

Caracterización fenotípica y genotípica de *Staphylococcus* spp con resistencia a meticilina en pollos comerciales

Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp with resistance to methicillin in commercial chickens

Rony Cotaquispe^{1,5}, Ruth Sarmiento², Stephane Lovón³, Jorge Rodríguez⁴

RESUMEN

El estudio tuvo como objetivo identificar *Staphylococcus* spp con fenotipos y genotipos de resistencia a meticilina, así como identificar variantes del polimorfismo del gen *coa* + en *S. aureus*. Se utilizaron 97 cepas de *Staphylococcus* spp aislados de pollos y se hicieron antibiogramas y pruebas de PCR multiplex, PCR convencional y secuenciamiento. Los resultados fenotípicos indican la presencia de resistencia a 2 SARM y 26 SCN resistentes a meticilina (cefotaxima) y 2 *S. aureus* y 67 SCN con presunta resistencia a meticilina (oxacilina) en las pruebas de antibiograma. Mediante PCR se identificó el gen *mecA* responsable de la resistencia a meticilina en 24 cepas: 2 SARM y 22 SCNRM y se identificaron cuatro genotipos de *S. aureus* con variantes del polimorfismo del gen coagulasa. Los resultados sugieren una actividad genética constante, la aparición de clones y la expresión de genes para la resistencia a los principales antibióticos que enfrentan *Staphylococcus* spp.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, estafilococos coagulasa positivos a la meticilina resistente, genes de resistencia

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Bioservice SRL, Lima, Perú

² Hospital de la Solidaridad, Lima, Perú

³ Laboratorio de Microbiología, Bioservice SRL, Lima, Perú

⁴ Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁵ E-mail: r.cotaquispe.n@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8273-4803>

Recibido: 7 de septiembre de 2020

Aceptado para publicación: 27 de febrero de 2021

Publicado: 23 de junio de 2021

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

ABSTRACT

The study aimed to identify *Staphylococcus* spp with phenotypes and genotypes of methicillin resistance, as well as to identify variants of the *coa* + gene polymorphism in *S. aureus*. In total, 97 strains of *Staphylococcus* spp isolated from chickens were used and antibiograms and multiplex PCR, conventional PCR and sequencing tests were carried out. The phenotypic results indicate the presence of resistance to 2 MRSA and 26 SCN resistant to methicillin (cefoxitin) and 2 *S. aureus* and 67 SCN with presumed resistance to methicillin (oxacillin) in the antibiograms. Using PCR, the *mecA* gene responsible for methicillin resistance was identified in 24 strains: 2 MRSA and 22 SCNRM. In addition, 4 *S. aureus* genotypes with variants of the coagulase gene polymorphism were identified. The results suggest a constant genetic activity, the appearance of clones and the expression of genes for resistance to the main antibiotics faced by *Staphylococcus* spp.

Key words: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant coagulase positive staphylococci, resistance genes

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus spp son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos y catalasa positivos. Son patógenos oportunistas de mamíferos y aves que colonizan la piel, superficies mucosas, tracto gastrointestinal y el aparato respiratorio superior (Werckenthin *et al.*, 2001). El género tiene al menos 38 especies distribuidas en dos clases principales: *Staphylococcus* coagulasa positiva, siendo el más importante *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus* coagulasa negativa, donde destacan *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*, entre otros.

La aparición y propagación de la resistencia a los antimicrobianos entre los estafilococos causa gran preocupación, debido a la creciente prevalencia de *S. aureus* resistente a la meticilina con sus genes altamente transmisibles y recombinantes (Espejo *et al.*, 2019), especialmente en casos de infecciones nosocomiales (Grundmann *et al.*, 2006). Sin embargo, se tiene evidencia de casos de personas que no tuvieron contacto con

el entorno hospitalario y fueron diagnosticadas con *S. aureus* resistente a la meticilina y el *Staphylococcus* coagulasa negativo (SCN) resistente a múltiples fármacos, de modo que estas infecciones parecen ser más comunes de lo que se cree, posiblemente debido a la ingesta de alimentos o contacto con animales silvestres y domésticos (Barbier *et al.*, 2010).

