

Ocena porównawcza mikroflory tlenowej gardła u psów zdrowych oraz z objawami pharyngitis

JAROSŁAW KRÓL, MAGDALENA FLOREK, ZDZISŁAW STARONIEWICZ, BARBARA SORDYL

Zakład Mikrobiologii Weterynaryjnej Katedry Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Król J., Florek M., Staroniewicz Z., Sordyl B.

Comparative evaluation of aerobic bacterial flora in the throats of healthy dogs and in dogs with pharyngitis

Summary

Ninety-one aerobic bacterial isolates obtained from the throats of 35 healthy dogs as well as strains isolated from 15 dogs with pharyngitis were characterized phenotypically and identified by the use of commercial identification systems. Gram negative microorganisms (*Pasteurella* sp. and *Moraxella* sp.) constituted the most abundant portion of pharyngeal microbiota in healthy dogs but the commercial system API 20 NE was not useful in identifying them accurately. Among the Gram-positive bacteria, *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguis* were most frequently isolated. The bacterial strains obtained from dogs with pharyngitis were most susceptible to enrofloxacin and gentamicin. Dogs' throats may harbor microorganisms that have been recognized as pathogens in infected bite wounds in humans and may also be involved in the initiation and development of periodontal disease in dogs.

Keywords: dog, throat, pharyngitis

Gardło jako miejsce krzyżowania się początkowych odcinków przewodu pokarmowego i układu oddechowego stanowi specyficzne siedlisko dla wielu różnorodnych grup drobnoustrojów. Błona śluzowa gardła i migdałków może być skolonizowana zarówno przez mikroorganizmy występujące w obrębie jamy ustnej, jak i typowe dla górnych oraz dolnych dróg oddechowych (14). Wiele z tych drobnoustrojów należy do warunkowo chorobotwórczych, zdolnych do wywołania zakażeń w następstwie zaburzeń miejscowych mechanizmów obronnych lub infekcji wirusowych (6). Bakterie zlokalizowane w jamie ustnej i gardle mogą się ponadto przyczyniać do rozwoju chorób przyzębia (5, 10). Znajomość dominującego czynnika zakaźnego w takich przypadkach oraz jego wrażliwości na czynniki przeciwbakteryjne jest podstawą skutecznej terapii. Osobnym problemem jest aspekt epidemiologiczny nosicielstwa bakterii w jamie ustnej i gardle psów, gdyż wiele drobnoustrojów występujących w tych miejscach może również powodować infekcje u ludzi, szczególnie w przypadku ran kąsanych (2, 11, 13).

Identyfikacja drobnoustrojów izolowanych z błony śluzowej gardła u psów napotyka często na znaczne trudności. Spowodowane jest to m.in. ogromną różnorodnością bakterii występujących w tym środowisku oraz nierzadko ich małą aktywnością biochemiczną i enzymatyczną (5). Ponadto wiele metod identyfikacyjnych, dostępnych dla rutynowych laboratoriów weterynaryjnych (w tym zminiaturyzowane systemy identyfikacyjne) koncentruje się głównie na drobnoustrojach pochodzących od człowieka. Piśmiennictwo na ten temat dotyczy głównie składu flory bakteryjnej jamy

ustnej psów ze zmianami przyzębia (5, 10, 12). Niewiele natomiast wiadomo na temat drobnoustrojów występujących na błonie śluzowej gardła u psów zdrowych oraz w przypadkach infekcji tego narządu.

Celem badań była identyfikacja bakterii tlenowych izolowanych z gardła od psów zdrowych i wykazujących objawy *pharyngitis*, a także ocena wrażliwości szczepów pochodzących z przypadków infekcji na chemioterapeutyki.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły wymazy z gardła pobrane od 50 psów (35 zdrowych i 15 wykazujących objawy *pharyngitis*). Wymazy posiewano na podłoże agarowe z krwią (Columbia Agar – bioMérieux z 5% dodatkiem odwłóknionej krwi baraniej) oraz MacConkey'a (bioMérieux), które następnie inkubowano w temperaturze 37°C. Wyizolowane szczepy bakterii wstępnie różnicowano, określając ich wybarwienie w metodzie Grama oraz zdolność do produkcji enzymu oksydazy cytochromowej (Oxidase Reagent – bioMérieux), katalazy (z 3% roztworem H₂O₂) oraz DN-azy (DNase Agar – Oxoid). Następnie przeprowadzano identyfikację za pomocą zestawów identyfikacyjnych API firmy bioMérieux (API 20 E, API 20 NE, API STREP, ID 32 STAPH). Przygotowanie badanych szczepów, a także napełnianie pasków, inkubacja oraz odczyt testów wykonywano zgodnie z instrukcją producenta.

