

Resistencia a antibióticos en bacterias ácido-lácticas y productos lácteos



Baltasar Mayo

- Presentación
- Bacterias ácido-lácticas (BAL)
- Antibióticos y resistencias
- Hipótesis del reservorio
- Resistencia a antibióticos en BAL
- Genes de resistencia a antibióticos en BAL
- Conclusiones

Grupo “Cultivos Lácteos Funcionales”



- **Dra. Ana Belén Flórez**
- **Dr. Mohamed Salim Amor**
- **Dra. Lucía Vázquez**
- **Dr. Auttawit Sirichoat**
- **Dra. Susana Delgado**
- **Dr. Ángel Alegría**
- Ldo. Javier Rodríguez
- Ldo. José Alejandro Valenzuela
-



Grupo Cultivos Lácteos Funcionales
Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA): 642383 CSIC

Objetivo:

“selección de microorganismos beneficiosos para su empleo en productos lácteos”

Líneas:

- 1.- Caracterización microbiológica de productos lácteos tradicionales y selección de fermentos
- 2.- Caracterización microbiológica de secciones del TGI humano y selección de probióticos

Cultivos Lácteos Funcionales

Microbiología de productos lácteos

- Queso de Peñamellera



- Queso de Cabrales



- Queso Casín



- Queso Oscypek (Polonia)



- Quesos Lighvan and Koozeh (Irán)



- Granos de kefir (Brasil)



- Yogur tradicional (Irán)



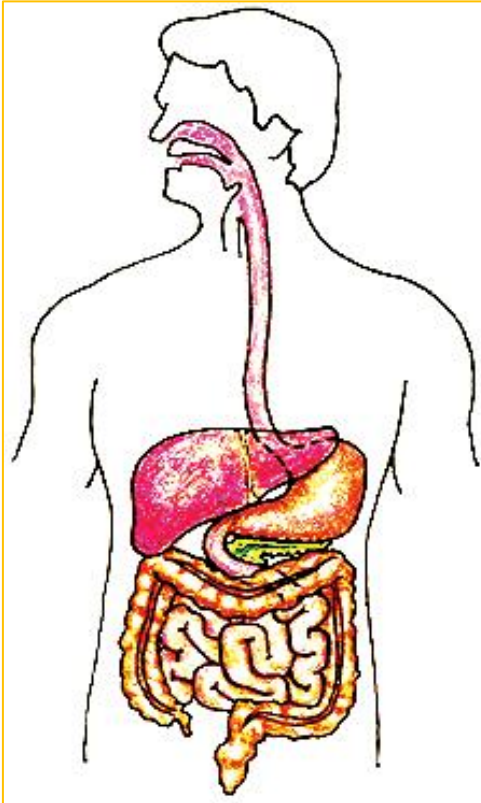
- Leche Fermentada Natural



Selección de BAL para fermentos específicos y generales

Cultivos Lácteos Funcionales

Microbiología gastrointestinal humana



Boca y faringe: 10^4 - 10^6 ufc/g

Treponema, Fusobacterium, Streptococcus, Eubacterium, Selenomonas, Haemophilus, Lactobacillus

Estómago: 10^1 - 10^4 ufc/g

Streptococcus, Lactobacillus, Levaduras

Yeyuno e íleon: 10^4 - 10^8 ufc/g

Lactobacillus, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Bifidobacterium, Fusobacterium, Bacteroides

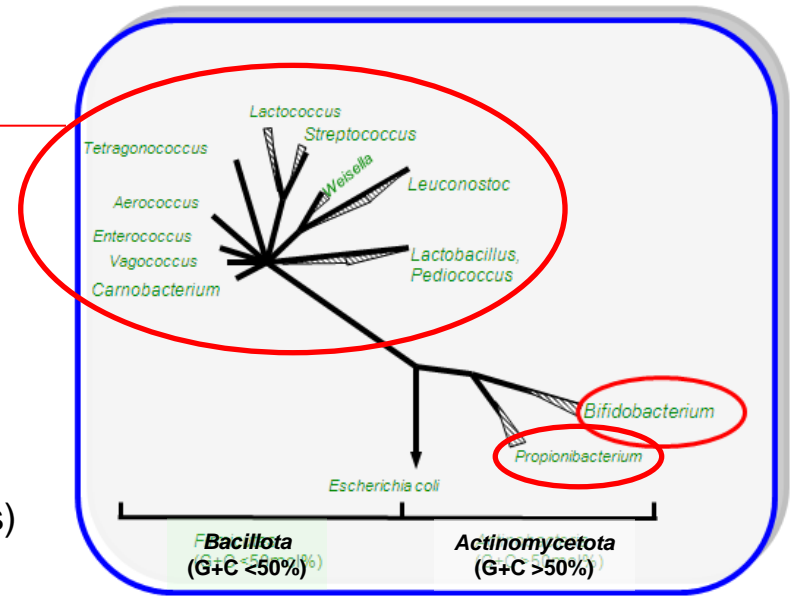
Colon: 10^{10} - 10^{14} ufc/g

Bacteroides, Bifidobacterium, Ruminococcus, Fusobacterium, Eubacterium, Clostridium, Lactobacillus, Streptococcus, Enterobacteriaceae, Enterococcus, Staphylococcus, Levaduras

Probióticos más específicos y más resistentes que los comerciales

Bacterias ácido-lácticas (BAL)

- Gram positivas
- No forman espora, inmóviles
- Catalasa negativas
- Anaerobias (la mayoría aerotolerantes)
- Exigentes: auxotrofías múltiples (medios ricos)
- Fermentadoras estrictas formando ácido láctico como producto de la fermentación de azúcares
- Tolerantes a las condiciones ácidas
- Bajo contenido G+C
- Bifidobacterias y propionibacterias filogenéticamente no relacionadas (se agrupan por razones ecológicas y prácticas)



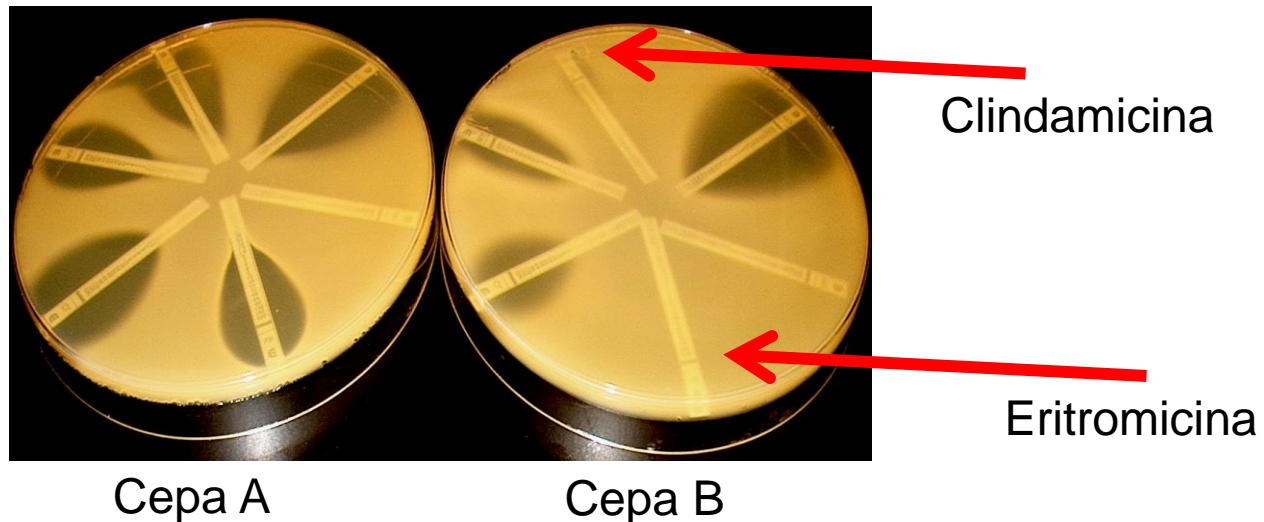
No patógenas

Bacterias ácido-lácticas (BAL)

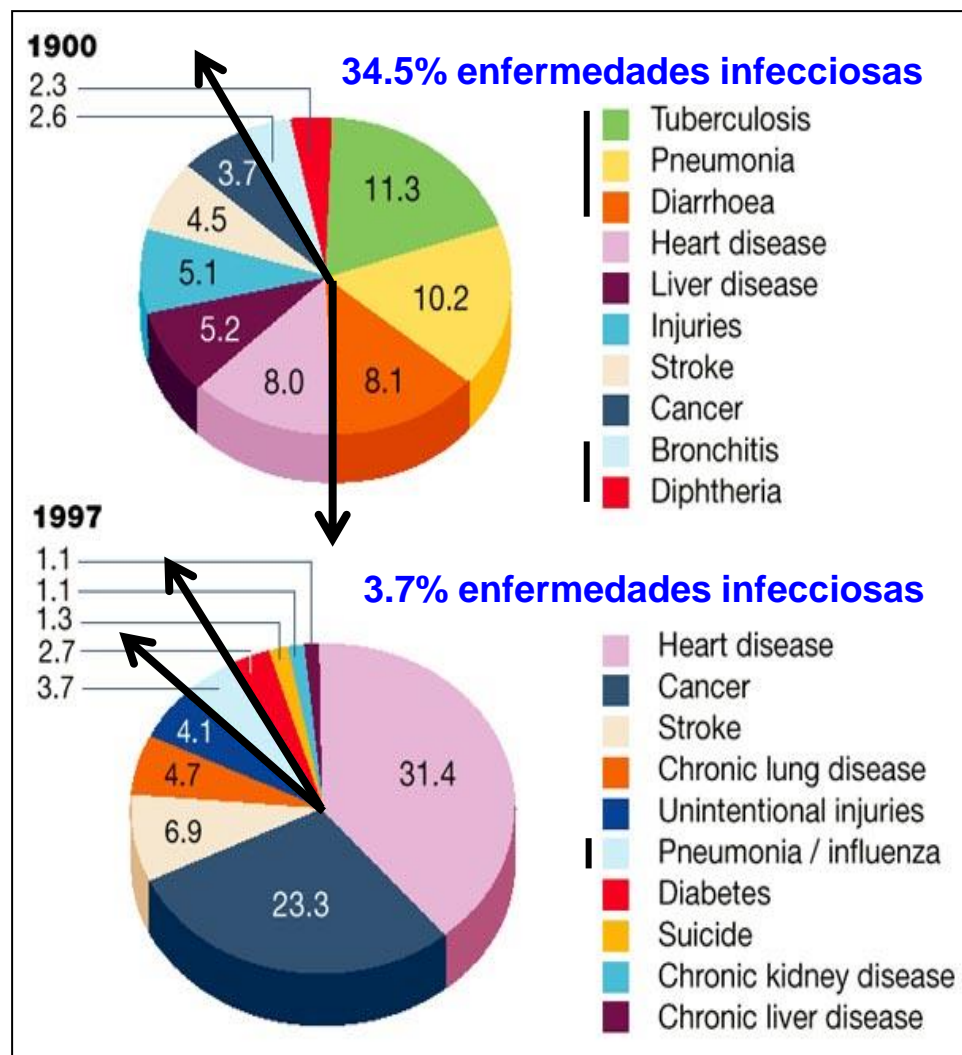
Resistencia a antibióticos

Propiedades clave:

