

IDENTIFIKACIJA I ANTIMIKROBNA OSJETLJIVOST BAKTERIJA IZDVOJENIH IZ PASA S UPALOM VANJSKOG ZVUKOVODA



Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from canine otitis externa

Karmelić, D., J. Habuš, Z. Milas, V. Starešina, N. Turk, Lj. Barbić, S. Hadina, V. Stevanović, M. Perharić, K. Martinković, Z. Štritof

Sažetak

Upala vanjskog zvukovoda pasa jedna je od najčešćih bolesti koje se susreću u veterinarskoj praksi, a procjenjuje se da se pojavljuje u otprilike 5 do 20 % pasa. Čimbenici koji utječu na nastanak upale vanjskog zvukovoda mnogobrojni su. Bakterijske infekcije česta su sekundarna komplikacija primarnih uzroka otitisa, a u slučaju njihove pojave nužna je primjena odgovarajućeg antimikrobnog pripravka. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi učestalost izdvajanja bakterijskih uzročnika iz pasa s upalom vanjskog zvukovoda, odrediti učestalost izdvajanja pojedinih bakterijskih vrsta te njihovu osjetljivost na antimikrobne tvari. Istraživanje je provedeno na uzorku od 200 pasa, zaprimljenih na Kliniku za zarazne bolesti u razdoblju od listopada 2012. do siječnja 2014. godine. U 104 (52 %) pasa bakterije su izdvojene iz jednoga ili obaju zvukovoda, dok je u 96 (48 %) pasa bakteriološka pretraga bila negativna. Najčešće izdvojene bakterije u ovom istraživanju bile su *S. pseudintermedius* (57,7 %) i *P. aeruginosa* (20 %) dok su ostale bakterije izdvojene u znatno manjem broju. Osjetljivost na antimikrobne pripravke analizirana je samo za dvije najučestalije vrste, *S. pseudintermedius* i *P. aeruginosa*, od kojih je kod bakterije *P. aeruginosa* utvrđena veća razina neosjetljivosti na antimikrobne tvari. Zbog sve manje predvidljive osjetljivosti na antimikrobne tvari te sprečavanja pojave novih rezistencija u liječenju bakterijskih infekcija zvukovoda bakteriološka pretraga i određivanje osjetljivosti uzročnika na antimikrobne pripravke presudan su korak u odabiru odgovarajuće terapije.

Ključne riječi: bakterije, antimikrobna osjetljivost, psi, upala vanjskog zvukovoda

Abstract

Canine otitis externa is one of the most common diseases encountered in veterinary practice. It is estimated to affect between 5 % and 20 % of dogs. Inflammation of the ear canal may result from numerous causes. Otitis caused by different bacterial species commonly occurs as a secondary complication of primary factors that initiate inflammation within the ears. However, selection of appropriate chemotherapeutics in relation to the sensitivity of the etiological agents is extremely important for successful treatment of bacterial otitis. The purpose of this study was to estimate the incidence of isolation of different bacterial

Danijela KARMELIĆ, dr. med. vet., Josipa HABUŠ, dr. med. vet., viši asistent, Zoran MILAS, dr. med. vet., redoviti profesor, Vilim STAREŠINA, dr. med. vet., izvanredni profesor, Nenad TURK, dr. med. vet., redoviti profesor, Ljubo BARBIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, Suzana HADINA, dr. med. vet., docent, Vladimir STEVANOVIĆ, dr. med. vet., viši asistent, Matko PERHARIĆ, dr. med. vet., asistent, Krešimir MARTINKOVIĆ, univ. mag. med. vet., stručni suradnik, Zrinka ŠTRITOF, dr. med. vet., docent, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

species involved in otitis externa in dogs, and to determine the antimicrobial susceptibility of the obtained isolates. Clinical specimens were collected from 200 dogs with clinical signs of otitis externa presented at the Clinic for Infectious Diseases from October 2012 to January 2014. Bacterial growth was noted in 104 (52 %) dogs. The most prevalent isolated bacteria were *S. pseudintermedius* (57,7 %) and *P. aeruginosa* (20 %). Other bacteria were isolated in a smaller number of cases. *P. aeruginosa* isolates had low sensitivity to a wide range of antimicrobials, suggesting that many antimicrobial agents commonly used in *Pseudomonas* but also in staphylococcal infections in companion animals may not constitute appropriate therapy for canines. Due to the highly variable resistance patterns observed, antimicrobial susceptibility testing is a crucial step in the selection of appropriate therapy in otitis

