

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in SALUTE ANIMALE

Ciclo XXIV

**PATOLOGIE CUTANEE COMPLICATE DA BATTERI NEL
CANE: DIAGNOSI E FOLLOW UP.
VALUTAZIONE DEGLI ASPETTI DI FARMACO RESISTENZA**

**“SKIN DISEASES COMPLICATED BY BACTERIA IN DOG:
DIAGNOSIS AND FOLLOW UP. EVALUATION OF
ANTIBIOTIC RESISTANCE “**

Coordinatore: Chiar.mo Prof. SANDRO CAVIRANI

Tutor: Chiar.ma Prof.ssa CLOTILDE SILVIA CABASSI

Dottorando: EMANUELE GANDOLFO

INDICE

ABSTRACT_____	pag. 3
INTRODUZIONE _____	pag. 5
CAPITOLO 1: LE PiodermITI DEL CANE _____	pag. 8
CAPITOLO 2: LA METICILLINO RESISTENZA _____	pag. 18
CAPITOLO 3: PROGETTO DI RICERCA – MATERIALI E METODI_____	pag. 25
CAPITOLO 4: RISULTATI_____	pag. 30
CAPITOLO 5: DISCUSSIONE E CONCLUSIONE_____	pag. 50
CAPITOLO 6: BIBLIOGRAFIA_____	pag. 56

ABSTRACT

During the 3 year period of the PhD (2009-2011) a study on "Skin diseases complicated by bacteria in dog: diagnosis and follow up. Evaluation of antibiotic resistance " has been developed. The study was conducted at the Department of Animal Health of the Veterinary Medicine Faculty of Parma.

As first opinion cases, 204 dermatological canine patients have been examined. Subsequently, the same patients were re-examined every 3 weeks, depending on the owner compliance. The cases have been selected among canine patients with pathologies of the skin and cutaneous annexes. On these patients a dermatological examination has been carried out, cultural examination and antibiotic sensitivity testing by Kirby-Bauer method on the bacterial isolates. A panel of 27 antibiotic drugs were tested. Among a total of 121 bacterial isolates, a number of 96 (80%) were belonging to the *Staphylococcus* genus. Other isolates belonged to the *Enterobacteriaceae* family (n.15), *Pseudomonas aeruginosa* (n. 6) and *Pasteurella multocida* (n. 3). A number of 34 staphylococcal strains were resistant to methicillin, whereas a number of 43 staphylococcal strains were resistant to oxacillin. Discordance were noted in the evaluation of methicillin /oxacillin activity in 20 cases. *MecA* expression, which confer resistance to beta-lactam antibiotics, was confirmed in 17 cases by evaluation of the presence of the PBP2a by a latex agglutination test. Also the pathogenicity of 10 haemolytic strains of *Staphylococcus epidermidis* isolates and their antibiotic resistances have been evaluated.

For staphylococcal strains we noticed antibiotic activity in >50% for amoxicillin + clavulanic acid, cefadroxil, cefalexin, cloramphenicol, cloxacillin, doxyciclin, mupirocin, rifampicin and vancomycin; on the opposite, fluoroquinolons had an activity on <50% of the isolated staphylococcal strains.

The application of a correct diagnostic protocol is strongly suggested to avoid the therapeutic failure and the emergence of antibiotic resistances , particularly in consideration of the zoonotic role of methicillin/oxacillin staphylococcal strain. This protocol is based on a complete dermatological evaluation, cultural examination and antibiotic testing.

INTRODUZIONE

Durante la mia attività di clinico libero professionista, che si occupa principalmente di problematiche dermatologiche, ho potuto notare che negli ultimi anni nel cane sono emersi batteri che presentano fenomeni di farmaco-resistenza di rilevanza clinica, ad esempio stipiti resistenti *in vitro* alla maggior parte degli agenti antimicrobici disponibili per l'impiego nella clinica dei piccoli animali, che rendono sempre più frequenti i fallimenti terapeutici.

Come è noto, la maggior parte dei batteri coinvolti nel determinismo delle forme patologiche della cute e degli annessi cutanei nel cane appartengono al genere *Staphylococcus* (Mason I.S. 1997).

Attualmente, un numero significativo di specie di stafilococchi in grado di infettare uomo ed animali mostrano gradi diversi di resistenza agli antimicrobici. In particolare, sin dagli anni '60, si è sviluppata la resistenza ad una classe di antimicrobici beta-lattamici, dei quali vengono considerati la meticillina e la oxacillina come molecole tipo per verificare la sensibilità dei batteri all'intera classe del farmaco (penicilline semisintetiche penicillinasi-resistenti) (Morris et al., 2006). Inoltre, è stato dimostrato che la maggior parte degli stipiti meticillino-resistenti presentano anche resistenza nei confronti di numerose altre classi di antimicrobici (Leonard F.C. e Markey B.K., 2008).

Alcuni stipiti, in particolare, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente, possono potenzialmente causare gravi infezioni per l'uomo e la loro comparsa negli animali da compagnia comporta gravi rischi sanitari sia per i proprietari che per lo staff veterinario. Tuttavia, è da tenere in considerazione anche un percorso epidemiologico inverso, dove l'animale da compagnia assume primariamente l'infezione dall'uomo e successivamente può fungere da portatore. Attualmente, uno stipite CC398 di MRSA risulta particolarmente indagato in quanto associato nell'uomo a serie infezioni cutanee dei tessuti molli, polmoniti e setticemie. Tuttavia, anche specie di stafilococchi diverse da *Staphylococcus aureus*

possono presentare resistenza alla metilicilina/oxacillina, pertanto si ritiene sempre opportuno procedere ad una attenta valutazione della attività *in vitro*.

Le infezioni da MRSA sono diffuse nelle strutture ospedaliere di numerosi stati membri UE e rappresentano una causa importante di infezioni nosocomiali che possono indurre malattie gravi, talvolta letali. Come confermato da un rapporto congiunto dell'Agenzia per la sicurezza alimentare (EFSA) – il Centro europeo per la prevenzione ed il controllo delle malattie (ECDC) – e l'agenzia europea per i medicinali (EMA), negli ultimi anni è stato stabilito un nesso tra le infezioni da MRSA negli animali e nell'uomo. nelle aree dell'UE in cui gli stipti metilicillino resistenti di stafilococchi sono presenti negli animali, le persone a contatto con essi, per ragioni professionali o familiari sono a rischio di contrarre l'infezione. Considerando la gravità di alcune di tali forme cliniche, l'ECDC sostiene l'attuazione di misure tese ad un uso prudente degli antibiotici negli animali, tra cui un monitoraggio della somministrazione di antimicrobici agli stessi, per individuare eventuali casi di utilizzo superfluo, in particolare evitando la somministrazione negli animali di principi attivi destinati al trattamento dell'MRSA nell'uomo, affinché continuino ad essere efficaci in quest'ultimo. (EFSA Journal, 2009).

L'emergenza di batteri multi-resistenti enfatizza la necessità di promuovere un impiego prudente e razionale degli antibiotici negli animali da compagnia. La diffusione del fenomeno dell'antibiotico resistenza può essere controllata in modi diversi: minimizzando l'uso di antibiotici sistemici, per diminuire la pressione selettiva sui batteri residenti in favore degli stipti resistenti; utilizzando tutte le procedure diagnostiche disponibili per impostare un protocollo terapeutico mirato, che comprendano un percorso diagnostico il più possibile completo, comprendente esami citologici-dermopatologici, esami microbiologici e l'effettuazione di un test *in vitro* di sensibilità agli antibiotici; da ultimo, nell'impostazione del protocollo terapeutico, si rende necessario mettere a punto il

dosaggio, la durata e la compliance del proprietario nella somministrazione del farmaco (Scott et al, 2001).

Scopo della mia ricerca, quindi, è stato quello di applicare un protocollo diagnostico rigoroso in termini di indagini specifiche e collaterali, come precedentemente descritto; procedere fino all'identificazione livello di specie del batterio presumibilmente coinvolto nel determinismo della patologia cutanea e saggiarne lo spettro di sensibilità ad antibiotici; di valutare la prevalenza delle diverse specie batteriche e la loro significatività patologica; dopo valutazione delle indicazioni di attività antimicrobica, in particolare di quei principi attivi maggiormente utilizzati nella terapia dermatologica, di impostare un protocollo terapeutico e di valutare gli effetti di tale terapia durante le visite cliniche successive, costituenti il follow up.

All'interno della valutazione degli aspetti microbiologici altri parametri sono stati presi in considerazione, quali alcuni aspetti squisitamente procedurali: la valutazione della presenza del gene *mecA*, concordanza /discordanza dell'attività di meticillina/oxacillina sulla base del diametro dell'alone di inibizione, valutazione degli aspetti di farmaco resistenza negli stipti emolitici di *Staphylococcus epidermidis*.

CAPITOLO 1

LE PIODERMITI DEL CANE

La cute e il mantello dei cani sono normalmente colonizzati da varie specie di batteri e funghi. Le infezioni insorgono quando sono presenti microrganismi patogeni oppure quando i meccanismi di difesa propri della cute sono ridotti o assenti. Un'alterazione dell'ecosistema cutaneo di superficie, una perdita dell'integrità cutanea o "deficit" immunitari dell'ospite ne favoriscono l'insorgenza.

Sono frequenti, quindi, le infezioni batteriche cutanee secondarie alla presenza di altre patologie dermatologiche.

Sono definite piodermiti un insieme di malattie, con varia espressione clinica, sostenute da batteri piogeni capaci di interessare l'epidermide, il derma o l'ipoderma. (Scott D.W., 2001).

Sono comuni nella specie canina dove sono ancora in discussione i fattori che ne determinano l'insorgenza.

Si pensa che a favorire l'adesione, la proliferazione e la penetrazione dei batteri sia il pH cutaneo elevato 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 di superficie.

Inoltre, alcune malattie primarie sottostanti, come ad esempio le patologie allergiche risultano essere importanti fattori predisponenti.

Le piodermiti sono classificate a seconda della profondità e struttura cutanea coinvolta in:

- **Piodermiti di superficie:** quando l'infezione resta confinata allo strato corneo. Per molti autori queste non sono considerate delle vere infezioni ma piuttosto delle colonizzazioni batteriche superficiali e vengono pertanto definite "pseudopiodermiti" dove la componente batterica è ampia e sono secondarie a insulti traumatici.

Tra queste vengono considerate la **dermatite Piotraumatica o dermatite essudativa acuta** e l'**intertrigine o dermatite delle pieghe**. La prima è causata dall'improvvisa e intensa attività di leccamento, mordicchiamento o grattamento del cane in aree corporee doloranti o pruriginose a seguito di malattie allergiche (es. DAP o Dermatite atopica), ectoparassitosi, otiti, corpi estranei ecc.

In poche ore si formano ampie aree eritematose ed essudative a livello delle zone sedi del prurito e conseguente grattamento.

Risultano maggiormente colpiti i cani a pelo folto e lungo, specie nei periodi caldo umidi a causa del microclima, favorevole alla moltiplicazione batterica, che si viene a creare sulla superficie cutanea.

L'intertrigine è, invece, indotta dallo sfregamento tra aree cutanee adiacenti, dove la poca aria circolante, l'eccesso di umidità e l'accumulo di secrezioni risultano essere fattori favorevoli la moltiplicazione batterica e di lieviti con conseguente eritema, essudazione e cattivo odore.

Alcune razze con cute sovrabbondante risultano essere maggiormente predisposte, quali, ad esempio: Carlino, Bulldog inglese e Shar pei (Mason I.S.1993).

- **Piodermi superficiali:** sono quelle dove l'infezione rimane confinata all'epidermide o al lume dei follicoli piliferi non estendendosi al derma.

Tra queste troviamo l'**impetigine, la follicolite batterica superficiale e la piodermite muco cutanea**.