- ✓ Buena capacidad acidificante
- ✓ Producción de aromas deseables
- ✓ Compatibilidad entre cepas
- ✓ No producción de sustancias tóxicas (aminas biógenas)
- ✓ Buenas propiedades de probiosis
- ✓ **Susceptibilidad a antibióticos**

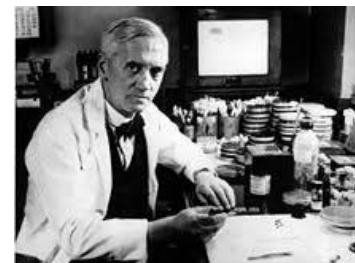


Antibióticos y resistencia a antibióticos

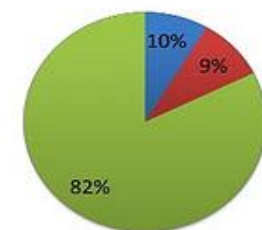


Cohen ML. 2000. *Nature*, 406:762-767

A. Fleming y la penicilina



Utilización de antibióticos

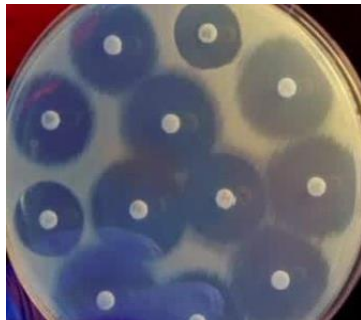
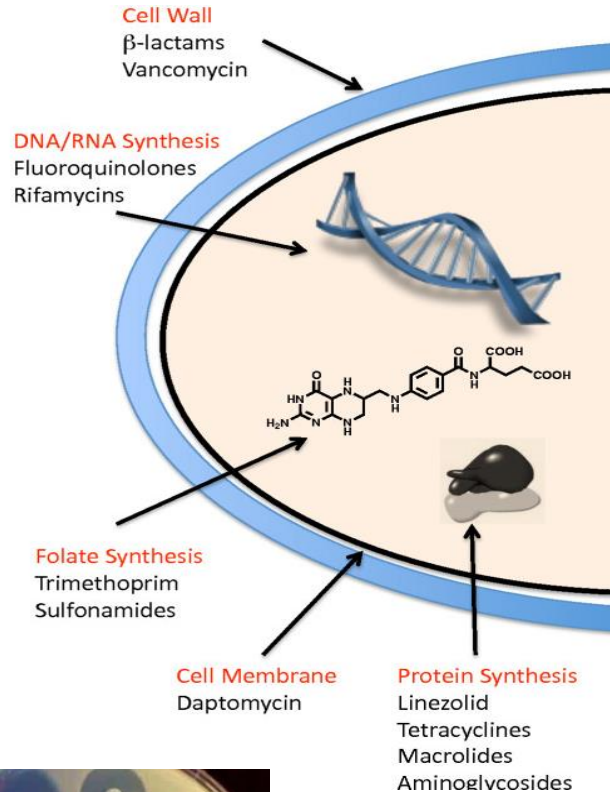


■ Humans ■ Pets
■ Farm animals

Antibióticos y resistencias

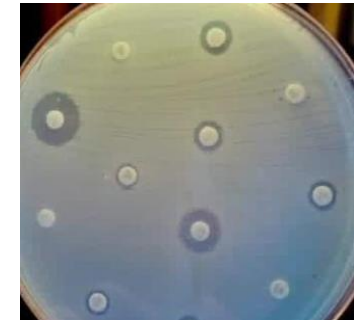
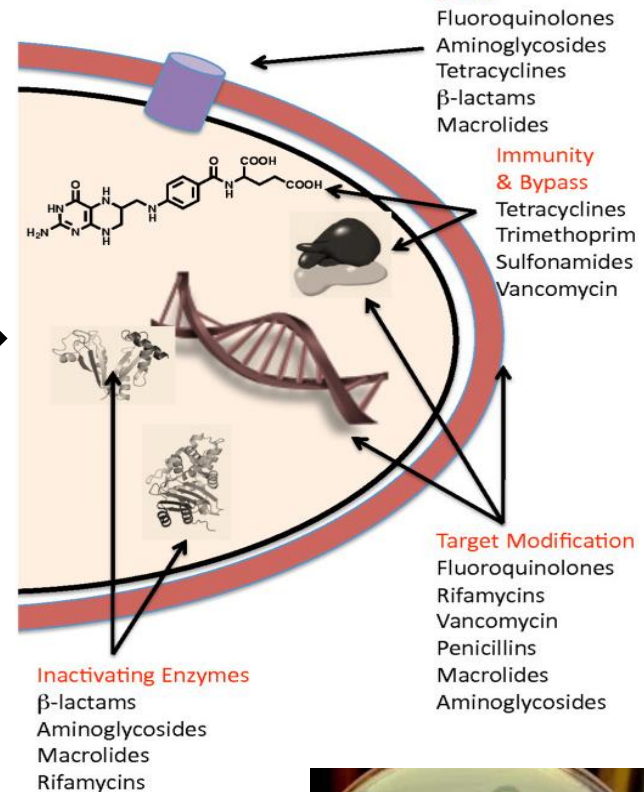
Mecanismos de acción

Sensibilidad



Mecanismos de resistencia

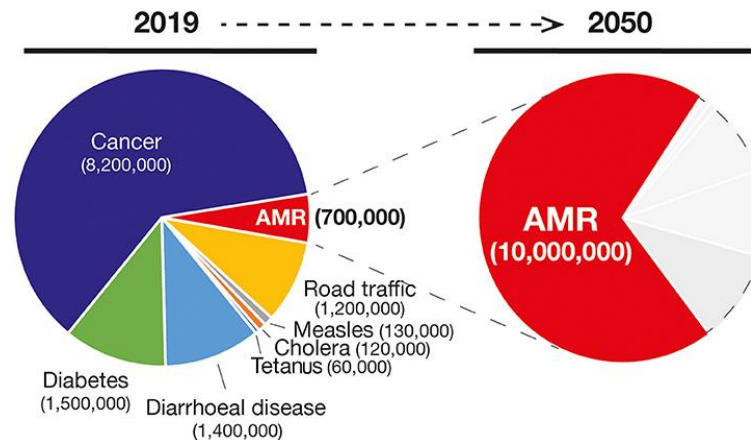
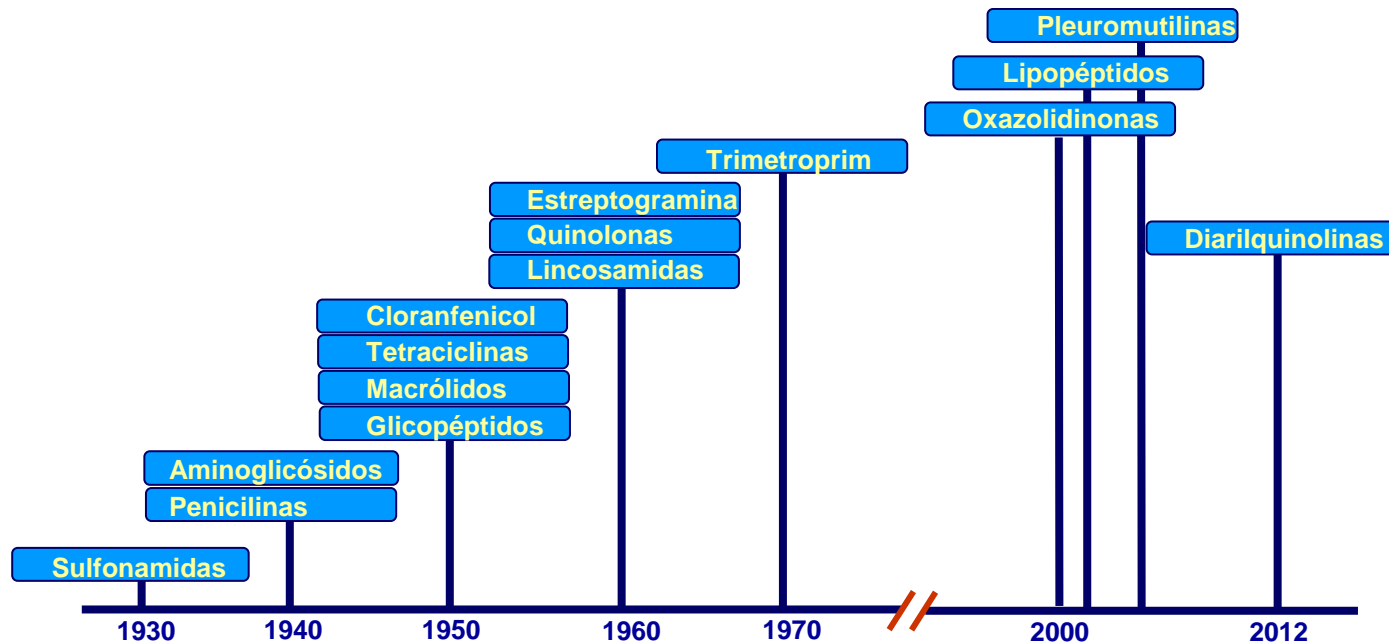
Resistencia: intrínseca, adquirida



