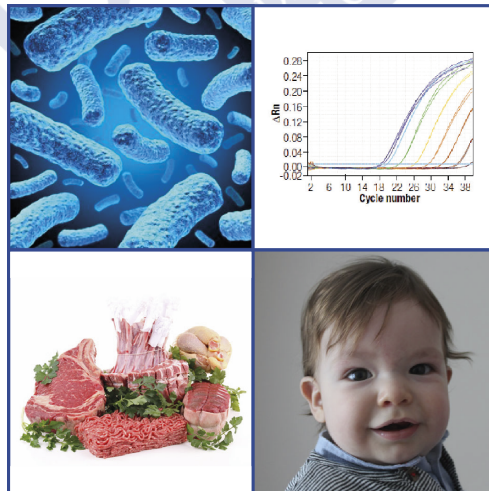




UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Química, Analítica, Nutrición y Bromatología

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA
CUANTIFICAR BACTERIAS PORTADORAS DE LOS GENES *tet(A)*
Y *tet(B)*. APLICACIÓN A ALIMENTOS CONVENCIONALES Y
ECOLÓGICOS**



Mónica Guarddon García

Lugo, 2013

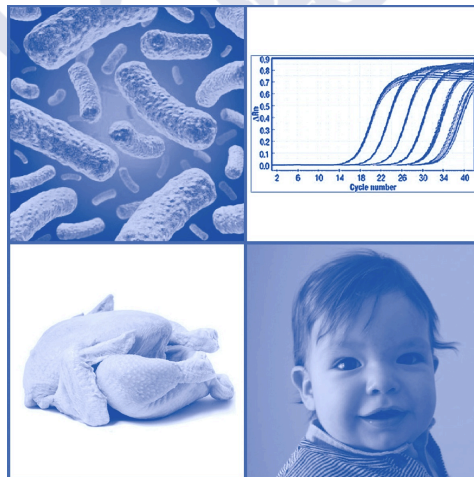




UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Departamento de Química, Analítica, Nutrición y Bromatología

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE PCR EN TIEMPO REAL PARA
CUANTIFICAR BACTERIAS PORTADORAS DE LOS GENES *tet(A)*
Y *tet(B)*. APLICACIÓN A ALIMENTOS CONVENCIONALES Y
ECOLÓGICOS



Mónica Guarddon García

Lugo, 2013



D. Carlos Manuel Franco Abuín, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología y **D. José Manuel Miranda López**, Investigador de la Universidad de Santiago de Compostela.

AUTORIZAN A:

D^a Mónica Guarddon García, a la presentación de la tesis doctoral, titulada “**Desarrollo de un método de PCR en tiempo real para cuantificar bacterias portadoras de los genes *tet(A)* y *tet(B)*. Aplicación a alimentos convencionales y ecológicos**“ realizada bajo su dirección en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, en octubre de 2013.

Fdo.: Carlos Manuel Franco Abuín

Fdo. Jose Manuel Miranda López

Fdo. Mónica Guarddon García



*A Diego,
a Tristán.*





*“No sigas las huellas de los antiguos,
busca lo que ellos buscaron”*

Matsuo Bashō





Cuando apenas sabía lo que era la investigación, entré en el Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos (LHICA) con la intención de hacer una tesina. Al final, esta iniciativa me llevó a desarrollar el trabajo de la tesis doctoral que ahora presento. Por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme esta valiosa oportunidad mi primer agradecimiento se lo debo al director del LHICA, el Prof. Alberto Cepeda Sáez.

Esta experiencia me ha hecho crecer profesional y personalmente y a esto han contribuido muchas personas, entre las que quiero destacar, en primer lugar, a mis directores de tesis, Carlos Manuel Franco Abuín, por su optimismo y por enseñarme a ver que siempre hay solución, y Jose Manuel Miranda López, por guiar mis pasos desde que entré en el laboratorio hasta ahora. Quiero extender este agradecimiento a las profesoras Beatriz I. Vázquez Belda y a Cristina Fente Sampayo por ser un ejemplo de esfuerzo y dedicación.

También tengo mucho que agradecer a todos los compañeros del LHICA: Ali, Conchi, Karola, Marcos, Carolina, Rosa, Chelo, Mónica, Patricia, Rocío,... Si miro atrás me doy cuenta de la suerte que he tenido al contar con tan buenos compañeros, pues todos y cada uno de ellos me han dado muestras de apoyo y ánimo, se han interesado por mi trabajo y me han tendido la mano siempre que la he necesitado. Por esto y por los buenos ratos que hemos compartido de vez en cuando, gracias.

Tampoco quiero olvidarme de aquellos compañeros que pasan por el LHICA y se van, dejando una huella imborrable. Entre ellos quiero hacer especial mención a Sam, mi compañero de fatigas, quien se merece todo lo mejor por lo buena persona que es. Pero además de él, muchos otros han pasado por el laboratorio y a estos quiero darles mi agradecimiento en conjunto, pues de cada uno me llevo algo bueno: conocimiento, cultura, anécdotas, compañerismo, experiencia... Gracias.

En la parte técnica, quiero agradecer su trabajo a Enka, en primer lugar, por enseñarme a “cacharrear”, en segundo lugar y muy especialmente a Carmen, Rodrigo y Lucía por su colaboración activa en esta tesis, por su esfuerzo, su trabajo y su ayuda incondicional y, en tercer lugar, a Laura Acuña por su importante contribución a la patente que contiene este trabajo. Muchas gracias a todos!

Gracias al “microgrupo”, Bea, Minia, Carmiña, por hacerme sentir tan a gusto en el laboratorio y servirme de motivación; a Ale y Alex por empujarme sin cansancio hasta llegar aquí y no dejarme caer, por escucharme tantas veces...; a mis amigos, en general, por estar siempre ahí.

Mi mayor agradecimiento es para mi madre y mis hermanos, Fran, Carlos y Alicia, porque gracias a vosotros lo he conseguido! Porque sé que estáis orgullosos de mi y eso me hace sentir especial. Porque habéis puesto todo vuestro empeño, amor, apoyo, ánimo y mucho más para que llegase hasta el final. Os lo debo todo.

Gracias también al resto de mi familia, en especial a mi abuelita, a quien llevo en el corazón, y a ti, abuelo, por tus consejos y por lo mucho que me apoyas y valoras. También quiero expresar mi agradecimiento a mis suegros, Juan y Maribel, y a mi cuñado Pedro por tenerme siempre en cuenta, por vuestra generosidad, por preocuparos por mi y por confiar en que podía lograrlo.

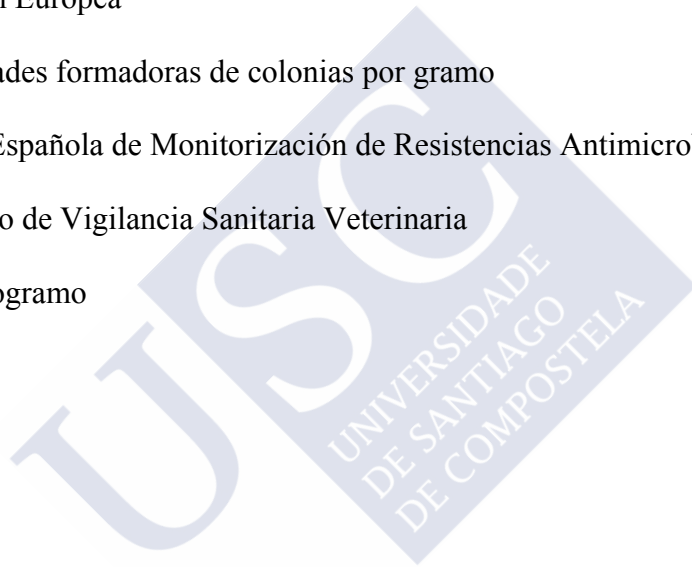
Gracias a ti, Diego, a quién he dedicado esta tesis, porque eres lo mejor que me ha pasado y por darme el mejor regalo que se puede dar, a Tristán, a quien también he dedicado mi esfuerzo y doy las gracias por ser más que una motivación para acabar este trabajo. Gracias infinitas a los dos, porque sé que si estáis ahí superaré todas las dificultades del camino.

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Zoosanitarios
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
C.R.A.E.GA	Consello Regulador de Agricultura Ecológica de Galicia
Ct	Threshold cycle o Ciclo umbral
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FRET	Transferencia de Energía de Resonancia de Förster/ Transferencia de Energía de Resonancia Fluorescente
g	Gramo
HRP	Enzima peroxidasa de rábano picante
kDa	kiloDalton
Kg	Kilogramo
LMR	Límite Máximo de Residuos
LOD	Límite de detección
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente
mg	Miligramo
MGB	Minor Groove Binder
ml	Mililitro
NFQ	Non-Fluorescent Quencher o Quencher No Fluorescente

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
OIE	Organización Mundial de la Sanidad Animal
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Polimerase chain reaction o Reacción en cadena de la polimerasa
RT-qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
UE	Unión Europea
ufc	Unidades formadoras de colonias por gramo
VAV	Red Española de Monitorización de Resistencias Antimicrobianas
VISAVET	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
µg	Microgramo



1 INDICE





1	INDICE	I
2	RESUMEN	V
3	INTRODUCCIÓN	1
3.1	Tetraciclinas	3
3.1.1	Origen y clasificación	3
3.1.2	Características generales	4
3.1.3	Mecanismo de acción	5
3.1.4	Indicaciones clínicas	6
3.1.5	Efectos adversos y contraindicaciones	7
3.1.6	Uso de tetraciclinas en medicina veterinaria	7
3.2	Resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos	9
3.2.1	Resistencia bacteriana a tetraciclinas y genes <i>tet</i>	12
3.2.2	Riesgos de resistencia a los antimicrobianos transmitida por los alimentos	15
3.3	Residuos de antimicrobianos en alimentos	16
3.4	La carne	18
3.4.1	Producción y consumo de carne	18
3.5	La agricultura ecológica	20
3.5.1	Requisitos para la producción ganadera ecológica en la UE	22
3.6	Alimentación infantil	25
3.6.1	Elaboración de preparados infantiles	25
3.6.2	Consecuencias del uso de antimicrobianos en niños	26
3.7	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	27
3.7.1	PCR cuantitativa en tiempo real	30
3.7.2	Ventajas de la RT-qPCR	33
3.8	Ensayo receptor para la determinación de tetraciclinas	34

4	OBJETIVOS	37
4.1	Objetivo general	39
4.2	Objetivos específicos	39
5	RESULTADOS	41
5.1	CAPÍTULO 1	43
5.1.1	Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas	43
5.1.2	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección cuantitativa de los genes de resistencia bacteriana a tetraciclina <i>tet(A)</i> y <i>tet(B)</i> en alimentos	87
5.2	CAPÍTULO 2	95
5.2.1	Cuantificación directa y distribución de genes de resistencia a tetraciclina en muestras de carne por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	95
5.3	CAPÍTULO 3	103
5.3.1	Detección cuantitativa de microorganismos resistentes a tetraciclina en carne convencional y ecológica de ternera, cerdo y pollo.	103
5.4	CAPÍTULO 4	125
5.4.1	Evaluación de residuos de tetraciclinas y bacterias resistentes a tetraciclina en preparados alimenticios infantiles convencionales y ecológicos	125
6	DISCUSIÓN	151
7	CONCLUSIONES	163
7.1	Conclusiones generales	165
7.2	Conclusiones específicas	165
8	BIBLIOGRAFÍA	167

2 RESUMEN





Hoy en día, los consumidores están cada vez más preocupados por la calidad y la seguridad de los alimentos que llegan a la mesa. Las alertas alimentarias causadas por enfermedades como la encefalopatía espongiforme bovina o la presencia de residuos químicos en los alimentos, como por ejemplo agentes antimicrobianos u hormonas entre otras muchas sustancias, ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar técnicas analíticas rápidas y específicas que, como la PCR, permitan detectar y cuantificar una gran variedad de contaminantes habitualmente presentes en los alimentos.

La agricultura ecológica ofrece una alternativa *a priori* más saludable que la convencional. Esto se debe a que los alimentos ecológicos se obtienen cumpliendo rigurosamente una serie de normas, entre las que cabe destacar la alta restricción en el uso de sustancias químicas de síntesis, como los antimicrobianos.

A lo largo de las últimas décadas se ha hecho un uso abusivo de los agentes antimicrobianos tanto en medicina humana como veterinaria y esto ha llevado a un aumento considerable de bacterias resistentes a estos agentes. Las bacterias, portadoras de los genes de resistencia, contaminan de forma natural el medio ambiente y, por lo tanto, es fácil que lleguen al consumidor a través de la cadena alimentaria. En el caso de que las bacterias resistentes sean patógenas estas se vuelven más peligrosas ya que pueden reducir o incluso anular las opciones terapéuticas lo que, en casos extremos, puede desencadenar incluso la muerte del paciente. Pero en los alimentos también puede haber bacterias resistentes que, no carentes de importancia, son inocuas para el consumidor y pueden transmitir la resistencia a las bacterias comensales del organismo.

Pese a las consecuencias que la resistencia bacteriana pueda tener en la salud, no existen límites en la legislación vigente ni protocolos oficiales para detectar, controlar o cuantificar microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos. Sin embargo, ya hay

numerosos estudios que demandan una mayor investigación para el desarrollo de herramientas de control, no solo de patógenos, sino también de poblaciones bacterianas resistentes a estos fármacos debido al problema de salud pública que supone su propagación.

Esta tesis doctoral pretende contribuir a esa demanda presentando un nuevo método de análisis por PCR en tiempo real capaz de detectar y cuantificar, de forma directa en alimentos, dos de los genes de resistencia a tetraciclina más frecuentes en bacterias gram negativas, *tet(A)* y *tet(B)*.

El trabajo se ha centrado en cuantificar por PCR las bacterias que porten estos genes dentro de dos tipos de población, aerobios mesófilos y enterobacterias, y en compararlos con los recuentos obtenidos por métodos microbiológicos. Las matrices alimentarias escogidas para la aplicación de este método fueron diferentes tipos de carne y preparados alimenticios infantiles, principalmente de origen animal. En ambos casos se analizaron productos tanto convencionales como ecológicos a fin de compararlos y verificar si, tal y como cabe esperar, los alimentos procedentes de la agricultura ecológica contienen menos cantidad de residuos de tetraciclinas que sus homólogos convencionales y, por lo tanto, si también están menos contaminados con bacterias resistentes a tetraciclina.