L' **impetigine** interessa di solito i cuccioli entro la pubertà ed è caratterizzata dalla presenza di papulo-pustole o croste nelle parti di cute glabra ventrali.

Si ritiene possa essere favorita dalla presenza di parassiti, infezioni virali, ambiente malsano e carenze nutrizionali.

La **follicolite** batterica superficiale rappresenta la forma di piodermite più frequente ed è di solito secondaria ad altre malattie dermatologiche concomitanti quali le patologie allergiche, autoimmuni, parassitarie, endocrine, metaboliche, tumorali, seborroiche o della cheratinizzazione.

Le lesioni classiche sono rappresentate da papule e/o pustole follicolari, scaglie, collaretti epidermici, croste non emorragiche, aree di alopecia multifocale.

Le zone maggiormente colpite sono l'addome, le ascelle, l'inguine e il tronco.

La **piodermite mucocutanea** interessa principalmente le labbra e la cute periorale.

La razza maggiormente colpita risulta essere il Pastore tedesco e i suoi incroci, ma possono essere coinvolte anche le altre razze.

Le lesioni iniziali sono rappresentate da eritema ed edema, seguite da essudazione, erosioni, ragadi e croste con conseguente depigmentazione nelle forme croniche (Hill PB, Morello KA, 1994)

- **Piodermi profonde:** si hanno quando l'infezione si estende al derma e all'ipoderma in seguito a ferite penetranti, depressione del sistema immunitario, traumi o gravi danni follicolari. Si tratta di forme gravi che si osservano, di solito, in seguito a malattie debilitanti e immunosoppressive. (Cerundolo R. et al. 1998)

Il quadro clinico è molto vario e rappresentato dalla presenza di pustole, noduli, bolle emorragiche, ulcere, necrosi, croste emorragiche e fistole.

Possono venire classificate in forme localizzate e forme generalizzate. Tra le prime troviamo la **follicolite/foruncolosi del dorso del naso**, la **follicolite/foruncolosi interdigitale** e la **follicolite Piotraumatica**.

Tali forme raramente sono associate a malattie sottostanti e se interessano piccole aree cutanee sono causate da fattori esterni quali: corpi estranei, traumi o morsi.

La *follicolite/foruncolosi del dorso del naso* è una infezione rara molto dolorosa, localizzata al dorso del naso e alle aree attorno alle narici. Le razze maggiormente coinvolte risultano essere: il pastore tedesco, il bull terrier, il collie e il pointer.

L'esordio è di solito improvviso con la comparsa di alcune papule e pustole sul dorso del naso associate a dolore e prurito che, in seguito a lesioni da autotraumatismo, degenerano in erosioni, ulcere, noduli e croste con interessamento delle aree limitrofe (Scott D.W. Miller W.H., Griffin C.E., 1995)

La *follicolite/foruncolosi interdigitale* si presenta con eritema, edema, papule, pustole emorragiche, noduli, ulcere e fistole a livello degli spazi interdigitali o altre aree podali di uno o più arti. Spesso è presente zoppia e dolorabilità.

La causa delle infezioni podali talvolta rimane sconosciuta anche perché i fattori predisponenti correlati sono numerosi e non sempre facili da identificare: ripetuti traumi locali, neoplasie, corpi estranei, dermatiti da contatto, dermatite atopica, allergia alimentare, ipotiroidismo, ipersensibilità batterica.

La *follicolite Piotraumatica* interessa principalmente cani giovani di razze come: Labrador, Golden Retriever, S. Bernardo, Terranova. Il quadro clinico è analogo a quello della dermatite Piotraumatica.

L'esordio è improvviso e l'evoluzione è rapida (poche ore) a seguito dell'auto traumatismo. Si formano delle aree eritematose, essudative, ulcerate e rilevate a placca, dai bordi ben definiti con papule e pustole in periferia, particolare al collo o alle guance.

Tutte le forme di piodermite profonda sono spesso correlate con un quadro di immuno depressione primario o secondario ad altre malattie sottostanti.

Tra le forme generalizzate bisogna ricordare la **piodermicosi** e la **piodermite idiopatica del pastore tedesco**.

Alla demodicosi è associato uno stato di alterazione del sistema immunitario, capace di favorire l'insorgenza di una piodermite profonda, pertanto le due malattie devono essere trattate contemporaneamente e per tempi lunghi. La guarigione della piodermite è, quindi, subordinata alla guarigione dalla demodicosi.

Le lesioni sono rappresentate da pustole, papule o bolle emorragiche con croste o lesioni cicatriziali a causa della distruzione permanente dei follicoli piliferi.

La piodermite idiopatica del Pastore tedesco è conosciuta anche col nome di Piodermite del pastore tedesco, è una malattia cronica, caratterizzata dalla presenza di infezioni profonde che si risolvono lentamente e che spesso recidivano una volta cessata la somministrazione di antibiotici.

Nei cani colpiti, oltre alla predisposizione familiare è stata evidenziata la possibilità di riscontrare malattie sottostanti quali: allergie, endocrinopatie, malattie infettive o parassitarie, deficit dell'immunità cellulo mediata.

L'ipotesi più accreditata è che i cani vadano incontro a un deterioramento delle loro immunocompetenza cutanea (Wisselink MA. 1988).

In questo modo, malattie capaci di causare un insulto cutaneo, come le malattie allergiche, o un deficit immunitario, come nell'ipotiroidismo o nel morbo di Cushing, comportano uno scompenso immunologico e la presenza di un'infezione cutanea grave e sproporzionata rispetto alla causa presente.

La malattia colpisce di solito soggetti adulti tra i 5 e gli 8 anni, con presenza di papule e pustole cui rapidamente fanno seguito placche, ulcere, tragitti fistolosi, aree iperpigmentate, alopeciche, necrotiche e/o crostose.

La distribuzione regionale è piuttosto caratteristica essendo colpite: la groppa, le cosce, il dorso e l'addome, mentre sono spesso risparmiati la testa e gli arti (Wisselink MA. et al, 1985).

Aspetti diagnostico-procedurali

Si basa sul quadro clinico e sugli esiti dell'esame citologico eseguito da lesioni integre.

Nelle piodermiti devono essere identificati i batteri fagocitati dai polimorfonucleati neutrofili, tenendo conto che per convenzione, a livello cutaneo, i cocci sono considerati Gram positivi, mentre i bastoncelli sono considerati Gram negativi.

Gli esami batteriologici ed istologici possono essere riservati ai casi che non rispondono alle terapie o recidivanti.

L'esame colturale batteriologico è assolutamente raccomandato nei casi in cui vengono evidenziati batteri coccacei o bastoncellari fagocitati dalle cellule polimorfonucleate.

Cenni terapeutici

La soddisfacente risoluzione di una piodermite comporta la scomparsa dei sintomi e l'eliminazione di eventuali recidive.

Essendo la maggioranza delle piodermiti secondarie, risulta di fondamentale importanza la diagnosi e la successiva terapia della patologia primaria, in quanto se la causa predisponente persiste, l'infezione può non rispondere in maniera corretta alla terapia o può recidivare.

Nella terapia delle piodermiti possono essere utilizzati sia farmaci topici che farmaci sistemici; di solito i primi vengono utilizzati per le piodermiti di superficie o superficiali,

mentre nelle piodermiti profonde, alla terapia topica deve essere associata anche una terapia antibiotica sistemica.

TERAPIA TOPICA

Tra i farmaci usati per uso topico troviamo sia sostanze antisettiche sotto forma di lozioni o shampoo avendo, in questo caso, l'accortezza di rispettare la corretta applicazione e durata del trattamento (Koch HJ, Vercelli A. 1993) che farmaci antibiotici.

Le sostanze antisettiche maggiormente efficaci sono:

Clorexidina: ha un ampio spettro d'azione contro batteri e funghi. A concentrazioni elevate coagula le proteine citoplasmatiche batteriche mentre a basse concentrazioni distrugge le membrane citoplasmatiche batteriche. E' efficace nei confronti dei batteri Gram positivi e Gram negativi, con l'eccezione di alcuni ceppi di *Pseudomonas spp.* Possiede anche una certa attività antifungina contro dermatofiti e lieviti (in particolare del genere *Malassezia*).

Lattato di etile: essendo altamente liposolubile penetra facilmente nel follicolo pilifero e nella ghiandola sebacea. Viene idrolizzato in acido lattico ed etanolo ad opera delle lipasi batteriche. L'acido lattico determina una diminuzione del pH cutaneo e inibizione delle lipasi stesse mentre l'etanolo solubilizza i grassi e diminuisce la secrezione sebacea (Scott DW et al. 2001)

Ha un'attività batteriostatica piuttosto che battericida e l'azione antiseborroica risulta modesta.

Derivati dello jodio (iodopovidone): ha attività battericida e fungicida ma non ha attività antiseborroica.

Triclosan: viene utilizzato nell'uomo per le infezioni da stafilococchi meticillino-resistenti. Ha attività battericida (Ihrke PJ. 1986).

Tra gli antibiotici utilizzati nella terapia topica troviamo invece:

Mupirocina: ha azione esclusivamente locale. Causa una deplezione intracellulare di isoleucina, con arresto della sintesi di RNA e delle proteine batteriche. Tale meccanismo d'azione unico giustifica l'assenza di resistenze crociate con altri antibiotici (Gauguere E. 2002).

Acido fusidico: agisce inibendo un fattore necessario all'allungamento della catena dei polipeptidi. Lo spettro d'azione è però limitato ai batteri Gram positivi. Ha azione prevalentemente batteriostatica e penetra bene nei tessuti per le sue caratteristiche lipofile.

TERAPIA SISTEMICA

Nella scelta della terapia sistemica si deve tener conto di:

- distribuzione del farmaco alla cute
- scelta dell'antibiotico
- dose e durata del trattamento

particolare importanza hanno la scelta dell'antibiotico, la dose e la durata del trattamento, in quanto sono fondamentali per un buon risultato terapeutico (Guardabassi L. et al. 2008).

Gli antibiotici maggiormente utilizzati nella pratica clinica sono:

amikacina, amoxicillina + ac. clavulanico, apramicina, cefadroxil, cefalessina, cefovecin, ciprofloxacina, clarithromicina, clindamicina, cloxacillina, doxiciclina, enrofloxacina, eritromicina, gentamicina, lincomicina, marbofloxacina, rifampicina, rifaximina, sulfametossazolo + thrimetoprim, tilosina.

Il farmaco scelto per la terapia deve essere attivo verso il batterio responsabile delle lesioni, per cui è sempre indicata l'esecuzione di un esame batteriologico con antibiogramma prima dell'inizio della terapia.

Particolare importanza ha la posologia del trattamento, in quanto i dosaggi dei farmaci antibatterici, in dermatologia, sono più elevati di quelli utilizzati per altre patologie.

La terapia deve essere, inoltre, sospesa dopo la scomparsa delle lesioni. La presenza del pelo e la grande varietà dei segni clinici che caratterizzano le infezioni cutanee nel cane rendono la guarigione difficilmente valutabile dal proprietario; è, quindi, compito del

veterinario stabilire quando interrompere il trattamento, mediante visite di controllo regolari ogni 15 – 20 gg.

Tali visite di follow up permettono inoltre di adattare la terapia in funzione dell'evoluzione clinica ed eventualmente di ripetere alcuni esami complementari (Scott. DW. et al. 2001).

CAPITOLO 2

LA METICILLINO RESISTENZA: DALLA STORIA ALL'ATTUALITA'

La pressione selettiva esercitata dall'uso massiccio e sconsiderato di antibiotici sia in medicina umana che veterinaria sembrerebbe aver favorito lo sviluppo di varie forme di resistenza.