S. aureus resistente a la meticilina y los SCN son de gran cuidado en animales comerciales y de compañía, así como en productos derivados de animales domésticos (Kloos y Bannerman, 1994; Kern y Perreten, 2013). Estos animales pueden actuar como reservorios de cepas humanas y posibilitar la evolución de cepas cada vez más patógenas y resistentes, debido a la presión selectiva por el uso inadecuado de antibióticos en los animales de crianza comercial (NRC, 1999; Silbergeld *et al.*, 2008). Debido a la importancia clínica de *S. aureus* y los SCN resistentes a meticilina, es evidente la necesidad de implementar herramientas de diagnóstico más sensibles y específicas para la identificación fenotípica y genotípica de aislados de muestras obtenidas de pollos comerciales (Schmidt *et al.*, 2017).

En Perú se dispone de pocos estudios publicados sobre el uso de antibióticos y la evolución epidemiológica de la resistencia a los antibióticos de primera y segunda generación en aves comerciales (Hoet *et al.*, 2011), lo que justifica las investigaciones basadas en la identificación, control y monitoreo de la resistencia a los antimicrobianos en el sector agropecuario. El objetivo del presente estudio fue la identificación microbiológica, molecular, caracterización fenotípica y genotípica del perfil de resistencia a los antibióticos en aves comerciales en el país.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se aislaron 97 cepas de *Staphylococcus* spp de muestras de senos infraorbitales, cornetes nasales, pulmón, hígado, saco vitelino, sacos aéreos y piel de aves afectadas con lesiones compatibles con la infección y procedentes de los departamentos de Lima, Arequipa y La Libertad (Perú).

Cultivo en Agar Selectivo Manitol Sal de Cefoxitina (MAS-Cef)

Las 97 cepas fueron sembradas en placas de agar salino estéril con cefoxitina (MAS-Cef) (Salvador *et al.*, 2005; Uchuya, 2015). La siembra se hizo mediante estrías, cubriendo la superficie del agar girando el hisopo. Se incubaron a 37 °C durante 48 horas y se seleccionaron las unidades formadoras de colonias (UFC) compatibles con *Staphylococcus* spp con supuesta resistencia a la meticilina. Estas eran colonias redondeadas, elevadas, con una superficie lisa y brillante, de consistencia variable, con márgenes definidos, blanco amarillento, incluso naranja, y que habían convertido el color característico del agar manitol salado (rosa) a amarillo, lo cual fue indicativo de colonias de fermentación de manitol. Además, se realizaron pruebas de Gram, catalasa y oxidasa (Salvador *et al.*, 2005).

Los aislados se almacenaron en el banco de cepas del laboratorio de Bioservice. Se colocaron tres colonias puras en tubos de ensayo con 4 ml caldo soja tripticasa; se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se colocaron en crioviales 1 ml del caldo bacteriano más 0.5 ml de glicerol al 85%. Dos juegos de cada cepa se almacenaron a -80 °C (Uchuya, 2015).

Enriquecimiento de Caldo de Corazón y Cerebro (BHI)

Se realizó el enriquecimiento de las cepas fenotípicamente similares a *Staphylococcus* spp. Para esto, se inocularon tres UFC en tubos de falcón estériles de 15 ml que contenían 5 ml de BHI, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas (Uchuya, 2015).

Antibiograma

Se suspendieron 3 a 5 colonias en un tubo de vidrio que contenía caldo soja tripticasa y se incubaron a 35 ± 2 °C hasta alcanzar una turbidez de 0.5 de la escala MacFarland. Luego, se introdujo un hisopo estéril en el tubo, dejándolo reposar durante no menos de 15 minutos antes de inocular las placas de Petri con agar Mueller Hinton al 2% de NaCl. Se colocaron los discos de antibióticos distribuidos de manera uniforme y manteniendo una distancia mínima de 25 mm entre ellos. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 horas en aerobiosis. Los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluido el diámetro del disco) se midieron con un calibrador y los datos se compararon con los límites de Susceptibilidad (S) y Resistencia (R) presentes en Pondit *et al.* (2018) y los documentos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI 2017).

Extracción de ADN de *Staphylococcus* spp

El ADN genómico de las 97 cepas se extrajo mediante membranas de sílica gel utilizando el *GF-1 Tissue DNA Extraction Kit*

(Vivantis), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico se almacenó a 20 °C.

