

# Isolamento di *Staphylococcus aureus* Meticillino-Resistenti (MRSA) da campioni clinici nel cane

## RIASSUNTO

**Introduzione e scopo del lavoro** - *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) può essere trasmesso dagli animali da compagnia all'uomo per contatto diretto. Lo scopo del nostro studio è stato quello di valutare la presenza di MRSA in 34 cani da compagnia.

**Materiali e metodi** - Da gennaio a giugno 2012 sono stati esaminati 34 cani con problemi clinici di vario genere. Da ciascun animale sono stati eseguiti prelievi microbiologici, ottenendo 40 isolati di stafilococco. Su tutti i ceppi è stato eseguito il test fenotipico di sensibilità verso l'oxacillina e la ricerca del gene *mecA* mediante PCR. I ceppi portatori di tale gene venivano considerati MRS. Infine sia sui ceppi MRS che sui ceppi Meticillino Sensibili (MSS) sono stati eseguiti antibiogrammi per evidenziare i profili di resistenza utilizzando 44 molecole appartenenti alle principali classi di antibiotici utilizzate nella pratica veterinaria. I risultati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica tramite test Z utilizzando un software statistico Primer®.

**Risultati e discussione** - Sono stati isolati 40 ceppi di *Staphylococcus* spp. I microrganismi più isolati sono stati *Staphylococcus aureus* con 14 isolamenti (35%) e *Staphylococcus pseudintermedius* con 11 isolamenti (27,5%), seguiti da *Staphylococcus epidermidis* con 4 isolamenti (10%) e da *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus warneri*, entrambi con 2 isolamenti (5%). Un unico isolamento (2,5%) è stato ottenuto per ognuna delle specie *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus sciuri*. Tredici (32,5%) ceppi di *Staphylococcus* spp. erano resistenti ad oxacillina e 3 *Staphylococcus aureus* (7,5%) sono risultati positivi alla ricerca del gene *mecA*. Tutti i 40 ceppi di *Staphylococcus* spp. sono risultati MDR (Multi Drug Resistant). I nostri risultati riportano l'isolamento di ceppi di *Staphylococcus* spp. resistenti ad oxacillina ed altri antibiotici in cani da compagnia. In 2 campioni non è stata riscontrata corrispondenza tra gli esiti del test di sensibilità verso l'oxacillina e la rilevazione del gene della resistenza *mecA*.

## INTRODUZIONE

L'infezione da parte di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA) rappresenta un problema sanitario di portata internazionale.<sup>1,2,3</sup>

Gli stafilococchi meticillino-resistenti (MRS) hanno integrato nel loro genoma un elemento genetico mobile, detto "Staphylococcal Cassette Chromosome *mec*" (SCC*mec*), che veicola il gene *mecA* responsabile per tale resistenza. Questo gene è considerato un utile marker molecolare della resistenza alla meticillina e, più in generale, a tutti gli antibiotici  $\beta$ -lattamici.<sup>4</sup>

Gli antibiotici  $\beta$ -lattamici agiscono legando le *Penicillin Binding Protein* (PBP) della parete batterica, inibendo la sintesi di peptidoglicano, con conseguente autolisi della cellula.<sup>5</sup>

Il gene *mecA* codifica per la produzione della proteina PBP2a avente bassa affinità per i  $\beta$ -lattamici, così il batterio può procedere con l'attività di sintesi della parete, anche in presenza di tali molecole, rendendone del tutto inefficace l'azione.<sup>6</sup>

Il trattamento delle infezioni causate da MRSA - risulta piuttosto com-

M. Foti, DVM - E. Giudice, DVM, PhD

V. Fisichella, DVM, PhD - F. Lo Piccolo, DVM

C. Giacobello, DVM, PhD

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Messina

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 03/12/2012 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 17/06/2013".

plesso e, in molti casi, i microrganismi sono suscettibili solo a glicopeptidi e farmaci sperimentali.<sup>7</sup>

Desto ulteriore preoccupazione il fatto che la resistenza alla meticillina dei ceppi nosocomiali di stafilococchi coagulasi negativi risulti talora ancora più elevata rispetto a quanto sia documentato per *Staphylococcus aureus*.<sup>8</sup>

Anche nel settore veterinario, a fronte di un utilizzo eccessivo di antibiotici, comprese molecole analoghe a quelle usate in terapia umana, si è assistito all'emergenza di batteri che manifestano detta resistenza. Esiste altresì il rischio che ceppi antibiotico-resistenti di origine animale siano trasmessi all'uomo per contatto diretto con gli stessi animali o con l'ambiente.<sup>9</sup>