I batteri del genere *Staphylococcus* sono batteri a morfologia coccacea, Gram positivi, aerobi-anaerobi facoltativi, rilevabili come parte della normale flora cutanea e mucosale dei mammiferi e dei volatili. Numerose specie di stafilococchi sono riscontrate sulla cute di cani sani, tuttavia, tale comune flora residente e/o saprofita può acquisire caratteri di patogenicità in dipendenza non solo dai caratteri del batterio ma anche da forme cliniche pregresse riscontrabili nel cane.

Staphylococcus aureus è un frequente ed importante patogeno di derivazione umana ed animale, responsabile, unitamente a *Staphylococcus intermedius group (SIG)*, di patologie cutanee nella specie canina.

Altri stafilococchi isolati in corso di patologie cutanee del cane sono stipiti di stafilococchi coagulasi positivi come *Staphylococcus schleiferi*, mentre tra gli stipiti coagulasi negativi, vanno segnalati *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus xylosus* (Hanselman B.A., 2008).

Nell'uomo, *Staphylococcus aureus*, è normalmente presente sulla cute e nelle narici di persone in buona salute, tanto che circa il 25-30 % della popolazione ne è portatore a livello nasale.

Staphylococcus aureus è responsabile di infezioni cutanee banali, quali foruncolosi, ma anche di sepsi, polmoniti, artriti settiche nonché infezioni delle ferite operatorie.

Negli anni *Staphylococcus aureus*, ha sviluppato resistenza agli antibiotici, fatto che ha fortemente condizionato le scelte terapeutiche, determinando una limitazione importante all'uso di alcune classi di antimicrobici. Attualmente si attribuisce particolare rilevanza alla resistenza alla meticillina / oxacillina.

La meticillina, la prima penicillina semisintetica resistente alle penicillasi, fu introdotta nella pratica clinica nel 1959.

La prima segnalazione di un isolato di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) segue di poco l'introduzione della meticillina in terapia.

Negli anni successivi, ceppi MRSA sono stati isolati con sempre maggiore frequenza, prima in Europa poi negli Stati Uniti, fino a diventare negli anni '80 uno dei principali problemi nel campo delle infezioni ospedaliere.

La meticillino resistenza negli stafilococchi isolati dagli animali domestici è stata documentata fin dagli anni '70 (Devriese LA, 1972), in particolare tale fenomeno nel cane è stato associato a *Staphylococcus intermedius* (ora *Staphylococcus Intermedius Group* - SIG) e *S. aureus* (Frank LA, 2003; Cania SA, 2004; Morris DO, 2006).

Storicamente, *S. aureus* è diventato molto presto resistente alla penicillina e proprio per combattere questi stipiti venne messo a punto l'antibiotico meticillina che non viene inattivato dalle beta-lattamasi (enzimi prodotti dai batteri resistenti per inattivare la penicillina) . per parecchi anni la meticillina è risultata efficace nel contrastare i ceppi di *S. aureus* resistenti ai beta-lattamici è ciò fino alla comparsa di stipiti di *S. aureus* resistenti

alla meticillina (ceppi MRSA) che divennero una delle principali cause di infezione in ambiente ospedaliero.

La meticillino-resistenza è un fenomeno di resistenza legato ad una alterazione della struttura bersaglio. Alla base di questo fenomeno troviamo la presenza nel genoma di un elemento mobile, la *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec), codificante per una variante della penicillin binding protein (PBP) con una ridotta affinità per la meticillina (Chambers et al, 1984; Tenover et al., 2006). In particolare, in *Staphylococcus aureus* e stafilococchi di specie diverse la resistenza alla meticillina è dovuta alla presenza, nella cassetta, del gene *mecA*, che codifica per una variante della *penicillin binding protein* (PBP) indicata come PBP2a. l'espressione genica per le PBP2a è sotto il controllo di un complesso di geni denominati *mec* (*nucleo mec*). Il gene *mecA* porta l'informazione per la proteina PBP2a, il gene *mec I* esprime una proteina che reprime l'espressione del *mecA*, infine il gene *mec RI* codifica l'espressione di una proteina che funge da coinduttore del gene *mec A*. questo complesso di geni ha una localizzazione cromosomiale, ma presenta anche elementi genetici mobili che vengono utilizzati per la diffusione attraverso plasmidi. Nel caso della resistenza alla meticillina è stata recentemente isolata e caratterizzata una proteina segnale transmembranaria. Il meccanismo è analogo a quello dell'attivazione dell'espressione genica delle beta-lattamasi: l'interazione tra la proteina segnale e l'antibiotico innesca un processo autoscissione proteolitica che dà origine ad un frammento proteico che inattivando il gene *mec I* promuove l'espressione del gene *mec A*. La cellula batterica, grazie alle PBP2a con attività transpeptidasiche e transglicolasiche, riesce a sintetizzare un peptidoglicano anche in presenza di meticillina, poiché l'affinità tra quest'ultimo e la PBP2a è molto scarsa.

Gli antibiotici β -lattamici normalmente agiscono legando le PBP in parete, inibendo la sintesi di peptidoglicano (componente fondamentale della parete batterica) e causando così la morte della cellula. La variante PBP2a è insensibile ai β -lattamici (non è in grado di legarli), pertanto può continuare la sua attività di sintesi anche in loro presenza, rendendo la loro azione del tutto inefficace (Deurenberg *et al.*, 2007).

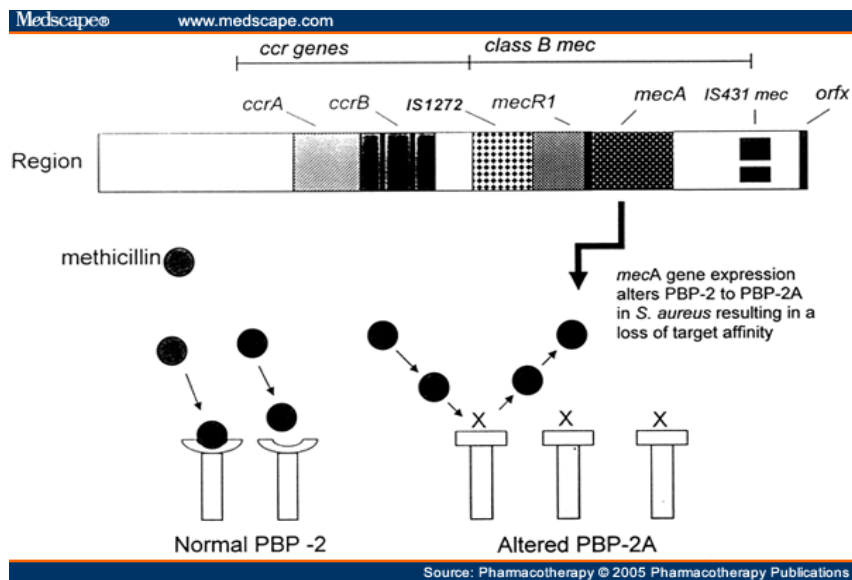


Fig. 1 – Meccanismo della meticillino resistenza

Aspetti epidemiologici

Trasmissione

La trasmissione di un agente infettivo può avvenire tra contatto diretto con l'animale portatore oppure tramite l'ambiente con il diretto contatto con le superfici contaminate.

Il meccanismo di trasmissione degli MRSA è simile a quello degli MSSA (meticillino sensibili, Kawada et al. 2003) ma esistono differenze per quanto riguarda la maggiore facilità di colonizzazione dei ceppi MRSA.

Il contatto con la cute è probabilmente la causa più frequente di infezione tra umani, umani ed animali, animali ed umani, animali ed animali; ma possono svolgere ruolo di vettori passivi anche materiali e superfici contaminate, alimenti e polvere (Asoh, N. *et al.*, 2005).

Il sovraffollamento e la mancanza di personale ospedaliero possono contribuire notevolmente ad aumentare l'inquinamento ambientale da MRSA e, quindi anche il rischio di trasmissione (Clements, A. *et al.*, 2008).

Un programma specifico di controllo per gli MRSA e una rigida applicazione delle misure igieniche possono consentire una riduzione dei rischi di trasmissione (Ben-David, D. *et al.*, 2008; Eveillard, M. *et al.*, 2006).

Negli ambienti i batteri trasportati dall'aria sono, di solito, adesi alle particelle di polvere di origine animale quali: cellule epiteliali, peli, lettiera, feci ecc.

Queste particelle sono trasportate dalle zone dove soggiornano gli animali attraverso i sistemi di condizionamento e ventilazione e possono contaminare gli ambienti circostanti (Gibbs, S.G. *et al.*, in 2006).

La concentrazione batterica nell'aria dipende dalla concentrazione degli animali nell'ambiente e la trasmissione è strettamente dipendente dalle condizioni ambientali come le condizioni meteorologiche, temperatura e umidità, mentre la dispersione

nell'ambiente circostante dipende dall'intensità del vento, direzione e turbolenza (Schulz, 2007).

Diffusione

La situazione attuale vede una distribuzione variegata tra i vari Paesi (ma anche tra i diversi ospedali dello stesso Paese) con prevalenza di ceppi resistenti che varia da meno del 1% nei Paesi baltici (Svezia, Norvegia, Finlandia, Estonia) fino a più del 40 % in altri Paesi (Grecia, Italia, Irlanda, Regno Unito).

Di estrema attualità è il tema della colonizzazione da MRSA dei medici veterinari. Gli MRSA sono attualmente considerati come un problema emergente in medicina veterinaria, essendo stati isolati da cavallo, cane, gatto, uccelli, bovini e suini.

Recentemente sono stati segnalati anche casi d'infezione da MRSA nelle persone a contatto con gli animali. La colonizzazione delle persone che lavorano a contatto con cavalli in USA e Canada è stata valutata dell'ordine del 13%, del 9,7% tra i veterinari per grossi animali e del 17,9% veterinari tra coloro che operano all'interno di un ospedale per piccoli animali in UK (Moodley A. et al, 2006; Loeffler A. et al, 2005).

In Italia le segnalazioni riguardano l'area di Roma, con isolamento di *Staphylococcus intermedius group* in corso di patologie cutanee del cane, durante un periodo di monitoraggio 2006-2008, con una prevalenza di 2,3% mentre valori inferiori pari a 0,4% erano segnalati *Staphylococcus aureus* meticillino resistente (MRSA) dal 2005 al 2007 (Moodley A. et al., 2008).

Nel cane il riscontro di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti va più frequentemente associato ad una trasmissione uomo-animale che cane-cane (Guardabassi L. et al, 2004).

Al contempo, l'animale domestico può costituire un serbatoio domestico di MRSA (Sing A. et al. 2008).

Attualmente il problema della meticillino-resistenza riguarda non solo *Staphylococcus aureus* ma anche altri stafilococchi, come *Staphylococcus intermedius group*, *Staphylococcus schleiferi* e stipiti di *Staphylococcus* coagulasi-negativi (Griffeth G.C. et al. 2008).

Questi ceppi multiresistenti limitano considerevolmente le opzioni terapeutiche e rendono pertanto di primaria importanza la valutazione della sensibilità o della resistenza alla meticillina in ogni caso di isolamento associato a problematica clinica.

Inoltre, l'elevata percentuale di resistenza indica la necessità di monitorare l'impiego degli antibiotici nella pratica veterinaria (Boost M. et al. 2008).

CAPITOLO 3

PROGETTO DI DOTTORATO:

“Patologie cutanee complicate da batteri nel cane: diagnosi e follow up.

Valutazione degli aspetti di farmaco resistenza”.

Nei tre anni di dottorato, ho svolto la mia attività prevalentemente presso l'Ospedale Universitario Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma (Dipartimento di Salute Animale), dove mi sono occupato in particolare di patologie dermatologiche, mentre la valutazione degli aspetti microbiologici è stata svolta presso la Sezione di Malattie Infettive degli animali del Dipartimento di Salute Animale della stessa Università.