W przypadku szczepów izolowanych od psów ze stanami zapalnymi gardła wykonywano dodatkowo badanie wrażliwości na następujące chemioterapeutyki: amoksycylinę, amoksycylinę z kwasem klawulanowym, cefaleksynę, cefuroksym, doksycylinę, enrofloksacynę, gentamycynę, linkomycynę ze spektynomycyną, norfloksacynę oraz sulfametoksazol z trimetoprimem.

Wyniki i omówienie

W tab. 1 podano wyniki badań przeprowadzonych u 35 psów zdrowych, od których wyizolowano 91 szczepów bakterii tlenowych. Pod względem liczby komórek zasiedlających powierzchnię błony śluzowej gardła dominującą grupę stanowiły Gram-ujemne ziarniaki oraz pałeczki należące do rodzin *Pasteurellaceae* i *Neiseriaceae*. Były to bakterie oksydazododatnie i katalazododatnie, nie tworzące kwasu z glukozy w zestawie API 20 NE. W tej grupie najczęściej stwierdzano przedstawicieli rodzaju *Pasteurella* (17 szczepów), w tym 11 wytwarzających indol z tryptofanu oraz 6 indoloujemnych. Nieco mniej liczną grupę (8 izolatów) stanowiły Gram-ujemne pałeczki nie redukujące azotynów, zakwalifikowane na podstawie systemu API do rodzaju *Moraxella*. Do tego rodzaju klasy-

Tab. 1. Bakterie tlenowe izolowane z błony śluzowej gardła od psów zdrowych

		Liczba szczepów	
Bakterie Gram-ujemne	Kształtu kulistego: <i>Moraxella sp.*</i>	5	
	Kształtu cylindrycznego: 1. Oksydazododatnie: <i>Pasteurella sp. NIT+, IND+**</i>	11	
	<i>Pasteurella sp. NIT+, IND-</i>	6	
	<i>Moraxella sp.* (NIT-)</i>	8	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1	
	2. Oksydazoujemne: <i>Escherichia coli</i>	4	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	
	Bakterie Gram-dodatnie	Kształtu kulistego: 1. Katalazododatnie: <i>Staphylococcus intermedius</i>	9
		<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Micrococcus sp.</i>		4	
2. Katalazoujemne: <i>Streptococcus mitis</i>		9	
<i>Streptococcus sanguis</i>		7	
<i>Streptococcus suis</i>		3	
<i>Streptococcus canis</i>		2	
<i>Streptococcus mutans</i>		1	
<i>Streptococcus sp.</i>		7	
Kształtu cylindrycznego: <i>Bacillus sp.</i>		7	
<i>Corynebacterium sp.</i>	3		
Ogółem:		91	

Objaśnienia: * do rodzaju *Moraxella* klasyfikowano Gram-ujemne ziarniaki oraz pałeczki katalazo-, oksydazo- i DN-azododatnie (5); ** NIT – redukcja azotanów do azotynów, IND – próba na indol

Tab. 2. Bakterie izolowane od psów z objawami zapalenia gardła

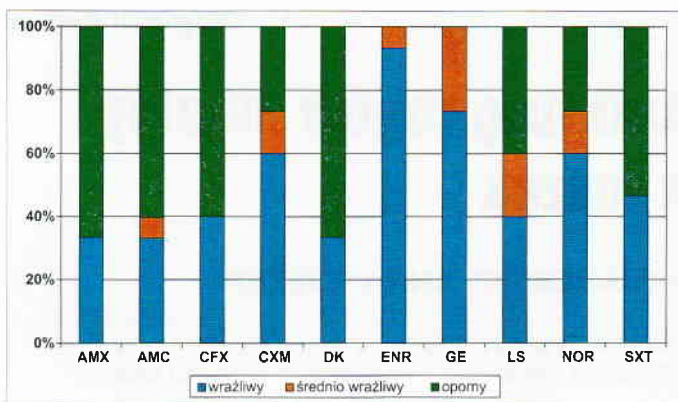
Rodzaj i gatunek bakterii	Liczba przypadków (n = 15)
<i>Pasteurella sp.</i>	5
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1
Mikroflora mieszana (<i>Staphylococcus intermedius</i> , <i>Moraxella sp.</i> , <i>Pasteurella sp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i>)	5