3 INTRODUCCIÓN





3.1 Tetraciclinas

3.1.1 Origen y clasificación

Las tetraciclinas de **primera generación** son principalmente un grupo de antibacterianos naturales. Las primeras tetraciclinas, clortetraciclina y oxitetraciclina, se descubrieron a finales de los años cuarenta y se obtuvieron a partir de los *Streptomyces aureofaciens* y *rimosus* respectivamente. Más tarde se identificaron otras tetraciclinas obtenidas tanto de forma natural como la tetraciclina, producida por *S. aureofaciens*, *S. rimosus* y *S. viridofaciens* (Figura 1), o de forma semisintética, como la metaciclina. Estos antibióticos se han utilizado con mucha frecuencia debido a su bajo coste y alta disponibilidad y, actualmente, muchas bacterias presentan resistencia a estos fármacos (Chopra y Roberts, 2001).

A la **segunda generación** de tetraciclinas pertenecen la doxiciclina y la minociclina. Este grupo está constituido fundamentalmente por antimicrobianos de origen semisintético que, además, se absorben mejor y son más lipofílicas que las anteriores. También existen muchas cepas bacterianas resistentes frente a este grupo (Pastor, 2011).

Ya en la década de los noventa se descubrieron las glicilciclinas, cuyo máximo representante es la tigeciclina, y actualmente se engloban dentro de las tetraciclinas de **tercera generación**. Estas últimas son derivados semisintéticos de las minociclinas y son efectivas frente a bacterias que son resistentes a otras tetraciclinas (Parida y col., 2010). De hecho, la tigeciclina ha sido categorizada como de “importancia crítica” por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007 por su actividad frente a *S. aureus* multirresistentes y bacterias gram negativas en medicina humana. Además, dentro de esta

última generación de tetraciclinas se encuentran también las aminometilciclinas, que están en vías de experimentación.

La Tabla 1 muestra una clasificación actualizada de las tetraciclinas atendiendo a su orden de descubrimiento.

Tabla 1. Principales componentes del grupo de las tetraciclinas

Generación	Nombre genérico	
Primera (1948–1963)	Clortetraciclina	Producidas por 2 diferentes especies de <i>Streptomyces</i> . Descubiertas a finales de la década de 1940
	Oxitetraciclina	Obtenidas a partir de <i>Streptomyces</i> en la década de 1950
	Tetraciclina	Derivados semisintéticos caracterizados por su hidrosolubilidad
	Demeclociclina	
	Rolitetraciclina	
	Limeciclina	
Metaciclina		
Segunda (1965–1972)	Doxiciclina	Derivados semisintéticos de las primeras
	Minociclina	
Tercera (1993-)	Glicilciclinas (tigeciclina)	Derivado semisintético de minociclina
	Aminometilciclinas	En desarrollo experimental

Fuente: Vicente, D., Pérez-Trallero, E. (2010)

3.1.2 Características generales

Las tetraciclinas pertenecen a un grupo de antibióticos con una estructura química tetracíclica básica y actividad biológica común, formadas por la fusión de cuatro anillos bencénicos con diversos sustituyentes, que dan lugar a los diferentes compuestos de esta familia de antimicrobianos. Son sustancias cristalinas, ligeramente amarillas, sin olor y

ligeramente amargas con propiedades quelantes y capaces de formar complejos insolubles con sales de hierro, calcio, magnesio o aluminio.

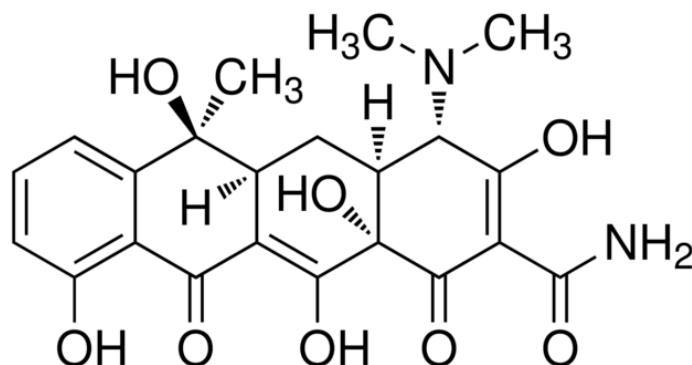


Figura 1: Tetraciclina

3.1.3 Mecanismo de acción

Las tetraciclinas son antimicrobianos de amplio espectro activos frente a un amplio rango de microorganismos gram positivos y gram negativos y microorganismos atípicos como clamidias, micoplasmas, rickettsias y parásitos protozoos. Su actividad es fundamentalmente bacteriostática, aunque a altas dosis pueden mostrar una actividad bactericida. Las características favorables de estos agentes y la ausencia de efectos adversos importantes han hecho que su uso se haya extendido ampliamente en la terapia de infecciones tanto de humanos como de animales (Chopra y Roberts, 2001).

Las tetraciclinas atraviesan la pared bacteriana por difusión pasiva y llegan al citoplasma gracias a un mecanismo dependiente de energía existente en la membrana citoplasmática (Tsankov y col., 2003). Su actividad antibacteriana se basa en la inhibición reversible de la síntesis de proteínas. Esto es debido a que se fijan a la subunidad ribosómica 30S bloqueando la fijación del aminoacil del ácido ribonucleico de

transferencia (ARNt) al sitio aceptor (A) del complejo ácido ribonucleico mensajero (ARNm) – ribosoma y, bloqueando a su vez la adición de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica en crecimiento (Pérez-Trallero, 2003; Michalova y col., 2004) (Figura 2).

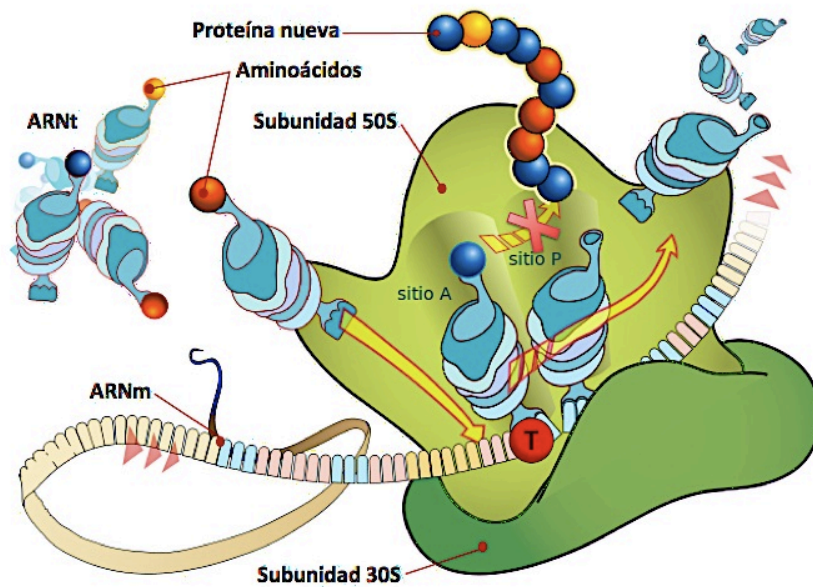


Figura 2. Inhibición de la síntesis de proteínas por la acción de tetraciclinas.

3.1.4 Indicaciones clínicas

Debido al desarrollo de resistencias y a la existencia de fármacos alternativos, se han reducido las indicaciones clínicas de las tetraciclinas. No obstante, siguen siendo eficaces frente a un gran número de enfermedades como la brucelosis o el cólera. Además, son muy activas frente a *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii*, *Mycoplasma* spp. y *Chlamydia* spp. También se usan solas o asociadas a otros antimicrobianos para el tratamiento de una gran variedad de enfermedades de transmisión sexual y son útiles en el tratamiento de la

enfermedad de Lyme, leptospirosis, acné o en el tratamiento de la gastritis y la úlcera péptica asociadas a *Helicobacter pylori*, entre otras enfermedades (Pérez-Trallero, 2003).

3.1.5 Efectos adversos y contraindicaciones

Las tetraciclinas son generalmente bien toleradas y actualmente tienen relativamente pocos efectos secundarios. Los más destacados son la intolerancia gastrointestinal (náuseas, vómitos, diarreas) y la fotosensibilidad.

No deben administrarse, excepto doxiciclina y minociclina, a pacientes con insuficiencia renal previa y, debido a su afinidad por el tejido óseo y dental, tampoco se recomienda su administración a embarazadas y niños menores de 13 años. Pueden producir decoloración de los dientes y otras alteraciones como displasia de encías, hipoplasia dental o deformidades óseas.

3.1.6 Uso de tetraciclinas en medicina veterinaria

Los sistemas actuales de explotación intensiva de los animales de producción favorecen la aparición de procesos infecciosos y parasitarios que requieren tratamientos con agentes antimicrobianos con fines terapéuticos y/o profilácticos. En España todos los medicamentos veterinarios que contienen antimicrobianos son dispensados exclusivamente por prescripción veterinaria.

Las tetraciclinas se han convertido en antibióticos de uso habitual en clínica veterinaria (Pérez-Trallero, 2003) a pesar de su prohibición como promotores del crecimiento desde el 1 de enero de 2006 (Reglamento (CE) 1831/2003). En Francia, la

práctica totalidad de las tetraciclinas que se venden están destinadas a ser utilizadas en medicina veterinaria (Moulin y col., 2008).

Estos fármacos se pueden administrar a numerosas especies animales: ganado vacuno, porcino, ovino, caprino, equino, aves de corral, conejos, peces y en algunos animales de compañía (Michalova y col., 2004). En animales, su uso está indicado para el tratamiento de infecciones gastrointestinales, respiratorias, de la piel, del tracto genito-urinario y/o enfermedades infecciosas sistémicas, entre otras (Prescott y col., 2000). Al igual que en medicina humana no se deben administrar en hembras gestantes y animales jóvenes ya que, además de la decoloración en los dientes, también se pueden dar problemas en el desarrollo óseo.

El mal uso o el uso abusivo de este grupo de antimicrobianos ha llevado a la aparición de resistencias bacterianas, lo que ha limitado en buena medida su efectividad (Chopra y Roberts, 2001). También hay estudios recientes que afirman que la selección de microorganismos resistentes en el medio ambiente puede suceder con y sin la presión selectiva de los antimicrobianos, lo que ayuda a entender que muchos genes de resistencia estén tan ampliamente distribuidos y preservados en nuestro entorno (Koike y col., 2007).

Por otra parte, cuando se administran antibióticos en medicina veterinaria, las cepas resistentes son seleccionadas tanto dentro de las bacterias que provocan la enfermedad como dentro de la población intestinal habitual del animal. Esto significa que al finalizar el efecto antimicrobiano, las cepas resistentes comienzan a ser reemplazadas por las cepas sensibles autóctonas o por las aportadas por el alimento y el ambiente. Sin embargo, la resistencia adquirida puede persistir más allá del período de supresión de dicho antibiótico (Griggs y col., 2005; Pedersen y col., 2003).

Según Kools y col. (2008) los agentes antimicrobianos son los más utilizados en medicina veterinaria y dentro de estos, las tetraciclinas son el grupo más usado. En esto coinciden los datos ofrecidos por el ministerio de sanidad, política social e igualdad y los analizados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), en colaboración con la Red Española de Monitorización de Resistencias Antimicrobianas (VAV) del centro de vigilancia sanitaria veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid (Figura 3). Además, también son los antimicrobianos más utilizados en otros países de la Unión Europea (UE) (Kools, 2008; Moulin y col., 2008; EMA, 2010).

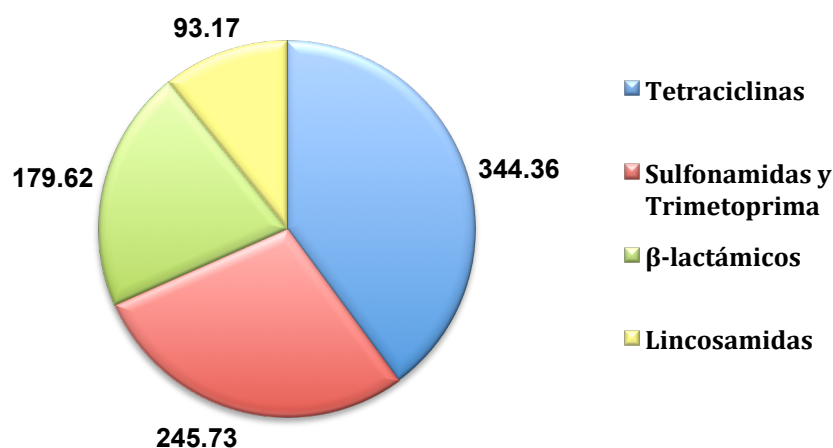


Figura 3. Datos de ventas de los antimicrobianos más vendidos en España en el año 2009 (expresados en toneladas)

3.2 Resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos

El uso de los antibióticos se extendió a partir de los años 40 con la intención de acabar con aquellas enfermedades producidas por microorganismos. Sin embargo, el resultado fue diferente al esperado desde el momento en que las bacterias empezaron a

adaptarse, desarrollando así diferentes mecanismos que les otorgaban resistencia frente a estos fármacos (Daza Pérez, 1998).

La **farmacorresistencia** o **resistencia a los antimicrobianos** es “el fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible. Los microorganismos resistentes (entre ellos las bacterias, los virus y algunos parásitos) son inmunes a los efectos de los antimicrobianos, como los antibióticos, los antivíricos o los antipalúdicos, de modo que los tratamientos habituales se vuelven ineficaces y las infecciones persisten y pueden transmitirse a otras personas. La resistencia es una consecuencia del uso de los antimicrobianos, y en particular de su abuso, y surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia” (OMS, 2012).

Existen dos tipos de resistencias mediadas por microorganismos:

- Algunas bacterias presentan una insensibilidad natural frente a determinados antimicrobianos, debido a la carencia de un punto de acción sobre el cual el agente ejercería su acción. Esta es la conocida como **resistencia intrínseca**. Es una característica natural y heredada que se asocia con la mayoría de las cepas que constituyen un grupo, un género o una especie de bacteria particular. Un ejemplo es la *Klebsiella* spp., que presenta una resistencia intrínseca a la ampicilina.