Identificación Molecular por PCR Multiplex

La identificación de *Staphylococcus* spp, *S. aureus* y el gen de la coagulasa se llevó a cabo utilizando un PCR multiplex; usando los cebadores 16S rRNA-F5'-GCAAGCGTTATCCGGATTT-3', 16S rRNA-R 5'-CTTAATGATGGCAACTA-AGC-3' de 597 pb; nuc1 (5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3') y nuc2 (5'-AGC-CAAGCCT-TGACGAACTAAAGC-3') de 280 pb; y coag2 (5'-GAGACCAAGATTCAACAAG-3'), coag3 (5'-AAGAAAACCACT-CACATCA-3') de 900 pb. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 20 µl que contenía 10X de buffer de PCR incompleto, dNTPs 0.2 mM, MgCl₂ 1.5 mM, 1.25 pmol de cada cebador, 1 U máximo de ADN polimerasa Taq (Geneon) y 5 ng/µl de ADN genómico. Los ciclos térmicos utilizados fueron: 1 ciclo inicial de 94 °C durante 4 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 54 °C durante 30 s y 65 °C durante 2.5 min y finalmente un ciclo de 65 °C por 3 min.

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems). Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TBE 1X (Tris, Borato, EDTA), con 2 µl de tinte fluorescente de tampón de carga (Geneon) y 4 µl de producto de PCR en 1X TBE al 1%, el peso molecular el marcador fue Escalera de ADN GeneRuler 100 pb PLUS (Thermo Scientific); durante 45 min a 100 v se fotografió bajo luz UV en un photodocumentador de Major Science.

Polimorfismo Genotípico del Gen Coa+ de *S. aureus*

Se realizó con cebadores específicos de genes en una PCR convencional, que contiene volúmenes finales de 10 µl de mezcla maestra 2X Taq polimerasa (Geneon), 0.5 µl

de cada cebador Forward coag2 5'-GAGACCAAGATTCAACAAG-3' y Reverse coag3 5'-AAGAAAACCACT-CACATCA-3'; 5 µl de agua libre de nucleasas y 5 µl de ADN a 5 ng/µl positivos para *S. aureus*. Los ciclos térmicos utilizados fueron: un ciclo inicial de 94 °C durante 4 min, 35 ciclos de: 94 °C durante 30 s, 54 °C durante 30 s y 65 °C durante 45 s y finalmente un ciclo de 65 °C durante 5 min. La amplificación se realizó en un termociclador Veriti (Applied Biosystems) (Breves *et al.*, 2015).

Identificación de Genes de Resistencia

Meticilina (Gene *mecA*) de 533 pb, utilizando el kit de Geneon (PCR Mastermix / Taq DNA Polymerase Premix 2X) de cPCR, con volúmenes finales de 10 µl de master mix 2X Taq polimerasa (GenEon), 1 µl de cada cebador a 0.5 µM, Forward *mecA* 5'-AAA-ATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' y Reverse *mecA* 5'-AGTTCTGGCACTACCG-GATTTGC-3'; 5 µl de ADN a 5 ng/µl y completar con H₂O libre de nucleasas. Las condiciones térmicas fueron 1 ciclo inicial de 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 62 °C durante 45 s y 72 °C durante 45 s y finalmente un ciclo de 72 °C durante 5 min (Breves *et al.*, 2015; Campos *et al.*, 2014).

Secuencia

Las cepas resistentes a la metilina identificadas con el gen *mecA* por PCR convencional fueron secuenciadas por ambas cadenas usando el servicio de secuenciación, BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Scientific) usando un analizador genético ABI 3137 XL (Life Technologies) provisto por Macrogen Inc.

RESULTADOS

Los datos microbiológicos identificaron 28/97 cepas con resistencia a metilina en medio selectivo de sal de manitol cefoxitina (MAS-Cef). Asimismo, el antibiograma de disco de difusión de cefoxitina 30 µg proce-

Cuadro 1. Perfil fenotípico de resistencia a meticilina mediante antibiogramas en 97 cepas aisladas de aves comerciales.

Antibiótico	<i>S. aureus</i>		<i>Staphylococcus</i> coagulasa negativos (SCN)		Pollo
	R	S	R	S	
Oxacilina	2/20	18/20	67/77	10/77	69
Cefoxitina	2/20	18/20	26/77	51/77	28

sado en agar Mueller-Hinton identificó 2 *S. aureus* y 26 SCN resistentes a meticilina (cefcoxitina) y 2 *S. aureus* y 67 estafilococos coagulasa negativos (oxacilina 1 µg) (Cuadro 1).

Los 97 aislamientos se sometieron a PCR multiplex para identificación de tres genes. Dos de ellos propios del genotipo de *S. aureus*: el gen de coagulasa, que es una proteína codificada por el gen *coa* + que se expresa durante la infección, y que también se usa para determinar variantes genéticas debido a que es una región ampliamente conservada; y el gen *nuc*, una proteína termoestable característica de *S. aureus*. Además, el gen *16S rRNA* para identificar el género *Staphylococcus*, que permite identificar regiones altamente divergentes y específicas de la especie dentro del dominio del ARN ribosómico 16S (*16S rRNA*) (Figura 1).