fikowano również Gram-ujemne ziarniaki wykazujące dodatnią reakcję na DN-azę (5 szczepów). Z innych pałeczek Gram-ujemnych, w gardle u psów zdrowych wykazano obecność *Pseudomonas aeruginosa* (u 2 psów) i *Bordetella bronchiseptica* (w 1 przypadku) oraz przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae* (4 szczepy *Escherichia coli* oraz 1 *Enterobacter cloacae*).

Bakterie Gram-dodatnie stanowiły zwykle stały składnik mikroflory błony śluzowej gardła psów, jednak liczebność ich populacji była znacznie mniejsza niż w przypadku drobnoustrojów Gram-ujemnych. Spośród ziarniaków katalazododatnich gatunkiem najczęściej izolowanym (w 9 przypadkach) okazał się *Staphylococcus intermedius*. Rzadziej stwierdzano przedstawicieli rodzaju *Micrococcus* (4 szczepy) oraz inne gatunki z rodzaju *Staphylococcus* (1 izolat *S. warneri*). Bardzo zróżnicowaną grupę drobnoustrojów występujących na błonie śluzowej gardła u psów stanowiły natomiast paciorkowce (*Streptococcus*). Od zwierząt zdrowych wyizolowano ogółem 29 szczepów należących do tego rodzaju. Najliczniej reprezentowany był gatunek *Streptococcus mitis* (w 9 przypadkach) oraz *S. sanguis* (u 7 psów), a znacznie rzadziej *S. suis* (3), *S. canis* (2) i *S. mutans* (1 szczep). Nie udało się określić przynależności gatunkowej 7 szczepów paciorkowców, ponieważ uzyskane w zestawie API 20 STREP profile biochemiczne odpowiadały dwóm lub trzem gatunkom. Ponadto na błonie śluzowej gardła psów zdrowych stwierdzono obecność przedstawicieli rodzaju *Bacillus* i *Corynebacterium* (odpowiednio u 7 i 3 psów).

W tab. 2 przedstawiono wyniki badań bakteriologicznych przeprowadzonych u 15 psów z zapaleniem gardła. Drobnoustrojami najczęściej izolowanymi okazały się pałeczki Gram-ujemne: *Pasteurella sp.* (u 5 psów), *Escherichia coli* (w 2 przypadkach), *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio parahaemolyticus* oraz *Bordetella bronchiseptica* (po 1 przypadku). U 5 psów wykazujących objawy *pharyngitis* stwierdzono florę mieszaną, w której skład wchodził *Staphylococcus intermedius* oraz bakterie z rodzaju *Pasteurella*, *Moraxella* i *Streptococcus*. Wrażliwość szczepów izolowanych od psów chorych na najczęściej używane chemioterapeutyki przedstawia ryc. 1. Bakterie te cechowały się największą wrażliwością na enrofloksacynę i gentamycynę (73-93% szczepów wrażliwych), a nieco mniejszą na norfloksacynę i cefuroksym (60%). Natomiast największą wrażliwością na amoksylicynę, amoksylicynę z kwasem klawulanowym, doksycyklinę, cefaleksynę oraz sulfametoksazol z trimetoprimem.

Zastosowanie systemu identyfikacyjnego API 20 NE nie pozwoliło na jednoznaczny identyfikację bakterii Gram-ujemnych – przedstawicieli rodzin *Pasteurellaceae* i *Neiseriaceae* – często występujących na błonie śluzowej jamy ustnej i gardła psów. Uzyskiwane profile biochemiczne odnosiły się najczęściej do gatunku *Pasteurella multocida* (szczepy redukujące azotany do azotynów i wytwarzające indol z tryptofanu) oraz rodzajów *Moraxella sp.* albo *Pasteurella sp.* (w przypadku szczepów indoloujemnych). Z uwagi na ogromną różnorodność Gram-ujemnych, wybrednych pałeczek występujących na powierzchni błon śluzowych u psów, a także ze względu na zmiany w klasyfikacji wielu z tych mikroorganizmów, różnicowanie omawianej grupy bakterii w laboratorium wymaga zastosowania wielu prób dodatkowych (1, 5, 8, 9).