- La **resistencia adquirida** se da como consecuencia de variaciones en la dotación genética habitual de los microorganismos. A diferencia de la anterior, esta puede ser un rasgo asociado con algunas cepas de un mismo grupo o especie de microorganismos pero no con otras. Los métodos de adquisición son básicamente los mismos que permiten el intercambio genético, por lo que la resistencia puede adquirirse de forma espontánea, por mutación del cromosoma bacteriano, o por adquisición de genes de otros microorganismos,

por medio de mecanismos de transferencia genética. Esto es debido a que los plásmidos que transportan genes de resistencia se transmiten fácilmente por conjugación o por transducción, tanto por herencia vertical, a las bacterias descendientes, como por herencia horizontal, entre organismos de la misma generación (Forbes y col., 2009).

La gran mayoría de los mecanismos de resistencia pueden agruparse en tres categorías:

- La inactivación enzimática consiste en la inactivación o destrucción de los antimicrobianos por medio de las enzimas que tienen los microorganismos.
- Modificaciones en el punto de acción sobre el que actúa el agente antimicrobiano.
- Alteraciones de la permeabilidad, lo que dificulta la penetración o acumulación de los antimicrobianos en el interior de la célula bacteriana.

Dentro de este mecanismo se pueden incluir tres tipos:

- Alteraciones de las membranas bacterianas. Este mecanismo se da frecuentemente en microorganismos gram negativos, donde la membrana externa de la envoltura celular, rica en lípidos, es impermeable a sustancias lipofílicas.
- Alteraciones en la entrada de antibióticos dependientes de energía.
- Aumento de la salida de antibióticos. La resistencia por eflujo es un mecanismo inespecífico por el cual se exportan determinadas moléculas desde el citoplasma hacia fuera de la membrana externa. Este mecanismo se afecta a diferentes grupos de antimicrobianos como las tetraciclinas, entre otros.

Cabe destacar que las bacterias pueden tener varios tipos de mecanismos para resistir a un solo agente, y que un solo mecanismo puede ejercer su efecto frente a varios tipos de antimicrobianos (Vadillo, S., 2002).

3.2.1 Resistencia bacteriana a tetraciclinas y genes *tet*

El uso de tetraciclinas en clínica ha sido el responsable de la selección de microorganismos resistentes a estos fármacos (Chopra y Roberts, 2001). Ya en 1953, pocos años más tarde del descubrimiento de la primera tetraciclina, se aisló la primera bacteria resistente a esta (Watanabe, 1963; Falkow, 1975). Desde entonces se han identificado muchas cepas resistentes y es frecuente observar determinantes de resistencia a tetraciclina en el material genético de la flora bacteriana autóctona de humanos, animales, así como de alimentos y diversas fuentes medioambientales (Michalova y col., 2004).

La disminución en la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (**achique** o **eflujo**) es un mecanismo que puede conferir resistencia a tetraciclina de forma natural o adquirida a un numeroso grupo de bacterias (Figura 4). Todos los genes *tet* de eflujo codifican proteínas Tet asociadas a membranas que expulsan tetraciclinas de la célula. Estas proteínas de eflujo, de aproximadamente 46 kDa, están localizadas en la membrana citoplasmática y funcionan intercambiando protones por complejos magnesio-tetraciclina monocationicos, disminuyendo la concentración intracelular del fármaco y protegiendo de esta manera los ribosomas.

Otro mecanismo frecuentemente involucrado en la resistencia adquirida se debe a proteínas de protección ribosomal que permiten actuar al aminoacil-ARNt en presencia de

concentraciones de antibiótico que normalmente inhibirían la síntesis de estas. Estos dos son los mecanismos más frecuentes en el caso de resistencia a tetraciclinas y, en la mayoría de las bacterias, están basados en la adquisición de uno o varios genes de resistencia (Michalova y col., 2004), pero también existen otros mecanismos de resistencia como pueden ser la inactivación enzimática del antibiótico, permeabilidad de la pared bacteriana o sistemas transportadores de fármacos. La transmisión horizontal de esta característica se ve favorecida por la ubicación de los genes de resistencia que, en muchos casos, se asocia a integrones o a elementos móviles como plásmidos y transposones. Los genes implicados en la resistencia a tetraciclina son los *tet* y los *otr*. (Pérez-Trallero, 2003).

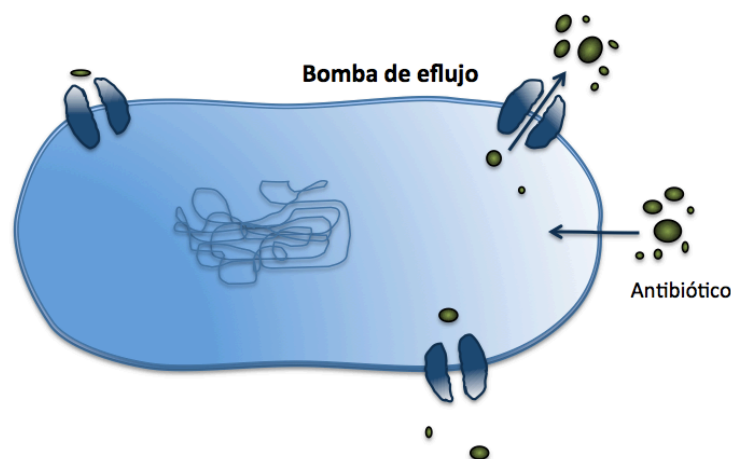


Figura 4. Bombeo de antibiótico al exterior de la célula a través de una bomba de eflujo.

Existen treinta y ocho genes de resistencia a tetraciclina, veintitrés de los cuales codifican para bombas de eflujo, mientras que para la protección ribosomal existen once (Roberts, 2005). El resto de genes están involucrados en otros mecanismos de resistencia.

La mayoría de las proteínas de eflujo confieren resistencia a tetraciclina pero no a minociclina o glicilciclinas. De los genes *tet* existentes en gram negativos, el *tet(B)* es el más ubicuo y se ha identificado en veinte géneros diferentes de este tipo de

microorganismos. Además es el único gen de eflujo que es efectivo frente a tetraciclina y también frente a minociclina (Chopra y Roberts, 2001; Michalova y col., 2004).

Los genes *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(I)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(30)* y *tet(31)* se encuentran exclusivamente en gram negativos y la mayoría de estos géneros pertenecen al grupo de bacterias entéricas (Chopra y Roberts, 2001). En la bibliografía científica, *tet(A)* y *tet(B)* se perfilan como los genes *tet* más frecuentes en bacterias gram negativas, especialmente en enterobacterias (Fan y col., 2007). Algunos ejemplos de esto son los trabajos de investigación llevados a cabo por numerosos autores en cepas aisladas, generalmente *Escherichia coli*, a partir de diferentes animales productores de alimentos (Sengeløv y col., 2003; Bryan y col., 2004; Smith y col., 2007). Sin embargo, estos estudios ofrecen una visión parcial de la realidad, ya que habitualmente solo seleccionan una o varias especies bacterianas atendiendo a su origen (muestras clínicas, estiércol, etc.), su patogenicidad (*E. coli*, *Enterococcus faecalis*, etc.) o su capacidad de crecer en presencia de tetraciclina, en lugar de investigar la resistencia a tetraciclina desde una perspectiva global. De hecho, esto ha sido demandado por diversos autores, ya que las bacterias comensales actúan como reservorio para los genes de resistencia a tetraciclinas y a otros antibióticos en patógenos humanos. Por lo tanto, el estudio de estos microorganismos también es muy importante para entender cómo se mantiene y se dispersa la resistencia a antibióticos a través de las diferentes poblaciones bacterianas (Bryan y col., 2004; Chopra y Roberts, 2001; Hölzel y col., 2011).

Desde este punto de vista, este trabajo se ha centrado en investigar la presencia, cantidad y distribución de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en poblaciones bacterianas de aerobios mesófilos y enterobacterias encontradas en carnes de distintas especies animales, así como en preparados infantiles de origen animal y vegetal.

3.2.2 Riesgos de resistencia a los antimicrobianos transmitida por los alimentos

Durante años se ha investigado la aparición y propagación de bacterias resistentes asociadas al uso de antimicrobianos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE), y la OMS, han evaluado los problemas de salud pública derivados del uso de estas sustancias en los animales productores de alimentos. El hecho de que se usen prácticamente los mismos antibacterianos en seres humanos que en animales y que haya pocos antibióticos nuevos para sustituir a los que se han vuelto ineficaces debido a las resistencias, ha creado la necesidad de tomar medidas para prevenir o contener la resistencia a los antimicrobianos. Entre ellas están el uso prudente de los agentes antimicrobianos, vigilar el uso de estos en animales de producción, vigilar la aparición de resistencias o establecer nuevas normas como la prohibición del uso de antimicrobianos como promotores de crecimiento (INFOSAN, 2008).

La resistencia a los antimicrobianos es un motivo de preocupación mundial a nivel de salud pública. Cuando los microorganismos patógenos se hacen resistentes se vuelven más peligrosos, ya que se reducen las opciones terapéuticas o fracasan directamente, lo que puede desembocar en una mayor frecuencia y gravedad de las infecciones así como en una mayor hospitalización e incluso mortalidad. El uso de agentes antimicrobianos en animales productores de alimentos o cultivos constituye un factor de riesgo importante para la salud del consumidor.

Según las directrices de la Comisión del Codex Alimentarius (2011), en un perfil de riesgo de resistencia a los antimicrobianos transmitida por alimentos debe evaluarse toda la información posible relativa a los microorganismos resistentes y sus genes de resistencia,

los antimicrobianos frente a los que se expresa la resistencia, los productos alimentarios y los efectos adversos sobre la salud pública. De este modo se pueden determinar las estrategias apropiadas a fin de minimizar los riesgos que, en relación con la resistencia a antimicrobianos, puedan afectar a la salud pública.

3.3 Residuos de antimicrobianos en alimentos

El uso de antimicrobianos en animales productores de alimentos ayuda en el tratamiento, prevención y control de enfermedades infecciosas. Sin embargo, esta práctica conlleva ciertos riesgos relacionados con la salud pública. Esto es debido a que los fármacos, una vez metabolizados por el organismo, pueden ser eliminados al medio ambiente, principalmente por heces u orina, o también pueden acumularse en diferentes tejidos del animal. En ocasiones, estos metabolitos todavía tienen actividad farmacológica pudiendo producir efectos negativos para el consumidor como reacciones alérgicas, intoxicaciones o el desarrollo de resistencias a estas sustancias, entre otros (Anthony y col. 2001). De hecho, existe una estrecha relación entre el uso de antimicrobianos en animales y la aparición de bacterias resistentes a estos fármacos, tanto en los propios animales como en los humanos que se alimentan de ellos. (Tollefson y Karp, 2004; Nunnery y col., 2006; Collignon y col., 2009).

Los metabolitos excretados por los animales pueden contaminar suelos y aguas directamente o en forma de estiércol que sirve como abono para los suelos agrícolas, lo que facilita que se incorporen en la cadena alimentaria (Díaz-Cruz y Barceló, 2006; Kemper, 2008; Dinh y col., 2011). Este hecho preocupa especialmente a los organismos internacionales ya que tienen el objetivo garantizar a los consumidores la inocuidad de los

alimentos. Así, la Comisión del Codex Alimentarius (2010) ha propuesto una mejora en la gestión de residuos para limitar la difusión de microorganismos resistentes y determinantes de resistencia controlando el uso apropiado de los desechos humanos y animales (aguas residuales, estiércol, biosólidos, etc.) en los campos para la producción de alimentos y piensos.

El **límite máximo de residuos (LMR)** se define en el Reglamento (CE) nº 470/2009 como “la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa (expresada en mg/kg o µg/kg sobre la base del peso en fresco) que puede permitirse en los alimentos de origen animal”. Este Reglamento establece que **residuos de sustancias farmacológicamente activas** son aquellas sustancias activas, excipientes o productos de degradación y sus metabolitos que permanezcan en los alimentos obtenidos a partir de animales, y **animales productores de alimentos** aquellos criados, mantenidos, sacrificados o recogidos con el fin de producir alimentos. Así, el Reglamento (UE) nº 37/2010 establece los LMR para cada especie animal (vacuno, porcino, ovino, etc.) y para cada producto en particular (músculo, leche, etc.) (Tabla 2).

Tabla 2. Límites Máximos de Residuos (LMR) establecidos en el Reglamento (UE) nº 37/2010 para tetraciclinas en músculo

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR	Clasificación terapéutica
Clortetraciclina Oxitetraciclina Tetraciclina	Suma de medicamento base y su 4-epímero	Todas las especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg	Antiinfecciosos/ Antibióticos
Doxiciclina	Doxiciclina	Bovinos, porcinos y aves de corral		

3.4 La carne

La carne puede formar parte de una dieta equilibrada ya que, desde un punto de vista nutricional, es un producto que aporta valiosos nutrientes como proteínas de alto valor biológico, grasas, vitaminas, minerales y micronutrientes necesarios para el crecimiento y desarrollo de nuestro organismo. A pesar de su precio, estas características nutricionales y sus cualidades organolépticas, la convierten en uno de los alimentos más demandados por los consumidores.

3.4.1 Producción y consumo de carne

El consumo de carne per cápita es elevado en los países industrializados, mientras que en los países en desarrollo es a menudo insuficiente y con frecuencia su bajo consumo es causa de subnutrición y malnutrición. Sin embargo, según las previsiones de la FAO, la producción mundial de carne se habrá duplicado para el año 2050 a expensas, sobre todo, de estos países en vías de desarrollo.

Las fuentes más frecuentes de suministro de carne son las especies de animales domésticos como el ganado vacuno, los cerdos y las aves de corral. De estas, la carne de cerdo es la más consumida, lo que supone un 36% de la ingesta mundial de carne, seguida de la carne de aves de corral y de vacuno, con aproximadamente un 33% y un 24%, respectivamente (FAO, 2013). Hay que observar que el uso y consumo de las diferentes especies animales varían también en función de preferencias culturales y creencias religiosas.