Key words: bacteria, antimicrobial susceptibility, dogs, otitis externa

Uvod

Upala vanjskog zvukovoda (lat. *otitis externa*) pasa jedna je od najčešćih bolesti koje susrećemo u veterinarskoj praksi (O'Neill i sur., 2014.). Čimbenici koji utječu na nastanak upale vanjskog zvukovoda mnogobrojni su, a možemo ih podijeliti u četiri skupine; predisponirajuće, primarne, sekundarne te čimbenike koji potpomažu upalu (August, 1988.). Predisponirajući su čimbenici oni koji povećavaju rizik nastanka upale vanjskog zvukovoda (npr. stenozna zvukovoda, preklapljenе uške, povećana vlažnost, prisutnost veće količine dlaka, neke metaboličke bolesti i sl.). Primarni su čimbenici oni koji izravno dovode do upale vanjskog zvukovoda. Uobičajeni su primarni čimbenici strana tijela, preosjetljivost (osobito atopije i alergije na hranu), poremećaji u keratinizaciji (npr. primarna idiopatska seboreja ili hipotireoidizam), poremećaji normalne sekrecije (hiperplazija ceruminoznih žlijezda, hiperplazija/hipoplazija lojnih žlijezda i sl.) i ušni paraziti (Miller i sur., 2012.). Bakterije i gljivice svrstavamo u sekundarne čimbenike upale vanjskog zvukovoda. One doprinose daljnjem razvoju upale, ali će do njihova pretjeranog razmnažanja doći najčešće u slučaju istodobne prisutnosti primarnih i/ili predisponirajućih čimbenika (Saridomichelakis i sur., 2007.). Čimbenici koji potpomažu održavanje upale ustvari su posljedica same upale, a nastaju zbog djelovanja predisponirajućih, primarnih i sekundarnih čimbenika. U ove čimbenike ubrajamo promjene koje nastaju kao rezultat upalnog odgovora epidermisa i dermisa. Oni dovode do stenoze zvukovoda te fibroze i kalcifikacije što komplicira upalu i otežava liječenje (Murphy, 2001.). Navedeni podaci objašnjavaju zašto se danas upala vanjskog zvukovoda više i ne smatra izdvojenom bolesti, već sindromom koji se zapravo pojavljuje zbog određene, najčešće dermatološke bolesti. Unatoč sve većim mogućnostima liječenja, u mnogim slučajevima ono ne daje zadovoljavajuće rezultate, uglavnom zbog složenosti navedenih etioloških čimbenika, ali i zbog sve češće pojave neosjetljivosti bakte-

rijskih uzročnika na pojedine antimikrobne pripravke. Određivanje osjetljivosti bakterijskih uzročnika na antibiotike posebice je važno u onim iznimnim slučajevima u kojima se odlučujemo na sustavno liječenje antibioticima, kada se u zvukovodu postižu mnogo manje koncentracije lijeka nego lokalnom primjenom (Miller i sur., 2012.).

Ovim smo istraživanjem željeli prikazati učestalost pojedinih bakterijskih uzročnika u pasa s upalom vanjskog zvukovoda i njihovu osjetljivost na antimikrobne tvari. Rezultati istraživanja pružit će uvid u zastupljenost pojedinih bakterijskih vrsta u slučajevima upale vanjskog zvukovoda pasa na području grada Zagreba. Pregled njihove osjetljivosti na antimikrobne tvari olakšat će veterinarima praktičarima donošenje odluke o prikladnosti uporabe pojedinih preparata dostupnih na tržištu, odnosno o potrebi za provođenjem bakteriološke pretrage, posebice u slučaju kronične ili recidivirajuće bolesti.