Ryc. 1. Wrażliwość na chemioterapeutyki szczepów bakterii izolowanych z przypadków zapalenia gardła u psów

Objaśnienia: AMX – amoksycylina, AMC – amoksycylina z kw. klawulanowym, CFX – cefaleksyna, CXM – cefuroksym, DK – doksycyklina, ENR – enrofloksacyna, GE – gentamycyna, LS – linkomycyna ze spektynomycyną, NOR – norfloksacyna, SXT – sulfametoksazol z trimetoprimem

Drobnoustroje z rodziny *Pasteurellaceae* oraz *Neisseriaceae* były izolowane z jamy ustnej od psów – zarówno zdrowych, jak i wykazujących schorzenia przyzębia – również przez wielu autorów (5, 11, 12). Natomiast Polkowska i wsp. (10) nie stwierdzili obecności bakterii z omawianej grupy u zwierząt ze zmianami paradontopatycznymi. Wiadomo, że mikroorganizmy te bytując w jamie ustnej i gardle psów, mogą powodować zakażenia ran kąsanych u ludzi (2, 5, 11, 13).

Izolowane w badaniach własnych pozostałe pałeczki Gram-ujemne (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella bronchiseptica* oraz gatunki z rodziny *Enterobacteriaceae*) nie stwarzają na ogół trudności przy identyfikacji w laboratorium. U psów zdrowych drobnoustroje te nie występowały w dużej ilości ani u dużego odsetka zwierząt. Jak jednak stwierdzono, mogą one powodować stany zapalne gardła, a także schorzenia przyzębia (10).

Spośród bakterii Gram-dodatnich występujących na błonie śluzowej gardła u psów największe znaczenie wydaje się mieć *Staphylococcus intermedius*. W badaniach własnych gronkowiec ten stwierdzony został w 9 przypadkach, co stanowiło około 25% psów zdrowych. Podobne wyniki uzyskali również Harvey i wsp. (7), którzy wykazali ponadto związek pomiędzy nosicielstwem *S. intermedius* w jamie nosowej i gardle a częstotliwością występowania pyodermyi u psów. Wydaje się, że błona śluzowa gardła, podobnie jak nosa, jamy ustnej i odbytu, stanowi główne miejsce występowania *S. intermedius* u tych zwierząt (4). W sprzyjających okolicznościach może dochodzić do rozprzestrzeniania się gronkowca w inne okolice ciała i powodowania infekcji. Ponadto, występujący w jamie ustnej i gardle u psów *S. intermedius* może być przyczyną zakażeń ran kąsanych u ludzi (13).

Większość z izolowanych od psów zdrowych bakterii z rodzaju *Streptococcus* charakteryzowała się nietypowymi właściwościami biochemicznymi, co może być związane z ich przystosowaniem do odmiennych, w porównaniu z innymi gospodarzami, warunków bytowania. Dwa najczęściej stwierdzane gatunki, *Streptococcus mitis* oraz *S. sanguis*, z uwagi na stosunkowo małą aktywność bio-

chemiczną, mogą często stwarzać problemy przy identyfikacji. *S. mitis* wykazywany był jako dominujący gatunek paciorkowca także przez niektórych innych autorów (cyt. 6). *S. mitis* i *S. sanguis* bywają stwierdzane u ludzi w płytce nazębnej (15), niewykluczone więc, że gatunki te mogą mieć udział w rozwoju chorób przyzębia również u psów.

