and human corneocytes: a preliminary study. (2005) *Vet. Dermatol.* **16**: 156–61.
- Stanisich V.A. Identification and analysis of plasmids at the genetic level. In: Grinsted J. E Bennett P.M. (Eds.), *Plasmid Technology*. Academic Press, London, UK (1988) 11-48.
- Strommenger B., Kettlitz C., Werner G. e Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. (2003) *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2480–2482.
- Strommenger B., Kehrenberg C., Kettlitz C., Cuny C., Verspohl J., Witte W. e Schwarz, S. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. (2006) *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 461–465.
- Swenson J.M. e Tenover F.C. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. (2005) *J. Clin. Microbiol.* **43**: 3818–3823.
- Telenti A. e Tenover C.F. Genetic Methods for Detecting Bacterial Resistance genes. In: *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. Lewis K., Salyers A.A., Taber H.W. e Wax R.G. (Eds). Marcel Dekker, Inc. New York (2002) 161-192.

Tenover F.C., Arbeit R.D., Goering R.V., Mickelsen P.A., Murray B.E., Persing D.H. e Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. (1995) *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2233-2239.

Ungemach F.R. Figures on quantities of antibacterials used for different purposes in the EU countries and interpretation. (2000) *Acta Vet. Scand.* **93**: Suppl. 89-97.

Van Leeuwen W.B., Melles D.C., Alaidan A., Al-Ahdal M., Boelens H.A., Snijders S.V., Wertheim H., van Duijkeren E., Peeters J.K., van der Spek P.J., Gorkink R., Simons G., Verbrugh H.A. e van Belkum A. Host- and tissue-specific pathogenic traits of *Staphylococcus aureus*. (2005) *J. Bacteriol.* **187**: 4584–4591.

Weese J.S., Dick H., Willey B.M., McGeer A., Kreiswirth B.N., Innis B. e Low D.E., Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. (2006) *Vet. Microbiol.* **115**: 148–155.

Werckenthin C., Cardoso M., Martel J.L. e Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Staphylococci* from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. (2001) *Vet. Res.* **32**: 341-362.

Werckenthin C. e Schwarz S. Molecular analysis of the translational attenuator of a constitutively expressed *erm(A)* gene from *Staphylococcus intermedius*. (2001) *J. Antimicrob. Chemother.* **46**: 785-788.

Witte W. Diagnostics, typing, and taxonomy. In: Fiscetti V.A., Novick R.P., Portnoy D.A. e Rood J.I.(Eds.). Gram-positive pathogens. ASM Press, Washington D.C. (2000) 309-316.

Yamashita K., Shimizu A., Kawano J., Uchida E., Haruna A. e Igimi S. Isolation and characterization of staphylococci from external auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. (2005) *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 263-268.

Yasuda R., Kawano J., Matsuo E., Masuda T., Shimizu A., Anzai T. e Hashikura S. Distribution of *mecA*-harboring staphylococci in healthy mares. (2002) *J. Vet. Med. Sci.* **64**: 821-827.

Zdovc I., Ocepek M., Pirš T., Krt B. e Pinter L. Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. (2004) *J. Vet. Med. B.* **51**: 449-454.

Zetola N., Francis J.S., Nuermberger E.L. e Bishai W.R. Community-acquired
meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. (2005) *Lancet
Infect. Dis.* **5**: 275-286.

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Luigi Intorre per essere stato un punto di riferimento, il Dott. Michele Vanni per la sua gentile disponibilità.

Ringrazio Enrico Orciuolo per il suo aiuto prezioso.

Ringrazio anche Giusi, Federica, Simona, Emma e la sua famiglia che sono state capaci di starmi vicino e di sopportarmi durante questo periodo.

In fine, non per importanza, un ringraziamento speciale va ai miei Genitori che mi hanno sostenuto incondizionatamente perché sono stati e saranno per sempre il mio punto di riferimento e la mia guida spirituale, ...e a Calogero un fratello come pochi.