Gli animali da reddito sono risultati spesso portatori asintomatici di un ceppo specifico di MRSA, definito Livestock Associated MRSA (LA-MRSA), responsabile nell'uomo di gravi infezioni cutanee e dei tessuti molli, polmonite e setticemia.<sup>10,11,12,13</sup>

Alcuni animali da compagnia, quali cani, gatti e cavalli sono stati chiamati in causa quali potenziali serbatoi di MRSA.<sup>14,15</sup> Diversi ceppi infatti sono stati isolati da campioni prelevati in animali affetti da patologie di vari apparati, o in animali ospedalizzati, ma anche in soggetti sani; in alcuni casi gli stessi proprietari risultavano, a loro volta, portatori.<sup>16,17</sup> I ceppi di MRSA isolati dagli animali da compagnia, sottoposti ad analisi molecolare, presentano quasi sempre una sequenza corrispondente al gene *mecA* del tutto sovrapponibile a quella riscontrata in ceppi isolati nell'uomo (Healthcare Associated-MRSA o Community Associated-MRSA). È ipotizzabile quindi che l'infezione di questi animali possa provenire dall'uomo.<sup>17,18</sup> La trasmissione di questi ceppi tra cane e uomo sembra essere relativamente infrequente, tuttavia sono stati riportati diversi casi di trasmissione al personale di ospedali veterinari e a proprietari di cani che vivevano in appartamento.<sup>16,19</sup> Negli animali da compagnia gli MRSA sono stati isolati più spesso da infezioni di ferite e siti chirurgici, piodermiti, otiti e infezioni urinarie, ma anche da infezioni opportunistiche varie.<sup>17</sup> A partire dal 2006 ceppi di

*Staphylococcus intermedius* (*pseudintermedius*), portatori del gene *mecA*, denominati Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), sono emersi come un importante problema sanitario in medicina veterinaria.<sup>20,21,22,23</sup>

In Italia le segnalazioni di isolamento di MRSA e MRSP nel cane sono limitate a pochi lavori.<sup>24,25</sup>

Considerato il grande interesse per il problema dell'antibiotico resistenza ed in particolare nei confronti dei ceppi MRSA, gli autori hanno ritenuto interessante indagare sulla eventuale presenza di questi microrganismi in cani da compagnia colpiti da diverse patologie.

## MATERIALI E METODI

I campioni della nostra ricerca provenivano da cani che presentavano diverse patologie, condotti a visita presso gli ambulatori di Clinica Medica del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Messina. Tutti i cani vivevano in appartamento a stretto contatto con i proprietari. Il materiale su cui è stato effettuato l'esame colturale veniva prelevato dal sito della lesione (Tabella I).

I campioni ottenuti sono stati isolati in terreno solido (Baird-Parker agar - Oxoid, Basingstoke, UK) dopo arricchimento in brodo nutritivo (Liofilchem, Teramo, Italia).

Una o più colonie con aspetto tipico erano trasferite in TSA agar (Tryptic Soy Agar, Liofilchem, Teramo, Italia) e sottoposte a colorazione di Gram, test della coagulasi (Coagulase Test, Liofilchem, Teramo, Italia) e dell'ureasi (Urea Broth, Liofilchem, Teramo, Italia). L'identificazione è stata effettuata mediante test biochimici (Api Staph, Bio Merieux, Firenze, Italia).

I ceppi di *Staphylococcus* spp. isolati sono stati sottoposti ad antibiogramma tramite metodo di diffusione in agar (Kirby-Bauer) utilizzando le seguenti molecole: acido nalidixico (NA, 30 µg), amikacina (AK, 30 µg), amoxicillina (AML, 30 µg), amoxicillina/acido clavulanico (AMC, 30 µg), ampicillina (AP, 10 µg), ampicillina/sulbactam (SAM, 20 µg), azitromicina (AZM, 15 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), carbenicillina (CAR, 100 µg), cefadroxil (CDX, 30 µg), cefalessina (CL, 30 µg), cefoperazone (CFP, 75 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), cefuroxime (CXM, 30 µg), cefalotina (KF, 30 µg), claritromicina (CLR, 15 µg), cloramfenicolo (C, 30 µg), cloxacillina (OB, 5 µg), colistina solfato (CT, 10 µg), doxiciclina (DXT, 30 µg), enrofloxacin (ENR, 5 µg), eritromicina (E, 15 µg), gentamicina (GM, 10 µg), kanamicina (K, 30 µg), lincomicina (MY, 2 µg), lomefloxacin (LOM, 10 µg), neomicina (N, 30 µg), netilmicina (NET, 30 µg), norfloxacin (NOR, 10 µg), ofloxacin (OFX, 5 µg), ossitettraciclina (OT, 30 µg), oxacillina (OX, 1 µg), penicillina G (P, 10 UI), piperacillina (PRL, 100 µg), rifampicina (RD, 30 µg),