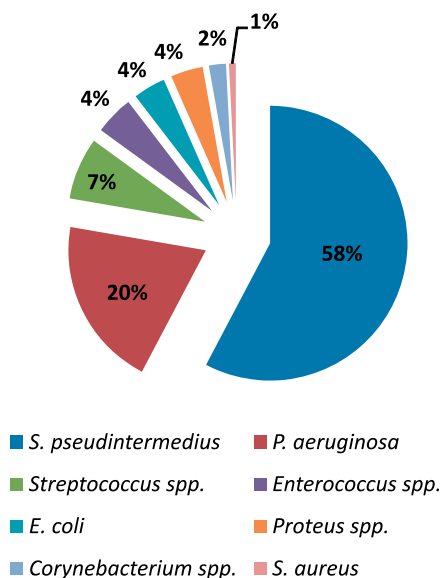
Materijal i metode

Podaci korišteni u ovom istraživanju prikupljeni su iz arhiva Klinike za zarazne bolesti Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. Istraživanje je obuhvatilo 200 pasa u kojih je postavljena dijagnoza upale vanjskog zvukovoda i kojima su u sklopu kliničke obrade uzeti obrisci obaju zvukovoda te su upućeni na bakteriološku pretragu u Bakteriološki laboratorij Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom. Uzorci su prikupljeni i obrađeni u razdoblju od listopada 2012. do siječnja 2014. godine. S obzirom na to da je ovaj rad izrađen koristeći se arhivskim podacima, ovdje nećemo opisivati način izdvajanja i identifikacije pojedinih bakterija.

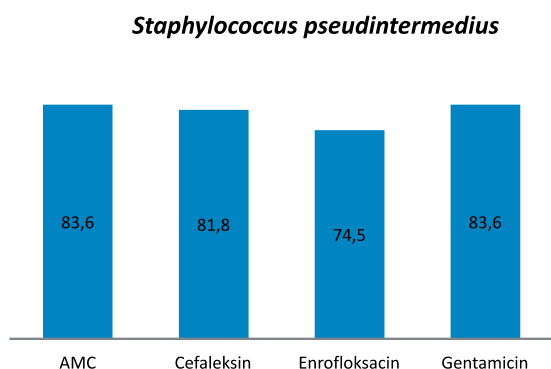
Rezultati

Od ukupno 200 pasa obuhvaćenih ovim istraživanjem u njih 104 (52 %) bakterije su izdvojene iz jednoga ili obaju zvukovoda dok je u 96 (48 %) pasa bakteriološka pretraga bila negativna. Od ukupno

104 pozitivne bakteriološke pretrage, u 75 % slučajeva izdvojen je samo jedan uzročnik, dok su u 25 % slučajeva izdvojeno dvije bakterijske vrste. Najčešće izdvojene bakterije u ovom istraživanju bile su *Staphylococcus pseudintermedius* (57,7 %) i *Pseudomonas aeruginosa* (20 %) dok su *Streptococcus* spp. (7,3 %), *Enterococcus* spp. (4,6 %) *Proteus* spp. (3,8 %), *Escherichia coli* (3,8 %), *Corynebacterium* spp. (2 %) i *Staphylococcus aureus* (0,8 %) izdvojeni u znatno manjem broju (slika 1). Budući da su *S. pseudintermedius* i *P. aeruginosa* bili najčešće utvrđeni uzročnici bakterijskih upala vanjskog zvukovoda, osjetljivost prema različitim antimikrobnim tvarima prikazana je samo za navedene izolate (slike 2 i 3).

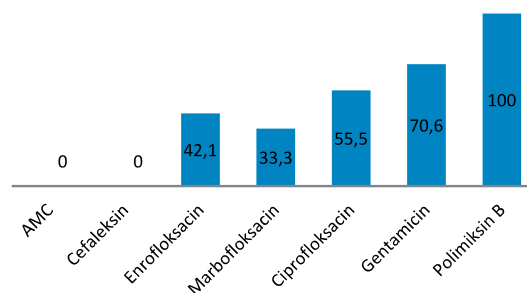


Slika 1. Grafički prikaz učestalosti pojedinih bakterijskih infekcija



Slika 2. Grafički prikaz osjetljivosti bakterije *S. pseudintermedius* prema pojedinim antimikrobnim tvarima

