



Participación de las bacterias lácticas en la salud humana y en la calidad alimentaria

6ª Reunión de la Red Temática BAL

Libro de Resúmenes

Tarragona, 28-29 junio 2012

Edición:

Manuel Zúñiga Cabrera

Albert Bordons de Porrata-Doria

Título original:

6ª Reunión de la Red Temática BAL: Participación de las bacterias lácticas en la salud humana y en la calidad alimentaria.

Libro de Resúmenes. Tarragona, 28-29 junio 2012

Edición:

Manuel Zúñiga Cabrera

Coordinador de la Red BAL, Científico Titular, Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Paterna, Valencia

Albert Bordons de Porrata-Doria

Catedrático Emérito, Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona

Libro financiado por la Acción Complementaria modalidad B, código AC2012-00020, aprobada el 11 de mayo de 2012, del Ministerio de Economía y Competitividad conjuntamente con el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria.



ISBN: 978-84-8424-212-3

Depósito Legal: T. 622-2012

Servicio de Publicaciones de la Universidad Rovira i Virgili
Tarragona, junio 2012



9. Detección y cuantificación de genes de resistencia a antibióticos en productos lácteos

Ana Belén Flórez¹, Ángel Alegría^{1,2}, Franca Rossi², Susana Delgado¹, Elena Fernández¹, Sandra Torriani², y Baltasar Mayo¹

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Carretera de Infiesto, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, España¹, Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona, Strada Le Grazie, 15, 37134-Verona, Italia²

Introducción. La resistencia a antibióticos en microorganismos oportunistas y patógenos es un problema de salud pública a escala mundial que complica y encarece el tratamiento de las enfermedades infecciosas (Levy and Marshall, 2004). La resistencia a antibióticos en los microorganismos comensales y beneficiosos no constituye en sí misma una preocupación. Sin embargo, estas poblaciones podrían servir de reservorios de determinantes de resistencia que, en último término, se pueden transferir a los patógenos. De hecho, varios autores creen que la cadena alimentaria es una de las principales vías de transmisión de genes de resistencia, sea durante la elaboración de los alimentos o durante el tránsito intestinal (Teuber et al., 1999; Salyers et al., 2004). En general, el análisis de la resistencia a antibióticos implica el aislamiento de los microorganismos y su ensayo frente al antibiótico de interés. En algunos ecosistemas, sin embargo, se estima que una mayoría de microorganismos no es cultivable, incluyendo los ecosistemas alimentarios (Justé et al., 2008). Con el fin de paliar estas limitaciones se han desarrollado una serie de técnicas moleculares cultivo-independientes (DGGE, qPCR, metagenómica funcional, etc.) para la caracterización microbiológica de estos hábitats. Estos métodos se están comenzando a aplicar también a la detección y cuantificación de determinantes de resistencia a antibióticos.

Objetivos. En este trabajo, que se ha realizado en parte mediante una Acción Integrada entre España e Italia (IT2009-0080), nos hemos marcado dos objetivos complementarios. Por un lado, la identificación y cuantificación de genes de resistencia a los antibióticos tetraciclina y eritromicina, cuya resistencia está ampliamente extendida entre las bacterias ácido-lácticas (Ammor et al., 2007). En un segundo objetivo pretendemos hacer un catálogo de los genes de resistencia (resistoma) presentes en nuestro queso modelo por excelencia, el queso de Cabrales.

Material y Métodos. Quesos. Se han utilizado 10 quesos españoles (Cabrales, Zamorano, Majorero, Mahón, Torta del Casar, Manchego, Ibores, Garrotxa, Boffard y Monteoro) y 10 quesos italianos (Gorgonzola dulce, Gorgonzola picante, Caprino, Quartirolo Lombardo, Pecorino Sardo, Grana Padano, Montasio, Monte Veronese, Asiago y Taleggio) procedentes de regiones distintas, elaborados con distintos tipos de leche y con diversas tecnologías, incluyendo queso de leche cruda y leche pasteurizada.

Análisis microbiológicos. Los quesos se sometieron a un análisis microbiológico convencional en medios selectivos y diferenciales suplementados y no suplementados con antibióticos.

Aislamiento de ADN. Se aisló ADN microbiano total directamente de las muestras de queso, así como de los microorganismos de las placas de recuento de aerobios totales (PCA).

PCR específicas. La presencia de determinantes de resistencia a tetraciclina y eritromicina se investigó mediante reacciones de PCR, con oligos específicos para genes de resistencia a tetraciclina (*tetM*, *tetW*, *tetO*, *tetS*, *tetK* y *tetL*) y eritromicina (*ermB*, *ermF*, *ermA* y *ermC*).