TABELLA I

*Staphylococcus* spp. isolati da 34 cani in diversi siti di prelievo

Sito di prelievo	N. isolati	N. <i>S. aureus</i>	N. <i>S. pseudointermedius</i>
Cute	13	4	7
Orecchio	7	2	2
Occhio	2	1	0
Cavità nasale	7	1	2
Versamento toracico	2	2	0
Vagina	2	1	0
Urina	7	3	0
Totale	40	14	11

spiramicina (SP, 100 µg), streptomina (S, 25 µg), tetraciclina (TE, 30 µg), ticarcillina/acido clavulanico (TIM, 85 µg), tilosina (TY, 30 µg), tobramicina (TOB, 10 µg), trimetoprim/sulfametossazolo (SXT, 25 µg), vancomicina (VA, 30 µg) (Oxoid, Basingstoke, Hampshire). Ai fini della identificazione fenotipica di stafilococchi meticillino-resistenti è stata valutata la sensibilità nei confronti di oxacillina piuttosto che della meticillina poiché questa molecola viene considerata un migliore indicatore della resistenza agli antibiotici β-lattamici.<sup>26</sup> I ceppi di *Staphylococcus* spp. venivano considerati resistenti, intermedi o sensibili in base ai criteri stabiliti dal CLSI.<sup>27</sup>

I ceppi sono stati inoltre saggiati in PCR per la ricerca del gene *mecA*,<sup>28</sup> ottenendo, in caso di positività, degli ampliconi di 163-bp. Inoltre, per confermare l'identificazione biochimica di *Staphylococcus aureus*, è stato ricercato anche un frammento (132 bp) del gene *femA* specie-specifico.<sup>28</sup> I ceppi positivi ad entrambe le PCR venivano considerati MRSA. Gli stafilococchi isolati che presentavano resistenza a tre o più classi di antibiotici erano considerati multi resistenti (MDR - Multi drug resistant) secondo le indicazioni di Magiorakos et al. (2012).<sup>29</sup>

## RISULTATI

Complessivamente sono stati isolati 40 ceppi di *Staphylococcus* spp. (Tabella 1), poiché in 6 casi, dallo stesso campione, sono state ottenute due specie differenti. Gli stafilococchi isolati appartenevano a 12 specie diverse. I microrganismi più frequentemente isolati sono stati *Staphylococcus aureus* con 14 isolamenti (35%) e *Staphylococcus pseudintermedius* con 11 isolamenti (27,5%), seguiti da *Staphylococcus epidermidis* con 4 isolamenti (10%) e da *Staphylococcus cohnii* e *Staphylococcus warneri*, entrambi con 2 isolamenti (5%). Un unico isolamento (2,5%) è stato ottenuto per ognuna delle specie *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylo-*

*coccus haemolyticus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus sciuri*. La valutazione della sensibilità nei confronti di oxacillina ha rilevato 13 (32,5%) ceppi resistenti, 27 (67,5%) ceppi sensibili e nessun ceppo intermedio. I ceppi resistenti provenivano da diversi siti di campionamento: cute (n. 4 *Staphylococcus aureus*), orecchio (n. 3 *Staphylococcus aureus* e n. 1 *Staphylococcus simulans*), cavità nasale (n. 1 *Staphylococcus aureus*), vagina (n. 1 *Staphylococcus sciuri*) e urina (n. 1 *Staphylococcus aureus* e n. 2 *Staphylococcus epidermidis*). Soltanto 3 ceppi su 40 (7,5%) sono risultati MRSA, ossia *Staphylococcus aureus mecA* positivi. In particolare due di questi ceppi di *Staphylococcus aureus* erano stati ottenuti da tamponi cutanei isolati in corso di piodermite mentre un terzo proveniva da un versamento toracico (Tabella 2). Tra i ceppi *mecA* positivi un unico isolato, ottenuto da uno dei due casi di piodermite, presentava resistenza nei confronti dell'oxacillina, mentre gli altri due erano entrambi sensibili. Questi ceppi risultavano inoltre resistenti alla maggior parte degli altri antimicrobici testati e in molti casi l'analisi statistica ha dimostrato una resistenza significativamente più elevata dei ceppi MRSA rispetto agli MSS anche se sarebbe necessario un maggior numero di campioni per poter confermare questa ipotesi (Tabella 4). Le poche molecole verso cui gli MRSA risultavano sensibili sono riportate nella Tabella 2 e 4. Tutti i 40 ceppi di *Staphylococcus* spp. hanno presentato resistenza a molecole (Tabella 3) appartenenti a più di tre classi di antibiotici tra quelle specificamente indicate da Magiorakos et al. (2012) per la valutazione della resistenza di tale genere batterico e quindi possono essere definiti multi resistenti.<sup>29</sup>