Las 24 cepas con el gen *mecA* fueron secuenciadas y el BLAST identificó las siguientes especies: *S. cohnii_sciuri*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. gallinarum*, *S. saprophyticus*, *S. agnetis*, *S. lentus* y *S. lugdunensis* (Cuadros 3 y 4).

Los resultados de la PCR convencional identificaron 97 cepas que amplificaron el gen específico 16S *rRNA* para la detección de *Staphylococcus* spp, 20 cepas de *S. aureus* que amplificaron el gen *nuc* (nucleasa

termoestable específica de *S. aureus*) y, además, se halló polimorfismo en el tamaño de las bandas del gen *coa* + (900 pb) en *S. aureus*, presentando bandas con tamaños variables debido a la presencia de cuatro variantes genotípicas. De otra parte, en las pruebas moleculares para la identificación de genes resistencia se determinaron dos cepas de *S. aureus* y 22 SCN presentaron el gen *mecA* (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

El uso de antibióticos en la crianza de animales es de uso rutinario, empleándose no solo como profiláctico para un mejor control de la salud de los animales, sino además para obtener mayores rendimientos de carne (Haskell *et al.*, 2018). Sin embargo, estos beneficios ocultan una realidad preocupante porque la administración podría proporcionar un caldo de cultivo para la resistencia antimicrobiana a los antibióticos, principalmente del gen *mecA* y de otros genes en estafilococos coagulasa positivos y negativos (Wendlandt *et al.*, 2013; Sousa *et al.*, 2014).

Los hallazgos microbiológicos en pollos en este estudio advierten la presencia de 28 cepas resistentes a meticilina (cefcoxitina), entre ellos 2 SARM y 69 SCN con presunta resistencia a meticilina (oxacilina). Estos ha-

Cuadro 2. Perfil genotípico de resistencia a meticilina mediante cPCR en aislados de *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulasa negativos en aves comerciales del Perú

Especies	PCR <i>nuc</i>	PCR <i>Coag</i> +	PCR <i>mecA</i>	Procedencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	20	20	2	Trujillo, Lima
<i>Staphylococcus</i> spp n=77	0	0	22	Trujillo, Lima
Total	20	20	24	

Gen *nuc*: nucleasa termoestable específica de *S. aureus*, gen coagulasa + específica de *S. aureus*; gen *mecA* presencia en *S. aureus* y *Staphylococcus* sp

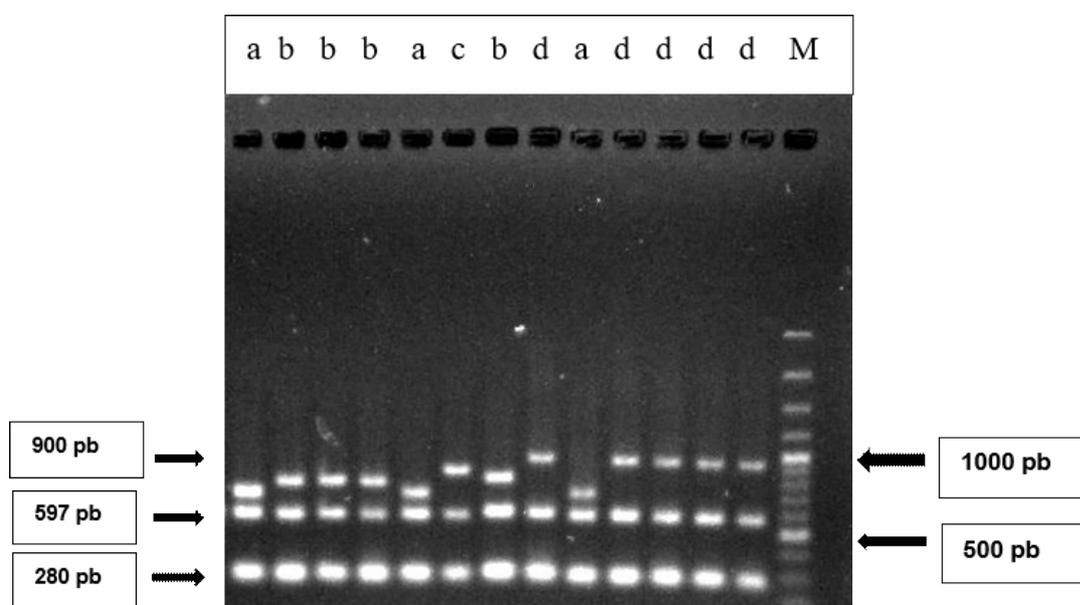


Figura 1. Detección de *coa* + (900 pb), 16S *rRNA* (597 pb) y *nucI* (280 pb) por PCR multiplex. (A) Carril M: marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific). (B) Carril 1 a 13: PCR multiplex positiva de *S. aureus*