Il protocollo di ricerca ha previsto: l'identificazione dei soggetti da inserire nello studio (cani con patologie cutanee e degli annessi cutanei), l'effettuazione di un esame citologico dalle lesioni, sui soggetti positivi per forme batteriche all'esame citologico è stato effettuato un esame colturale mediante il prelievo per apposizione di un tampone dalla lesione della cute o degli annessi. In base al risultato dell'esame colturale, è stata poi effettuata la tipizzazione dei batteri isolati e la valutazione dei caratteri di farmacoresistenza dei diversi stipiti batterici isolati.

Sono state inoltre approfonditi alcuni aspetti, in particolare inerenti a:

- Valutazione della prevalenza delle diverse specie batteriche isolate
- Valutazione della sensibilità degli stipiti batterici ai più comuni antibatterici in uso nella pratica clinica dermatologica.

- Valutazione della patogenicità di *Staph. epidermidis* nelle patologie dermatologiche del cane in base alla presenza di emolisine e resistenza agli antibiotici

Il protocollo delle visite cliniche è stato applicato alla intera casistica clinica; complessivamente, nel corso dei 3 anni di dottorato, sono stati visitati 204 soggetti con patologie della cute e degli annessi, con un numero di controlli successivi (follow up) pari a 592.

MATERIALI E METODI

Scelta dell'animale:

La scelta dell'animale da inserire nella ricerca è stata effettuata sulla base della presenza di lesioni che potevano indurre il sospetto di piodermite superficiale o profonda (papule, pustole, croste, bolle, con gradi diversi di essudazione) a carico della cute e annessi cutanei.

Il protocollo della visita clinica ha previsto la valutazione dello stato clinico dell'animale alla prima visita (giorno 0) e, in dipendenza dalla compliance del proprietario, a visite successive (follow up) ogni 3 settimane.

Protocollo diagnostico:

La visita clinica ha previsto il segnalamento (peso dell'animale, sesso, età, tipo e colore del mantello, alimentazione, genealogia e provenienza), l'esame obiettivo generale

(E.O.G), l'esame obiettivo particolare (E.O.P.), la raccolta dell'anamnesi con particolare riferimento all'ambiente interno od esterno in cui viveva il cane, il soggiorno in regioni o paesi particolari, la presenza di animali conviventi, le eventuali variazioni nell'ambito familiare, il contatto con altri animali o l'uomo, le attitudini e le abitudini comportamentali ed alimentari, le patologie pregresse o eventualmente in corso.

Il supplemento anamnestico per la patologia dermatologica ha riguardato la cronologia e l'evoluzione del quadro clinico dermatologico, comprensivo di esami di laboratorio eventualmente effettuati. Da ultimo, sono stati investigati gli eventuali elementi relativi a terapie locali e sistemiche effettuate dalla comparsa della patologia.

La visita dermatologica si è basata su un esame ispettivo e sull'applicazione di una serie di esami collaterali, quali lo scotch test, l'esame del raschiato superficiale e profondo per l'evidenziazione di eventuali forme parassitarie, l'esame microscopico del pelo, l'esame con la lampada di Wood per l'identificazione di eventuali forme micotiche da confermarsi mediante esame colturale per dermatofiti, l'esame citologico mediante prelievo per apposizione, per raschiato, per incisione, per infissione o per tampone. Sui soggetti che presentavano all'esame citologico granulociti neutrofili degenerati con batteri coccacei e bastoncellari intracitoplasmatici, è stato effettuato un prelievo (tampone) per l'effettuazione di un esame colturale.

I tamponi sono stati eseguiti per apposizione previo lavaggio della cute con soluzione fisiologica e mantenuti a temperatura di refrigerazione fino alla consegna in laboratorio (entro 4 ore).

Altri esami supplementari sono rappresentati da esami istologici, allergologici e sierologici.

- **Esame colturale**

I tamponi sono stati seminati su agar triptose (Bekton Dickinson, USA) addizionato di 5% di globuli rossi di bovino, agar Mc Conkey (Bekton Dickinson, USA) e agar Sabouraud (Bekton Dickinson, USA) ed incubati per 24-48 ore a 37°C per 24-48 ore in aria ed in atmosfera arricchita del 5% di CO₂. Dopo l'isolamento in purezza le colonie batteriche sono state identificate in base a caratteristiche morfologico-tintoriali e biochimiche, come colorazione di Gram, reazione della catalasi e della coagulasi (Slidex Staph Plus, bioMérieux, France).

In particolare, l'appartenenza al genere *Staphylococcus* è stata accertata mediante valutazione della morfologia delle colonie, colorazione di Gram, test di idrossido di potassio al 3% e positività al test della catalasi.

Su tutti i ceppi è stato eseguito il test della coagulasi e successivamente è stata effettuata l'identificazione di specie mediante API system: API 20 Staph (bioMérieux sa 69280 MARCY L'ETOILE-France).

Per i batteri Gram negativi l'identificazione di specie è stata effettuata mediante API system: API 20 E (bioMérieux sa 69280 MARCY L'ETOILE-France).

Per tutti gli stipiti batterici è stata valutata anche l'attitudine a produrre emolisine su terreno Agar sangue di bovino.

- **Valutazione della sensibilità agli antibiotici**

Su tutti gli stipiti isolati è stato eseguito un test di sensibilità ad antibiotici mediante la tecnica di Kirby-Bauer (Quin, et al., 1994). I principi attivi testati sono quelli di uso corrente nelle patologie del cane, adeguati per la terapia delle forme cutanee; inoltre, sono stati testati *in vitro* anche principi attivi per utilizzo topico o in uso in terapia umana. Il

panel degli antibiotici testati ha compreso 27 principi attivi: acido fusidico (10 µg), amikacina (30 µg), amoxicillina + ac. clavulanico (30 µg), apramicina (5 µg), cefadroxil (30 µg), cefalessina (30 µg), cefovecin (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clarithromicina (15 µg), clindamicina (2 µg), cloramfenicolo (30 µg), cloxacillina (5 µg), doxiciclina (30 µg), enrofloxacin (5 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), lincomicina (15 µg), marbofloxacina (5 µg), meticillina (10 µg), mupirocina (5 µg), oxacillina (1 µg), rifampicina (5 µg), rifaximina (40 µg), sulfametossazolo + thrimetoprim (25 µg), tilosina (30 µg), vancomicina (30 µg).

Sui ceppi risultati resistenti a meticillina e/o oxacillina è stato in seguito eseguito il test per l'individuazione della proteina PBP2a, da cui dipende la resistenza agli antibiotici sopraelencati, utilizzando il kit OXOID PENICILLIN BINDING PROTEIN (PBP2') LATEX AGGLUTINATION TEST (Oxoid, Hampshire, UK) secondo le istruzioni del produttore.

In genere, gli aloni di inibizione sono stati valutati in base alle indicazioni del produttore e secondo quanto previsto dalle indicazioni fornite dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Gli aloni di inibizione per gli antimicrobici topici (acido fusidico e mupirocina) sono stati definiti come precedentemente descritto da Fuchs et al (1990). Gli stipiti di stafilococchi sono stati considerati resistenti alla oxacillina se presentavano un alone di inibizione < 10 mm (CLSI, 2008) e resistenti alla meticillina se presentavano un alone di inibizione <9mm (CLSI, 2005). Per gli stipiti di SIG i nostri dati sono stati considerati sulla base dei diametri degli aloni di inibizione stabiliti da Bemish et al (2009), che considerava resistenti gli stipiti che mostravano un alone di inibizione di diametro <17mm.

CAPITOLO 4

RISULTATI

Il protocollo delle visite cliniche è stato applicato all'intera casistica clinica; complessivamente, nel corso dei tre anni di dottorato sono stati visitati 204 soggetti con patologie della cute e degli annessi cutanei, con un numero di controlli successivi (follow up) pari a 592.

All'interno di questo gruppo, è stato possibile identificare in base ai caratteri clinici, un sottoinsieme di casi poi sottoposti ad ulteriori accertamenti diagnostici e inseriti nella casistica relativa al tema del dottorato:

- Piodermi primarie n: 11
- Piodermi secondarie n: 37
- Atopie n: 15
- Patologie a probabile eziologia allergica n: 8
- Patologie parassitarie n: 5
- Patologie tumorali n: 2
- Patologie endocrine n: 2
- Patologie autoimmuni n: 1
- Patologie metaboliche n: 0
- Patologie idiopatiche n: 4
- Otiti n: 16

I soggetti con piodermi primarie presentavano lesioni focali o multifocali con alopecia parziale e/o completa, papule e/o pustole, eritema, collaretti epidermici e croste; le lesioni

erano localizzate soprattutto a livello di doso, muso ed addome. Il prurito non era sempre presente. Nei soggetti con piodermiti secondarie le lesioni presentavano ampia variabilità nel tipo e nella localizzazione in rapporto alla patologia primaria.

I soggetti atopici presentavano prurito generalizzato o localizzato soprattutto alle zampe, muso ed addome, eritema cutaneo, lesioni da autotraumatismo con papule, pustole, croste, collaretti epidermici.

In molti soggetti era presente pododermatite con eritema degli spazi interdigitali e bolle a contenuto siero emorragico o purulento (figura 1 e 2)



Figura 1: lesione bollosa interdigitale in soggetto atopico



Figura 2: lesioni bollose interdigitali in un cane affetto da dermatite atopica

In alcuni casi era presente congiuntivite bilaterale, otite e/o sacculite.

Alcuni cani presentavano lesioni che per tipo e localizzazione erano riferibili a dermatite allergica da pulci, successivamente confermata con l'isolamento del parassita e successiva buona risposta terapeutica ai trattamenti antiparassitari (figura 3)

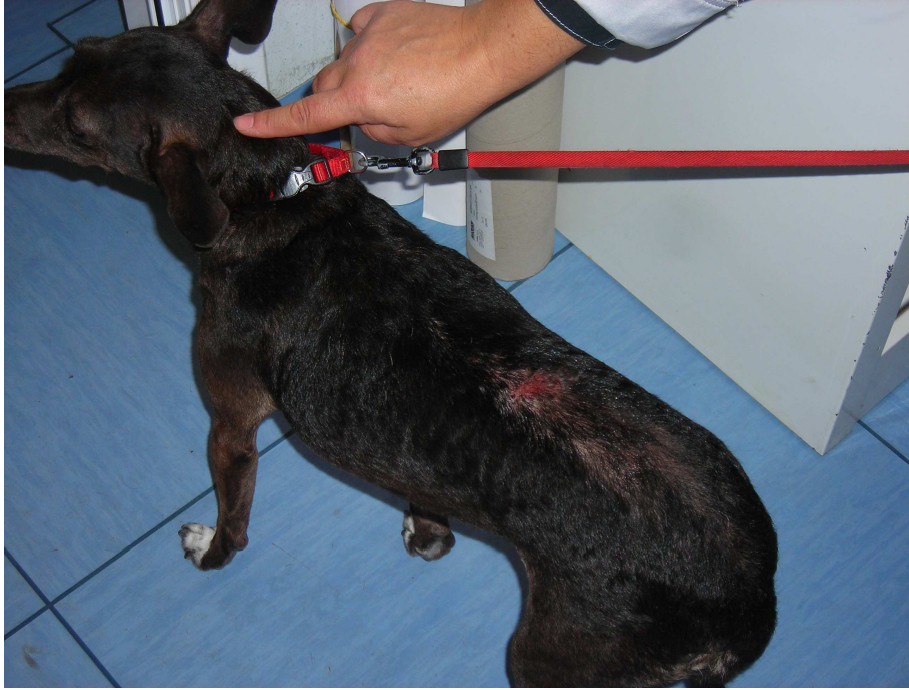


Figura 3: lesione erosiva in regione lombo sacrale in soggetto con Dermatite Allergica da Pulci

Due casi presentavano lesioni erosive a livello della borsa scrotale con essudazione e croste, riferibili a dermatite da contatto.