## DISCUSSIONE

Abbiamo osservato una elevata diffusione di ceppi coagulasi positivi. Tra questi *Staphylococcus au-*

TABELLA 2  
Quadro riassuntivo dei tre casi clinici in cui sono stati isolati MRSA

N. caso	Anamnesi			Sito di prelievo	In vivo: Terapia antibiotica	In vitro: Antibiotico-sensibilità
	Razza	Sesso/Età (anni)	Patologia			
1	Segugio italiano	F/11	Piodermite profonda, diffusa, recidivante. Leishmaniosi. Isolamento di <i>P. aeruginosa</i> .	Cute	CL, ENR, RD, CRO, GM, TOB	SAM, CRO, CFP, ENR, LOM, GM, N, AZM
2	Beagle	F/9	Diabete mellito. Versamenti cavitari. Emotorace.	Vers. toracico	Non eseguita	<b>OX</b> , OB, CAR, SAM, TIM, CDX, CFP, ENR, N, K, S, TOB, RD, TE, OT, VA
3	Pastore tedesco	M/5	Dermatite atopica. Piodermite profonda, diffusa, recidivante.	Cute	AMC, CL, CRO, ENR	<b>OX</b> , TIM, CRO, CFP, TE

**TABELLA 3**  
Prevalenza di antibiotico-resistenza nei 40 ceppi di *Staphylococcus* spp. isolati da 34 cani

Agente antimicrobico	n. (%) di isolati resistenti
TY	40 (100)
AMP, P, CAZ, NA, MY	38 (95,0)
AML, CLR, SP, ATM	37 (92,5)
CT, AZM, E, TE	35 (87,5)
CL, C, DXT	34 (85,0)
AMC, CTX, OFX, LOM, K, S, SXT, OT	32 (80,0)
CAR, AK, NOR, RD, TOB	31 (77,5)
OB	30 (75,0)
CDX, CXM, NET, N, PRL	28 (70,0)
GM	27 (67,5)
KF, VA	24 (60,0)
TIM	21 (52,5)
CRO, ENR	18 (45,0)
OX, SAM, CFP	13 (32,5)

*reus* e *Staphylococcus pseudintermedius* sono le specie batteriche più frequentemente isolate in corso di problemi dermatologici del cane,<sup>22,25</sup> ma possono colpire anche altri distretti dell'organismo, causando soprattutto otiti, congiuntiviti o infezioni urinarie.<sup>30,31,32,33</sup> Anche le altre specie di stafilococchi isolate occasionalmente possono causare infezioni cutanee, auricolari, oculari e urinarie.<sup>30,31,32,34</sup> *Staphylococcus warneri* è stato segnalato come causa di meningoencefalite nel cane,<sup>35</sup> mentre *Staphylococcus lugdunensis* è stato di recente isolato, per la prima volta, in un caso di endocardite nel cane.<sup>36</sup> Solo 3 *Staphylococcus aureus* (7,5%) sono risultati meticillino resistenti. La presenza di MRSA in materiale patologico prelevato nell'8,8% (3/34) dei cani testati conferma che questi ceppi di MRSA possono colonizzare più distretti nell'organismo.<sup>37</sup> Tale percentuale si avvicina a quella riportata da altri autori (9-10%).<sup>38,39,40</sup> Su tutti i tre soggetti colpiti dall'infezione erano state precedentemente praticate terapie reiterate con diversi antibiotici che una volta saggiati in vitro si sono dimostrati quasi tutti non efficaci (Tabella 2). Gli MRSA in questione risultavano sensibili solo ad alcune delle numerose molecole testate (Tabella 2 e 4) limitando di molto la scelta di un antibiotico che fosse adatto al trattamento della patologia, sia per efficacia che per maneggevolezza, come avviene spesso in questi casi.<sup>41</sup> È da sottolineare il fatto che tra i *mecA* positivi isolati un unico ceppo presentava resistenza nei confronti dell'oxacillina, mentre gli altri due erano sensibili. Risultavano invece elevate le resistenze ad oxacillina dei ceppi di stafilococchi isolati non portatori del gene *mecA*. Tale resistenza potrebbe essere il frutto della pressione selettiva esercitata

su tali microrganismi dalle precedenti terapie antibiotiche empiriche o a problemi di specificità del test.<sup>24,41</sup>