llazgos concuerdan con la investigación de López *et al.* (2015); quienes demostraron la presencia de *S. aureus* resistente a cefoxitina y oxacilina en muestras de leche cruda en vacas con mastitis; así como el estudio de Osman *et al.* (2016) que identificaron cepas resistentes a la oxacilina en pollos de carne,

revelando la inquietante realidad en la industria avícola. En este sentido, Freitas *et al.* (2004) reportaron *Staphylococcus* spp resistente a la vancomicina y multi-drogo resistente (MDR) a 14 antibióticos, incluyendo oxacilina y cefalexina, entre otros en 10% de los aislados. En forma similar, Dalcin (2012)

Cuadro 3. Aislamientos de *Staphylococcus* spp según origen, tipo de muestra, identificación molecular, perfil genotípico de resistencia a meticilina e identificación del genotipo del gen de la coagulasa en aves comerciales del Perú (Parte 1)

Código DNA	Zona	Órgano	PCR/ Secuenciamiento	16s rRNA	nuc	Coag +	Genotipo coa +	mecA
Sp01-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp02-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp03-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp04-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp05-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp06-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp07-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp08-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp09-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp10-19	Lima	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp11-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp12-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp13-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp14-19	Trujillo	C. N	<i>S. aureus</i>	+	+	+	A	-
Sp15-19	Lima	C.N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp16-19	Lima	S. vitelino	<i>S. cohnii sciuri</i>	+	-	-	-	+
Sp17-19	Lima	Hígado	<i>S. aureus</i>	+	+	+	B	+
Sp18-19	Lima	S. I	<i>S. aureus</i>	+	+	+	B	-
Sp19-19	Trujillo	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp20-19	Trujillo	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp21-19	Trujillo	Piel	<i>S. simulans</i>	+	-	-	-	+
Sp22-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp23-19	Lima	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp24-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp25-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp26-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp27-19	Lima	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp28-19	Trujillo	Piel	<i>S. xylosus</i>	+	-	-	-	+
Sp29-19	Trujillo	Piel	<i>S. carnosus</i>	+	-	-	-	+
Sp30-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp31-19	Trujillo	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp32-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp33-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp34-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp35-19	Trujillo	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp36-19	Trujillo	Piel	<i>S. gallinarum</i>	+	-	-	-	+
Sp37-19	Lima	S. I	<i>S. saprophyticus</i>	+	-	-	-	+
Sp38-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp39-19	Lima	S. I	<i>S. gallinarum</i>	+	-	-	-	+
Sp40-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp41-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp42-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp43-19	Lima	C. N	<i>S. agnetis</i>	+	-	-	-	+
Sp44-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp45-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp46-19	Trujillo	Piel	<i>S. lentus</i>	+	-	-	-	+
Sp47-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp48-19	Lima	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp49-19	Trujillo	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-

S.I: seno infraorbital, S.A: sacos aéreos, C.N: cornete nasal

Cuadro 4. Aislamientos de *Staphylococcus* spp según origen, tipo de muestra, identificación molecular, perfil genotípico de resistencia a meticilina e identificación del genotipo del gen de la coagulasa en aves comerciales del Perú (Parte 2)