Pseudomonas aeruginosa



Slika 3. Grafički prikaz osjetljivosti bakterije *P. aeruginosa*

Rasprava

Najčešće izdvojene bakterije u pasa s upalom vanjskog zvukovoda u ovom istraživanju bile su *S. pseudintermedius* (57,7 %) i *P. aeruginosa* (20 %), dok su u znatno manjem broju izdvojene bakterije *Streptococcus* spp. (7,3 %), *Enterococcus* spp. (4,6 %) *Proteus* spp. (3,8 %), *E. coli* (3,8 %), *Corynebacterium* spp. (2 %) i *S. aureus* (0,8 %). Ovakva raspodjela bakterijskih patogena nije neuobičajena. Vrlo slične rezultate objavili su i Petrov i suradnici (2013.) koji su u svom istraživanju izdvojili *S. pseudintermedius* u 70 %, *P. aeruginosa* u 17 % te *E. coli* u 5 % pasa s upalom vanjskog zvukovoda, te Hariharan i suradnici (2006.) i Penna i suradnici (2009.) u čijim su istraživanjima najčešće izdvojene bakterije također bile *S. pseudintermedius* i *P. aeruginosa*.

Od ukupnog broja pasa s pozitivnom bakteriološkom pretragom iz njih 75 % izdvojena je samo jedna bakterijska vrsta, dok je u preostalih 25 % utvrđena mješovita bakterijska infekcija koja je u 20/26 (76,9 %) slučajeva uključivala *S. pseudintermedius* u kombinaciji s nekom drugom bakterijskom vrstom (*Streptococcus* spp., *P. aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Proteus* spp. ili *S. aureus*). Postotak monoinfekcija u različitim istraživanjima poprilično je varijabilan i iznosi od 18 % (Oliviera i sur., 2008.) do 93,77 % (Petrov i sur., 2013.). Navedene različitosti uglavnom su posljedica neujednačenosti u odabiru uzorka, odnosno istraživane populacije životinja poput pasa lotalica, kućnih ljubimaca, životinja s izraženim kliničkim znakovima upale zvukovoda, životinja bez kliničkih znakova, u nekim su istraživanjima uzimani obrisci samo jednog zvukovoda ili pak obaju bez obzira na prisutne znakove bolesti i sl. Nadalje, pojedina istraživanja, uključujući i ovo naše, bila su usmjerena isključivo na izdvajanje bakterija, dok su u drugima istraživani i bakterijski

i gljivični uzročnici upale zvukovoda (Penna i sur., 2009.; Petrov i sur., 2013.; Olivera i sur., 2008.).

U ovom je istraživanju najzastupljenija monoinfekcija bila ona uzrokovana bakterijom *S. pseudintermedius* koja je utvrđena u 55/75 (73,3 %) slučajeva. *S. pseudintermedius* važan je oportunistički patogen i jedan od najčešćih bakterijskih uzročnika upale vanjskog zvukovoda što pokazuje ovo, ali i druga slična istraživanja (Penna i sur., 2009.). Ova je bakterija često i dio uobičajene fiziološke mikroflora pasa, što potvrđuje istraživanje koje su proveli Rubin i Chirino-Trejo (2011.) u kojemu je *S. pseudintermedius* izdvojen iz 87,4 % obrisaka uzetih od zdravih pasa. Ovaj podatak uvijek treba imati na umu jer iz njega proizlazi da samo izdvajanje bakterije *S. pseudintermedius* nije dokaz da je ona uzročnik bolesti nego nalaz treba tumačiti u skladu s kliničkim nalazom i brojnošću izdvojenih bakterija. Najprikladnija metoda kojom utvđujemo važnost bakterija izdvojenih iz zvukovoda jest mikroskopska (citološka) pretraga (Griffin, 2006.; Miller i sur., 2012.). Ta je pretraga prvi korak u određivanju prisutnosti i brojnosti pojedinih skupina mikroorganizama i upalnih stanica u zvukovodu (Ginel i sur., 2002.) koja bi uvijek trebala prethoditi bakteriološkoj pretrazi. Nalaz okruglih bakterija (koka) upućuje na infekciju gram-pozitivnim bakterijama iz rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus* ili *Enterococcus*, dok nalaz štapičastih bakterija (bacila) upućuje na infekciju gram-negativnim bakterijama iz rodova *Pseudomonas*, *Proteus* ili *Escherichia*. Ipak, zbog nedovoljno predvidljive osjetljivosti bakterija na antimikrobne pripravke, kod svakog nalaza bakterija u mikroskopskom preparatu preporučljivo je napraviti bakteriološku pretragu, a rezultate tih dvaju nalaza trebalo bi tumačiti zajedno (Gotthelf, 2005.).