En España, a pesar de la crisis económica de los últimos años, el consumo de carne fresca se ha ido recuperando y en el año 2012 ha crecido paulatinamente, lo que se debe principalmente a un incremento en el consumo de carne de ave. Tanto es así que la carne fresca más consumida a principios de 2012 fue la de pollo, seguida de la de porcino y en tercer lugar la de vacuno (Tabla 3). Estos datos coinciden con los ofrecidos por la FAO (2012) en lo que se refiere a los tipos de carne más consumidos a nivel internacional (Tabla 4).

Tabla 3. Cantidad (expresada en toneladas (t)) y valor de la carne consumida en España en el primer trimestre de 2012 (expresada en millones de euros (mill. €))

Tipo de carne	Cantidad (t)	Dif. 12/11 %	Valor (mill. €)	Dif. 12/11 %
Carne fresca	468.633	1,6	2.657,88	0,9
Vacuno	76.441	-0,5	687,39	2,1
Pollo	180.102	3,9	701,67	5,1
Ovino/ Caprino	22.018	-5,9	221,85	-5,7
Porcino	130.524	-1,2	732,01	-4,1
Congelada	21.173	8,3	94,07	-6,5
Transformada	142.649	3,8	1.145,79	3,6
Total	632.456	2,3	3.897,75	1,5

Fuente: Eurocarne digital, Noticias 1.6.2012

Tabla 4. Producción mundial de carne

Panorama del mercado mundial de la carne				
	2010	2011 Estim.	2012 Pronóst.	Variación de 2012 a 2011
<i>Millones de toneladas %</i>				
BALANZA MUNDIAL				
Producción	294,2	297,1	301,8	1,6
Carne de bovino	66,7	66,6	66,8	0,4
Carne de ave	98,9	102,3	104,5	2,2
Carne de cerdo	109,3	108,8	110,8	1,9
Carne de ovino	13,7	13,8	13,9	0,9

Fuente: FAO, 2012

3.5 La agricultura ecológica

La **agricultura ecológica**, orgánica o biológica, es un sistema general de gestión agrícola y producción de alimentos basado en una normativa rigurosa y unas técnicas agrarias específicas que excluyen normalmente el uso, en la agricultura y ganadería, de productos químicos de síntesis como fertilizantes, plaguicidas, antibióticos, etc. La finalidad es, por un lado, preservar el medio ambiente, el bienestar animal y el desarrollo rural y, por otro, proporcionar alimentos de máxima calidad con todas sus propiedades naturales a un mercado específico que responde a la demanda de los consumidores.

Todo esto supone que certificar una explotación agraria como ecológica añade más valor a su producción al ofrecer alimentos saludables, de calidad y cuya producción es respetuosa con el medio ambiente. El logotipo de la agricultura ecológica de la UE (Figura 5) es obligatorio desde el 1 de julio de 2010 para todos los alimentos preenvasados procedentes de la agricultura ecológica (Reglamento (UE) N° 271/2010) y ofrece a los consumidores plenas garantías de que el origen y la calidad de los alimentos y bebidas

cumplen los requisitos establecidos en la normativa europea sobre agricultura ecológica.

Existen autoridades de control públicas y organismos de certificación privados que se encargan de realizar controles para asegurar que los alimentos ecológicos se producen bajo una ética rigurosa y respeto por la naturaleza. Así, los productos ecológicos envasados pueden ir acompañados del sello que otorga dicho organismo de control correspondiente con su comunidad autónoma. A este respecto, el C.R.A.E.GA es el organismo de control y certificación de la agricultura ecológica de Galicia y significa Consello Regulador de Agricultura Ecológica de Galicia (Figura 6).



Figura 5. Logotipo de la agricultura ecológica de la Unión Europea



Figura 6. Sello del Consello Regulador de la Agricultura Ecológica de Galicia

Las organizaciones internacionales, los gobiernos y otras entidades públicas se preocupan del bienestar de la sociedad en su conjunto y de cada individuo en particular. En este sentido, es frecuente ver campañas publicitarias que, a través de diferentes canales, informan a la población sobre los beneficios de practicar hábitos de vida saludables o el respeto al medio ambiente. En los alimentos procedentes de la agricultura ecológica se aúnan estos dos conceptos y, paulatinamente, se está creando una tendencia al alza en relación al consumo de estos productos. Así lo refleja la Comisión Europea, cuyos estudios estiman que el mercado de productos ecológicos está creciendo a un ritmo del 10-15% por año, y que la aportación de los productos ecológicos al total del mercado alimentario de los

Estados Miembros de la UE experimentó incrementos del 0,5% al 4% entre 1997 y 2006 (Comisión Europea, 2013).

En España, la agricultura ecológica está regulada desde 1989 y actualmente se rige, entre otras normativas, por el Reglamento del Consejo (CE) 834/2007, relativo a la producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) 2092/1991, y por el Reglamento de la Comisión (CE) 889/2008, con normas detalladas sobre la producción ecológica, su etiquetado y su control.

En este país existen buenas condiciones para el desarrollo de este tipo de agricultura por su favorable climatología y los sistemas extensivos de producción que se aplican en un gran número de cultivos. En lo que respecta a la producción animal, la conservación de un patrimonio genético importante de razas autóctonas, de gran rusticidad en su mayoría y adaptadas al medio, favorece su cría y explotación en régimen extensivo. Estas razas resisten mejor las enfermedades, lo que evita problemas sanitarios asociados con frecuencia a las razas utilizadas en la cría intensiva (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), 2013).

3.5.1 Requisitos para la producción ganadera ecológica en la UE

La ganadería ecológica está sometida a rigurosas normas que no pierden de vista el bienestar animal y el respeto al medio ambiente. En este sentido, el Reglamento (CE) N° 834/2007 establece unos requisitos determinados de producción ganadera en lo relativo al origen de los animales, a las prácticas pecuarias y condiciones de estabulación, a la reproducción, a la alimentación, a la prevención de enfermedades y a limpieza y desinfección. De entre estos requisitos, en lo que concierne a este trabajo, cabe destacar los

siguientes:

- El ganado ecológico debe nacer y haber sido criado en explotaciones ecológicas a lo largo de toda su vida y, a rasgos generales, este debe estar separado de otros tipos de ganado.

- Dado que la agricultura ecológica es una actividad vinculada al suelo, el ganado ecológico debe tener, siempre que sea posible, acceso permanente a áreas al aire libre, preferiblemente pastizales, y el número de animales será limitado para minimizar el sobrepastoreo y el deterioro y contaminación del suelo causada por los animales o el esparcimiento de sus excrementos.

- La alimentación del ganado debe hacerse con piensos ecológicos a fin de cubrir las necesidades nutricionales de los animales en las distintas fases de su desarrollo y también tendrá acceso permanente a pastos y forrajes.

- Deben respetarse las normas de bienestar animal y las necesidades del comportamiento inherentes a cada especie, mientras que la atención veterinaria debe basarse en la prevención de enfermedades. En este aspecto, son importantes la elección de las razas y las estirpes, las prácticas pecuarias, los piensos de alta calidad y el ejercicio, así como que las cargas ganaderas sean las adecuadas y que la estabulación sea la apropiada y esté en buenas condiciones higiénicas.

- En caso de enfermedad los animales se tratarán de forma inmediata y preferiblemente con productos fitoterapéuticos, homeopáticos o de otro tipo, dejando en última instancia el tratamiento con medicamentos alopáticos de síntesis, incluidos los antibióticos. Para estos el Reglamento 889/2008 ha establecido un período de supresión que duplica el establecido para los animales criados de forma no ecológica.

Los productos ecológicos procesados deben someterse a métodos que garanticen la

integridad ecológica y las calidades esenciales del producto durante todas las etapas de la cadena de producción.

En el caso de los preparados ecológicos destinados a niños de corta edad, solo podrán etiquetarse como ecológicos cuando todos o la mayor parte de los ingredientes de origen agrario sean ecológicos (Reglamento 834/2007).

Todas estas medidas están encaminadas a la obtención de una amplia variedad de productos ecológicos que cada año demandan más consumidores. De hecho, en la Unión Europea se ha notado un incremento en la participación de los estados miembros y solo en España ha pasado de 4.235 hectáreas a casi 2 millones desde 1991 a 2011 (MAGRAMA, 2012). La producción ganadera ecológica aún se encuentra poco desarrollada, pero cada año son más los productores dedicados a la producción de alimentos ecológicos procedentes de distintas especies animales (Figura 7).

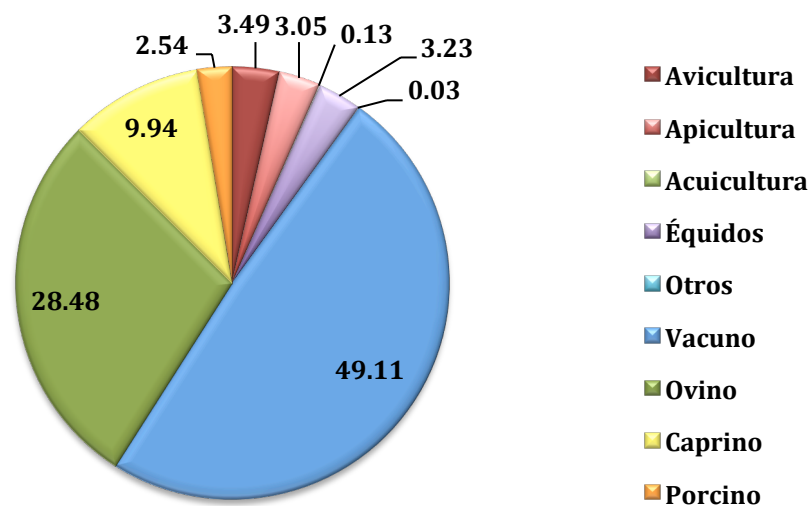


Figura 7. Porcentaje de explotaciones ganaderas ecológicas según la producción en el año 2011 (MAGRAMA, 2012)

3.6 Alimentación infantil

La leche materna suministra todos los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades totales de un bebé hasta los seis meses de edad y al finalizar ese período esta ya no es suficiente por sí sola, por lo que es preciso dar al lactante alimentos complementarios a base de preparados que le proporcionan, en las cantidades adecuadas, la energía y los nutrientes indispensables para garantizar su crecimiento y desarrollo (Latham, 2002).

Así, en base a la alimentación de los niños, es importante diferenciar el período de crecimiento. La Directiva 2006/125/CE, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad, define como “**lactantes**” a los niños que tienen menos de doce meses, y como “**niños de corta edad**” a los niños entre uno y tres años de edad.

Por otra parte, también define “**alimentos infantiles**” como aquellos alimentos distintos de los elaborados a base de cereales. El análisis de este tipo de alimentos constituye uno de los objetivos de este trabajo debido a la relación directa que tienen con la salud de los niños de corta edad y, así, nos referiremos indistintamente a estos alimentos como “alimentos infantiles”, “preparados infantiles”, “alimentos para niños de corta edad” o “preparados para niños de corta edad”.

3.6.1 Elaboración de preparados infantiles

La carne que se utiliza en el proceso de producción de preparados infantiles, se corta en piezas de 100 g aproximadamente, y se precocina durante aproximadamente 30

minutos. Posteriormente se pretritura y la masa resultante, pastosa y todavía con trozos de carne sin deshacer totalmente, se deposita inmediatamente en un tanque de mezclado.

Por otra parte, las hortalizas, frescas o congeladas, se clasifican cuidadosamente y se lavan y, a continuación, son trituradas, calentadas y transportadas a un tanque de mezclado, al igual que la carne.

En el tanque de mezclado, se procede a agregar los condimentos necesarios como, por ejemplo, azúcar, jarabe de maíz, polvo de almidón, extractos de levadura, proteínas vegetales, etc. La adición de estos condimentos dependerá de los preparados que se quieran elaborar.

Es importante resaltar que durante el proceso de preparación en el tanque, la temperatura no debe bajar nunca de los 90°C.

Una vez realizada la mezcla, esta se bombea para ser triturada, emulsificada y homogeneizada y, a continuación, se quita el aire del producto para, de este modo, prevenir oxidaciones y cambios en el sabor, aroma o color.

La siguiente etapa consiste en una pasteurización, la cual calienta el alimento sin daños de quemado hasta una temperatura de 91°C. Realizada dicha operación, el producto se envasa en tarros de cristal y estos son finalmente esterilizados (Bartholomai, 1991).

3.6.2 Consecuencias del uso de antimicrobianos en niños

Los lactantes y los niños tienen más riesgo que los adultos de padecer infecciones bacterianas y las opciones de tratamiento están más limitadas. Una de las causas es que el sistema inmunológico de los niños todavía no está suficientemente preparado para combatirlos al no tener todos los anticuerpos necesarios para ello. Otro motivo es que,

debido a sus comportamientos y actividad diaria, los niños se encuentran constantemente expuestos a contraer infecciones. Finalmente, existen diferencias metabólicas entre adultos y niños que hacen que algunos medicamentos sean poco seguros para estos (Shea y col., 2001). Si a esto le añadimos la creciente resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos el resultado es la reducción en gran medida de las opciones terapéuticas para este colectivo.

Por otra parte, tal y como se ha dicho anteriormente, los antibióticos pueden tener efectos adversos en la salud humana y, en relación al uso de tetraciclinas se sabe que administradas a niños menores de 9 años, (incluso en la segunda mitad de gestación y lactantes) ocasionan alteraciones en el color de los dientes y/o malformaciones en el esmalte (Cubas, 2005). Otros efectos derivados de uso en niños es la fotosensibilidad, la alteración de la microbiota intestinal (crecimiento excesivo de estafilococos), diarreas y/o colitis y también puede provocar abultamiento reversible de las fontanelas en los neonatos (Lilley. A., 2000). Además, estudios recientes demostraron que la exposición a agentes antimicrobianos en edades muy tempranas están relacionadas con incrementos considerables en la masa corporal, lo que podría contribuir al aumento del sobrepeso y de la obesidad infantil (Trasande y col., 2012).