Sebbene il trasferimento di MRSA fra cani e persone che ne vengono in contatto sia un evento poco comune, le segnalazioni di casi di infezione umana e successivo isolamento di MRSA dalle mucose di cani familiari sani indicano che il ruolo del cane nel trasferimento di MRSA ai proprietari deve essere maggiormente valutato.<sup>38,39</sup>

Nella presente ricerca è stato adottato un doppio screening, ricorrendo sia a una metodica classica sia a una tecnica biomolecolare. Le percentuali di ceppi resistenti ad oxacillina (32,5% dei ceppi isolati), riscontrate nel presente studio mediante l'antibiogramma, si avvicinano a quelle riportate da Ghidini et al.,<sup>25</sup> tuttavia tra i risultati ottenuti, al pari di quanto riportato da alcuni autori,<sup>24,42,43</sup> non è stata riscontrata corrispondenza tra gli esiti dell'antibiogramma e la rilevazione del gene della resistenza *mecA*. Sulla base di ciò, è possibile ipotizzare che la resistenza ai  $\beta$ -lattamici abbia origini diverse e che essa possa dipendere da differenti meccanismi, come ad esempio una iperproduzione di  $\beta$ -lattamasi,<sup>44,45</sup> oppure che alcuni ceppi portatori del gene *mecA* non esprimano costantemente una ottimale produzione di PBP2a e quindi risultino sensibili alla oxacillina.<sup>42,44</sup>

Infine, in un lavoro recente, Meucci et al. (2010), avendo contemporaneamente utilizzato più metodiche per lo screening dei ceppi portatori di tale resistenza, sostengono che la discrepanza tra gli esiti dell'antibiogramma e la rilevazione del gene *mecA* possa essere legata a una minore specificità del test di diffusione in agar rispetto alle altre metodiche.<sup>24</sup>

I risultati degli antibiogrammi hanno mostrato un'elevata resistenza alla maggior parte delle molecole testate. La percentuale maggiore di antibiotico resistenza è stata riscontrata nei confronti di tilosina (100%), seguita da ampicillina, penicillina G, ceftazidime, lincomicina (95%) e da amoxicillina, claritromicina, spiramicina (92,5%). Tutti i 40 ceppi (100%) di *Staphylococcus* spp. isolati sono risultati MDR, e ciò dimostra un'ampia circolazione di stafilococchi multi resistenti in cani affetti da varie patologie. È nota una crescente tendenza, da parte degli stafilococchi isolati in corso di patologie del cane, a sviluppare resistenza nei confronti di diversi antibiotici.<sup>24,25,41</sup> Youn et al. hanno riportato di recente una percentuale del 71,9% di stafilococchi MDR,<sup>46</sup> ma i nostri risultati hanno inaspettatamente evidenziato percentuali di resistenza addirittura maggiori. Se tale risultato era prevedibile per l'acido nalidixico, visto lo spettro d'azione ristretto verso i Gram negativi,<sup>47</sup> tutti i batteri isolati (100%) sono risultati resistenti verso la tilosina, fenomeno molto preoccupante, dato che tale molecola viene attualmente annoverata nel protocollo terapeutico della pododermite stafilococcica

del cane.<sup>47,48,49</sup> Simili considerazioni possono essere fatte per la maggior parte delle molecole da noi testate, come le cefalosporine, l'amoxicillina/acido clavulanico e i fluorochinoloni, che vengono comunemente impiegate nella pratica clinica, specialmente in dermatologia.<sup>24,47</sup>

Tali risultati sottolineano ancora una volta la necessità di ricorrere alla terapia mirata basata sui risultati dell'antibiogramma e di modificare i protocolli terapeutici correnti, qualora dimostrino, come nel presente studio, l'insorgenza di resistenze microbiche.