Le patologie parassitarie identificate sono state demodicosi e rogna sarcoptica. Nei casi di demodicosi i soggetti presentavano piodermite profonda con moderato eritema, papule o pustole follicolari, alopecia parziale o completa, prurito più o meno intenso. Le lesioni erano localizzate soprattutto a livello di arti, parte ventrale di collo e testa (soprattutto zona perioculare), dorso (figura 4)



Figura 4: papule e pustole follicolari in un cane affetto da demodicosi

I soggetti con rogna sarcoptica presentavano, invece, prurito molto intenso, eritema cutaneo diffuso soprattutto a livello di arti, gomiti, padiglioni auricolari, muso e dorso con presenza di papulo-croste e scaglie (figura 5).



Figura 5: lesioni cutanee in un cane affetto da rogna sarcoptica

I due soggetti con patologia tumorale erano affetti rispettivamente da linfoma cutaneo e mastocitoma.

Il cane con linfoma cutaneo presentava una lesione a livello di tartufo con erosione, ulcera, croste e depigmentazione con perdita della normale struttura anatomica.

Nel caso di mastocitoma, invece, la lesione era localizzata alla base della coda, rappresentata da un nodulo eritematoso, con lesioni da autotraumatismo.

Le patologie endocrine riscontrate sono state l'ipotiroidismo e l'ipercorticosurrenalismo (Morbo di Cushing).

Nel primo caso il cane presentava ipotricosi diffusa, alopecia completa a livello addominale, fianchi e coda. Erano presenti lesioni secondarie da autotraumatismo con ulcerazioni, eritema e croste, soprattutto a livello di fianchi, addome e coda.

Il soggetto con Morbo di Cushing, invece, presentava alopecia diffusa soprattutto a livello addominale con presenza di comedoni, lesioni da autotraumatismo ed assottigliamento cutaneo.

L'unico soggetto con patologia autoimmune è risultato affetto da Pemfigo foliaceo e presentava lesioni diffuse, pruriginose, crostose, eritematose ed erosive soprattutto a livello del dorso e padiglioni auricolari (figura 6).



Figura 6: lesioni cutanee in un cane con Pemfigo foliaceo

FOLLOW UP

Successivamente alla visita clinica i soggetti sono stati sottoposti ad adeguata terapia. In particolare l' e rivalutati con visite di follow up ogni 20 giorni per controllarne il quadro clinico ed adeguare il protocollo terapeutico in relazione alle condizioni cliniche.

I soggetti con piodermiti primarie hanno avuto una percentuale di guarigione del 100% e sono stati dimessi, nella maggior parte dei casi, in occasione del secondo controllo di follow up.

Nei soggetti che presentavano piodermiti secondarie la remissione della sintomatologia è stata fortemente influenzata dalla patologia primaria in causa.

La guarigione o il controllo della sintomatologia è stato buono nella maggior parte dei casi (vedi figure 6-7-8 tranne che nei soggetti con patologia tumorale che hanno dimostrato

una buona risposta terapeutica alla terapia antimicrobica con guarigione dell'infezione secondaria ma sono stati sottoposti ad eutanasia a causa della grave patologia primaria.



Figura 7: follow up a 60 gg del cane in fig. 1



Figura 8: follow up a 60 gg del cane in figura 3



Figura 9: follow up a 60 gg del cane in fig. 4



Figura 10: follow up a 40 gg del cane in fig. 5



Figura 11: follow up a 60 gg del cane in fig. 6

Risultati esami colturali

Complessivamente, dagli esami batteriologici effettuati sono stati isolati :

Staphylococcus aureus : n.56

Staphylococcus intermedius group : n.20

Staphylococcus xylosum: n. 7

Staphylococcus sciuri : n. 2

Staphylococcus hominis : n. 1

Staphylococcus epidermidis: n.10

Streptococcus spp.: n.1

Pseudomonas aeruginosa: n. 6

E. coli: n. 10

Pantoea spp.: n.1

Protes mirabilis: n.4

Pasteurella multocida n.3

Il numero e la specie degli isolati batterici, unitamente alle sensibilità agli antibiotici testati, sono riportati nella Tabella 1.

Tabella 1. Numero (%) degli isolati batterici sensibili agli antibiotici testati.

Antibiotic	Staph. aureus n=56	Staph. intermedius group (SIG) n=20	Staph. xylosum n=7	Staph. sciuri n=2	Staph. hominis n=1	Staph. epidermidis n=10	Streptococci spp. n=1	Pseudomonas aeruginosa n=6	E. coli n=10	Pantoea spp n=1	Pasturella multocida n=3	Proteus mirabilis n=4
Amikacin (30 µg)	9 (16,07%)	6 (30%)	2 (28,57%)	1 (50%)	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)	4(66,75)	1 (10%)	1 (100%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Amox. + Clav. acid (30 µg)	33 (58,92%)	10 (50%)	5 (71,42%)	2 (100%)	1 (100%)	6 (60%)	0 (0%)	10,71	3 (30%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (25%)
Apramicin (5 µg)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	2 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Cefadroxil (30 µg)	43 (76,78%)	17 (85%)	5 (71,42%)	2 (100%)	1 (100%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (10%)	1 (100%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Cefalexin (30 µg)	39 (69,64%)	14 (70%)	4 (57,14%)	2 (100%)	1 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Cefovecina 30 mcg (33.3%)	42 (75%)	15 (75%)	3 (42,85%)	2 (100%)	1 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	1 (16,7%)	4 (40%)	1 (100%)	1 (33,3%)	1 (25%)
Ciprofloxacin (5 µg)	26 (46,43%)	8 (40%)	1 (14,28%)	2 (100%)	0 (0%)	3 (30%)	0 (0%)	5 (83,3%)	4 (40%)	1 (100%)	1 (33,3%)	2(50%)
Chlarithromycin (15 µg)	12 (21,43%)	8 (40%)	3 (42,85%)	2 (100%)	0 (0%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Clindamicin (2 µg)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Chloramphenicol (30 µg)	34 (60,71%)	16 (80%)	6 (85,71%)	2 (100%)	1 (100%)	7 (70%)	0 (0%)	1 (16,7%)	6 (60%)	1 (100%)	1 (33,3%)	1 (25%)
Cloxacillin (5 µg)	37 (60,07%)	14 (70%)	4 (57,14%)	2 (100%)	1 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Doxiciclin (30 µg)	46 (82,14%)	18 (90%)	5 (71,42%)	2 (100%)	1 (100%)	7 (70%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (40%)	1 (100%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Enrofloxacin (5 µg)	27 (48,21%)	14 (70%)	3 (42,85%)	2 (100%)	1 (100%)	5 (50%)	0 (0%)	2 (33,3%)	6 (60%)	1 (100%)	0 (0%)	2 (50%)
Erythromicin (15 µg)	0 (0%)	1 (5%)	1 (14,28%)	1 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Fusidic Acid (10 µg)	15 (26,78%)	5 (25%)	2 (28,57%)	1 (50%)	0 (0%)	4(40%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Gentamicin (10 µg)	16 (28,57%)	9 (45%)	3 (42,85%)	1 (50%)	0 (0%)	7 (70%)	0 (0%)	1 (16,7%)	3 (30%)	1 (100%)	3 (100%)	2(50%)
Imipenem (10 µg)	55 (98,21%)	19 (95%)	7 (100%)	2 (100%)	1 (100%)	10 (100%)	0 (0%)	6 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	1 (33,3%)	4 (100%)
Lyncomicin (15 µg)	6 (10,71%)	9 (45%)	2 (28,57%)	1 (50%)	0 (0%)	3 (30%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Marbofloxacin (5 µg)	36 (64,28%)	14 (70%)	4 (57,14%)	2 (100%)	0 (0%)	7 (70%)	0 (0%)	5 (83,3%)	6 (60%)	1 (100%)	1 (33,3%)	1 (25%)
Methicillin (5 µg)	36 (64,28%)	15 (75%)	3 (42,85%)	2 (100%)	0 (0%)	6 (60%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Mupirocin (5 µg)	37 (60,07%)	14 (70%)	5 (71,42%)	2 (100%)	1 (100%)	5 (50%)	1(100%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Oxacillin (1 µg)	31 (55,35%)	14 (70%)	3 (42,85%)	2 (100%)	0 (0%)	5 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (66,6%)	0 (0%)
Riphampicin (5 µg)	47 (83,93%)	14 (70%)	3 (42,85%)	2 (100%)	1 (100%)	7(70%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (100%)	3 (100%)	0 (0%)
Rifaximin (40 µg)	45 (80,36%)	14 (70%)	4 (57,14%)	2 (100%)	0 (0%)	8 (80%)	0 (0%)	1 (16,7%)	0 (0%)	1 (100%)	0 (0%)	1 (25%)
Sulfam. + Thrim. (25 µg)	6 (10,71%)	4 (20%)	0 (0%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (20%)	1 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Tylosin (30 µg)	1 (1,78%)	2 (10%)	1 (14,28%)	1 (50%)	0 (0%)	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (33,3%)	0 (0%)
Vancomicin (30 µg)	42 (75%)	18 (90%)	6 (85,71%)	2 (100%)	1 (100%)	8 (80%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Come atteso, gli stafilococchi rappresentano la percentuale maggiore degli isolati, essendo pari a n. 96 (81.35%) sul totale degli stipiti (n. 121).

Sul totale degli stafilococchi, n. 34 stipiti sono risultati resistenti a meticillina (35.4%) e n. 41 stipiti sono risultati resistenti alla oxacillina (42.7%). Successivamente, la valutazione della presenza del gene *mecA* mediante valutazione della presenza di PBP2a ha dato risultato positivo in n. 17 stipiti (17.7%), appartenenti a specie diverse di stafilococchi (vedi Tabella 2).

Tabella 2. Resistenza alla Meticillina/Oxacillina e produzione di PBP2a negli isolati di stafilococchi.

Specie batterica	Numero degli isolati	Stipiti oxacillino	Stipiti meticillino	PBP2a positivi
		resistenti al metodo Disc diffusion	resistenti al metodo Disc diffusion	
- <i>Staph. aureus</i>	56	25	20	10
Staph. intermedius group	20	6	5	3
Staph. xylosus	7	4	2	4
Staph. epidermidis	10	5	6	0
Staph. sciuri	2	0	0	0
Staph. hominis	1	1	1	0
<i>Totale</i>	96	41	34	17

Successivamente è stata valutata la concordanza/discordanza dell'attività di meticillina/oxacillina in base al test Kirby/Bauer ed ai parametri relativi agli aloni di inibizione precedentemente menzionati, rilevando la presenza di 20 stipiti di stafilococchi in cui solo uno dei due antibiotici testati mostrava attività o resistenza. Anche in tal caso si è proceduto alla valutazione della presenza del gene *mecA* rilevando n: 6 stafilococchi portatori del gene (vedi Tabella 3).

Tabella 3. Discordanza tra l'attività di meticillina e oxacillina in 20 casi di isolati di Stafilococchi.