U ovom istraživanju utvrđena je relativno visoka osjetljivost bakterije *S. pseudintermedius* na amoksisicilin i klavulansku kiselinu, cefaleksin te gentamicin na što je bilo osjetljivo 83,6 %, 81,8 %, odnosno 83,6 % izolata. Visoka osjetljivost bakterije *S. pseudintermedius* izdvojene iz pasa s upalom vanjskog zvukovoda na navedene antimikrobne lijekove utvrđena je i tijekom istraživanja u drugim državama (Pena i sur., 2009; Petrov i sur. 2013.), ali i u prethodnom istraživanju u Hrvatskoj (Matanović i sur., 2012.). U navedenom istraživanju najveća osjetljivost bakterije *S. pseudintermedius* utvrđena je upravo na amoksisicilin i klavulansku kiselinu (92,5 %), cefaleksin (92,5 %), ali i enrofloksacin (82,1 %) na koji je u našem istraživanju bilo osjetljivo 74,5 % izolata. Upravo zbog ovakvog porasta rezistencije na jedan ili više antimikrobnih lijekova svi navedeni autori upozoravaju

na trend porasta rezistencije ove bakterije. Porast rezistencije vidljiviji je kod antimikrobnih pripravaka koji se učestalo rabe u liječenju pasa i mačaka, kao što je to slučaj kod gentamicina koji se nalazi u većini komercijalno dostupnih pripravaka za liječenje upale zvukovoda u pasa (Lilenbaum i sur., 2000.; Matanović i sur., 2012.). Problem neosjetljivosti na uobičajene antimikrobne tvari koje se primjenjuju u liječenju vrlo često susrećemo i kod infekcije bakterijom *P. aeruginosa* koja je čest uzročnik kroničnih upala vanjskog zvukovoda u pasa. U ovom radu *P. aeruginosa* izdvojen je iz 20 % uzoraka. Osjetljivost izolata *P. aeruginosa* na enrofloksacin, koji je jedan od najčešće korištenih sistemskih antibiotika kod infekcija ovom bakterijom, u našem istraživanju iznosi 42,1 %, što je unutar raspona rezultata dobivenih u ostalim istraživanjima gdje osjetljivost varira između 14 % i 48,1 % (Rubin i sur., 2007.; Mekić i sur., 2011.; Petrov i sur., 2013.). Vrlo slična osjetljivost od 33,3 % utvrđena je i za marbofloksacin što odgovara istraživanju Rubina i suradnika (2007.) gdje je utvrđena osjetljivost u 27 % izolata. Najveća osjetljivost ove bakterije na antibiotike iz skupine kinolona bila je zabilježena na ciprofloksacin na koji je bilo osjetljivo 55,5 % izolata. Pri procjeni djelovanja kinolona potrebno je uvijek imati na umu da se enrofloksacin u pasa djelomično metabolizira u ciprofloksacin te da obje aktivne tvari kruže organizmom (Blondeau i sur., 2012.).

Relativno dobra osjetljivost *P. aeruginosa* utvrđena je na gentamicin na koji je bilo osjetljivo 75 % izolata. Usprkos boljoj učinkovitosti u odnosu na druge antimikrobne tvari u ovom istraživanju ipak se, kao i u slučaju osjetljivosti bakterije *S. pseudintermedius*, opaža povećana rezistencija u odnosu na rezultate drugih istraživanja u kojima je utvrđena osjetljivost od 93 %, odnosno 98 % (Rubin i sur., 2007.; Petrov i sur., 2013.).

Svi izolati bakterije *P. aeruginosa* bili su osjetljivi na polimiksin B što se podudara i s rezultatima drugih istraživanja (Tron i sur., 2004.; Hariharan i sur., 2006.; Petrov i sur., 2013.). Bitno je naglasiti da se ne mogu sve upale zvukovoda uzrokovane bakterijom *P. aeruginosa* uspješno liječiti lokalnom uporabom polimiksina B. Naime, ovaj antibiotik nije djelotvoran u prisutnosti gnoja kojega gotovo uvijek ima, zbog čega je učinkovitost polimiksina B *in vivo* i *in vitro* bitno različita (Miller i sur., 2012.).