Código DNA	Zona	Órgano	PCR/ Secuenciamiento	16s rRNA	nuc	Coag +	Genotipo <i>coa</i> +	<i>mecA</i>
Sp50-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp51-19	Trujillo	C. N	<i>S. lugdunensis</i>	+	-	-	-	+
Sp52-19	Trujillo	S. I	<i>S. simulans</i>	+	-	-	-	+
Sp53-19	Lima	S. aéreos	<i>S. aureus</i>	+	+	+	B	-
Sp54-19	Lima	S. vitelino	<i>S. aureus</i>	+	+	+	A	-
Sp55-19	Lima	Pulmón	<i>S. aureus</i>	+	+	+	C	-
Sp56-19	Lima	Hígado	<i>S. aureus</i>	+	+	+	B	-
Sp57-19	Lima	S. aéreos	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp58-19	Lima	S. vitelino	<i>S. aureus</i>	+	+	+	A	+
Sp59-19	Lima	Pulmón	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp60-19	Lima	Hígado	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp61-19	Lima	Hígado	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp62-19	Lima	Hígado	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp63-19	Lima	S. aéreos	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp64-19	Lima	Hígado	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp65-19	Lima	S. vitelino	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp66-19	Lima	Piel	<i>S. sp</i>	+	-	-	-	-
Sp67-19	Lima	C.N	<i>S. sp</i>	+	-	-	-	-
Sp68-19	Lima	S. I	<i>S. gallinarum</i>	+	-	-	-	+
Sp69-19	Trujillo	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp70-19	Trujillo	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp71-19	Trujillo	C. N	<i>S. lugdunensis</i>	+	-	-	-	+
Sp72-19	Trujillo	S. I	<i>S. simulans</i>	+	-	-	-	+
Sp73-19	Trujillo	Piel	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp74-19	Trujillo	C. N	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp75-19	Trujillo	Piel	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp76-19	Trujillo	C. N	<i>S. aureus</i>	+	+	+	D	-
Sp77-19	Lima	C. N	<i>S. gallinarum</i>	+	-	-	-	+
Sp78-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp79-19	Lima	Piel	<i>S. simulans</i>	+	-	-	-	+
Sp80-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp81-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp82-19	Lima	Piel	<i>S. agnetis</i>	+	-	-	-	+
Sp83-19	Lima	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp84-19	Lima	Piel	<i>S. gallinarum</i>	+	-	-	-	+
Sp85-19	Lima	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp86-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp87-19	Lima	Piel	<i>S. lentus</i>	+	-	-	-	+
Sp88-19	Lima	C. N	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp89-19	Lima	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp90-19	Lima	Piel	<i>S. simulans</i>	+	-	-	-	+
Sp91-19	Arequipa	C. N	<i>S. agnetis</i>	+	-	-	-	+
Sp92-19	Arequipa	S. I	<i>S. sp</i>	+	-	-	-	-
Sp93-19	Arequipa	C. N	<i>S. sp</i>	+	-	-	-	-
Sp94-19	Arequipa	S. I	<i>S. gallinarum</i>	+	-	-	-	+
Sp95-19	Arequipa	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp96-19	Arequipa	S. I	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-
Sp97-19	Arequipa	Piel	<i>Staphylococcus</i> sp	+	-	-	-	-

S.I: seno infraorbital, S.A: sacos aéreos, C.N: cornete nasal

obtuvo 50 aislamientos resistentes a la vancomicina y tres de ellos de *S. aureus* en carne de pollo, además de 40% de MDR a 11 antibióticos.

Una de las razones de la presencia de estafilococos resistentes a diversos antibióticos es debida a la exposición a altas presiones selectivas, que causan un activo intercambio genético, logrando adaptarse al entorno en el que se desarrollan (Lebeaux *et al.* (2012). Esto ha aumentado los temores de una cepa mutante con resistencia a los antibióticos, habiéndose incluso encontrado casos de personas que, sin tener contacto con centros nosocomiales, fueron diagnosticadas con *S. aureus* resistente a la meticilina y estafilococos coagulasa negativos multirresistentes (Lebeaux *et al.*, 2012), posiblemente asociado con animales productores de alimentos o sus derivados (Bagcigil *et al.*, 2007). Estos genes han sido identificados mediante biología molecular logrando, por ejemplo, la documentación de *S. pseudintermedius* resistente a la meticilina (Duijkeren *et al.*, 2011).

En este estudio se pudo identificar 24/97 cepas resistentes a la meticilina mediante la detección del gen *mecA* por técnicas moleculares, distribuido en 2 SARM ((*Staphylococcus* Coagulasa Resistente a Meticilina).) y 22 SCNRM (*Staphylococcus* Coagulasa Negativo Resistente a Meticilina). Sin embargo, existen varias cepas enfrentadas con cefoxitina u oxacilina con presunta resistencia a meticilina que no presentaron el gen *mecA*. Este fenómeno de hetero resistencia puede estar relacionado con la presencia de algún otro marcador asociado con la resistencia, como algunos genes homólogos (Aqib *et al.*, 2018).