Stipite	Diametro dell'alone di inibizione della Meticillina (mm)	Diametro dell'alone di inibizione della Oxacillina (mm)	PBP2a Agglutination test
Caso 50. <i>S. intermedius</i> group	24 (S)	0 (R)	-
Caso 53. <i>S. intermedius</i> group	0 (R)	22 (S)	-
Caso 54. <i>S. intermedius</i> group	22 (S)	0 (R)	-
Caso 40. <i>S. xylosus</i>	14 (I)	26 (S)	+
Caso 51. <i>S. xylosus</i>	20 (S)	0 (R)	+
Caso 59. <i>S. xylosus</i>	15 (S)	0 (R)	-
Caso 7. <i>S. aureus</i>	20 (S)	0 (R)	+
Caso 14. <i>S. aureus</i>	14 (I)	0 (R)	+
Caso 19. <i>S. aureus</i>	24 (S)	0 (R)	-
Caso 32. <i>S. aureus</i>	0 (R)	11 (I)	-
Caso 55. <i>S. aureus</i>	12 (I)	0 (R)	-
Caso 56. <i>S. aureus</i>	12 (I)	0 (R)	-
Caso I. <i>S. aureus</i>	22 (S)	0 (R)	-
Caso II. <i>S. aureus</i>	24 (S)	0 (R)	-
Caso III. <i>S. aureus</i>	22 (S)	0 (R)	+
Caso IV. <i>S. aureus</i>	21 (S)	0 (R)	-
Caso V. <i>S. epidermidis</i>	25 (S)	0 (R)	-
Caso VI. <i>S. epidermidis</i>	24(S)	0 (R)	-
Caso VII. <i>S. aureus</i>	15 (I)	0 (R)	+
Caso VIII. <i>S. epidermidis</i>	14(I)	25 (S)	-

Tutti gli stipiti di *Staphylococcus epidermidis* isolati sono risultati produttori di emolisine. Su di essi sono state valutate inoltre le sensibilità agli antibiotici (vedi Tabella 4) ritenendo il rilevamento di emolisine come un importante fattore di patogenicità, da valutare in corso di terapia.

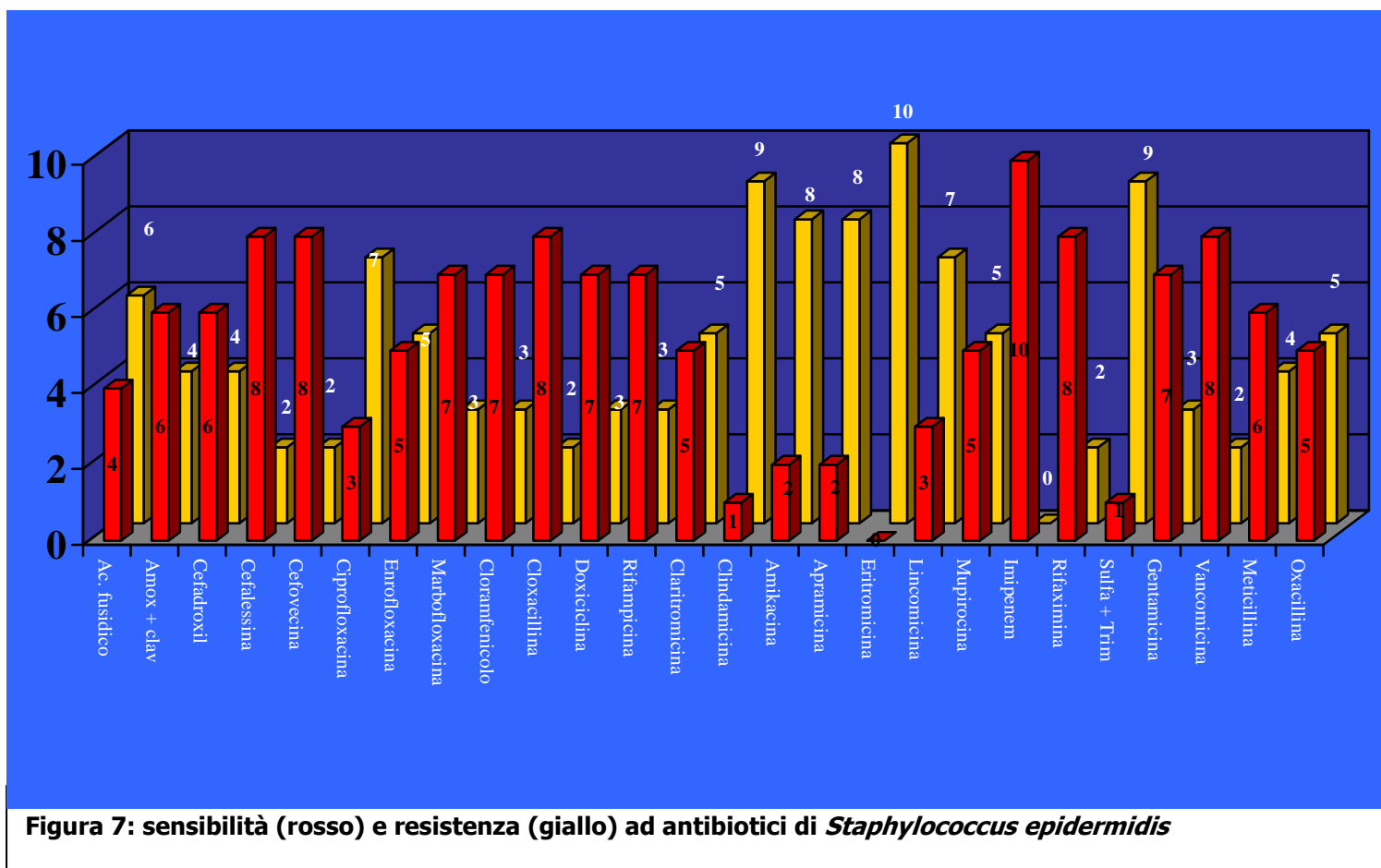
Infatti, se *Staphylococcus epidermidis* non emolitico viene isolato normalmente da cute di soggetti sani senza che si renda necessario sottoporre il soggetto a terapia, il reperimento

di emolisine in tali stipiti riveste un significato patologico, rappresentando essa un fattore di citotossicità, e richiedendo in questo senso l'applicazione di un protocollo terapeutico simile a quello riservato a stipiti tradizionalmente patogeni come *Staph. aureus*.

- Antibiotici	Ceppo: 1 emolitico	Ceppo: 2 emolitico	Ceppo: 3 emolitico	Ceppo: 4 emolitico	Ceppo: 5 emolitico	Ceppo: 6 emolitico	Ceppo: 7 emolitico	Ceppo:8 emolitico	Ceppo:9 emolitico	Ceppo: 10 emolitico
Acido fusidico	S	R	S	I	R	R	R	R	R	I
Amoxicillina + ac. clavulanico	S	S	R	S	R	R	R	S	S	S
Cefadroxil	S	R	R	S	I	R	R	S	S	S
Cefalessina	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Cefovecina	S	R	S	S	I	R	R	S	S	S
Ciprofloxacina	I	R	S	R	I	I	I	S	S	S
Cloramfenicolo	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
Cloxacillina	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S
Doxiciclina	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
Meticillina	S	S	S	I	S	R	R	S	R	S
Rifampicina	S	R	I	S	S	I	R	R	S	S
Claritromicina	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S
Marbofloxacina	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
Penicillina G	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amikacina	R	S	I	R	R	R	R	R	I	S
Apramicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Clindamicina	I	R	R	R	I	R	R	R	I	S
Enrofloxacina	S	S	S	I	I	S	I	S	S	S
Eritromicina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Imipenem	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
Lincomicina	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
Mupirocina	R	R	R	S	I	R	R	S	R	S
Oxacillina	S	R	R	S	R	R	R	S	R	S
Rifaximina	S	R	S	S	I	S	I	R	S	S
Sulfa + Trim	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Vancomicina	S	I	S	S	S	R	S	R	S	S
Gentamicina	I	R	S	S	I	R	S	S	S	S

Tabella 4: sensibilità ad antibiotici di stipti di *Staphylococcus epidermidis*

Dai risultati ottenuti, è da sottolineare come tutti gli stipti di *Staphylococcus epidermidis* siano risultati resistenti a Eritromicina, mentre 9 stipti su 10 sono risultati resistenti a Clindamicina e all'associazione Sulfametossazolo + Trimethoprim. 8 stipti su 10 sono risultati resistenti a Amikacina, Apramicina e mentre le percentuali relative alle resistenze agli altri antibiotici testati risultano inferiori al 60%.



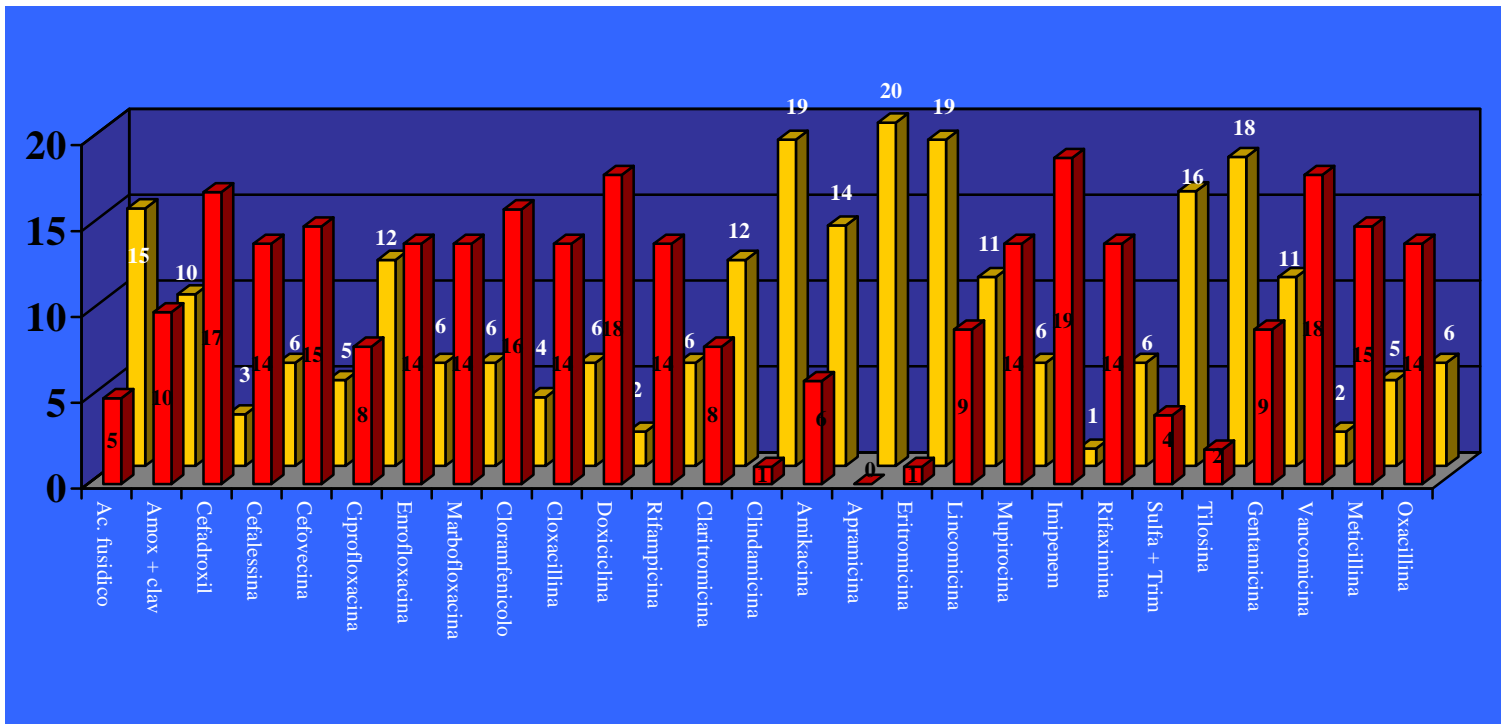


Figura 8: sensibilità (rosso) e resistenza (giallo) ad antibiotici di *Staphylococcus intermedius group (SIG)*