3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A finales de los años 80 Kary Mullis desarrolló una técnica genética consistente en producir *in vitro* múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de otras muchas moléculas de ADN. Esta técnica que ha revolucionado el mundo de la biología molecular es la **Reacción en Cadena de la Polimerasa** o **PCR** (del inglés Polymerase Chain Reaction). Hoy en día, ha adquirido una gran importancia en ciencias

biológicas y biomédicas, pero también tiene muchas otras aplicaciones diferentes. Una de ellas es en la industria alimentaria, donde se utiliza con frecuencia como herramienta de control para garantizar la trazabilidad de los alimentos, conocer su composición o para detectar en ellos la presencia de diferentes microorganismos de interés higiénico-sanitario.

La PCR consiste en la repetición cíclica de tres etapas (Figura 8) (McPherson y Møller, 2006):

- Desnaturalización: el molde de ADN bicatenario se desnaturaliza por temperaturas superiores a 90°C, generalmente 94°C, entre 2 y 5 minutos, para separar las dos cadenas complementarias.

- Alineación: La reacción alcanza rápidamente la temperatura idónea que permite a los oligonucleótidos cebadores (o “primers”) unirse a cada una de las cadenas del ADN molde. Esta temperatura es variable (entre 40 y 72°C) y depende de la composición de las bases y del tamaño de los cebadores, lo que es importante para controlar la especificidad de la reacción. En esta etapa, la enzima ADN polimerasa se activará para permitir la extensión de la cadena en cuanto se hayan alineado los cebadores.

- Extensión: Una subida de la temperatura, generalmente a 72°C, permitirá la síntesis de ADN mediante la ADN polimerasa.

Después del primer ciclo (desnaturalización, alineación y extensión) se obtienen dos réplicas del fragmento de ADN original, de tal forma que estas copias sirven de molde para las subsiguientes y así, el número de moléculas aumenta exponencialmente. Es decir que al final de n ciclos el número de copias de ADN por cada secuencia será de 2^n . Habitualmente, estos ciclos se repiten entre 25 y 40 veces y posteriormente suele haber una fase de extensión a 72°C para garantizar que los productos de PCR estén completos.

Este proceso se lleva a cabo en un equipo llamado termociclador, que permite amplificar el ADN de forma programada, controlando de forma precisa y específica la temperatura y el tiempo necesarios para cada reacción. La detección de los productos de la PCR se realiza normalmente mediante electroforesis en gel de agarosa.

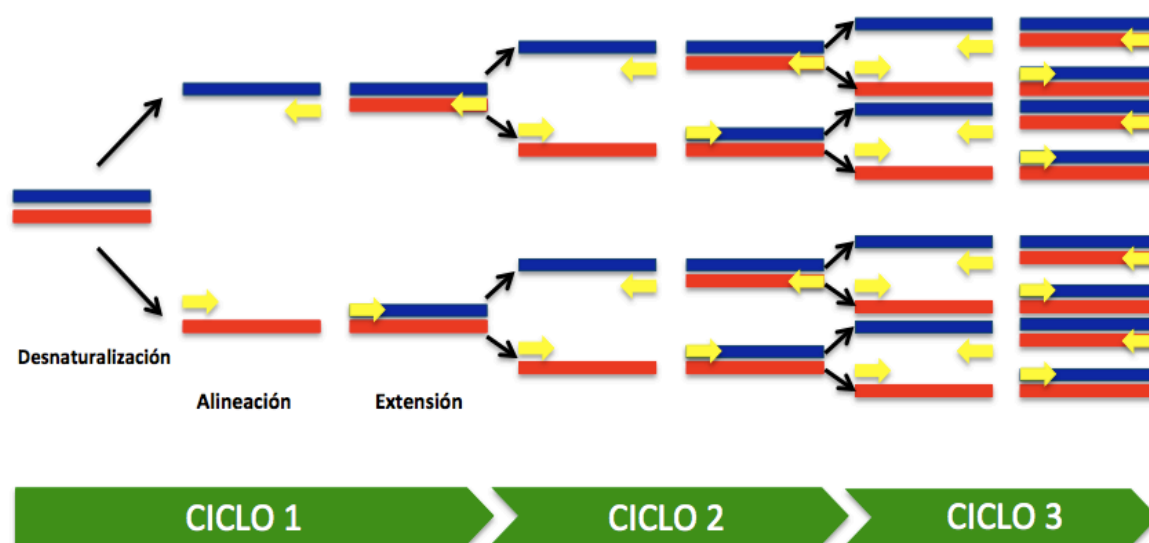


Figura 8. Reacción en cadena de la polimerasa

Además, es importante tener en cuenta que las técnicas basadas en el ADN son especialmente útiles cuando se analizan productos sometidos a tratamientos térmicos intensos, debido a la estabilidad del ADN en dichos procesos (Kangethe y col., 1986; Kesmen, Z., 2012). Esto es particularmente importante en la industria alimentaria, en donde los alimentos son sometidos con frecuencia a procesos físicos, químicos, térmicos o a altas presiones, lo que no supone un impedimento para su posterior análisis en el laboratorio, mediante la PCR.

3.7.1 PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real (RT-qPCR) o PCR cuantitativa (qPCR) es una modificación de la PCR que se utiliza para amplificar y detectar una región específica de ADN y cuantificar los productos resultantes al mismo tiempo que se desarrolla la reacción. Esto es posible gracias a que los termocicladores diseñados para RT-qPCR, incorporan un lector de fluorescencia que permite conocer la cantidad de ADN sintetizado en el mismo momento en que la muestra emite la señal fluorescente, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado (Fonseca Mendoza y col., 2010).

La fluorescencia evaluada es la que se produce durante la fase de crecimiento exponencial y el ciclo de PCR en el que se produce se denomina C_T (Threshold cycle) (Figura 9). Este valor está relacionado con la cantidad de ADN de partida y será menor cuanto mayor sea la señal de fluorescencia, es decir, cuantas más copias haya del ADN diana.

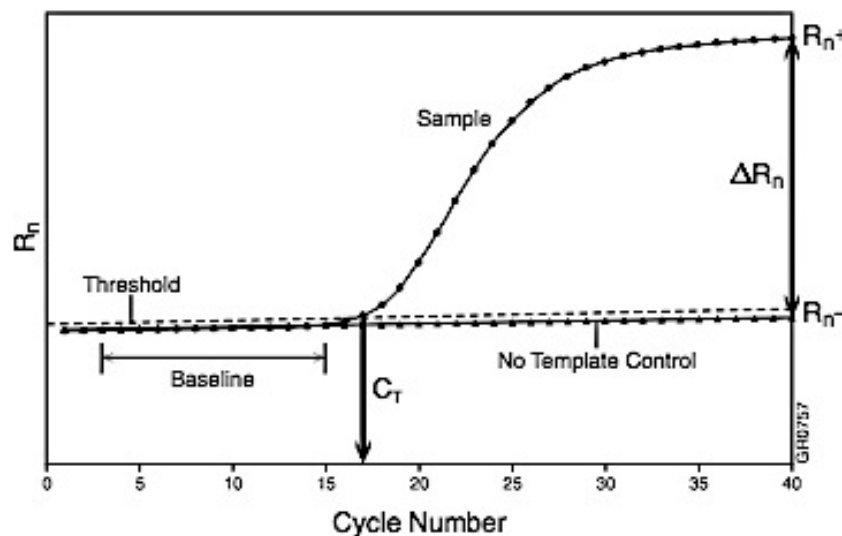


Figura 9. Esquema de una curva de amplificación en una reacción de RT-qPCR (Applied Biosystems – Relative Quantification Getting Started Guide for 7000 v1.1 27)

Los ensayos en los que se analizan secuencias específicas mediante RT-qPCR, usan sondas marcadas con fluorocromos. Para la realización de este trabajo se ha utilizado la sonda de hidrólisis TaqMan[®] (en adelante Taqman), que es un oligonucleótido marcado con dos fluorocromos en sus extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de la secuencia de ADN diana. El fluorocromo donador está situado en el extremo 5' y se llama "*reporter*" (o reportero) y el fluorocromo aceptor del extremo 3' recibe el nombre de "*quencher*" (o extintor). Cuando la sonda está intacta, la proximidad entre donador y aceptor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en que el fluorocromo extintor inhibe la emisión de fluorescencia del reportero. En el transcurso de la reacción, la sonda se une a su secuencia diana cuando esta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa provoca la liberación del fluorocromo reportero del extremo 5' de la sonda y al separarse del extintor comienza a emitir fluorescencia (Figura 10). Cuanto mayor es la cantidad de producto generado, mayor es la cantidad de sondas que hibridan en la secuencia diana y que liberan al pigmento reportero durante la reacción, por lo tanto, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de amplicón generado.

En este trabajo se han utilizado sondas Taqman MGB, que incluyen una molécula llamada MGB (Minor Groove Binder) que se une al surco menor del ADN y que otorga a la sonda una mayor estabilidad y especificidad durante la hibridación a la secuencia diana. También utilizan un "quencher" no fluorescente (NFQ) que actúa como un aceptor de transferencia de energía del reportero, pero que no emite una señal fluorescente detectable

por sí misma. Esto permite obtener una señal más limpia que facilita la interpretación de los datos (Rodríguez y col., 2003).

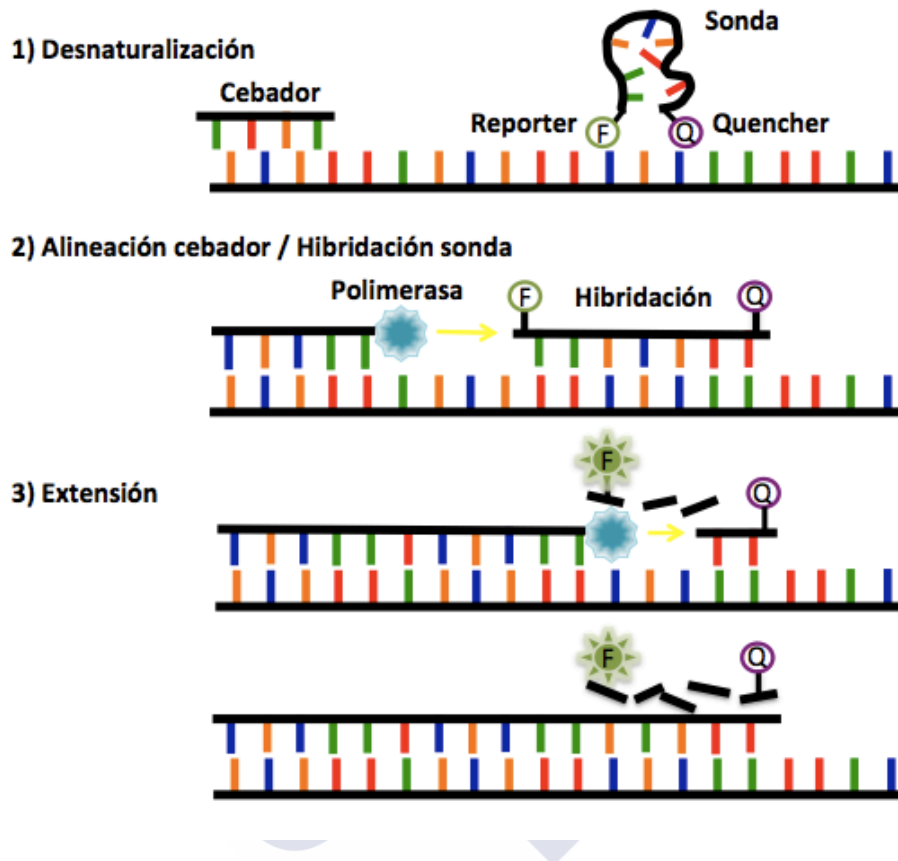


Figura 10. El “reporter” y el “quencher” están unidos en la sonda y no hay emisión de fluorescencia. La enzima Taq polimerasa corta la sonda fluorescente durante cada ciclo de amplificación, aumentando la emisión de fluorescencia al liberar el “reporter”.

Hasta el momento, han sido muchos y muy diferentes los estudios publicados acerca de la resistencia a antimicrobianos analizada mediante PCR cuantitativa pero, en general, la detección o cuantificación de genes de resistencia se hace a partir de aislamientos de un solo microorganismo indicador o patógeno como, por ejemplo, *E. coli* en muestras fecales humanas, porcinas o de otras especies animales (Schwaiger y col., 2010; Bryan y col., 2004), en alimentos de origen animal (Jouini y col., 2009), *Campylobacter* spp. en muestras de carne convencional y ecológica (Young y col., 2009) o

Leuconostoc mesenteroides en productos cárnicos (Elizaquível y col., 2008). Sin embargo, este trabajo se ha enfocado hacia la detección y cuantificación directa de genes de resistencia a tetraciclinas en poblaciones bacterianas de enterobacterias y aerobios mesófilos a partir de muestras de carne convencional, ecológica y a partir de preparados infantiles para bebés y niños de corta edad.

3.7.2 Ventajas de la RT-qPCR

La RT-qPCR, además de proporcionar información cuantitativa, como ya se ha comentado anteriormente, presenta otra serie de ventajas frente a la PCR tradicional:

- Es una técnica más rápida ya que durante la reacción solo emplea dos etapas por ciclo, mientras que la PCR convencional necesita tres. Esto es debido al pequeño tamaño de los amplicones (entre 50 y 150 pb), ya que el tiempo invertido en pasar entre las fases de unión de los cebadores y de desnaturalización es suficiente para copiar la secuencia diana.

- El hecho de que los amplicones sean tan pequeños confiere al ensayo una mayor eficiencia ya que permite detectar el ADN diana incluso en muestras muy degradadas.

- La PCR cuantitativa emplea el Ct como medida fiable del número de copias inicial de ADN diana en la muestra en lugar de medir el producto acumulado a tiempo final.

- Es una técnica muy sensible y por tanto es capaz de analizar muestras con muy poca cantidad de ADN.

- No requiere elaboración, tinción y visualización de geles de agarosa, lo que también la convierte en una técnica más segura que la PCR tradicional y reduce el riesgo

de contaminación de la muestra.

- Es una técnica muy específica debido a la incorporación de un tercer oligonucleótido, la sonda marcada con los fluorocromos.

3.8 Ensayo receptor para la determinación de tetraciclinas

Es frecuente encontrar trabajos en los que la detección de tetraciclinas se lleva a cabo por cromatografía líquida o espectrometría de masas, pero estos métodos son complicados, laboriosos y caros.