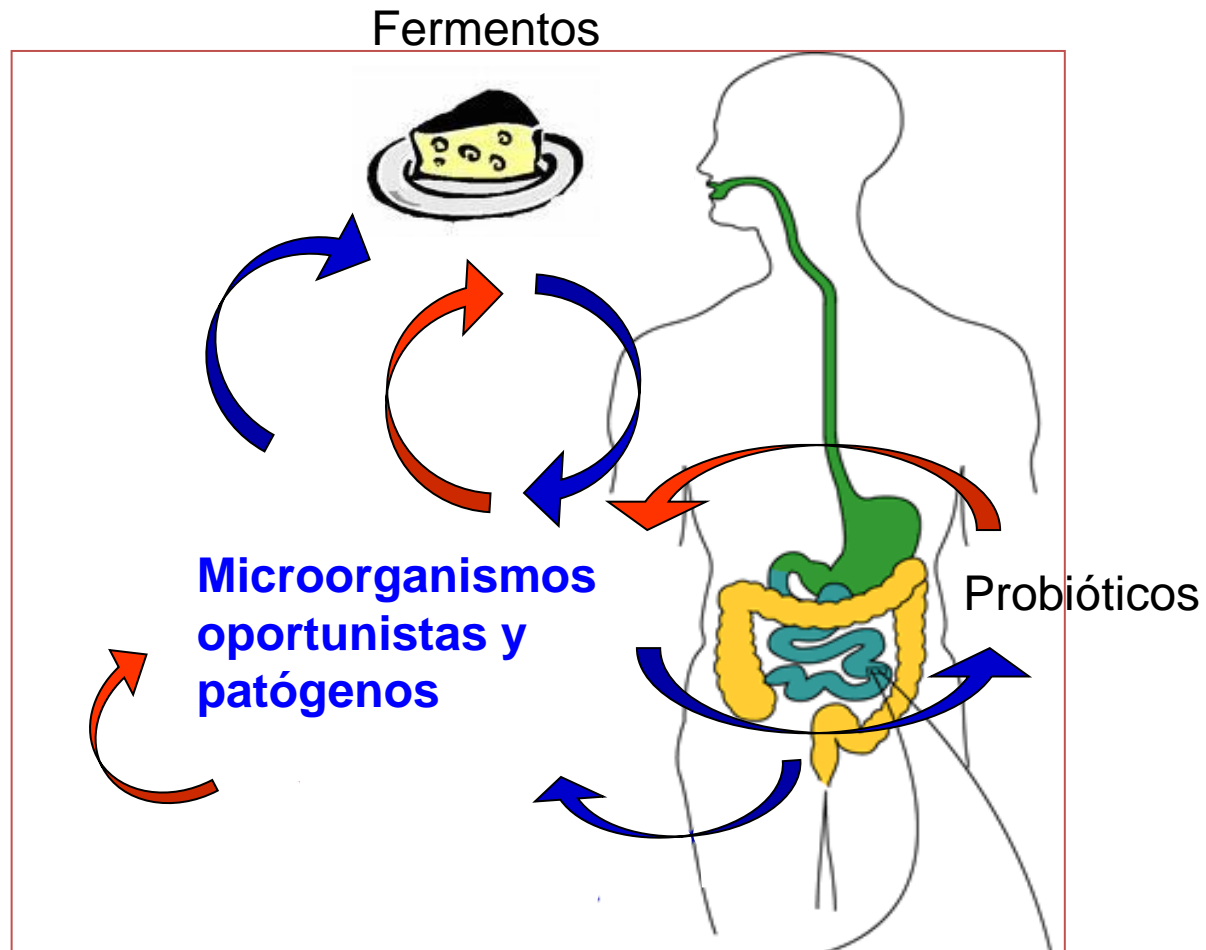
Escherichia coli
Staphylococcus aureus
Klebsiella pneumoniae
Acinetobacter baumannii
Pseudomonas aeruginosa
Enterococcus faecalis

Antibióticos y resistencias

Descubrimiento e introducción de antibióticos en clínica

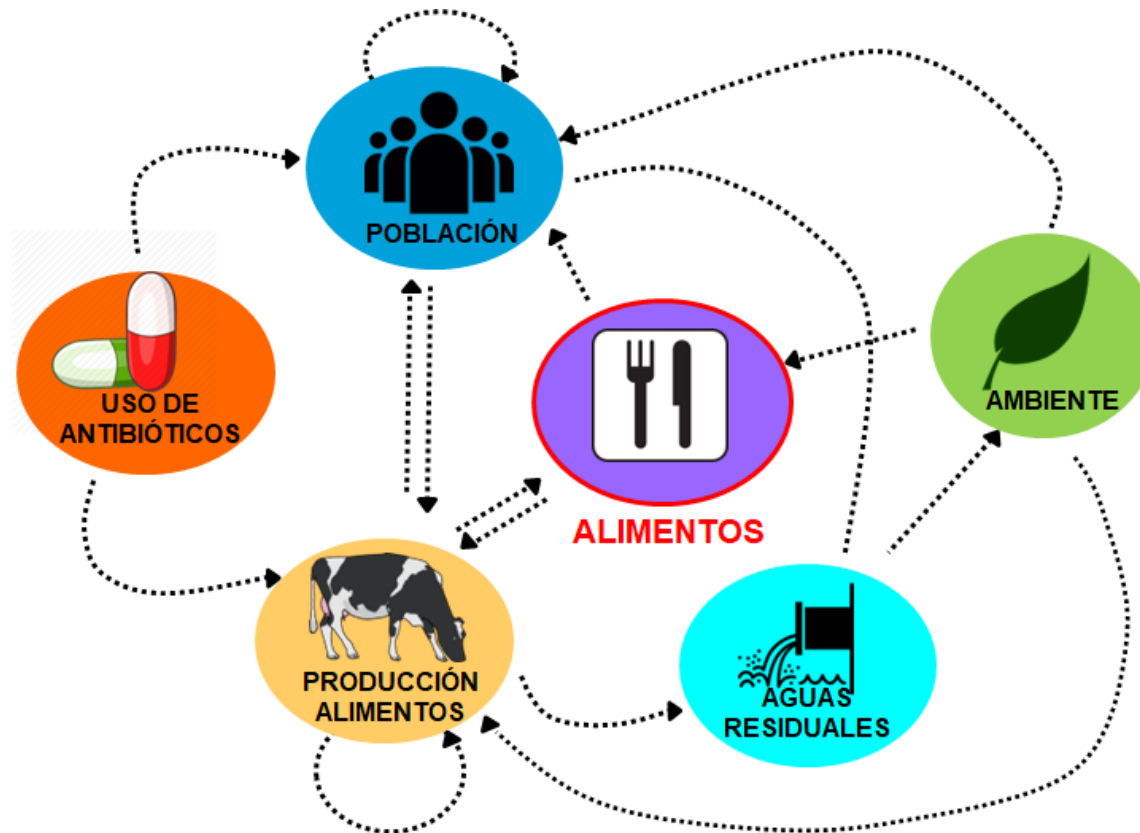


BAL/Bifidobacterias



Concepto "One Health"

Todos los ambientes están interconectados



Resistencia a antibióticos en BAL

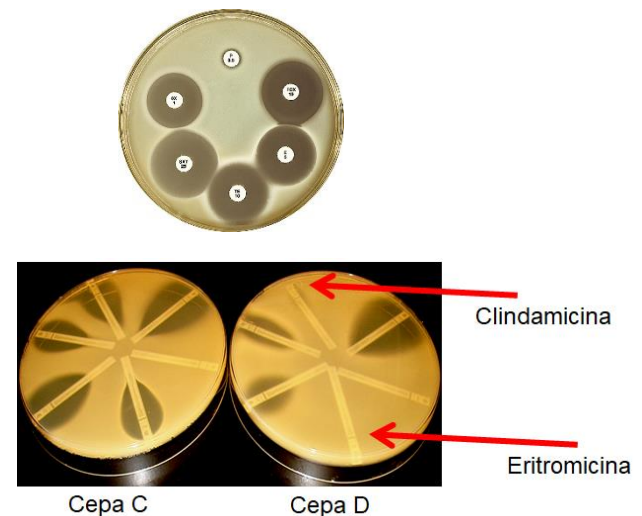
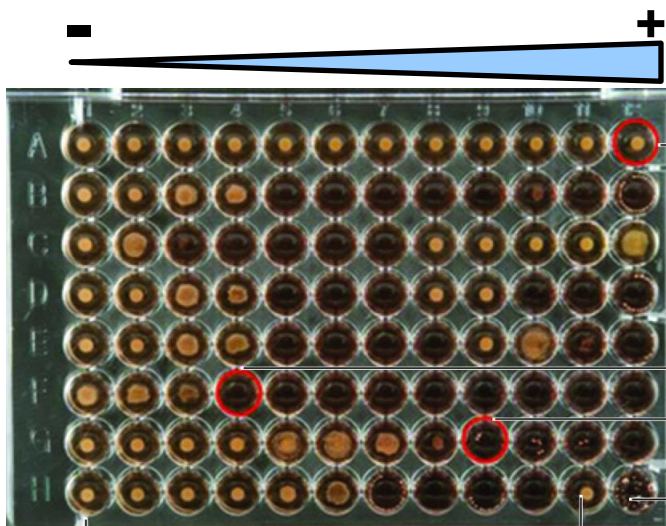
No introducir bacterias con resistencias en la cadena alimentaria:

- Estandarizar condiciones analíticas:
 - Medios de cultivo: sólido, líquido (Mueller-Hinton, IsoSensitest)
 - Establecer inóculo, tiempo y temperatura de incubación,...
 - Método de ensay: disco, dilución, E-test

ISO 10932:2010 (IDF 223:2010) Milk and milk products - Determination of the minimal inhibitory concentration of antibiotics applicable to bifidobacteria and non-enterococcal lactic acid bacteria

ACE-ART (Ref. 506214)