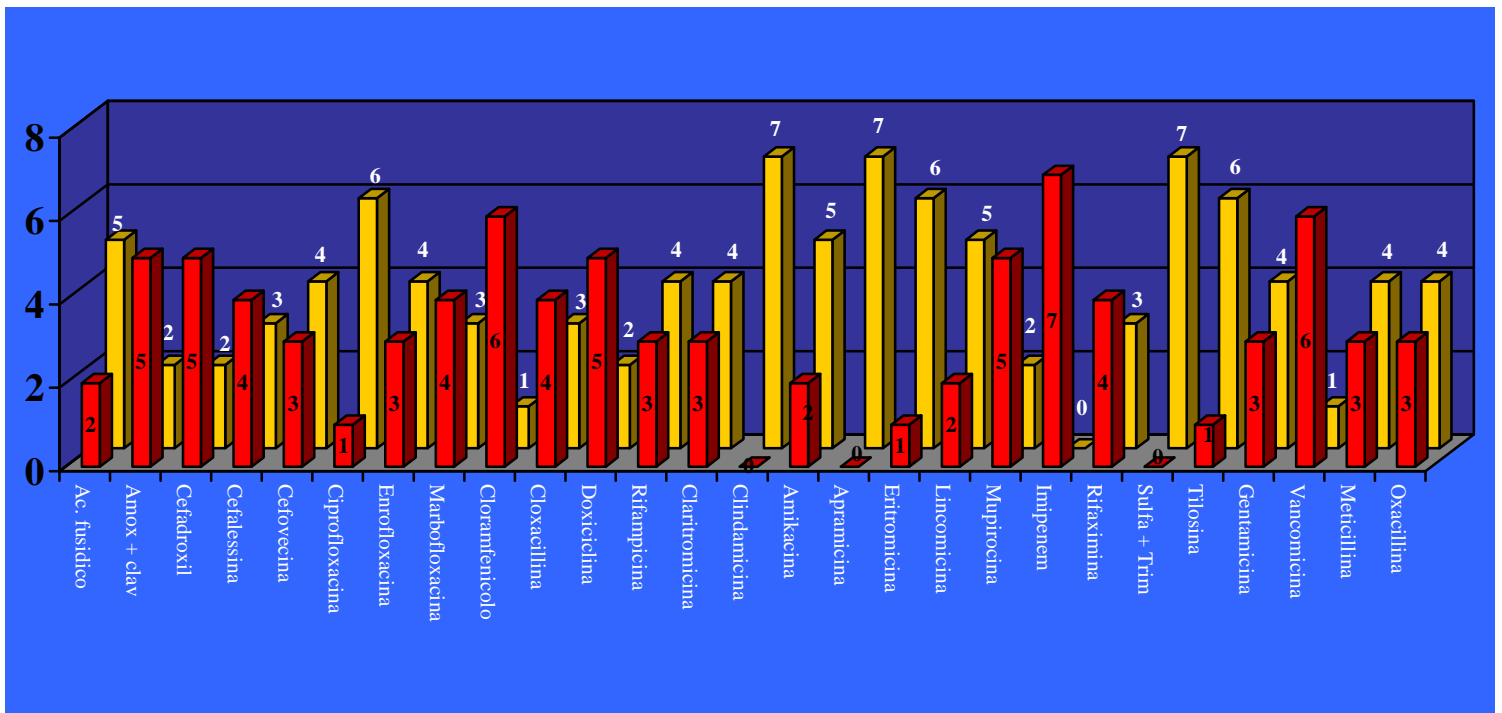


Figura 9: sensibilità (rosso) e resistenza (giallo) ad antibiotici di *Staphylococcus xylosus*

La disamina delle sensibilità ad antibiotici relativa a *Staphylococcus xylosus* (fig.9) mostra una resistenza totale nei confronti di Apramicina, Clindamicina e dell'associazione

Sulfametossazolo + Trimetoprim mentre 6 stipiti su 7 sono risultati resistenti a Ciprofloxacina, Tilosina ed Eritromicina. 5 stipiti su 7 sono risultati resistenti ad Acido fusidico, Lincomicina e Amikacina. Da segnalare una percentuale di resistenza superiore al 50% degli stipiti nei confronti di Meticillina e Oxacillina.

I valori di antibiotico resistenza relativi a *Staphylococcus intermedius* group (SIG) (fig.8) mostrano una totale resistenza nei confronti di Apramicina mentre 19 stipiti su 20 sono resistenti a Clindamicina ed Eritromicina; 18 stipiti su 20 sono resistenti a Tilosina.

Nei confronti di Meticillina e Oxacillina i valori di resistenza percentuali sono del 25% e 30%, rispettivamente.

Con l'eccezione di due casi, tutti i campioni hanno mostrato crescita batterica in coltura pura, con un numero di colonie >10 per ciascun campione. Nelle colture miste, sono stati isolati in un caso *E. coli* + *Pantoea spp*, e nell'altro *E. coli* + *Pseudomonas aeruginosa*. Gli isolati batterici non appartenenti al genere *Staphylococcus*, già descritti, appartengono in un caso al genere *Streptococcus*, mentre i rimanenti isolati appartengono alla famiglia *Enterobacteriaceae* (n: 15/121, pari a 12.39%), *Pseudomonas aeruginosa* (n.6/121, 4.95%), e *Pasteurella multocida* (n.3/121, 2.48%).

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel mio periodo di dottorato ho, innanzitutto, cercato di eseguire un corretto approccio diagnostico alla patologia dermatologica con l'applicazione di un protocollo diagnostico standard in tutti i soggetti che venivano presentati alla visita clinica. Tale protocollo deve condurre alla corretta identificazione delle specie batteriche responsabili di infezioni cutanee e successiva valutazione delle sensibilità o resistenze ai farmaci antibiotici per impostare una corretta terapia.

Tale metodica risulta, infatti, indispensabile per giungere ad una corretta diagnosi ed evitare inutili dispendi in termini di tempo, denaro, ma soprattutto per evitare inutili terapie all'animale, che talvolta risultano essere anche controproducenti in termini di prognosi. I risultati ottenuti mostrano una maggiore prevalenza dei batteri appartenenti al genere *Staphylococcus*, pur rilevando anche specie batteriche diverse, sia Gram positivi (es. *Streptococcus spp.*) e batteri Gram negativi (*Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Pantoea*, *Proteus mirabilis* e *Pasteurella multocida*). Particolare attenzione è stata riservata anche agli stipti di *S. epidermidis* produttori di emolisine, in quanto ritenuti rivestire ruolo di patogeno per l'espressione di un fattore di patogenicità non manifestato negli stipti comunemente isolati da cute di cani sani (*S. epidermidis* non emolitici).

Tutte le specie batteriche sono state sottoposte a valutazione della sensibilità ai più comuni antibiotici utilizzati nella terapia dermatologica; abbiamo inoltre testato anche alcuni principi attivi non utilizzabili nella pratica clinica ma che risultano interessanti dal punto di vista scientifico per la valutazione della farmaco resistenza di alcuni stipti.

In base ai nostri dati, si può affermare che gli antibiotici che hanno un'attività in almeno il 50 % dei ceppi di Stafilococchi isolati sono stati:

- amoxicillina + acido clavulanico
- cefadroxil
- cefalessina
- cefovecina
- cloramfenicolo
- cloxacillina
- doxiciclina
- mupirocina
- rifampicina
- vancomicina

mentre imipenem presenta una attività, addirittura, superiore al 90%.

L'attività dei fluorochinoloni, *in vitro*, risulta invece limitata, non superando in molti casi il 50% degli stipti isolati.

Per gli stipti di *S. epidermidis* isolati i dati relativi alle sensibilità ad antibiotici mostrano una sostanziale concordanza con i dati riportati per gli altri isolati di stafilococchi di specie diverse, tranne che per i fluorochinoloni, dove almeno il 90% degli stipti di *S. epidermidis* isolati risultano sensibili.

Per *Pseudomonas aeruginosa* è stata osservata un' ampia sensibilità solo nei confronti di amikacina, ciprofloxacina, imipenem, marbofloxacina. Il profilo di attività antimicrobica riguardante le *Enterobctteriaceae* mostra un ampio livello di resistenza ad apramicina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, ac. fusidico, lincomicina, mupirocina, tilosina, vancomicina e, come atteso, a cloxacillina, meticillina e oxacillina. Similmente, tutti gli isolati di *Pasteurella multocida* sono risultati resistenti ad amoxicillina + acido clavulanico,

claritromicina, enrofloxacin, rifaximina, sulfametossazolo+trimethoprim e vancomicina. Sulla base dei criteri espressi da Cox et al. (1988), in base ai quali le piastre con sviluppo di meno di 10 colonie vengono considerate indicative di batteri residenti, tutti i batteri isolati devono essere considerati residenti. La crescita abbondante delle colture pure ottenute in tutti i casi tranne 2 potrebbe essere indicativa del coinvolgimento degli isolati batterici nello sviluppo delle lesioni (May, 2006). Gli isolati di stafilococchi hanno avuto una prevalenza di 79.33% su tutti gli isolati. Un fattore di rischio per la salute dell'uomo e degli animali è rappresentato dalla presenza, nel genoma batterico, di geni codificanti per multiresistenza nei confronti dei farmaci antibatterici, resistenza a meticillina/oxacillina, o semplicemente la resistenza fenotipica a meticillina/oxacillina valutata in base al metodo disk-diffusion secondo Kirby-Bauer (Bemis et al., 2009). Pertanto, una determinazione accurata della resistenza a meticillina/oxacillina diventa di importanza critica per gli aspetti clinici, terapeutici e microbiologici. *S. pseudintermedius* viene considerato il più comune agente eziologico nella pododermite del cane (Lloyd, 2007), tanto che Devriese e coll. (2009) hanno proposto che gli isolati canini identificati con metodi tradizionali siano considerati tutti come *S. pseudintermedius* a meno che siano identificati attraverso metodologie di identificazione genomica. Tuttavia, dal momento che *S. intermedius* e *S. pseudintermedius* non possono essere distinti fenotipicamente sulla base dei test biochimico-metabolici impiegati, abbiamo indicato tutti questi stipti come appartenenti al SIG (*Staphylococcus intermedius group*). Bemis e coll (2009) hanno dimostrato che i criteri interpretativi correntemente raccomandati da CLSI per gli aloni di inibizione di meticillina/oxacillina non sono sufficienti per rilevare tutti i gli stipti caratterizzati da resistenza associata al gene *mecA* in *S. pseudintermedius*, mentre i criteri precedentemente adottati (2004-2008) da CLSI sono in accordo con i gradienti di diffusione ed il reperimento del gene *mecA*. Un diametro di inibizione della oxacillina <17mm viene considerato un accurato indicatore di resistenza correlata al gene *mecA*.

Nel nostro caso, sono stati isolati 20 stipti appartenenti a SIG, tutti con un alone di inibizione della oxacillina >19mm (sensibili) o pari a zero (totalmente resistente), e nessuno ha mostrato resistenza alla meticillina. Tre stipti di SIG sono risultati positivi a PBP2a, confermando i dati rilevati in letteratura (Jones et al., 2007). Nel nostro caso, gli stipti di SIG hanno mostrato un grado di sensibilità all'attività degli antibiotici testati inferiore rispetto a quella riportata per agli stipti isolati in Italia, dove la percentuale di sensibilità è superiore a 85% degli stipti (Vanni et al, 2009). A differenza di quanto riportato per gli altri stipti di stafilococchi, come espresso precedentemente, nessuno antibiotico testato ha presentato un ampio spettro nei confronti dei batteri Gram negativi. In tal caso risulta, pertanto, difficile suggerire una terapia antibiotica empirica in caso di citologia positiva per tali batteri senza il risultato di un test di sensibilità ad antibiotici. Occorre anche sottolineare l'importanza dell'alto livello di sensibilità ad imipenem rilevato sugli stipti da noi isolati, con l'eccezione di *Pasteurella multocida*. Questo antibiotico non è utilizzato routinariamente in medicina veterinaria, ma prevalentemente in medicina umana (Tejedor Junco e Martin Barrasa, 2002). Nella nostra opinione, che l'uso di imipenem dovrebbe essere limitato, specialmente in medicina veterinaria, a quei casi che non possono essere trattati con farmaci diversi, per minimizzare il rischio della comparsa di fenomeni di farmaco-resistenza nei batteri, in particolare quei batteri che rivestono un potenziale ruolo zoonosico. I dati relativi agli stipti da noi isolati dimostrano una resistenza nei confronti di antibiotici comunemente utilizzati come prima scelta in molte formulazioni dermatologiche veterinarie. La consapevolezza ed il monitoraggio della resistenza nei confronti dei principi antimicrobici negli stipti batterici isolati da animali devono rivestire la massima importanza dal momento che fenomeni di farmaco-resistenza nei patogeni animali possono condurre a fallimenti terapeutici nei singoli pazienti e possono porre le basi per un aumentato rischio zoonosico nel proprietario, nel personale veterinario, e in tutti coloro che vengono a contatto con tale paziente. Tale fenomeno è

stato dimostrato per gli stipti meticillino resistenti di *S. aureus* e *S. pseudintermedius* (Jones et al, 2007; Manian, 2003). Infatti, *S. pseudintermedius* viene isolato occasionalmente in corso di infezioni umane anche gravi, e l'emergenza e la diffusione di stipti di *S. pseudintermedius* meticillino-resistenti rivestono grande importanza in campo veterinario e nel campo della Sanità Pubblica (Bannhoer et al., 2009).