Los resultados moleculares identificaron la presencia de intercambio genético entre *S. aureus* y estafilococos coagulasa negativos de los genes *mecA* presentes en mues-

tras de hospederos de pollos. Esto conduce a una alerta, ya que existe la presencia del SARM y SCNRM en el mismo nicho; así como sucedió con la meticilina, podría ocurrir con la resistencia a vancomicina, ya que hay indicios de intercambio genético significativo dentro de pollos de engorde (Van Duin y Paterson, 2016). Además de la presencia de cuatro variantes genotípicas del gen *coa* + *S. aureus* hacen pensar de la plasticidad genética de esta bacteria (Goh *et al.*, 1992).

La investigación dirigida a evaluar la resistencia a varios antimicrobianos por microbiología y genética es de particular interés porque permite identificar la interacción y distribución en animales que producen alimentos en la comunidad, así como identificar los factores que contribuyen al aumento de la resistencia a múltiples fármacos en el uso indiscriminado de antimicrobianos en veterinaria (Levy y Marshall, 2004).

CONCLUSIONES

- Se encontró la presencia de dos SARM y 26 SCNRM (cefoxitina) y 69 SCN con presunta resistencia a la meticilina (oxacilina) en muestras de tejidos de pollos en las pruebas de antibiograma.
- Se encontró dos SARM y 22 SCNRM con el gen *mecA* mediante PCR en pollos de engorde.
- Se identificó cuatro genotipos de *Staphylococcus aureus* con sus propias variantes del polimorfismo del gen coagulasa.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Médico Veterinario Rosario Condori por el apoyo logístico, sugerencias y revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

1. **Aqib AI, Ijaz M, Farooqi SH, Ahmed R, Shoaib M, Ali MM, et al. 2018.** Emerging discrepancies in conventional and molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. *Microb Pathogenesis* 116: 38-43. doi: 10.1016/j.micpath.-2018.01.005
2. **Bagcigil FA, Moodley A, Baptiste KE, Jensen VF, Guardabassi L. 2007.** Occurrence, species distribution, antimicrobial resistance and clonality of methicillin and erythromycin-resistant staphylococci in the nasal cavity of domestic animals. *Vet Microbiol* 121: 307-315. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.-12.007
3. **Barbier F, Ruppé E, Hernandez D, Lebeaux D, Francois P, Felix B, et al. 2010.** Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in the community: high homology of SCCmec IVa between *Staphylococcus epidermidis* and major clones of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 202: 270-281. doi: 10.1086/653483
4. **Breves A, Miranda CA, Flores C, Filippis ID, Clementino MM. 2015.** Methicillin- and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in health care workers and medical devices. *J Bras Patol Med Lab* 51:143-152. doi: 10.5935/1676-2444.20150025.
5. **Campos PE, Martin NE, Pulido RG, Martin PJ, Caro CE, Donate CJ, et al. 2014.** Multiplex PCR assay for identification of six different *Staphylococcus* spp and simultaneous detection of methicillin and mupirocin resistance. *J Clin Microbiol* 52: 2698-2701. doi: 10.1128/jcm.00918-14
6. **CLSI. 2017.** Estándares de rendimiento para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. 27th ed. Suplemento CLSI M100s. Wayne, PA: Instituto de estándares clínicos y de laboratorio. [Internet]. Disponible en: <https://clsi.org/>
7. **Dalcin MP. 2012.** Análisis, distribución de especies, prevalencia de genes de enterotoxinas y perfil de resistencia a antibióticos de estafilococos coagulasa positivos aislados de carne de franco resfriada y congelada Tesis de Maestría. Brasil: Univ. Federal Do Rio Grande Do Sul. 82 p.
8. **Duijkeren EV, Catry B, Greko C, Moreno MA, Pomba MC, Pyorala S, et al. 2011.** Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Antimicrob Chemoth* 66: 2705-2714. doi:10.1093/jac/dkr367
9. **Espejo LJ, Rodríguez KL, Rodríguez MF, Ramírez AP. 2019.** Identificación genotípica de *Staphylococcus* con fenotipo metilino resistente aislados de muestras de humanos, animales y ambiente. *Rev Inv Vet Peru* 30: 364-376. doi: 10.15381/rivep.v30i1.14614
10. **Freitas MFL, Mota RA, Leão AEDS, Figueiredo ML, Fonte MM, Vieira RFC. 2004.** Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp aisladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. *Arq Bras Med Vet Zoo* 56: 405-407. doi: 10.1590/S0102-09352004000300019
11. **Goh SH, Byrne SK, Zhang JL, Chow AW. 1992.** Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 30: 1642-1645.
12. **Grundmann H, Aires-De-Sousa M, Boyce J, Tiemersma E. 2006.** Emergence and resurgence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat. *Lancet* 368: 874-885. doi: 10.1016/s0140-6736(06)68853-3
13. **Haskell KJ, Schriever SR, Fonoi-moana KD, Haws B, Hair BB, Wienclaw TM, et al. 2018.** Antibiotic resistance is lower in *Staphylococcus aureus* isolated from antibiotic-free raw meat as compared to conventional raw meat. *PLoS One* 13: e0206712. doi: 10.1371/journal.pone.0206712