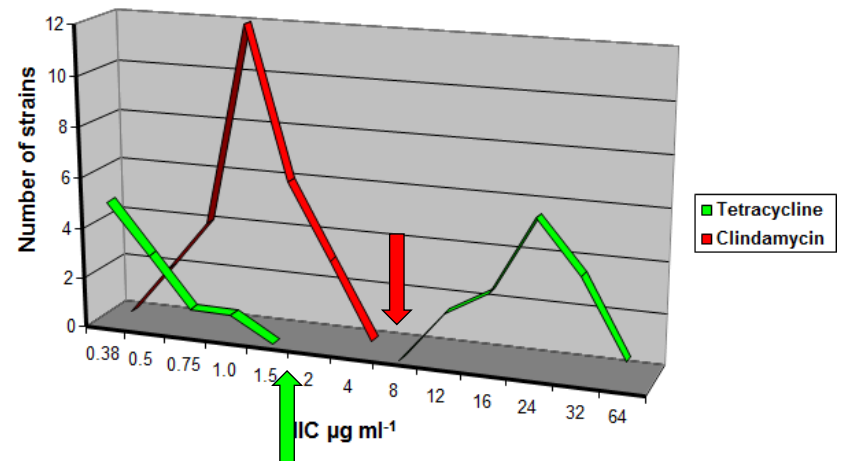
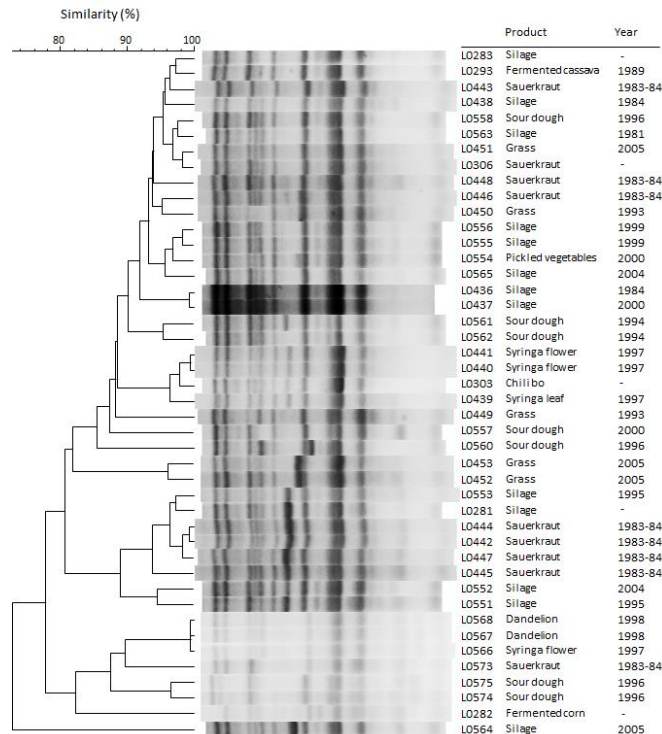
Medio **MLS**: 90% IsoSensitest / 10% MRS (Klare et al., 2005)



Resistencia a antibióticos en BAL

No introducir bacterias con resistencias en la cadena alimentaria:

- No han recibido el interés de las grandes Agencias: CLSI, EUCAST,...
- No existen puntos de corte “clínicos”, MCOFFs, ECOFFs

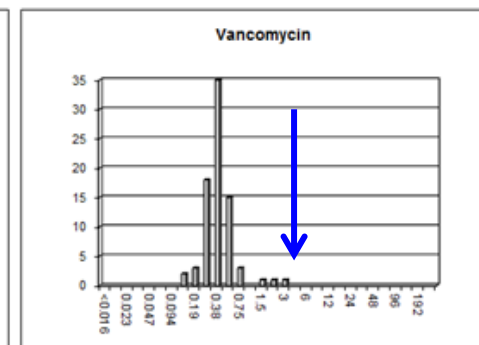
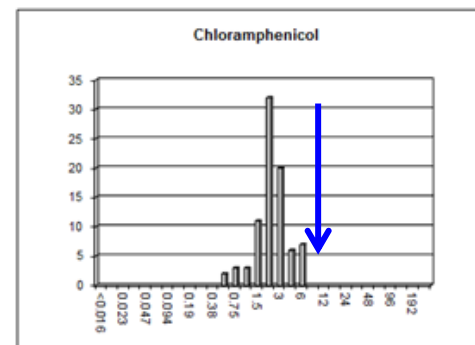
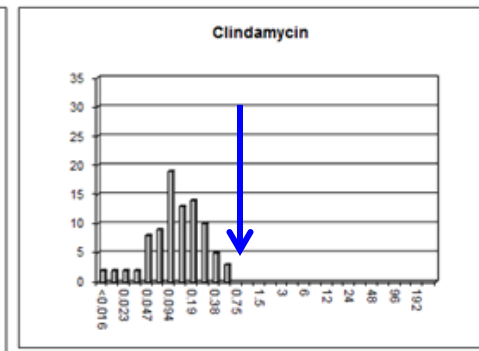
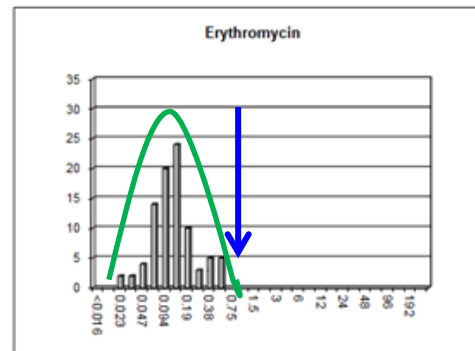
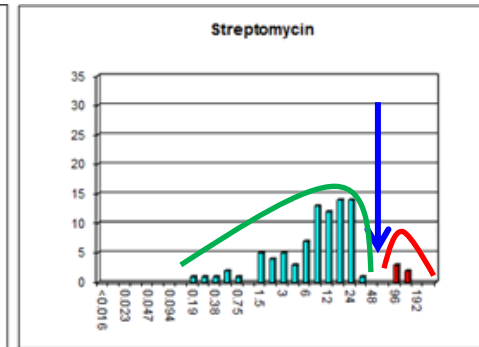
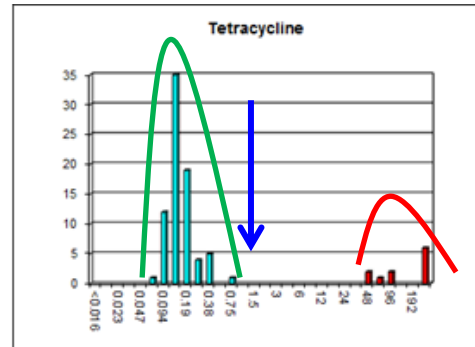


Distribución de CIMs

Resistencia a antibióticos en BAL

Lactococcus lactis
MCOFFs

Número de cepas

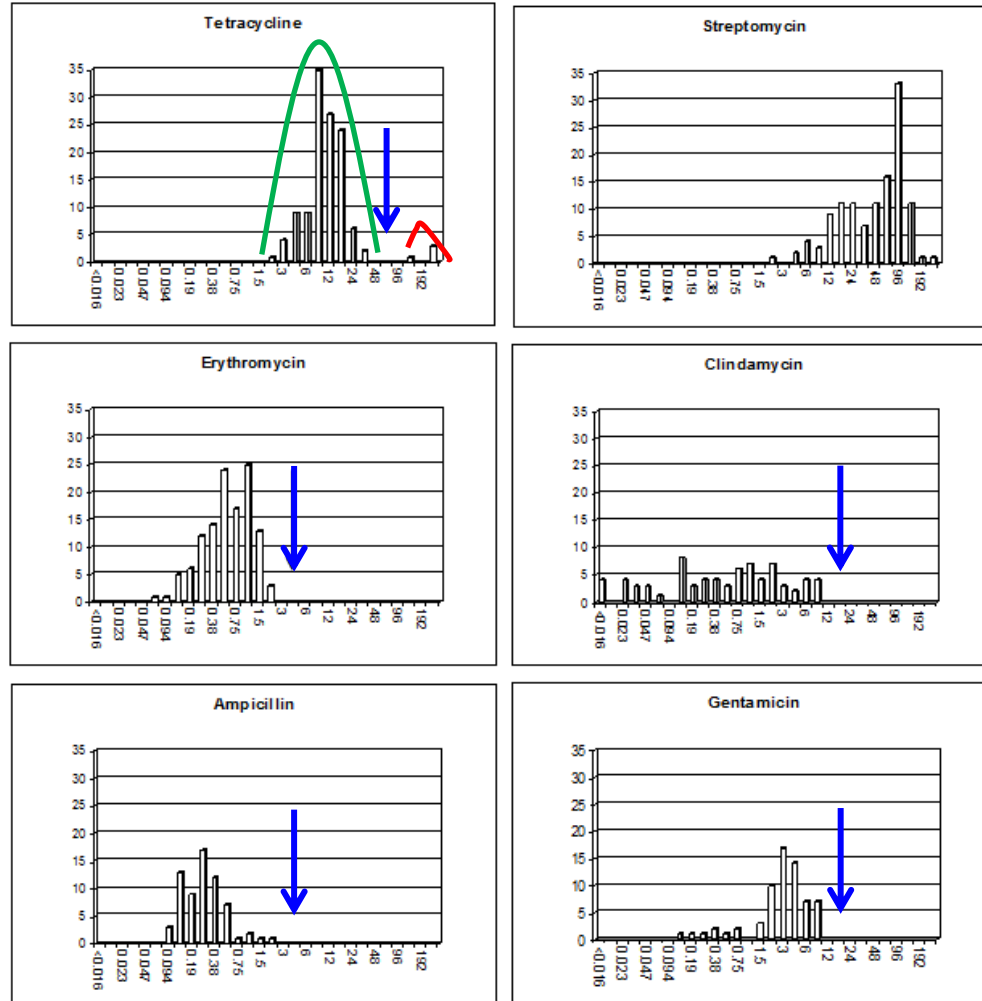


CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Resistencia a antibióticos en BAL

Lpb. plantarum
MCOFFs

Número de cepas



CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Distinguir resistencias intrínsecas de resistencias adquiridas

Resistencia a antibióticos en BAL

EFSA's cut-offs, 2018

	Ampicillin	Vancomycin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Erythromycin	Clindamycin	Tetracycline	Chloramphenicol
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^(a)	2	2	16	16	16	1	4	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	4	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^(b)	2	n.r.	16	64	64	1	4	8 ^(c)	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	4	32	4
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative ^(d)	4	n.r.	16	64	64	1	4	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	4	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	4	8	4
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	4	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	n.r.	64	2	2	4	4
<i>Bacillus</i>	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1,024	128	4	4	4	16
<i>Corynebacterium</i> and other Gram-positive	1	4	4	16	8	1	4	2	4
Enterobacteriaceae	8	n.r.	2	8	16	n.r.	n.r.	8	n.r.

Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)

Alimentación animal

Resistencia a antibióticos en BAL

No introducir bacterias con resistencias en la cadena alimentaria:

- fermentos
- probióticos

Cepas analizadas en nuestro grupo:

<i>Lactococcus lactis</i>	200
<i>Lactobacillus</i> spp.	200
<i>Bifidobacterium</i> spp.	100
<i>Streptococcus thermophilus</i>	50
<i>Leuconostoc</i> spp.	30
Otras especies	200
TOTAL	780

Tetragenococcus spp.
Staphylococcus equorum

Resistencia a antibióticos en BAL

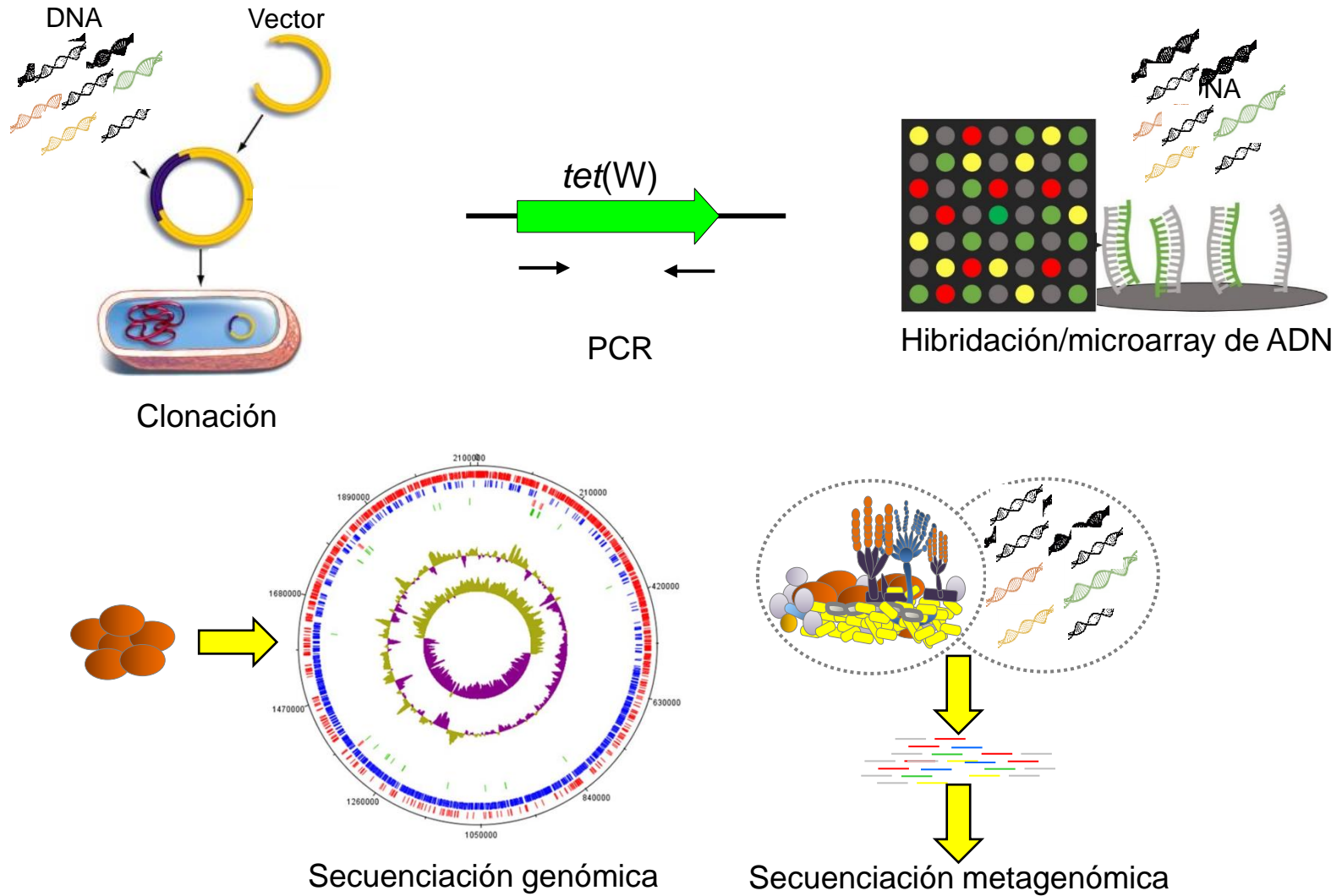
Resistencia a antibióticos de 34 cepas *Leuconostoc* spp. de quesos

Antibiótico	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)											ECOFF* ($\mu\text{g/mL}$)
	<1	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	
Gentamycin	9	15	10									16
Kanamycin			3		8	6	13	2	1		1	16
Streptomycin			2	3	3	22	3		1 ^a			64
Neomycin	8	5	16	3	1		1					8
Tetracycline			19	13			1	1				8
Erythromycin	31	2								1 ^a		1
Clindamycin	33									1 ^a		1
Chloramphenicol			1	12	19	1	1					4
Ampicillin	29	5										2
Penicillin G	34											1
Vancomycin											34 ^a	≥ 32
Virginiamycin	25	8							1			4
Linezolid		2	27	5								≥ 8
Trimethoprim					1	7	4	1	21 ^a			8
Rifampicin	10	8	13	2	1							≥ 4
Ciprofloxacin				15	16	2		1				>32

Eliminar las cepas “sospechosas” de los procesos de selección

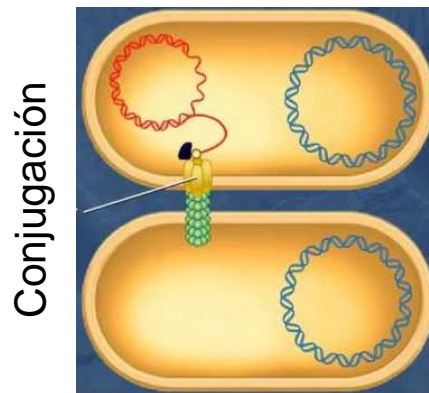
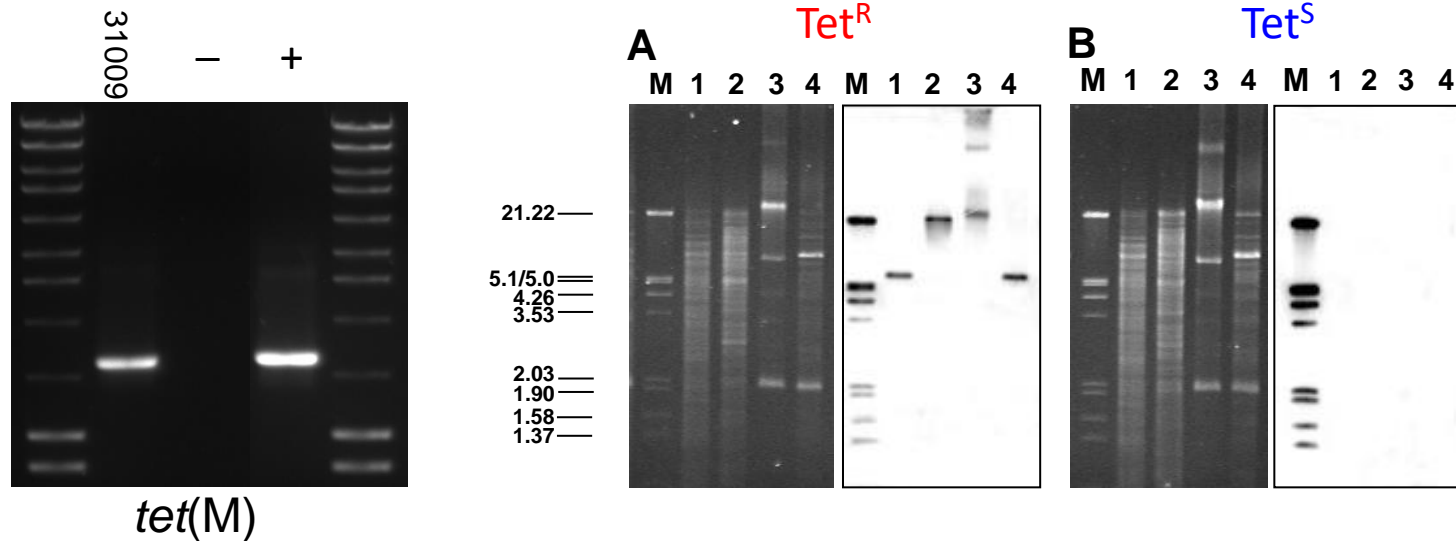
Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Análisis de la base genética de la resistencia: genes, localización, riesgo de transferencia,...



Genes de resistencia a antibióticos en BAL

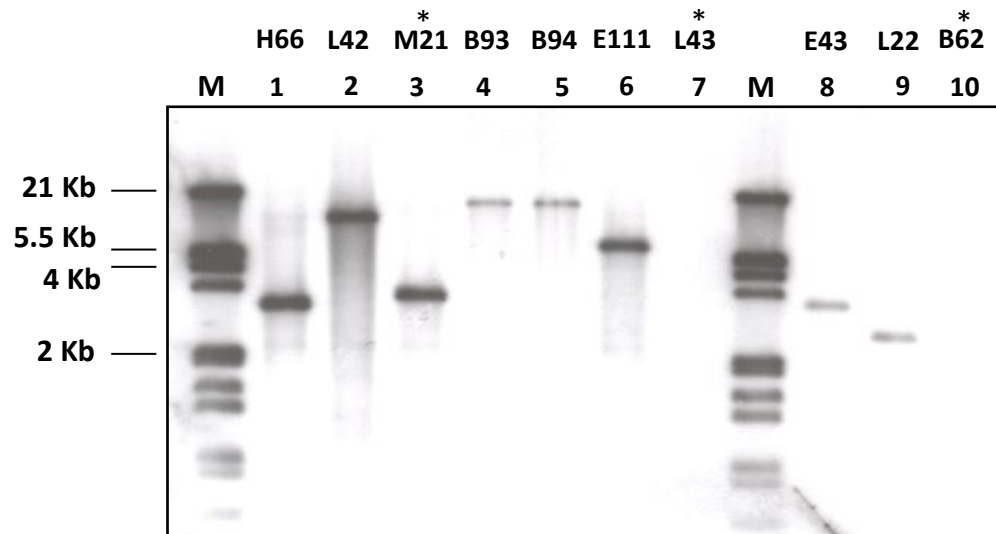
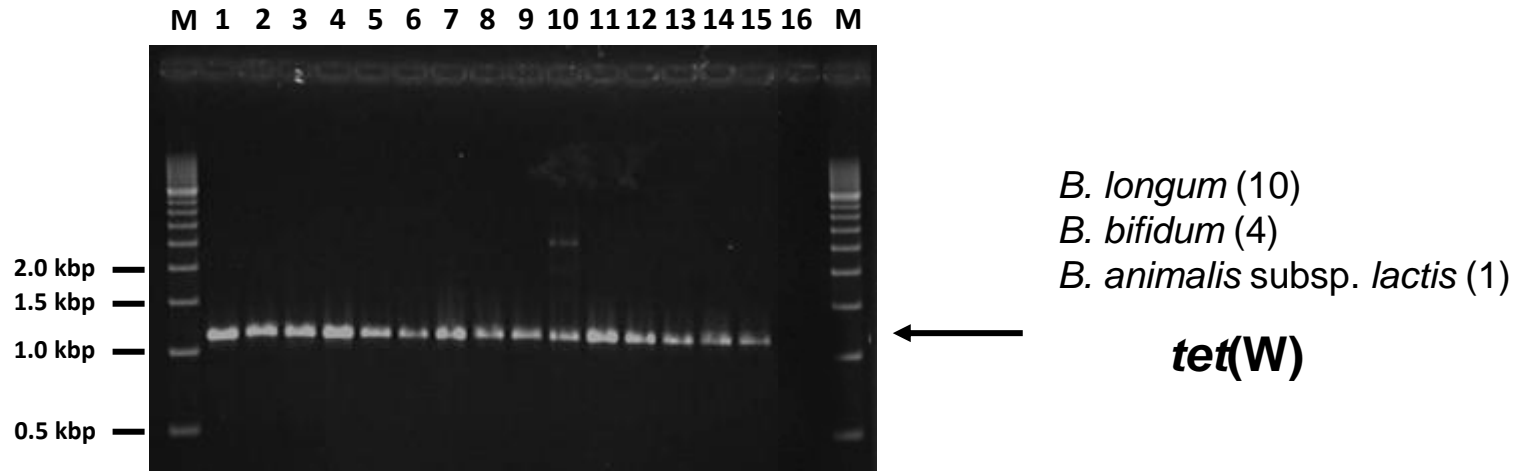
Lactococcus lactis IPLA 31009 resistente a tetraciclina: *tet(M)*