DGGE y qPCR. La técnica de DGGE se utilizó para estudiar la heterogeneidad de los genes de resistencia a tetraciclina, y la técnica qPCR para la cuantificación de éstos en el ADN total del queso.

Metagenómica funcional. Se ha construido una librería génica con ADN total de un queso Cabrales en el vector pCC1FOS. La librería se transformó en *Escherichia coli* y se han seleccionado los clones que confieren resistencia a tetraciclina.

Resultados y Discusión. El número de microorganismos resistentes a tetraciclina y eritromicina ha sido muy variable para las distintas poblaciones de bacterias y en los distintos quesos. El rango de resistentes a tetraciclina y eritromicina fluctuaba entre 10^2 y 10^6 ufc/g de queso en las placas de PCA (bacterias aeróbicas totales). Este mismo rango para los recuentos en MRS (bacterias lácticas) se situó entre 10^2 y 10^5 ufc/g. Las poblaciones resistentes de *Enterococcus* (Slanetz and Blartey) y *Staphylococcus* (Baird-Parker) variaba entre 10^2 y 10^4 ufc/g. En general, el número de resistentes estaba muy relacionado con el tratamiento de la leche de elaboración, siendo mayor en los quesos elaborados con leche cruda.

Mediante las reacciones de PCR específicas se obtuvo amplificación positiva para uno o más genes de resistencia a tetraciclina en todos los quesos, excepto en los quesos italianos Gorgonzola dulce, Grana Padano y Montasio. En los quesos Cabrales, Zamorano, Torta del Casar, Boffard, Pecorino Sardo y Asiago se detectaron al menos 4 determinantes genéticos distintos para este antibiótico. El principal mecanismo involucrado en la resistencia fue la presencia de los genes de protección ribosomal *tetS*, *tetM* y *tetW*. El gen de protección ribosomal *tetO* se detectó en dos quesos españoles y en dos quesos italianos. En algunos quesos se detectaron también, los genes *tetK* y *tetL* que codifican para sistemas efflux. En cuanto a genes de resistencia a eritromicina, el gen *ermB* parece estar ampliamente extendido tanto en quesos españoles como en italianos, detectándose en todos excepto en tres (Mahón, Quartirolo Lombardo y Pecorino Sardo). También se detectó el gen *ermF* en 7 de los 10 quesos italianos, aunque solo se observó amplificación positiva para este gen en un queso español (Boffard).

En estos momentos, estamos tratando de analizar el ADN total de los quesos mediante PCR-DGGE, utilizando oligonucleótidos para los genes *tetS*, *tetM*, *tetW* y *tetO*. Lo que se pretende es poner a punto un método capaz de detectar variantes de cada uno de estos genes. Posteriormente, el ADN se utilizará también para la cuantificación por qPCR de los genes de resistencia más habituales, y los resultados se compararán con los que se obtengan con primers universales para el gen que codifica el ARNr 16S.

Mediante la librería metagenómica hemos obtenido un total de $3,6 \times 10^5$ colonias resistentes a tetraciclina. El tamaño medio del inserto fue de aproximadamente 30 kpb, lo que representa unos 2100 genomas bacterianos (estimando un tamaño medio de 5 Mb). Se ha aislado DNA de 113 clones, de los que se han caracterizado sus perfiles de restricción con el enzima *EcoRI*. Se ha encontrado una gran diversidad de perfiles, aunque muchos de ellos pueden tener bandas de ADN comunes (y, por tanto, contener el mismo gen de resistencia). La secuenciación de uno de los extremos de los 113 insertos y la comparación de secuencias sugiere que el 99% de los insertos contiene ADN de enterobacterias (*Escherichia*, *Salmonella*, etc.). Dada su mayor carga de resistencias, este grupo podría ser la fuente de transferencia de genes de resistencia a antibióticos a otros grupos bacterianos del queso. En la actualidad, hemos iniciado la caracterización de los genes de resistencia que contienen y de sus regiones adyacentes, de dónde se esperan obtener datos de los mecanismos y vías de transferencia

Bibliografía

- Ammor, M.S., Flórez, A.B., and Mayo, B. 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24: 559-570.
- Levy, S.B., and Marshall, B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: 122-129.
- Justé, A., Thomma, B.P., and Lievens, B. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25: 745-761.
- Salyers, A.A., Gupta, A., and Wang, Y. 2004. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. *Trends Microbiol.* 12: 412-416.
- Teuber, M., Meile, L., and Schwarz, F. 1999. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 115-137.

Palabras clave: seguridad alimentaria, resistencia a antibióticos, resistencia a tetraciclina, resistencia a eritromicina, productos lácteos, microbiología cultivo-independiente