Los métodos de cribado o screening se utilizan, en muchas ocasiones, para detectar residuos de antibióticos en alimentos antes que los métodos de confirmación. Esto es debido a que presentan muchas ventajas, entre las cuales cabe destacar que son métodos sensibles, fiables, rápidos, robustos y relativamente económicos. Además permiten analizar muchas muestras en el mismo ensayo y puede realizarse por personal no necesariamente cualificado (Pastor, 2011).

En esta tesis se ha utilizado un test tipo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay o Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), el “ensayo receptor para la determinación de tetraciclinas”. El procedimiento (Figura 11) se lleva a cabo en pocillos de plástico previamente revestidos con un competidor de tetraciclinas (fase sólida). Posteriormente se añaden los patrones de tetraciclina o las muestras y también el receptor. Durante la incubación, el receptor puede unirse bien a la fase sólida o bien a las moléculas de tetraciclina y los lavados posteriores arrastran cualquier molécula que no se haya unido a la fase sólida. Durante una segunda incubación, la unión del receptor a la fase sólida es detectada por un anticuerpo HRP-conjugado “antirreceptor”, el cual se une a su vez a este

complejo, y tras la segunda fase de lavado, la unión entre el receptor y el anticuerpo conjugado se detecta con un sustrato cromogénico. La enzima convierte el cromógeno incoloro en azul y tras la adición de un nuevo sustrato la coloración pasa de azul a amarillo. Por último, la absorbancia se mide en un lector de microplacas a 450 nm. La intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de tetraciclina en la muestra (Puppini y col., 2008).

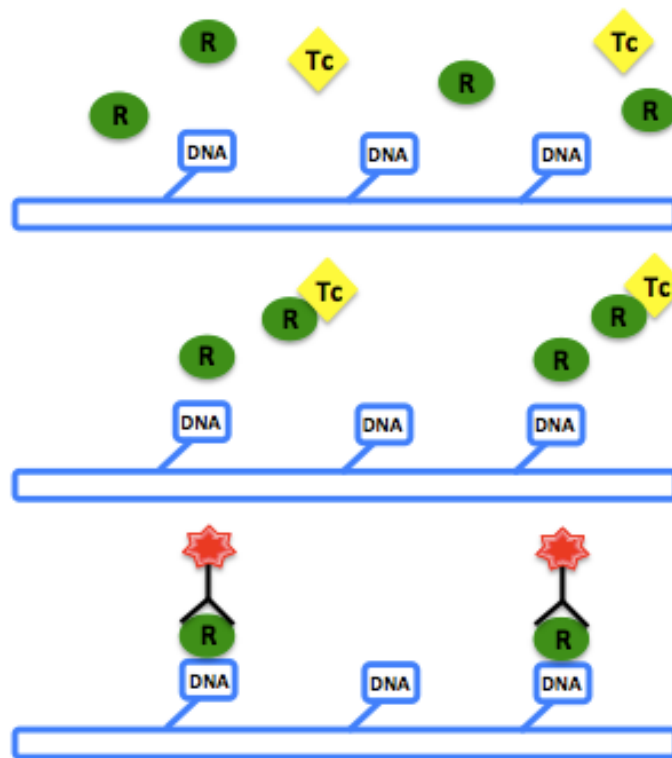


Figura 11. Esquema de reacción del ensayo receptor de tetraciclina (Puppini y col., 2008)



4 OBJETIVOS





4.1 Objetivo general

El principal objetivo de este trabajo fue desarrollar un método molecular sensible, específico y rápido, capaz de detectar y cuantificar de forma directa cepas bacterianas resistentes a tetraciclinas, que posean los genes *tet(A)* y/o *tet(B)*, en distintos tipos de carne y preparados infantiles, tanto convencionales como ecológicos. La técnica seleccionada para llevar a cabo este objetivo fue la PCR en tiempo real y para el desarrollo del método fue necesario un kit de cebadores y sonda Taqman para cada gen.

4.2 Objetivos específicos

1. Diseñar dos kits de cebadores y sonda Taqman para detectar dos de los genes de resistencia a tetraciclina más frecuentes en bacterias gram negativas, *tet(A)* y *tet(B)* mediante la técnica de RT-qPCR.

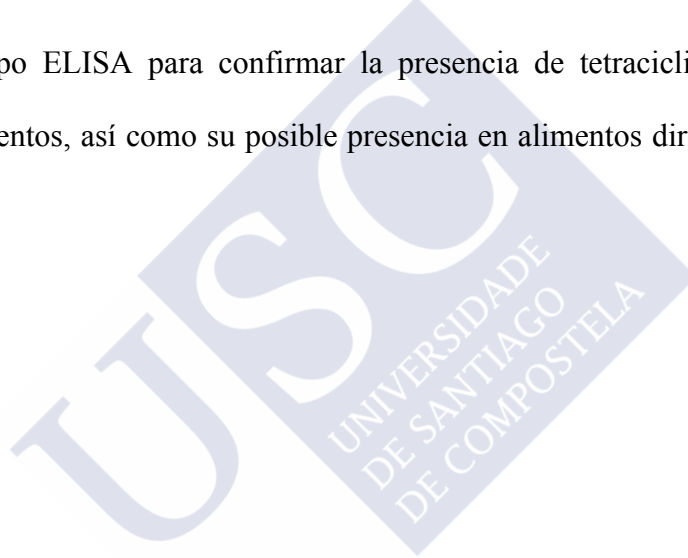
2. Desarrollar un método de RT-qPCR utilizando las sondas Taqman previamente diseñadas, para la detección y cuantificación, en diferentes alimentos, de los genes mencionados anteriormente. Esto pretende contribuir al estudio de la distribución de los genes de resistencia en el medio ambiente y al estudio de la relación entre el uso de los agentes antimicrobianos en medicina veterinaria y la propagación de la resistencia bacteriana a estas sustancias.

3. Cuantificar las bacterias portadoras de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en carne de pavo, pollo, cerdo y ternera con el método desarrollado por RT-qPCR y comparar los resultados con los recuentos obtenidos, por microbiología convencional, de aerobios mesófilos y enterobacterias resistentes a tetraciclina.

4. Comparar los recuentos microbiológicos y moleculares de bacterias resistentes a tetraciclina entre carnes de origen convencional y ecológico, así como estudiar la frecuencia y distribución de los genes *tet(A)* y *tet(B)* entre las distintas especies animales estudiadas.

5. Evaluar la presencia y cantidad de los citados genes por RT-qPCR en preparados infantiles de carne, tanto convencionales como ecológicos y comparar los resultados entre las diferentes especies y métodos de producción.

6. Evaluar la cantidad de residuos de tetraciclinas en los citados tipos de carne mediante un test tipo ELISA para confirmar la presencia de tetraciclinas en animales productores de alimentos, así como su posible presencia en alimentos dirigidos a niños de corta edad.



5 RESULTADOS



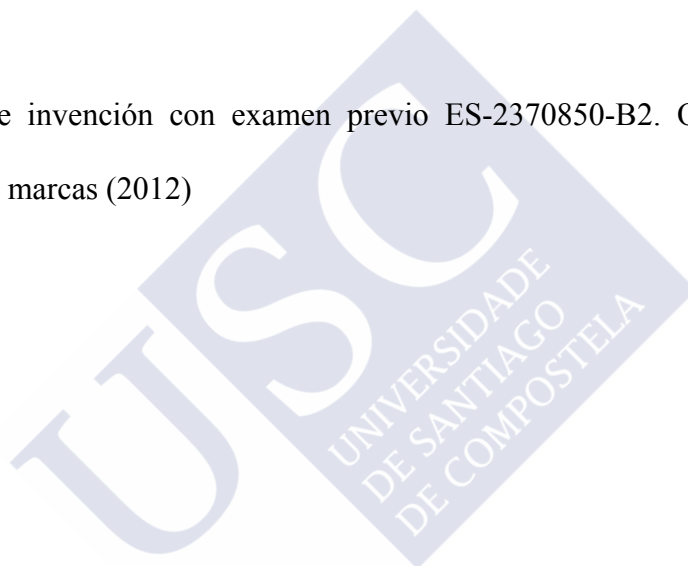


5.1 CAPÍTULO 1

5.1.1 Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas

Mónica Guarddon García, José Manuel Miranda López, Carlos Manuel Franco Abuín, Beatriz Martínez Ruiz, Beatriz Vázquez Belda, Alberto Cepeda Sáez

Patente de invención con examen previo ES-2370850-B2. Oficina española de patentes y marcas (2012)



Resumen

En esta tesis se ha desarrollado un nuevo método, rápido, sensible y específico para detectar y cuantificar de forma directa los genes de resistencia a tetraciclina *tet(A)* y *tet(B)* en alimentos. Ambos genes son dos de los más frecuentes en bacterias gram negativas. Para detectarlos se diseñaron un kit de cebadores y una sonda Taqman específicos para cada uno de estos genes. Tanto el diseño de los kits como el del método están descritos con detalle en la patente y el artículo que se muestran a continuación. Las rectas de calibrado se crearon con *E. coli* BM13 (C600 Rif^R)/RP4, que porta el gen *tet(A)*, y con *E. coli* NCTC 50365, que porta el gen *tet(B)*. También se inocularon con estas cepas muestras de carne y pescado, que se usaron como matriz para construir nuevas rectas de calibración para el análisis de 20 muestras de carne de ave y 10 muestras de merluza (*Merluccius merluccius*). Los límites de detección en cultivo puro fueron 5 ufc/ml (0,7 log ufc/ml) para el caso de *tet(A)*, 50 ufc/ml (1,7 log ufc/ml) para *tet(B)* y 5×10^2 ufc/g (2,7 log ufc/g) para ambos genes en muestras de alimentos. Los resultados obtenidos por qPCR se compararon con recuentos de bacterias resistentes a tetraciclina obtenidos a partir de la siembra de extractos de carne de ave o merluza en medios de cultivo suplementados con 16 mg/l de tetraciclina. Los recuentos de bacterias resistentes a tetraciclina obtenidos por qPCR mostraron una correlación positiva, particularmente interesante cuando se compararon con los recuentos microbiológicos de las *Enterobacteriaceae* resistentes a tetraciclina de la carne de ave ($r=0,5509$) y con los de bacterias aerobias mesófilas resistentes a la tetraciclina en merluza ($r=0,7146$). Los resultados mostraron que el método podría ser útil para la cuantificación directa de bacterias portadoras del gen *tet(A)* y/o *tet(B)* en muestras de alimentos.

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11) Número de publicación: **2 370 850**

21) Número de solicitud: 201030856

51) Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22) Fecha de presentación: **02.06.2010**43) Fecha de publicación de la solicitud: **23.12.2011**Fecha de la concesión: **25.06.2012**45) Fecha de anuncio de la concesión: **05.07.2012**45) Fecha de publicación del folleto de la patente:
05.07.201273) Titular/es:
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA
CITT-CENTRO DE INNOVACIÓN E
TRANSFERENCIA DE TECNOLOXÍA-EDIFICIO
EMPRENDIA-CAMPUS SUR
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA, A Coruña, ES72) Inventor/es:
GUARDDON GARCIA, MONICA;
MIRANDA LOPEZ, JOSE MANUEL;
FRANCO ABUIN, CARLOS MANUEL;
MARTINEZ RUIZ, BEATRIZ;
VAZQUEZ BELDA, BEATRIZ y
CEPEDA SAEZ, ALBERTO74) Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan54) Título: **MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A TETRACICLINAS.**57) Resumen:
Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina.

Se describe un método in vitro para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina mediante una reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa empleando cebadores específicos para el gen de resistencia a tetraciclina A (tetA). De aplicación en la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en muestras ambientales, alimentarias, biológicas y clínicas.

ES 2 370 850 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

ES 2 370 850 B2

DESCRIPCIÓN

Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas.

5 **Campo de la invención**

La invención se relaciona con métodos *in vitro* para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas mediante una reacción de amplificación empleando cebadores específicos para una región del gen de resistencia a tetraciclina A (*tetA*). Dichos métodos son útiles en la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en muestras ambientales, alimentarias, biológicas, clínicas, etc. La invención también se relaciona con un kit para la puesta en práctica de dichos métodos.

15 **Antecedentes de la invención**

Tras diversas décadas de uso de agentes antimicrobianos, se está empezando a observar la aparición de diversos patógenos multiresistentes (Martínez, J. L., *et al.* 2009. FEMS Microbiol. Rev. 33:44-65). Este aspecto es muy importante en producción animal ya que depende del uso de altas cantidades de agentes antimicrobianos para el control de enfermedades, lo que proporciona condiciones favorables para la aparición y diseminación de bacterias resistentes a estos agentes (Aarestrup, F. M. 2005. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96:271-281). Se han realizado diferentes estudios (Aarestrup, F. M. 2005. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96:271-281; White, D. G. 2006. Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In F. M. Aarestrup (ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin, 1st ed. ASM Press, Washington, DC. 145-166) en donde se detalla el riesgo que estas bacterias resistentes suponen para la salud humana, puesto que algunas de estas cepas bacterianas acaban siendo intratables con este tipo de fármacos.

Las tetraciclinas son agentes de amplio espectro que presentan una actividad fundamentalmente bacteriostática y bactericida, en dosis elevadas, frente a un gran número de bacterias gram negativas y positivas. Debido a dicho efecto antimicrobiano, su uso se ha extendido mucho en la terapia de infecciones de animales. Sin embargo, parece que este uso generalizado es la causa de la selección de organismos resistentes (Chopra, I. & M. Roberts. 2001. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:232-260).

Los genes que codifican la resistencia a tetraciclinas son transmisibles entre diferentes bacterias pero también desde bacterias de animales de producción a bacterias de los humanos (Aarestrup, F. M. 2005. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 96:271-281). Así, los determinantes de resistencia a tetraciclina se han extendido entre especies de bacterias identificándose más de 39 especies de bacterias gram negativas y 23 especies de gram positivas (Chopra, I. & M. Roberts. 2001. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:232-260).