Lactococcus spp.
Enterococcus spp.
[*tet(M)*- Tn916]

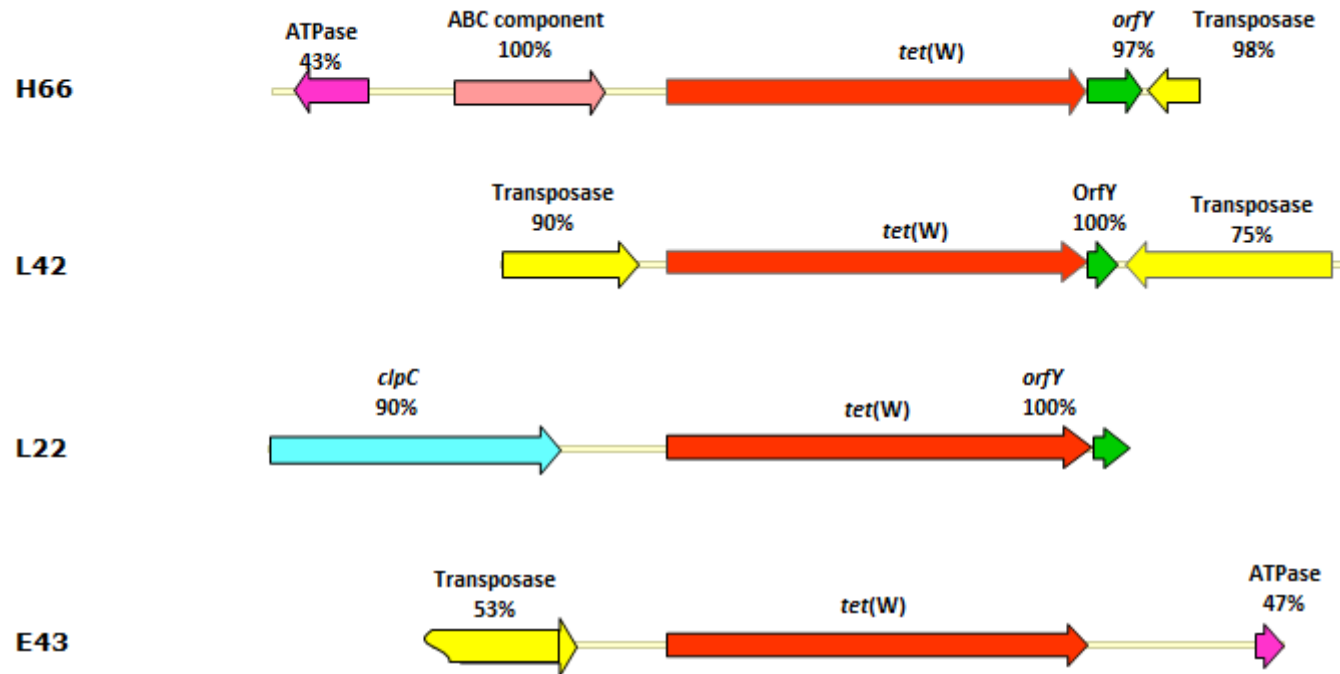
Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Bifidobacterium spp. resistentes a tetraciclina



Genes de resistencia a antibióticos en BAL

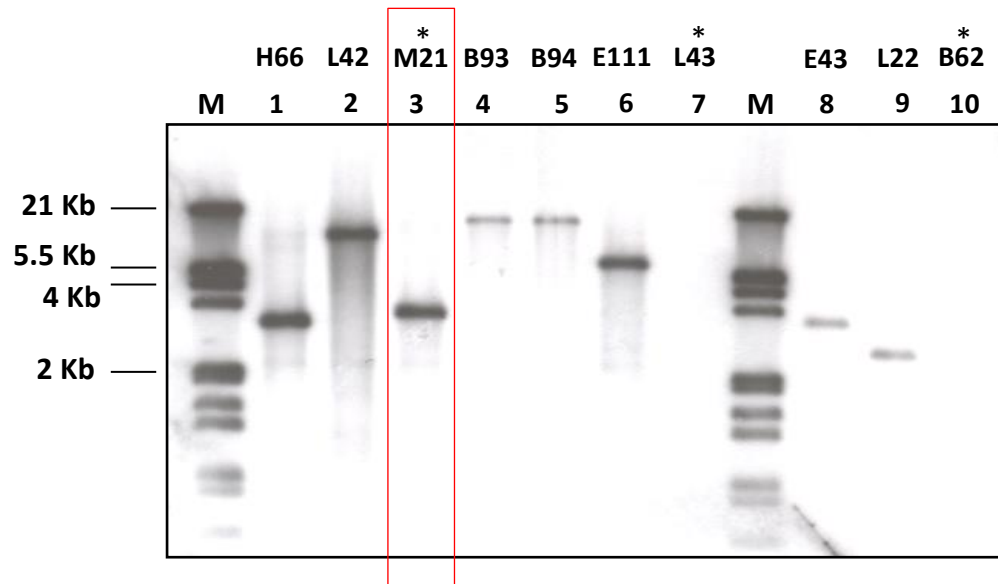
Bifidobacterium spp.: **tet(W)**



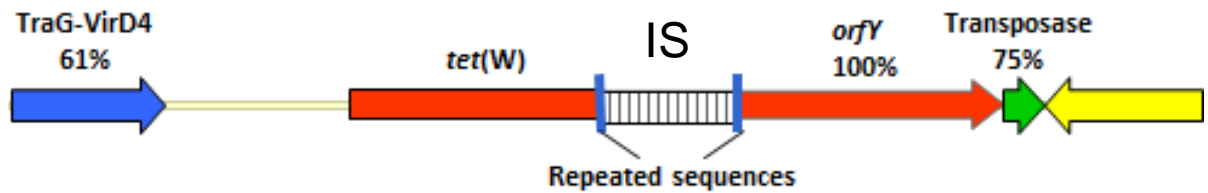
No transferencia por conjugación

Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Bifidobacterium longum M21, **tet(W)**, Tet^S