14. **Hoet AE, Johnson A, Nava-Hoet RC, Bateman S, Hillier A, Dyce J, et al. 2011.** Environmental methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a veterinary teaching hospital during a nonoutbreak period. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 609-615. doi: 10.1089/vbz.2010.0181
15. **Kloos WE, Bannerman TL. 1994.** Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7: 117-140. doi: 10.1128/cmr.7.1.117
16. **Kern A, Perreten V. 2013.** Clinical and molecular features of methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci of pets and horses. *J Antimicrob Chemoth* 68: 1256-1266. doi: 10.1093/jac/dkt020
17. **Lebeaux D, Barbier F, Angebault C, Benmahdi L, Ruppé E, Felix B, et al. 2012.** Evolution of nasal carriage of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a remote population. *Antimicrob Agents Ch* 56: 315-323. doi: 10.1128/AAC.00547-11
18. **Levy SB, Marshall B. 2004.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10: S122-129. doi: 10.1038/nm1145
19. **López VM, Martínez C, Talavera RM, Valdez AJ, Velázquez V. 2015.** Detection of *mecA*, *mecI* and *mecR1* genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of bovine origin isolated from family dairy farms, Mexico. *Arch Med Vet* 47: 245-249. doi: 10.4067/S0301-732X2015000200018
20. **[NRC] National Research Council. 1999.** The use of drugs in food animals. Washington DC: Committee on Drug Use in Food Animals. [Internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK232571/>
21. **Osman K, Badr J, Al-Maary KS, Moussa IM, Hessain AM, Girah ZM, et al. 2016.** Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase-positive and negative-*Staphylococcus* in chicken meat retailed to consumers. *Front Microbiol* 7: 1846. doi: 10.3389/fmicb.2016.01846
22. **Pondit A, Haque ZF, Sabuj AAM, Khan MSR, Saha S. 2018.** Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from chicken and quail eggshell. *J Adv Vet Anim Res* 5: 466-471. doi: 10.5455/javar.2018.e300
23. **Salvador CGC, Acevedo C, Bennani A. 2005.** Técnicas para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina en el laboratorio de microbiología clínica. AEFA. Actualidades 74-78. [Internet]. Disponible en: http://www.yumpu.com/es/document/view/12571349/11-tecnicaspara-la-deteccion-de-staphylococcus-aureus-pncq.org.br/biblioteca/actualidades2005_11.pdf
24. **Schmidt T, Kock MM, Ehlers MM. 2017.** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis and close human contacts in South African dairy herds: genetic diversity and inter-species host transmission. *Front Microbiol* 8: 511. doi: 10.3389/fmicb.2017.00511
25. **Silbergeld EK, Graham J, Price LB. 2008.** Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu Rev Publ Health* 29: 151-169. doi: 10.1146/annurev.publhealth.-29.020907.090904
26. **Sousa M, Silva N, Igrejas G, Silva F, Sargo R, Alegria N, et al. 2014.** Antimicrobial resistance determinants in *Staphylococcus* spp recovered from birds of prey in Portugal. *Vet Microbiol* 171: 436-440. doi: 10.1016/j.vetmic.-2014.02.034
27. **Uchuya H. 2015.** Presencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en crianza porcina de traspatio del departamento de Tumbes. Tesis de Médico Veterinario. Lima, Perú: Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 61 p.

28. **Van Duin D, Paterson DL. 2016.** Multidrug-resistant bacteria in the community. *Infect Dis Clin N Am* 30: 377-390. doi: 10.1016/j.idc.2016.02.004
29. **Werckenthin C, Cardoso M, Martel JL, Schwarz S. 2001.** Antimicrobial resistance in staphylococci from animals with particular reference to bovine *Staphylococcus aureus*, porcine *Staphylococcus hyicus*, and canine *Staphylococcus intermedius*. *Vet Res* 32: 341-362. doi: 10.1051/vetres:2001129
30. **Wendlandt S, Feßler AT, Monecke S, Ehrlich R, Schwarz S, Kadlec K. 2013.** The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. *Int J Med Microbiol* 303: 338-349. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.02.006