En el estado de la técnica existen diversos métodos para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas basados en la detección de diferentes genes. A modo ilustrativo, se ha descrito un método para la detección de bacterias gram negativas resistentes a tetraciclina de diferentes muestras obtenidas de comida de animales y aguas residuales usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y pruebas para los determinantes *tetA*, *tetB* y *tetC*, *tetG* y *tetM*, *O*, *P*, *Q*, *S*, *T* y *W* (Yu Z. *et al.* 2005 Appl. Environ. Microbiology. p. 6926-6933). Sin embargo, con este método es necesario realizar múltiples pruebas para cuantificar diferentes especies de bacterias.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar un método de detección de bacterias resistentes a tetraciclina que permita detectar un gran número de especies, subespecies y serovariantes de este tipo de bacterias que sea, a la vez, eficaz, sensible, rápido y económico.

50 **Compendio de la invención**

Los inventores han diseñado diversas parejas de cebadores y sondas que amplifican una región del gen *tetA* muy conservada entre diferentes especies de géneros, e incluso a nivel de variante, de bacterias resistentes a tetraciclinas, lo que permite la detección específica de microorganismos resistentes a tetraciclinas, y, en particular, la detección de múltiples especies y serovariantes de bacterias resistentes a tetraciclinas con un único ensayo. La secuencia identificada por los inventores aparece en múltiples especies de bacterias resistentes a tetraciclinas (Figuras 3 y 4). El empleo de cebadores que amplifican dicha región, en particular, unos cebadores que hibridan con los extremos de dicha región, permite cuantificar en muestras de alimentos las unidades formadoras de colonia con una sensibilidad de hasta 50 ufc/g (unidades formadoras de colonia/gramo) en cultivo puro y de 5×10^2 ufc/g en carne y pescado (Figuras 6 y 7).

En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como "método 1 de detección de la invención" [véase más adelante].

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como "método 2 de detección de la invención" [véase más adelante].

ES 2 370 850 B2

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como “método 1 de cuantificación de la invención” [véase más adelante].

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que presenta las características del método identificado en esta descripción como “método 2 de cuantificación de la invención” [véase más adelante].

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido seleccionado del grupo de oligonucleótidos formado por los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y sus combinaciones.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit adecuado para la puesta en práctica de los métodos previamente mencionados. El empleo de dicho kit para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a las tetraciclinas constituye un aspecto adicional de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

20 Figura 1. Parte de la secuencia del gen *tetA*. Subrayada aparece la secuencia entre los nucleótidos 592 y 884 (dichos nucleótidos aparecen señalados en negrita). Los cebadores aparecen marcados. La sonda utilizada para el PCR tiempo real aparece marcada y en negrita.

25 Figura 2. Secuencia del gen *tetB*. Subrayada aparece la secuencia entre los nucleótidos 75 y 400 (dichos nucleótidos aparecen señalados en negrita). Los cebadores aparecen marcados. La sonda utilizada para el PCR tiempo real aparece marcada y en negrita.

30 Figura 3. Alineamiento de diferentes secuencias de genes de resistencia a tetraciclina A de diferentes especies (número de secuencia indicado a la izquierda de cada secuencia) donde se puede observar la similitud entre las secuencias. La flecha indica el nucleótido 884 de la Figura 1.

35 Figura 4. Alineamiento de diferentes secuencias de genes de resistencia a tetraciclina B de diferentes especies (número de secuencia indicado a la izquierda de cada secuencia) donde se puede observar la similitud entre las secuencias. La flecha indica el nucleótido 400 de la Figura 2.

Figura 5. Análisis en PCR tiempo real del ADN extraído a partir de diluciones seriadas de un cultivo puro de *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) (◆) y de *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Los valores del ciclo umbral se representan frente a la concentración de unidades formadoras de colonias.

40 Figura 6. Análisis en PCR tiempo real del ADN extraído a partir de diluciones seriadas de una muestra de carne inoculada con *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) (◆) y de *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Los valores del ciclo umbral se representan frente a la concentración de unidades formadoras de colonias.

45 Figura 7. Análisis en PCR tiempo real del ADN extraído a partir de diluciones seriadas de una muestra de pescado inoculado con *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) (◆) y de *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Los valores del ciclo umbral se representan frente a la concentración de unidades formadoras de colonias.

50 Figura 8. Comparación entre el recuento en placa, en muestras de carne, de *Enterobacteriaceae* en Violet Red Bile agar con Glucosa (VRBG) con tetraciclina y el recuento por PCR cuantitativa de la microbiota total con los genes de resistencia *tetA* y *tetB*.

55 Figura 9. Comparación entre el recuento en placa, en muestras de pescado, de la microbiota aerobia mesófila en Plate Count Agar (PCA) con tetraciclina y el recuento por PCR cuantitativa de la microbiota total con los genes de resistencia *tetA* y *tetB*.

Descripción detallada de la invención

60 En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “método 1 de detección de la invención”, que comprende

- 65 (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).

ES 2 370 850 B2

Las “tetraciclinas” constituyen un grupo de antibióticos, unos naturales y otros obtenidos por semisíntesis, que abarcan un amplio espectro en su actividad antimicrobiana. Químicamente son derivados de la naftacenocarboxamida policíclica, que posee un núcleo tetracíclico, de donde deriva el nombre del grupo. Las tetraciclinas naturales se extraen de bacterias del género *Actinomyces*. Del *Streptomyces aureofaciens* se extrae la clortetraciclina y la demetil-clortetraciclina. La oxitetraciclina se extrae a partir del *Streptomyces rimosus*. La tetraciclina, representante genérico del grupo, se puede extraer del *Streptomyces viridifaciens*, aunque también se puede obtener de forma semisintética a partir de clortetraciclina. La democlociclina se obtiene a partir de una mutación de una cepa de *Streptomyces aureofaciens*. Otros derivados sintéticos incluyen la metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, etc.

En la presente invención, la expresión “bacterias resistentes a tetraciclina” incluye cualquier bacteria en la que al menos una tetraciclina no ejerce sobre dicha bacteria ni un efecto bacteriostático (es decir, no detiene el crecimiento de la bacteria en cuestión) ni un efecto bactericida (es decir, no la mata). Una bacteria puede ser resistente a un tipo específico de tetraciclina o a varias de ellas al mismo tiempo.

Los mecanismos por los que las tetraciclinas ejercen su función bacteriostática o bactericida implican desacoplar la fosforilación oxidativa de las bacterias, provocar una inhibición de la síntesis proteica en el ribosoma de la bacteria inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 30S del ribosoma y no permitir la unión del ácido ribonucleico de transferencia (tRNA) a este, ni el transporte de aminoácidos hasta la subunidad 50S, o alterar la membrana citoplasmática, permitiendo la salida de componentes intracelulares.

La resistencia a la tetraciclina está mediada por diferentes genes que pueden estar codificados en diversos elementos genéticos tales como, plásmidos, transposones e integrones. La resistencia a tetraciclina puede ser debida a la disminución de la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana (eflujo). Otro tipo de resistencia es debido a la presencia de proteínas de protección ribosomal que permiten actuar al aminoacil-ARN-transfer en presencia de tetraciclinas.

En una realización particular, la resistencia es debida a la disminución de la acumulación intracelular de tetraciclinas por bombeo activo asociado a la membrana. Se conocen diversos genes que codifican proteínas implicadas en el bombeo de tetraciclinas. Entre ellos se encuentran los genes *tet* que codifican bombas de flujo.

En una realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias gram negativas. En otra realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas, especialmente bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos.

En otra realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, etc.; en otra realización más particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas pertenecientes a dichos géneros, en particular, bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos.

Por bacterias “patógenas” se entiende bacterias que pueden causar enfermedades infecciosas en el huésped. En materia de alimentación, las bacterias patógenas son las que, si se encuentran presentes en los alimentos, pueden originar las intoxicaciones y toxi-infecciones alimentarias. Así, en la presente invención, la expresión “enfermedades derivadas de la ingestión de alimentos infectados”, incluye aquellas enfermedades originadas por el consumo de alimentos infectados por agentes contaminantes (entre los que se encuentran las bacterias resistentes a tetraciclina) en cantidades tales que pueden afectar a la salud. Las enfermedades derivadas de la ingestión de alimentos infectados con tales agentes contaminantes se pueden dividir en:

- Enfermedades causadas por infecciones: son enfermedades provocadas por el consumo de alimentos que contienen microorganismos vivos perjudiciales, tales como la salmonelosis (*Salmonella* sp.), la campilobacteriosis (*Campylobacter* sp.), la infección causada por *Shigella* sp., la infección causada por *Listeria monocytogenes*, etc.;
- Enfermedades causadas por intoxicaciones: son enfermedades causadas por la ingestión de toxinas formadas en tejidos de plantas o animales, o de productos metabólicos de microorganismos en los alimentos, o por sustancias químicas que se incorporan a ellos de modo accidental o intencional desde su producción hasta su consumo. Este tipo de enfermedades sucede cuando las toxinas bacterianas están presentes en los alimentos ingeridos. Estas toxinas no producen olores ni sabores pero son capaces de causar daño aun después de ser eliminado el microorganismo. Ejemplos ilustrativos incluyen la intoxicación causada por la toxina estafilocócica (*Staphylococcus aureus*), la intoxicación causada por *Bacillus cereus*, etc.; y
- Toxi-infecciones: son enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos con una cierta cantidad de microorganismos causantes de enfermedades, los cuales son capaces de producir o liberar toxinas una vez que son ingeridos. Ejemplos ilustrativos incluyen el cólera (*Vibrio cholerae*), la toxi-infección causada por *Clostridium perfringens* (según el tipo de toxina que produzca puede causar enfermedades en humanos o en animales), las infecciones producidas por toxinas de *Escherichia coli*.

ES 2 370 850 B2

- En una realización particular y preferida, las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*. En otra realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes a distintas subespecies (*subsp.*), por ejemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Choleraesuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*, etc.
- Las bacterias resistentes a tetraciclina son microorganismos ampliamente distribuidos que pueden sobrevivir en multitud de ambientes distintos, por lo que para la puesta en práctica de los métodos de detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina proporcionados por la presente invención puede emplearse cualquier tipo de muestra susceptible de contener dichas bacterias o sospechosa de contaminación por dichas bacterias resistentes a tetraciclina.
- El término “*muestra*”, tal como aquí se utiliza, incluye cualquier tipo de material que pueda contener bacterias resistentes a tetraciclina, incluyendo muestras ambientales, alimentarias, biológicas, clínicas, etc., por ejemplo, muestras procedentes de procesos industriales, e.g., industrias papeleras, alimentarias (tal como, por ejemplo, industrias aceiteras, cerveceras, heladeras, etc.), petroleras, etc.; muestras procedentes del tratamiento de aguas residuales; muestras procedentes de la manipulación de fluidos biológicos en el entorno sanitario, e.g., sistemas de perfusión entéricos, sistemas de diálisis, catéteres, etc.; muestras biológicas (e.g., tejidos, células, extractos celulares, homogeneizados celulares, fluidos biológicos tales como sangre, suero, plasma, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, heces, sudor, etc.), etc. En una realización particular, dicha muestra es una muestra alimentaria, por ejemplo, una muestra de un producto alimentario perecedero, una muestra de un producto cárnico o derivado del mismo, o una muestra de pescado o un derivado del mismo, una muestra de productos alimenticios que contienen huevo y sus derivados, productos lácteos y sus derivados, huevos, cremas, etc. Alternativamente, la muestra puede consistir en un órgano entero, e.g., músculo, ojo, piel, gónadas, nódulos linfáticos, corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, bazo, tumores, etc. En una realización particular, la muestra utilizada para llevar a cabo los métodos de detección y cuantificación proporcionados por esta invención, es una muestra ambiental (e.g., una muestra de agua, tierra, etc.), una muestra biológica (e.g., fluidos biológicos, heces, etc.), una muestra alimentaria (e.g., productos alimentarios perecederos, carnes, pescados, huevos, cremas, etc.).
- Tal como aquí se utiliza, la expresión “*ácido nucleico*”, se refiere a un polímero formado por la repetición de unos monómeros llamados nucleótidos, unidos mediante enlaces fosfodiéster. Existen 2 tipos de ácidos nucleicos: ADN (ácido desoxirribonucleico) y ARN (ácido ribonucleico). Adicionalmente, de forma artificial, a partir de ARN se puede obtener ADN complementario (ADNc) que también se considera un ácido nucleico. Por tanto, tal como aquí se utiliza, la expresión “*preparación de ácidos nucleicos*” incluye el conjunto de ácidos nucleicos presentes en la preparación que va a ser sometida a una reacción de amplificación, incluyendo ADN, ARN y/o ADNc procedente de la retrotranscripción del ARN.
- En la presente invención se entiende por “ADN” o “ADN genómico” (ADNg) al material genético de los organismos vivos que controla la herencia. En el caso de las bacterias este material puede estar formando plásmidos. El término “ARN” tal como aquí se utiliza se refiere a la molécula resultado de la transcripción de una secuencia de ADN. Un “ADNc” es un ADN obtenido a partir del ARN mensajero (ARNm) por acción de la retrotranscriptasa inversa.
- El experto en la materia entenderá que la detección de bacterias resistentes a las tetraciclinas a partir de ARN implica la existencia de bacterias viables en la muestra analizada. Por tanto, la puesta en práctica de cualquiera de los métodos de detección de bacterias resistentes a tetraciclina proporcionados por esta invención permite detectar no sólo bacterias resistentes a tetraciclinas viables presentes en la muestra analizada (e.g. si la muestra comprende una preparación de ácidos nucleicos que comprende ARN o ADNc obtenido a partir de ARN) sino también bacterias resistentes a tetraciclinas que estén (o hayan estado) en la muestra analizada aunque ya no sean viables (e.g. si la muestra comprende una preparación de ácidos nucleicos que comprende ADNg).
- Cualquiera de los métodos de detección de bacterias resistentes a tetraciclina proporcionados por esta invención (método 1 de detección de la invención y método 2 de detección de la invención) incluye una etapa previa de extracción de los ácidos nucleicos de la muestra a analizar. Se conocen distintas técnicas de extracción de ácidos nucleicos, por ejemplo, cromatografía de penetrabilidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de adsorción, ultrafiltración, empleo de bolas magnéticas a las que los ácidos nucleicos se unen selectivamente, etc. (Sambrook *et al.*, 2001. “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3). Adicionalmente, existen kits de extracción de ácidos nucleicos comercialmente disponibles para realizar dicha extracción.
- Si el ácido nucleico es ADN, la extracción puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de resinas quelantes (e.g. CHELEX 100) y de intercambio iónico. Estas resinas pueden ser naturales (aluminosilicatos) como zeolitas, arcillas minerales y feldespatos, o de naturaleza sintética como óxidos metálicos hidratados (óxido de titanio hidratado), sales insolubles de metales polivalentes (fosfato de titanio), sales insolubles de heteropolisacáridos (molibdofosfato amónico), sales complejas basadas en hexacianoferratos insolubles y zeolitas sintéticas. Estas resinas poseen una elevada afinidad por los iones metálicos polivalentes y se emplean para separar los compuestos potencialmente inhibidores de la PCR presentes en la preparación de ácidos nucleicos obtenida a partir de la muestra a analizar.