L'uso irrazionale di antimicrobici negli animali da compagnia accresce il rischio di induzione di multi resistenze e in particolare di colonizzazione o infezione da MRSA.<sup>50</sup> Misure d'igiene rigide e altre strategie efficaci devono essere adottate per ridurre il rischio di infezioni da MRSA negli animali da compagnia e nei proprietari, ma soprattutto la limitazione dell'uso di antimicrobici solo ai casi strettamente necessari. L'uso sugli animali da compagnia di alcuni agenti antimicrobici di nuova generazione destinati alla medicina umana dovrebbe essere evitato poiché essi rappresentano l'unica risorsa terapeutica ancora valida in alcune infezioni dell'uomo. Nella pratica clinica veterinaria la diffusione delle antibiotico resistenze può essere contrastata minimizzando l'uso di antibiotici sistemici, facendo ricorso ad analisi microbiologiche e antibiogrammi e usando gli antibiotici in modo razionale e prudente, con particolare attenzione al dosaggio e alla durata del trattamento, nonché alla compliance del proprietario.<sup>41</sup>

Sulla base dei risultati emersi dal presente studio appare necessario effettuare screening su vasta scala per valutare i rischi associati alla diffusione di MRSA in animali da compagnia nonché il relativo potenziale zoonosico, anche per prevenire l'eventuale trasferimento agli operatori del settore. Non è, infatti, da sottovalutare il rischio professionale per coloro che operano, a vario titolo, a contatto con gli animali, quali allevatori, veterinari e altre figure professionali.<sup>51</sup>

Il metodo biomolecolare rappresenta un test di elezione per valutare la reale diffusione degli MRSA consentendo lo studio della complessa epidemiologia di tali batteri.

La presente indagine, infine, sottolinea l'importanza dell'uso dell'antibiogramma in funzione della messa a punto ed ottimizzazione di strategie terapeutiche nella pratica clinica.

**Parole chiave**

MRSA; cane; multiresistenza.

**Occurrence of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates from clinical specimens of dogs**

TABELLA 4 Confronto fra la prevalenza di antibiotico-sensibilità nei 3 ceppi MRSA rispetto ai 37 ceppi meticillino sensibili (MSS)			
Antibiotici	N. (%) di ceppi sensibili		P
	MRSA (N. 3)	MSS (N. 37)	Isolati MRSA versus MSS (test Z)
Penicillina G	0	2 (5,4)	P>0,05
Ampicillina	0	2 (5,4)	
Amoxicillina	0	3 (8,1)	
Carbencillina	1 (33,3)	8 (21,6)	
Cloxacillina	1 (33,3)	9 (24,3)	
Ampicillina/sulbactam	2 (66,7)	25 (67,6)	
Ticarcillina/acido clavulanico	2 (66,7)	17 (45,9)	
Oxacillina	2 (66,7)	25 (67,6)	
Aztreonam	0	3 (8,1)	
Cefadroxil	1 (33,3)	21 (56,7)	
Ceftazidime	0	2 (5,4)	
Ceftriaxone	2 (66,7)	20 (54,1)	
Gentamicina	1 (33,3)	12 (32,4)	
Neomicina	2 (66,7)	20 (54,1)	
Streptomina	1 (33,3)	7 (18,9)	
Tobramicina	1 (33,3)	8 (21,6)	
Kanamicina	1 (33,3)	7 (18,9)	
Rifampicina	1 (33,3)	8 (21,6)	
Acido nalidixico	0	2 (5,4)	
Enrofloxacin	2 (66,7)	20 (54,1)	
Lomefloxacin	1 (33,3)	7 (18,9)	
Vancomicina	1 (33,3)	25 (67,6)	
Lincomicina	0	2 (5,4)	
Tilosina	0	0	
Azitromicina	1 (33,3)	4 (10,8)	
Claritromicina	0	3 (8,1)	
Spiramicina	0	3 (8,1)	
Ossitetraciclina	1 (33,3)	7 (18,9)	
Colistina solfato	0	5 (13,5)	
Eritromicina	0	5 (13,5)	
Tetraciclina	2 (66,7)	3 (8,1)	
Piperacillina	0	22 (59,4)	
Amoxicillina/ac, clavulanico	0	8 (21,6)	
Cefalessina	0	6 (16,2)	
Cefotaxime	0	8 (21,6)	
Cefuroxime	0	22 (59,4)	
Cefalotina	0	16 (43,2)	
Netilmicina	0	22 (59,4)	
Amikacina	0	9 (24,3)	
Norfloxacin	0	9 (24,3)	
Ofloxacin	0	8 (21,6)	
Trimetoprim/sulfametossazolo	0	8 (21,6)	
Doxiciclina	0	6 (16,2)	
Cloramfenicolo	0	6 (16,2)	
Cefoperazone	3 (100)	24 (64,9)	

### Summary

**Introduction and aim** - Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has recently become a great concern for pet animal disease and zoonotic infection. MRSA strains transfer between pet animals and humans could occur. The aim of the present study was to determine the occurrence of MRSA in 34 household dogs.