W badaniach własnych znacznie rzadziej izolowano natomiast *S. suis* oraz *S. canis*. Gatunki te były stwierdzane przez innych autorów o wiele częściej, np. Devriese i wsp. (3) wykazali je na powierzchni migdałków odpowiednio od 20% i 32% badanych psów. Szczepy *S. suis*, co wykazali również wspomniani autorzy, różnią się profilem biochemicznym od izolatów pochodzących od świń – tworzą kwas z mانيتolu oraz wykazują ujemną reakcję na β -glukuronidazę. *Streptococcus canis* jest natomiast stosunkowo łatwy do identyfikacji na podstawie właściwości biochemicznych, zdolności do wywoływania hemolizy β na agarze z krwią oraz przynależności do grupy serologicznej G. Występuje on na powierzchni błon śluzowych u zdrowych psów, a także może powodować u psów i kotów ciężkie infekcje (zapalenie gardła, płuc i stawów, ronienia, ropnie oraz posocznice) (3, 4).

Ogromna różnorodność bakterii występujących na błonie śluzowej gardła u psów sprawia, że ich diagnostyka laboratoryjna może sprawiać wiele trudności. Szczególnie dotyczy to licznej grupy bakterii Gram-ujemnych, których identyfikacja wymaga zastosowania różnorodnych testów biochemicznych i enzymatycznych. Przydatność tych metod do diagnostyki drobnoustrojów występujących u małych zwierząt oceniona zostanie w trakcie dalszych badań.

Piśmiennictwo

- Andersen B. M., Steigerwalt A. G., O'Connor S. P., Hollis D. G., Weyant R. S., Weaver R. E., Brenner D. J.: *Neisseria weaveri* sp. nov., formerly CDC group M-5, a Gram-negative bacterium associated with dog bite wounds. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 2456-2466.
- Bailie W. E., Stowe E. C., Schmitt A. M.: Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *J. Clin. Microbiol.* 1978, 7, 223-231.
- Devriese L. A., Cruz Colque J. I., De Herdt P., Haesebrouck F.: Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and streptococcal flora of dogs and cats. *J. Appl. Bacteriol.* 1992, 73, 421-425.
- Devriese L. A., De Pelsmaecker K.: The anal region as a main carrier site of *Staphylococcus intermedius* and *Streptococcus canis* in dogs. *Vet. Rec.* 1987, 121, 302-303.
- Forsblom B., Sarkiala-Kessel E., Kanervo A., Väisänen M.-L., Helander I. M., Jousimies-Somer H.: Characterisation of aerobic Gram-negative bacteria from subgingival sites of dogs – potential bite wound pathogens. *J. Med. Microbiol.* 2002, 51, 207-220.
- Greene C. E. (red.): *Clinical Microbiology and Infectious Diseases of the Dog and Cat*. Saunders W. B. Company 1984.
- Harvey R. G., Noble W. C.: Aspects of nasal, oropharyngeal and anal carriage of *Staphylococcus intermedius* in normal dogs and dogs with pyoderma. *Vet. Derm.* 1998, 9, 99-104.
- Mannheim W., Pohl S., Holländer R.: Zur Systematik von *Actinobacillus*, *Haemophilus* und *Pasteurella*: Basenzusammensetzung der DNS, Atmungsschönone und kulturell-biochemische Eigenschaften repräsentativer Sammlungsstämme. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A* 1979, 243, 499-510.
- Mutters R., Ihm P., Pohl S., Frederiksen W., Mannheim W.: Reclassification of the Genus *Pasteurella* Trevisan 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the New Species *Pasteurella dagnatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1985, 35, 309-322.
- Polkowska I., Różańska D., Cwiek A.: Mikroorganizmy wyizolowane z kieszonek dziąsłowych psów ze zmianami paradontopatycznymi. *Med. Wet.* 2002, 58, 608-610.
- Saphir D. A., Carter G. R.: Gingival flora of the dog with special reference to bacteria associated with bites. *J. Clin. Microbiol.* 1976, 3, 344-349.
- Sarkiala E., Asikainen S., Wolf J., Kanervo A., Happonen I., Jousimies-Somer H.: Clinical, radiological and bacteriological findings in canine periodontitis. *J. Small. Anim. Pract.* 1993, 34, 265-270.
- Talan D. A., Staatz D., Staatz A., Goldstein E. J. C., Singer K., Overturn G. D.: *Staphylococcus intermedius* in canine gingiva and canine-inflicted human wound infections: laboratory characterization of a newly recognized zoonotic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 78-81.
- Washington J. A. (red.): *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*. Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin 1981.
- Zaremba M. L., Borowski J.: *Mikrobiologia Lekarska*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1997.