In conclusione, possiamo suggerire l'applicazione di uno stretto protocollo diagnostico basato sulla esecuzione di un esame citologico iniziale e da un esame batteriologico che consenta l'identificazione della stipte fino a livello di specie; successivamente, dai risultati ottenuti si evince l'importanza di eseguire test di sensibilità ad antibiotici quando il quadro clinico e citologico lo richiedono per poter prescrivere una terapia antibiotica efficace e per ridurre il rischio di selezionare ceppi antibiotico-resistenti.

Essendo la piodermite del cane una patologia assolutamente molto frequente e quindi la causa più comune di trattamento antimicrobico, essa costituisce una difficile sfida terapeutica, ostacolata molto spesso dalla complessa eziologia della malattia primaria sottostante o da fattori ospite-dipendenti.

Occorre, inoltre, sottolineare il potenziale ruolo zoonosico di alcuni stipti batterici isolati, in particolare gli stipti meticillino resistenti, che possono rappresentare un vero e proprio problema di Sanità Pubblica causando gravi infezioni nell'uomo e la loro comparsa negli animali da compagnia comporta dei rischi sanitari sia per i proprietari che per il personale veterinario.

Negli animali il trattamento delle infezioni causate da batteri multiresistenti risulta essere molto più difficile che nell'uomo dal momento che alcuni principi attivi (vancomicina, o imipenem) non sono registrati per gli animali e sono estremamente costosi.

La scelta dell'antibiotico deve, quindi, basarsi sull'attività verso le specie bersaglio, valutabile in vitro, ma il protocollo terapeutico deve essere multifattoriale tenendo ben presente i corretti schemi di dosaggio e la corretta durata della terapia, l'eliminazione della

causa primaria della piodermite, la possibilità di utilizzare in associazione farmaci antisettici per uso topico e il corretto controllo della compliance del proprietario.

BIBLIOGRAFIA

- Asoh, N., Masaki, H., Watanabe, H., Watanabe, K., Mitsusima, H., Matsumoto, K., Oishi, K. and Nagatake, T., 2005. Molecular characterization of the transmission between the colonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to human and environmental contamination in geriatric long-term care wards. *Intern Med* 44 (1), 41-45.
- Bannoeh J., Ben Zakour N.L., Waller A.S., Guardabassi L., Thoday K.L., Van Den Broek A.H., Fitzgerald J.R. (2007). Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. *J Bacteriol.* **189**, 8685-8692.
- Bannoehr J., Franco A., Iurescia M., Battisti A., Fitzgerald J.R. (2009) - Molecular diagnostic identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol.* **47**, 469-471.
- Bemis DA, Jones RD, Frank LA, Kania SA. – Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict mecA-mediated resistance in *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 21(1):53-8, 2009
- Ben-David, D., Mermel, L.A. and Parenteau, S., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission: the possible importance of unrecognized health care worker carriage. *Am J Infect Control* 36 (2), 93-97.
- Boost MV, O'Donoghue MM, James A – Prevalence of *Staphylococcus aureus* carriage among dogs and their owners. *Emidemiol. Infect.* 136 (7), 953-64, 2008
- Cerundolo R. et al. – Recurrent deep pyoderma in German shepherd dogs with underlying ehrlichiosis and hyperglobulinemia. *Vet. Dermatology*; 9:135, 1998.
- Chambers, H. F., B. J. Hartman, and A. Tomasz – Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to Nafcillin. *J. Clin. Invest.* 76, 325-331, 1984
- Clements, A., Halton, K., Graves, N., Pettitt, A., Morton, A., Looke, D. and Whitby, M., 2008. Overcrowding and understaffing in modern health-care systems: key determinants in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission. *Lancet Infect Dis* 8 (7), 427-434.
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). (2005). Performance standards for antimicrobialsusceptibility testing. CLSI approved standard M100-S15. Wayne, PA.

Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test form bacteria isolated from animals; approved standard M31-A3, vol.28, no. 8. CLSI, Wayne, PA.

Correte M., D'abramo M., Latronico F., Greco M.F., Bellacicco A.L., Greco G., Martella V., Buonavoglia D. (2009). Methicillin-resistant coagulase negative staphylococci isolated from horses. *New Microbiol.* **32**, 311-314.

Cox H.U., Hoskins J.D., Newman S.S. Foil C.S., Turnwald G.H., Roy A.F. (1988). Temporal study of staphylococcal species on healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 747-751.

Devriese LA, Vandamme LR, Fameree L. – Methicillin (cloxacillin) resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralblatt Fur Veterinarmedizin Riehe B*; 19:598-605; 1972

Eveillard, M., Lancien, E., de Lassence, A., Branger, C., Barnaud, G., Benlolo, J.A. and Joly- Guillou, M.L., 2006. Impact of the reinforcement of a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* control programme: a 3-year evaluation by several indicators in a French university hospital. *Eur J Epidemiol* 21 (7), 551-558.

Faires M.C., Traverse M., Tater K.C. Pearl D.L., Weese J.S. (2010). Methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* infections in dogs. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 69-75.

Fuchs P.C., Jones R.N., Barry A.L. (1990). Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 608-609.

Frank LA., Kania SA, Hnilica KA, et al. - Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 222: 451-4, 2003

Gibbs, S.G., Green, C.F., Tarwater, P.M., Mota, L.C., Mena, K.D. and Scarpino, P.V., 2006. Isolation of antibiotic-resistant bacteria from the air plume downwind of a swine confined or concentrated animal feeding operation. *Environmental Health Perspective* 114, 1032–1037.

Guardabassi L, Loeber ME, Jacobson A – Transmission of multiple antimicrobial resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. *Vet. Microbiol.* 14;98(1): 23-7, 2004

Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC – Screening for skin carriage of methicillin resistant coagulase positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin; *Vet. Dermatology*; 19(3):142-9, 2008

Guardabassi L, Houser G.A., Frank LA., Papich MG. – Guideline for antimicrobial use in dog and cats. Guide to antimicrobial use in animals. Eds., Guardabassi L. Jensen LB. and Kruse H., 183-206. Wiley-Blackwell, Oxford UK; 2008.

Guaguere E., Bensignor E. – Therapeutique Dermatologique du Chien. Paris : Masson – AFVAC, 2002

Hanselman B.A., Kruth S., Weese J.S., Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital - Vet. Microbiology, 126, 277-81, 2008.

Hill PB, Moriello KA – Canine pyoderma. JAVMA 20(3):334,1994

Ihrke PJ. – Antibacterial therapy in dermatology. Kirk RW, ed. Current Veterinary Therapy IX. Philadelphia: Saunders, 1986:566-71

Kania SA, Williamson NL, Frank LA et al. – Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dog with pyoderma. American Journal of Veterinary Research; 65: 1265-8; 2004

Katayama Y., Robinson A., Enright M., Chambers H. – Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiology, 43, n.5, 2380-2383, 2005.

Kawada, M., Okuzumi, K., Hitomi, S. and Sugishita, C., 2003. Transmission of *Staphylococcus aureus* between healthy, lactating mothers and their infants by breastfeeding. *J Hum Lact* 19 (4), 411-417.

Jones R.D., Kania S.A., Rohrbach B.W., Frank L.A., Bemis D.A. (2007). Prevalence of oxacillin and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 17772 samples (2001-05). *J. Am. Vet. Med. Ass.* **230**, 221-227.

Leonard F.C. e Markey B.K., 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. The Veterinary Journal, 175, 27-36.

Lloyd D.H. (2007). Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals. *Clin. Infect. Dis.* **2**, 148-152.

Koch HJ, Vercelli A. – Shampoos and other topical therapies. Workshop Report 3. In: White S. and Mason I. (eds.) – Advanced in Veterinary Dermatology , vol. 2. Pergamon Press, 1993:409.

- Manian F.A. (2003). Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 26-28.
- Mason I.S., Kietzmann M. (1999). Cephalosporins pharmacological basis of clinical use in veterinary dermatology. *Vet. Dermatol.* **10**, 187-92
- Mason I.S. – Canine pyoderma. Proceedings of the 13th AAVD/ACDV Meeting, Nashville. 69-73; 1997.
- May E.R. (2006). Bacterial skin diseases: current thoughts on pathogenesis and management. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* **36**, 185-202.
- Meucci V., Vanni M., Guardabassi L., Moodley A., Soldani G., Intorre L. (2010). Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Vet. Res. Commun.* **34**, S79-S82.
- Moodley A., Stegger M., Bagcigil AF., Baptiste KE, Loeffler A., Lloyd DH, Williams NJ., Leonard N., Abbott Y., Skov R., Guardabassi L. – Spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals and veterinary staff in UK and Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.* 58(6): 1118-23, 2006.
- Moodley A., Stegger M., Ben Zakour NL., Fitzgerald JR., Guardabassi L. - Tandem repeat sequence analysis of staphylococcal protein A (spa) gene in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius*. *Vet. Microbiol. Sep.* 30, 2008
- Morris D.o., Rook K.A., Shofer F.S., Rankin S.C. (2006). Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *J. European Society of Veterinary Dermatology*, 17, 332-337.
- Niemeyer D.M., Pucci M.J., Thanassil J.A. (1996). Role of mecA transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **178**, 5464-5471.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B., Carter G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London, 95-102.
- Ruscher C., Lubke-Becker A., Wleilinski C.G., Soba A., Wieler L.H., Walther B. (2009). Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Vet. Microbiol.* **136**, 197- 201.

Schillers J.R., Hillier A., Daniels J.B., Cole L.K., Gebreyes W.A. (2009). Evaluation of Clinical Laboratory Standard Institute interpretive criteria for methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 684-688.

Scott D.W., Miller W.H., Griffin C.E. – Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, 5th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 174-277, 2001.

Schulz, J. Zur Charakterisierung der Ausbreitungsentfernung von Bioaerosolen aus Masthühnerställen. Universität Bielefeld 2007.

Sing A., Tuschak C., Hormansdofer S. – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a family and its pet cat.; *N. Engl. J. Med.*, 358; 11, 1200-1201, 2008

Tejedor J. Unco M.T., Martin Barrasa J.L. (2002). Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. *J. Vet. Med.* **49**, 419-423.

Tenover, F. C., L. K. McDougal, R.V. Goering, G. Killgore, S. J. Projan, J. B. Patel et al. – Characterization of a strain of community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus widely disseminated in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 108-118; 2006.

The EFSA Journal – 993, 1-73, 2009

Vanni M., Tognetti R., Pretti C., Crema F., Soldani G., Meucci V., Intorre L. (2009). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. *Res. Vet. Sci.* **87**, 192-195.

Wisselink MA. et al. – Immunologic aspect of German shepherd pyoderma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 19: 67-77, 1988

Wisselink MA. et al. – Deep pyoderma in the German sheperd dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **21**:773-776; 1985