**Materials and methods** - Thirty-four samples from dogs affected from various pathologies were obtained from January to June 2012. All samples were processed by conventional method and a total of 40 *Staphylococci* were obtained. The identified *Staphylococcus* spp. strains were subjected to a PCR protocol for the detection of *mecA* gene. The *mecA* positive strains were considered to be MRS. On all strains antimicrobial sensitivity against a panel of 45 antibiotics, including oxacillin, was

performed for detecting the presence of resistance. The statistical analysis of the results was made using the Z-test by a Primer® software.

**Results and discussion** - Forty *Staphylococcus* spp. strains were isolated. The most frequently identified species were *Staphylococcus aureus* (35%) and *Staphylococcus pseudintermedius* (27.5%). Thirteen (32.5%) *Staphylococcus* spp. strains were resistant to oxacillin and 3 *Staphylococcus aureus* (7.5%) were methicillin-resistant. Our results showed the presence of MRSA and multi-resistant strains in household dogs. A lack of correspondence between antimicrobial susceptibility tests and molecular methods was found in the present study.

### Key words

MRSA, dog, multiresistance.

## BIBLIOGRAFIA

- Jevons MP. "Celbenin"-resistant staphylococci. *British Medical Journal* 1:124-125, 1961.
- Oliveira DC, Tomasz A, de Lencastre H. The evolution of pandemic clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: identification of two ancestral genetic backgrounds and the associated *mec* elements. *Microbial Drug Resistance* 7:349-361, 2001.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance System. EARSS Annual Report, 2007. Period of data collection: January 1999-December 2007. Document prepared by the EARSS Management Team, members of the Advisory Board, and national representatives of EARSS, Bilthoven, The Netherlands, October 2008.
- Kitagawa Y, Ueda M, Ando N et al. Rapid detection of *mecA* gene by nested PCR for diagnosis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Tijdschr Diergeneeskd* 132:558-560, 2007.
- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S et al. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* 13:222-235, 2007.
- Hiramatsu K. Molecular evolution of MRSA. *Microbiology and Immunology* 39:531-543, 1995.
- Martins A, Cunha MLRS. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology* 51:787-795, 2007.
- Chu VH, Woods CW, Miro JM et al. Emergence of coagulase negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clinical Infectious Diseases* 46:232-242, 2008.
- Goldman E. Antibiotic Abuse in Animal Agriculture: Exacerbating Drug Resistance in Human Pathogens. *Human and Ecological Risk Assessment* 10:121-134, 2004.
- Witte W, Strommenger B, Stanek C et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in humans and animals, Central Europe. *Emerging Infectious Diseases* 13:255-258, 2007.
- van Loo I, Huisdens XV, Tiemersma E et al. Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerging Infectious Diseases* 13:1834-1839, 2007.
- Declercq P, Petr e D, Gordts B et al. Complicated community-acquired soft tissue infection by MRSA from porcine origin. *Infection* 36:590-592, 2008.
- Lewis H, Molbak K, Reese C et al. Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 infections in humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases* 14:1383-1389, 2008.
- Morris DO, Mauldin EA, O'Shea K et al. Clinical, microbiological, and molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of cats. *American Journal of Veterinary Research* 67:1421-1425, 2006.
- Vengust M, Anderson ME, Rousseau J et al. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in clinically normal dogs and horses in the community. *Letters in Applied Microbiology* 43:602-606, 2006.
- Center for Food Security and Public Health - CFSPH. Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. Available at: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/mrsa.pdf>, 1-25. Last Updated: January 2011.
- Weese JS. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Animals. *Institute for Laboratory Animal Research Journal* 51:233-244, 2010.
- Strommenger B, Kehrenberg C, Kettlitz C et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from pet animals and their relationship to human isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57:461-465, 2006.
- Morris DO, Lautenbach E, Zaoutis T et al. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. *Zoonoses and Public Health* 59:286-93, 2012.
- Devriese LA, Hermans K, Baele M et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. *Veterinary Microbiology* 133:206-207, 2009.
- Bannoehr J, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary Dermatology* 23:253-266, 2012.
- Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Canine Veterinary Journal* 52:153-157, 2011.
- van Duijkeren E, Cattrly B, Greko C et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 66:2705-2714, 2011.
- Meucci V, Vanni M, Guardabassi L et al. Evaluation of methicillin resistance in *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. *Veterinary Research Communications* 1:579-82, 2010.
- Ghini F, Piancastelli C, Taddei S et al. Antibiotic sensitivity of bacterial isolates from cases of canine dermatitis. *New Microbiologica* 34:403-408, 2011.
- Andrews JM, Boswell FJ, Wise R. Establishing MIC breakpoints for coagulase-negative staphylococci to oxacillin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45:259-261, 2000.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Seventeenth Informational Supplement. CLSI document M100-S17. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA, 2007.

28. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for Detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. *Journal of Clinical Microbiology* 38:1032-1035, 2000.
29. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 18:268-281, 2012.
30. Penna B, Vargas R, Martins R et al. In vitro antimicrobial resistance of staphylococci isolated from canine urinary tract infection. *Canine Veterinary Journal* 51:738-742, 2010.
31. Penna B, Vargas R, Medeiros L et al. Species distribution and antimicrobial distribution of staphylococci isolated from canine otitis externa. *Veterinary Dermatology* 21:292-296, 2010.
32. Vargas R, Penna B, Martins G et al. Antimicrobial susceptibility of Staphylococci isolated from naturally occurring canine external ocular diseases. *Veterinary Ophthalmology* 12:216-220, 2009.
33. Hauschild T, Wójcik A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. *Research in Veterinary Science* 82:1-6, 2007.
34. Lilenbaum W, Veras M, Blum E et al. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Letters in Applied Microbiology* 31:42-45, 2000.
35. Espino L, Bermudez R, Fidalgo LE et al. Meningoencephalitis associated with *Staphylococcus warneri* in a dog. *Journal of Small Animal Practice* 47:598-602, 2006.
36. Nakamura RK, Zimmerman SA, Lange AJ et al. Isolation of methicillin-resistant *Staphylococcus lugdunensis* in a dog with endocarditis. *Journal of Veterinary Cardiology* 14:531-536, 2012.
37. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Community - associated MRSA information for clinicians. Available at: <http://www.nmhanet.org/quality/patient-safety/the-patient-safety-corridor-e-library/mrsa/FAQs%20for%20Clinicians.pdf>. Accesso al sito 17 aprile 2006.
38. Manian FA. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. *Clinical Infectious Diseases* 36:e26-28, 2003.
39. van Duijkeren E, Wolfhagen MJ, Box AT et al. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 10:2235-2237, 2004.
40. Boost M, O'Donoghue M, James A. Investigation of the role of dogs as reservoirs of *Staphylococcus aureus* and the transmission of strains between pet owners and their dogs. *Hong Kong Medicine Journal* 14:15-18, 2008.
41. Guardabassi L, Fondati A. Uso prudente e razionale degli antibiotici nel trattamento delle piodermiti nel cane e nel gatto. *Veterinaria* 3:11-22, 2009.
42. Murakami K, Minamide W, Wada K et al. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 29:2240-2244, 1991.
43. Hososaka Y, Hanaki H, Endo H et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy* 13:79-86, 2007.
44. Kolbert CP, Arruda J, Varga-Delmore P et al. Branched-DNA Assay for Detection of the *mecA* Gene in Oxacillin-Resistant and Oxacillin-Sensitive Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* 36:2640-2644, 1998.
45. Mathews AA, Thomas M, Appalaraju B et al. Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* 53:79-82, 2010.
46. Youn JH, Yoon JW, Koo HC et al. Prevalence and antimicrogram of *Staphylococcus intermedius* group isolates from veterinary staff, companion animals, and the environment in veterinary hospitals in Korea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23:268-274, 2011.
47. Green CE, Watson ADJ. Farmacoterapia antibatterica. In: Green CE. *Malattie infettive del cane e del gatto. Malattie batteriche e protozoarie*. Elsevier Masson, Masson. Pag. 8-36, 2008.
48. Scott DW, Miller WH Jr, Cayatte SM et al. Efficacy of tylosin tablets for the treatment of pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs. *Canine Veterinary Journal* 35:617-621, 1994.
49. Scott DW, Miller WH Jr, Rothstein SE et al. Further studies on the efficacy of tylosin tablets for the treatment of pyoderma due to *Staphylococcus intermedius* infection in dogs. *Canine Veterinary Journal* 37:617-661, 1996.
50. European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety Agency, European Medicines Agency. Joint scientific report of ECDC, EFSA and EMEA on methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in livestock, companion animals and foods. EFSA-Q-2009-00612 and EMEA/CVMP/SAGAM/62464/2009. Available at: [http://www.ema.europa.eu/doc/en\\_GB/document\\_library/Report/2009/10/WC500004306.pdf](http://www.ema.europa.eu/doc/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500004306.pdf). Accesso al sito 16 giugno 2009.
51. Weese JS, van Duijkeren E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology* 140:418-429, 2010.