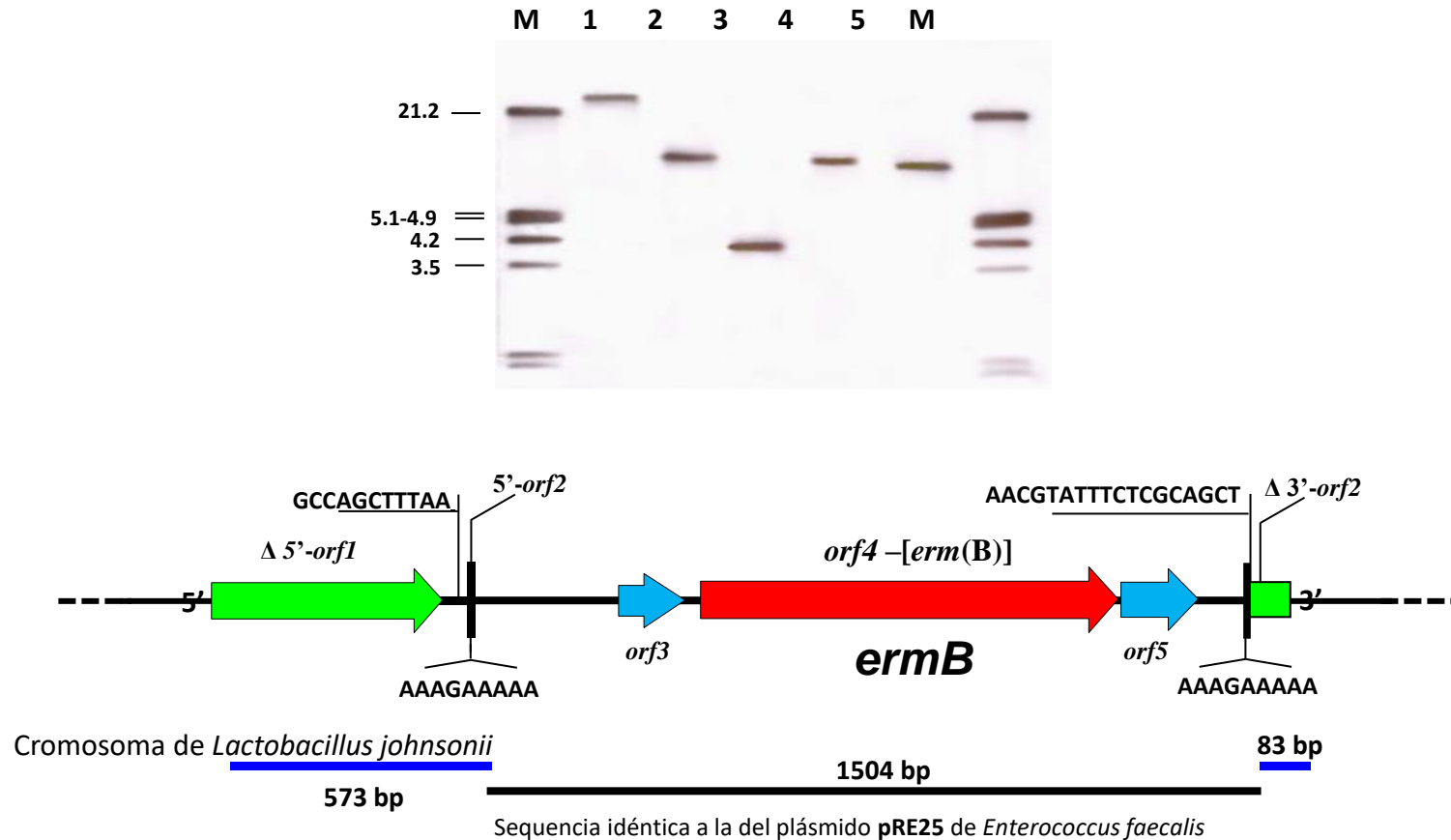


M21*



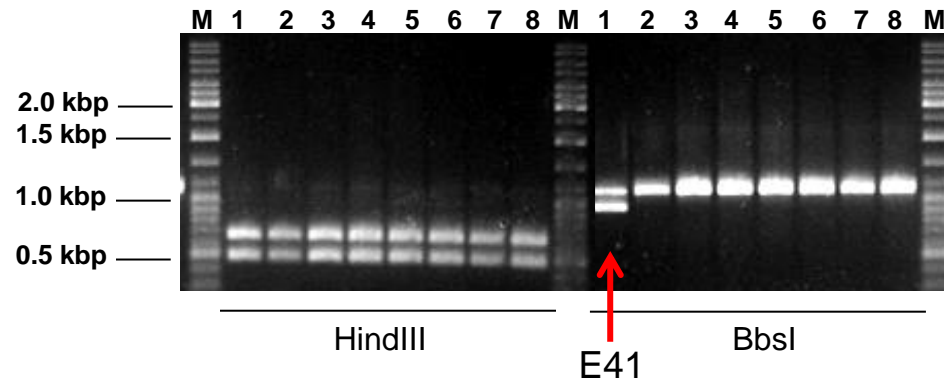
Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Lactobacillus johnsonii G41 resistente a eritromicina: *ermB*

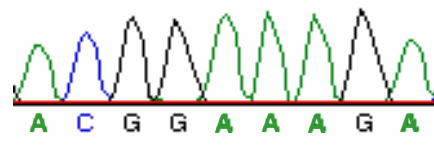


Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Lactobacillus rhamnosus E41 resistente a eritromicina: no gen

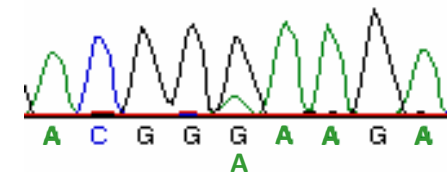


2058
↓
A C G G A A A G A C



L. rhamnosus LMG 18243 (cepa GG)
Susceptible a eritromicina

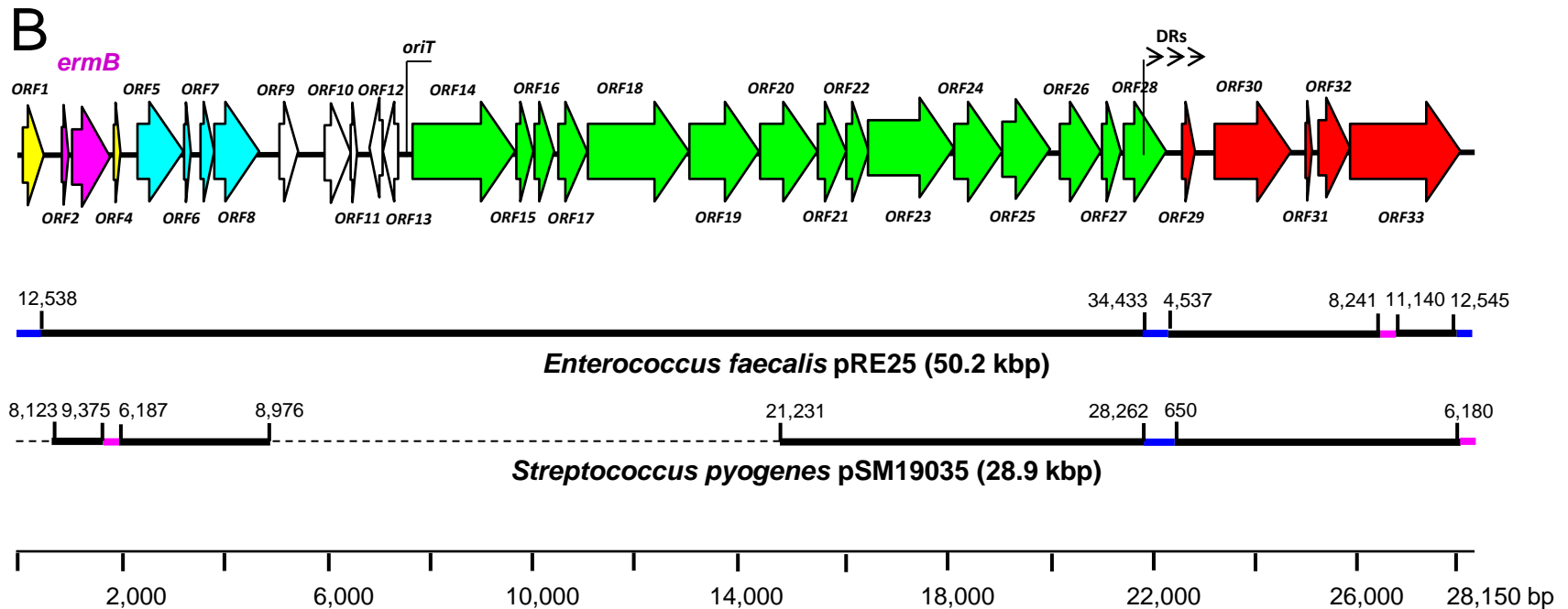
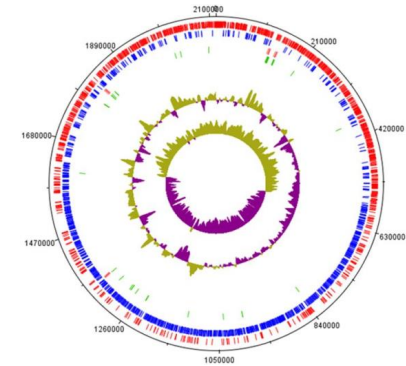
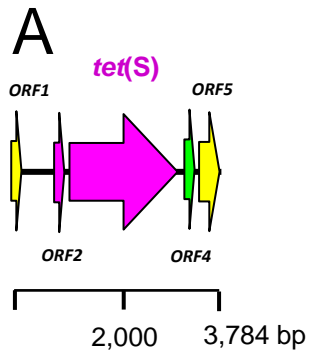
2058
↓
A C G G G A A G A C



L. rhamnosus E41
Resistente a eritromicina

Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Streptococcus thermophilus: **tet(S)** y **ermB**



Genes de resistencia a antibióticos en BAL

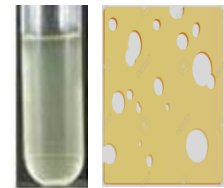
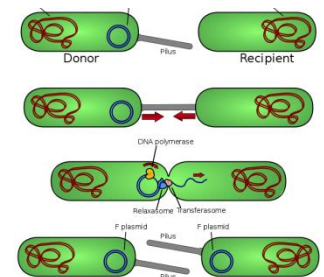
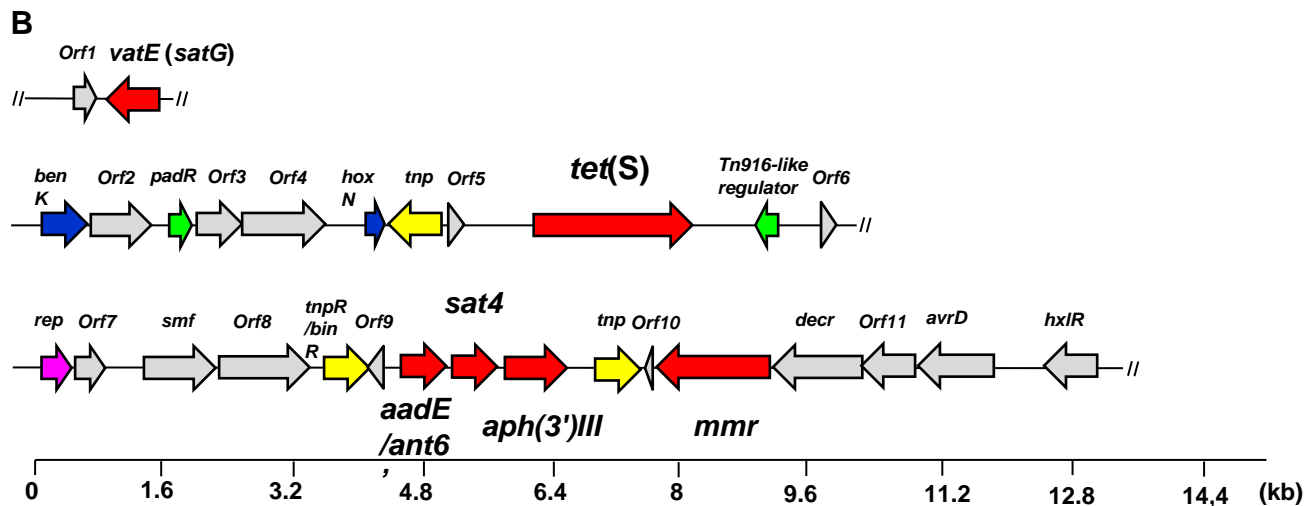
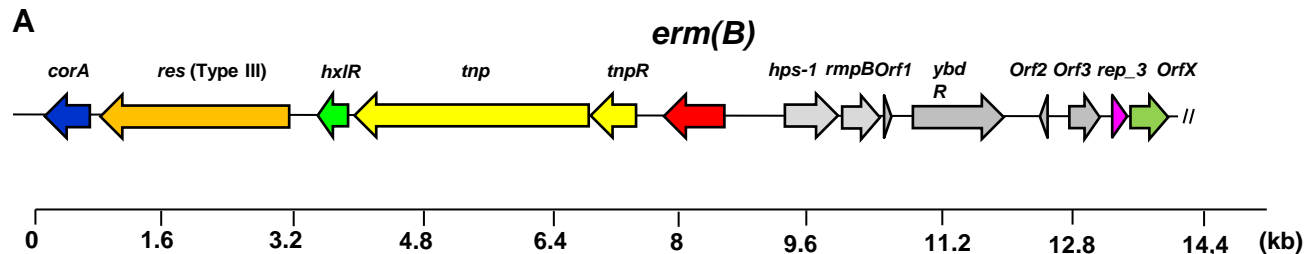
Streptococcus thermophilus: Str^r, Neo^r