Općenito se može reći da je neosjetljivost bakterije *S. pseudintermedius* promjenjiva i u polaganom porastu, osobito na one antimikrobne tvari koji se često rabe u liječenju. Nadalje, zbog vrlo promjenjivih obrazaca i općenito visoke razine neosjetljivosti

utvrđene u bakterije *P. aeruginosa* empirijsko liječenje vrlo lako može rezultirati neuspjehom i razvojem kroničnih upala zvukovoda te dovesti do stvaranja novih rezistencija. Stoga smatramo da je odabir antimikrobnog pripravka na temelju antibiograma presudan korak u liječenju infekcija ovom bakterijom, posebice u slučajevima kad se radi o kroničnoj ili rekurentnoj infekciji.

Literatura

- AUGUST, J. R. (1988): Otitis externa: a disease of multifactorial etiology. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* 18, 731-742.
- BLONDEAU, J. M., S. BORSOS, L. D. BLONDEAU, B. J. BLONDEAU (2012): In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. *Vet. Microbiol.* 155, 284 -290.
- GINEL, P. J., R. LUCENA, J. C. RODRIGUEZ, J. ORTEGA (2002): A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. *Vet. Dermatol.* 13, 151-156.
- GOTTHELF, L. N. (2005): Cytology and histopathology of the ear in health and disease. Chapter 3. In: *Small animal ear disease*. Second edition, Saunders Elsevier, 54 -55.
- GRIFFIN, C. E. (2006): Otitis techniques to improve practice. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 21, 96 -106.
- HARIHARAN, H., M. COLES, D. POOLE, L. LUND, R. PAGE (2006): Update on antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. *Can. Vet. J.* 47(3), 253-255.
- LILENBAUM, W., M. VERAS, E. BLUM, G. N. SOUZA (2000): Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Let. Appl. Microbiol.* 31(1), 42-45.
- MATANOVIĆ, K., S. MEKIĆ, B. ŠEOL (2012): Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats in Croatia during a six -month period. *Veterinarski arhiv* 82 (5), 505-517.
- MEKIĆ, S., K. MATANOVIĆ, B. ŠEOL (2011): Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. *Vet. Rec.* 169(5), 125-125.
- MILLER, W., K. CAMPBELL, C. GRIFFIN (2012): Diseases of the eyelids, claws, anal sacs and ears. Chapter 19. In: *Small animal dermatology*. 7th edition, Saunders Elsevier, 1203 -1215.
- MURPHY, K. M. (2001): A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* 16 (3), 236-241.
- O'NEILL, D. G., D. B. CHURCH, P. D. MCGREEVY, P. C. THOMSON, D. C. BRODBELT (2014): Prevalence of Disorders Recorded in Dogs Attending Primary-Care Veterinary Practices in England. *PLoS ONE* 9(3): e90501. doi:10.1371/journal.pone.0090501.
- OLIVEIRA, L. C., C. A. LEITE, R. S. BRILHANTE, C. B. CARVALHO (2008): Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. *Can. Vet. J.* 49, 785-788.
- PENNA, B., W. LILENBAUM, G. M. MARTINS, R. R. MARTINS, L. MEDEIORES, R. VARGES (2009): Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Vet. Dermatol.* 21., 292. -296.
- PETROV, V., G. MIHAYLOV, I. TSACHEV, G. ZHELEV, P. MARUTSOV, K. KOEV (2013): Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. *Rev. Med. Vet.* 164, 18-22.
- RUBIN, J., R. D. WALKER, K. BLICKENSTAFF, S. BODEIS-JONES, S. ZHAO (2008): Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine infection. *Vet. Microbiol.* 131, 164-172.
- RUBIN, J. E., CHIRINO -TREJO M. (2011): Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *S. pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. *Vet. Diagn Invest* 23, 351 -354.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N., R. FARMAKI, L. S. LEONTIDES, A. F. KOUTINAS (2007): Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol.* 18, 341-347.
- TRON, E. A. M., H. WILKE, H. L. PETERMANN, L. RUST, (2004): *Pseudomonas aeruginosa* from canine otitis externa exhibit a quorum sensing deficiency. *Vet. Microbiol.* 99, 121. -129.