LMG 18311	1	50
LMD-9	-----	-----
St-2 [tet(S)]	-----	-----
St-5 (ermB)	-----	-----
St-6 (ermB)	-----	-----
St-9 [tet(S)]	-----	-----
<u>St-10 (Sm^r/Nm^r)</u>	-----	-----
LMG 18311	51	100
LMD-9	-----	-----
St-2 [tet(S)]	-----	-----
St-5 (ermB)	-----	-----
St-6 (ermB)	-----	-----
St-9 [tet(S)]	-----	-----
<u>St-10 (Sm^r/Nm^r)</u>	-----	-----
LMG 18311	101	150
LMD-9	-----	-----
St-2 [tet(S)]	-----	-----
St-5 (ermB)	-----	-----
St-6 (ermB)	-----	-----
St-9 [tet(S)]	-----	-----
<u>St-10 (Sm^r/Nm^r)</u>	-----	-----
LMG 18311	151	200
LMD-9	-----	-----
St-2 [tet(S)]	-----	-----
St-5 (ermB)	-----	-----
St-6 (ermB)	-----	-----
St-9 [tet(S)]	-----	-----
<u>St-10 (Sm^r/Nm^r)</u>	-----	-----
LMG 18311	201	237
LMD-9	-----	-----
St-2 [tet(S)]	-----	-----
St-5 (ermB)	-----	-----
St-6 (ermB)	-----	-----
St-9 [tet(S)]	-----	-----
<u>St-10 (Sm^r/Nm^r)</u>	-----	-----

Metiltransferasa RsmG:
metilación de la posición
G527 del RNAr 16S

Genes de resistencia a antibióticos en BAL

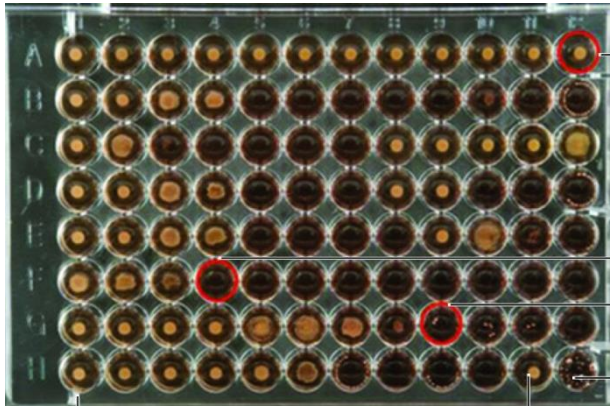
Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum* **LbE15: Em^r, Cl^r (MLS)**
L. mesenteroides subsp. *cremoris* **LbT16: Tet^r, Vir^r, Km^r, Sm^r**



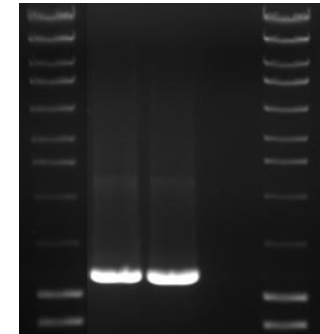
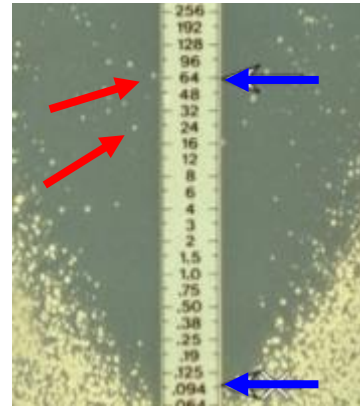
Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Bifidobacterium bifidum VA07-1AN Tet^r / Tet^s

Microdilución

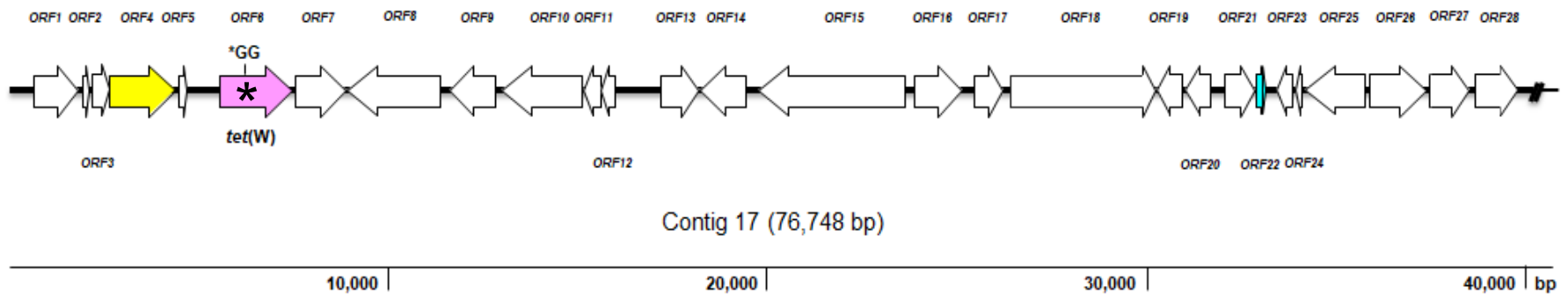


E-test



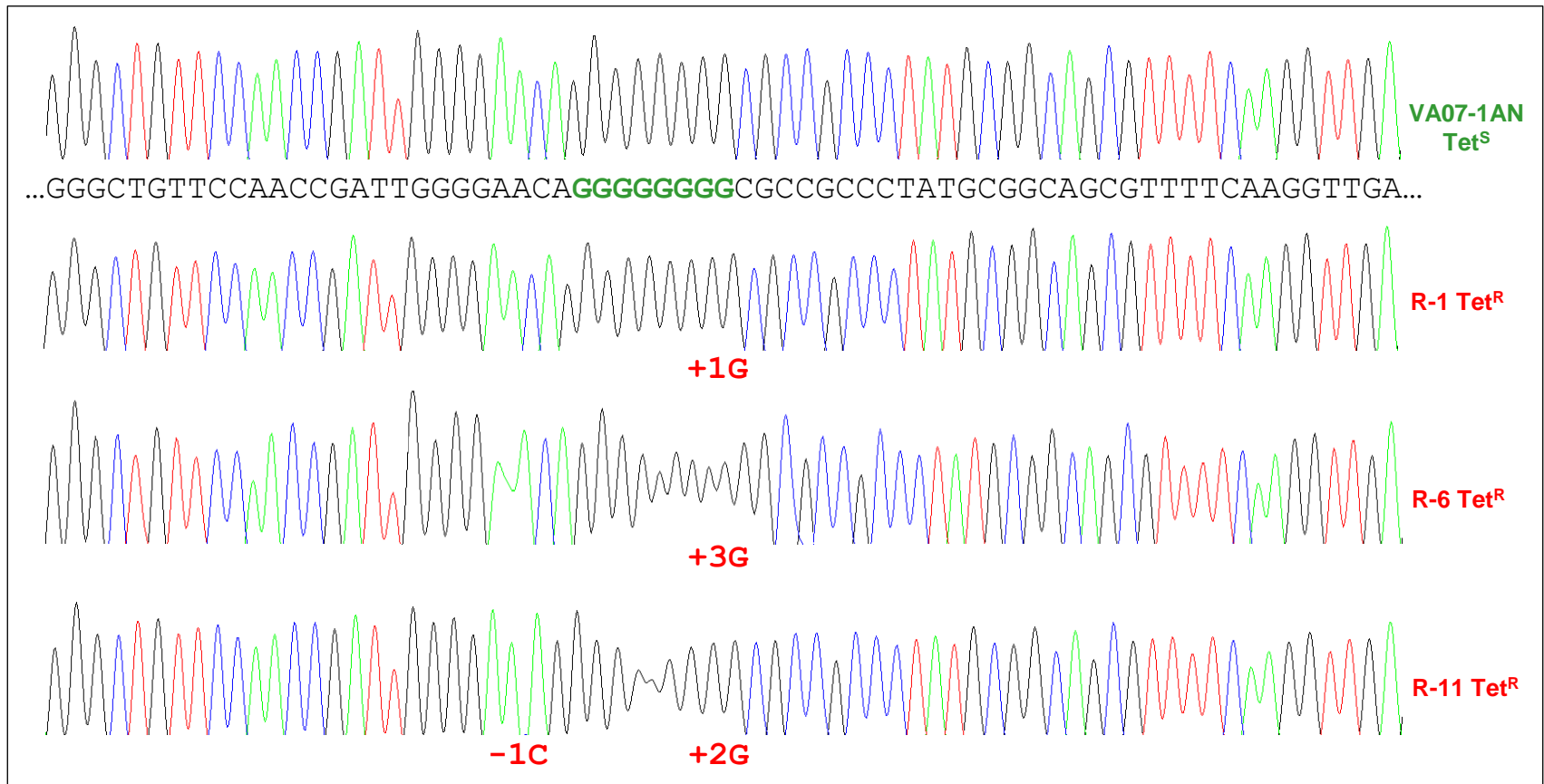
tet(W)

Secuenciación y análisis genómico



Genes de resistencia a antibióticos en BAL

Bifidobacterium bifidum VA07-1AN, **tet(W)**, Tet^S



Conclusiones

- Las BAL presentan resistencias intrínsecas y adquiridas
- Pocas cepas de BAL portan genes de resistencias adquiridos
- Resistencias extendidas en BAL: tetraciclina y eritromicina
- Genes de resistencia en plásmidos y en el cromosoma
- Algunos han podido ser transferidos, otros no
- La cadena alimentaria debería estar libre de genes adquiridos

Resistencia a antibióticos en bacterias ácido-lácticas y productos lácteos

¡Gracias!

Baltasar Mayo