ES 2 370 850 B2

En el caso de que el ácido nucleico a extraer de la muestra sea ARN, existen kit comerciales exclusivamente diseñados para este propósito que contienen los componentes adecuados para extraer en perfectas condiciones el ARN: altas concentraciones de sales caotrópicas en el tampón de lisis para inactivar las RNAsas, membranas de sílice que favorecen la adsorción del ARN, DNAsas que eliminan el ADN para alcanzar un aislado de ARN de gran pureza, etc.

5 A modo ilustrativo, no limitativo, un kit comercial que reúne las características antes citadas es Nucleospin® RNA.

El método 1 de detección de la invención comprende la realización de una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos. Como entiende el experto en la materia, una reacción de amplificación consiste, básicamente, en la multiplicación exponencial de una molécula de ADN diana (o de una región diana de una molécula de ADN) mediante el empleo de oligonucleótidos que hibridan con las regiones que flanquean la región diana que se quiere amplificar. Las diferentes técnicas o procedimientos de llevar a cabo reacciones de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001. (*supra.*). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de reacciones de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y variaciones de la misma [amplificación regional de la reacción en cadena de la polimerasa (RA-PCR, del inglés “*Regional Amplification PCR*”), la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR, del inglés “*Real Time PCR*”), etc.]. El protocolo seguido para llevar a cabo una PCR es ampliamente conocido en el estado de la técnica y, actualmente, existen kits comerciales que contienen los materiales necesarios para llevar a cabo dicha amplificación. Asimismo, las condiciones de temperatura, tiempo, concentraciones de reactivos y número de ciclos de la PCR dependerán de la ADN polimerasa utilizada en la reacción de amplificación, de la especificidad de los cebadores, etc. Si se emplea un kit comercial, las condiciones de la reacción serán las especificadas por el fabricante del kit.

Así, en una realización particular de la invención, la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). Una RT-PCR es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia, basándose dicha detección en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y “quenchers”.

En general, una reacción de amplificación requiere el empleo de una pareja de oligonucleótidos, denominados cebadores, que van a hibridar con unas regiones que permiten la amplificación de la región/secuencia diana que se quiere amplificar. En el caso concreto del método 1 de detección de la invención, la región diana a amplificar es una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En la Figura 3 que acompaña a la presente descripción, se muestran la región del gen *tetA* de distintos géneros y especies de bacterias resistentes a tetraciclina, concretamente de (identificados mediante su código en Genbank y bacteria): AJ313332.1 *Escherichia coli* plásmido pTOJO2; CP000971.1 *Escherichia coli* SMS-3-5 plásmido pSMS35_130; CU459141.1 *Acinetobacter baumannii*; EF679779.1 *Laribacter hongkongensis* plásmido pHLHK22; AB366441.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* plásmido pMAK2; AM746674.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Brandenburg*; pUO-Sbr3 plásmido, EF633507.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* plásmido IncW pIE321; DQ464880.1 *Escherichia coli* aislado H14t plásmido pWSH1 Tnp; AY214164.3 *Escherichia coli* plásmido pAPEC-O2-R; AY333434.1 *Salmonella typhimurium* plásmido pU302L; AY458016.1 *Escherichia coli* plásmido pC15-1a; AF542061.1 *Salmonella enteritidis* vector de expresión pSY7K transposasa putativa; AJ517790.2 *Aeromonas salmonicida* plásmido de resistencia parcial a fármacos pRAS1; CR376602.1 *Aeromonas punctata* (*Aeromonas caviae*) HGB5 plásmido pFBAOT6; AJ634602.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* plásmido; AJ628353.1 *Salmonella enterica* plásmido; X61367.1 Transposon Tn1721 bacteria gram-negativa; AY509004.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Choleraesuis* aislado SC-B67 plásmido pSC138; EU664602.1 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Kentucky strain* 01-2100 *Salmonella* genomic island 1 variante SGI1-K1; AJ419171.1 *Escherichia coli*, AM261760.1 IncP-1alpha plásmido pBS228; DQ645594.1 vector *Shuttle* pME6032; Y608912.1 *Escherichia coli* plásmido pFL129; L29404.1 *Escherichia coli*; AF534183.1 *Shigella sonnei* plásmido pSS4; AF502943.1 *Shigella sonnei* plásmido pSSTAV; AF497970.1 *Shigella sonnei* plásmido pKKTET7; AJ307714.1 *Escherichia coli*, que corresponden a la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Como entiende el experto en la materia, todas las secuencias mostradas en la Figura 3 son secuencias homólogas (que comparten una secuencia consenso) que serán detectadas al poner en práctica el método 1 de detección de la invención, permitiendo así la detección de distintos géneros/especies/serovariantes de bacterias resistentes a tetraciclina. Asimismo, el experto en la materia apreciará que el método 1 de detección de la invención es adecuado para la detección de otros géneros y cepas no recogidas en la Figura 3 siempre que la región del gen *tetA* correspondiente a la región recogida en dicha figura muestra una similitud de secuencia sustancial con la secuencia consenso deducida de dicho alineamiento y, en particular, con la región central del mismo frente a la que se dirige la sonda de hibridación.

En la etapa (i) del método 1 de detección de la invención, se amplifica la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Por tanto, en una realización particular, se amplifica la totalidad de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Para ello, en una realización particular, en el paso (i) del método 1 de detección de la invención, se utiliza una pareja de cebadores que hibrida con los extremos de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. A modo ilustrativo, en una realización particular, uno de los cebadores de dicha pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha pareja

ES 2 370 850 B2

de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; y, en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y el otro de los cebadores de dicha pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Por tanto, en una realización particular, el producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, se amplifica una parte (fragmento) de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, tal como un fragmento de dicha región que comprende 250 nucleótidos o menos, preferentemente 200 nucleótidos o menos, más preferentemente 150 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 100 nucleótidos o menos, y, todavía aún más preferentemente, 75 nucleótidos o menos. Así, en otra realización particular, el producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En una realización particular, la amplificación de dicha región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 688 y el nucleótido 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 se lleva a cabo mediante el empleo de una pareja de cebadores formada por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

Adicionalmente, la reacción de amplificación se puede llevar a cabo empleando un sistema de amplificación que permite eliminar la contaminación con amplificadores provenientes de anteriores ciclos de amplificación. Este es el caso, por ejemplo, del máster de amplificación AmpErase[®] uracil-N-glicosidasa. La uracil-N-glicosidasa es una enzima que degrada el ADN que lleva dUTPs incorporados en lugar de los dTTPs del ADN natural. De esta manera se impide la aparición de falsos positivos debido a la citada contaminación.

Una vez llevada a cabo la reacción de amplificación es necesario detectar los productos de amplificación o ampli-cones [etapa (ii) del método 1 de detección de la invención]. Las técnicas para detectar los productos de amplificación están ampliamente descritas en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Sambrook *et al.*, 2001 (citado *supra*). En dicha detección puede emplearse cualquiera de los procedimientos de identificación de fragmentos de amplificación conocidos del estado de la técnica, tales como hibridación con sondas marcadas (e.g., con un fluoróforo), tinción (e.g., tinción de plata, con agentes intercalantes, tales como bromuro de etidio, SYBR Green[®], etc.), etc.

Como es conocido del estado de la técnica, si el método de amplificación elegido es una RT-PCR, la detección del producto de amplificación se realiza simultáneamente a la reacción de amplificación. Para ello, pueden emplearse tanto mecanismos de detección no específicos como específicos.

Los mecanismos de detección no específicos detectan todos los ADN de doble cadena producidos durante la reacción de amplificación (ya sea un producto específico, un producto inespecífico o dímeros de cebadores). Este mecanismo es el método estándar y básicamente consiste en añadir un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a esta. Agentes adecuados para este propósito incluyen SYTO 15, SYTO 25, SYTO 13, SYTO 9, SYBR Green I, SYTO 16, SYTO 17, SYTO 21, SYTO 59, SYTOX, SYTO BC, DAPI, Hoechst 33342, Hoechst 33258, y PicoGreen. Preferiblemente, se utiliza SYBR Green[®] que se excita a 497 nm y emite a 520 nm.

Por tanto, en una realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante un agente intercalante fluorescente tal como se ha mencionado previamente; en una realización todavía más particular, dicho agente intercalante es SYBR Green[®].

Tal como aquí se utiliza, el término “*fluoróforo*” se refiere a una molécula capaz de emitir una radiación electro-magnética en respuesta a la absorción de una radiación de excitación en donde la longitud de onda de la radiación emitida es distinta a la longitud de onda de la radiación de excitación y en donde la emisión de radiación persiste únicamente mientras se mantiene la radiación de excitación.

Por otro lado, los mecanismos de detección específicos son capaces de distinguir entre la secuencia de interés y las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de *quenchers* (pigmento *quencher* o extinguidor no fluorescente -NFQ- que incrementa la eficacia de detección y señal al no emitir fluorescencia) y sondas marcadas con un amplio rango de fluoróforos (pigmento reportero) con diferentes espectros de excitación y emisión.

Ejemplos ilustrativos pero no limitativos de marcadores fluorescentes que pueden ser usados en el contexto de los mecanismos de detección específicos se incluyen en la Tabla 1.

ES 2 370 850 B2

TABLA 1

Colorantes fluorescentes comúnmente empleados

Molécula	Longitud de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
FAM	488	518
HEX	488	556
TET	488	538
CY3	550	570
CY5.5	675	694
JOE	527	548
6-ROX	575	602
Cascade Blue	400	425
Fluoresceína	494	518
Texas Red	595	615
Rodamina	550	575
Rodamina Green	502	527
Rodamina Red	570	590
Rodamina 6G	525	555
6-TAMRA	555	580
5-TMRIA	543	567
Alexa 430	430	545
Alexa 488	493	516
Alexa 594	588	612
Bodipy R6G	528	550

Tal como aquí se utiliza, un “quencher” es una molécula que acepta energía de un fluoróforo y la disipa en forma de calor o fluorescencia. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de quenchers incluyen Methyl Red, ElleQuencher, Dabcyl, Dabsyl, TAMRA, etc.

Así, en una realización particular, la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante una sonda marcada que, en otra realización todavía más particular, comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher. Ejemplos de sondas que llevan este tipo de marcaje son, por ejemplo, sondas TaqMan, balizas moleculares (sondas del tipo “Molecular Beacon”), sondas Scorpions, sondas Amplifluor, sondas Eclipse, etc.

Adicionalmente, si se desea, la sonda puede comprender en su extremo 3' una molécula MGB entre la secuencia de nucleótidos y el pigmento quencher. Un MGB (enlazante al surco menor, del inglés, “minor groove binder”) es una pequeña molécula en forma de media luna que encaja muy bien en el surco menor del ADN bicatenario. Así, cuando la sonda hibrida a la secuencia diana, el MGB estabiliza el apareamiento incorporándose al surco menor del ADN bicatenario creado entre la sonda y dicha secuencia diana. La estabilización es mucho más eficaz cuando las secuencias coinciden perfectamente (es decir, no hay desparejamiento). Además del superior potencial discriminador, la mayor estabilidad permite que las sondas sean muy cortas (normalmente de 13 a 20 bases) en comparación con las sondas estándar (de 18 a 40 bases), sin detrimento de las directrices en el diseño de los cebadores. El Ejemplo que ilustra la presente invención, muestra el uso de dichas moléculas MGB.

En una realización particular, el producto de amplificación es detectado mediante el uso de una sonda que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 que detecta de forma específica la región diana de *tetA* empleada en el método 1 de detección de la invención, es decir, la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Tal como aquí se utiliza, “la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1”, se refiere a la región o secuencia del gen *tetA* de cualquier especie o variante de bacteria resistente a tetraciclina que es homóloga a la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Asimismo, la expresión “secuencias homólogas”, tal como aquí se utiliza, se refiere a aquellas secuencias que tienen una identidad de secuencia entre sí de al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 91%, al menos el 92%, al menos el 93%, al menos el 94%, al menos el 95%, al menos el

ES 2 370 850 B2

96%, al menos el 97%, al menos el 98% o al menos el 99%. La expresión “identidad de secuencia” se refiere al grado en que 2 secuencias de polinucleótidos son idénticas en base a una comparación de nucleótido a nucleótido a lo largo de una región en particular de comparación. El porcentaje de identidad de secuencia puede calcularse, por ejemplo, comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una región de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentran bases de ácidos nucleicos idénticas (por ejemplo, A, T, C, G o U) en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la región de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100.

La homología entre varias secuencias de nucleótidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento múltiple de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, ClustalW (Chenna, *et al.* 2003 Nucleic Acids Res, 31:3497-3500). En la Figura 3 que acompaña a la presente descripción se muestra un alineamiento múltiple de secuencias en la que pueden verse alineadas las secuencias del gen *tetA* de distintas especies de bacterias resistentes a tetraciclina cuyas secuencias del *tetA* son homólogas entre sí.

Adicionalmente, en una realización particular, se incluye un control interno de amplificación en el método 1 de detección de la invención. De este modo, es posible llevar a cabo una reacción de amplificación en presencia de un ADN exógeno que sirva como control interno de la amplificación, de tal forma que se pueda asegurar que un resultado negativo en la detección del microorganismo (en la presente invención bacterias resistentes a las tetraciclinas) no se debe a la inhibición de la *Taq* polimerasa por la presencia de sustancias inhibitoras sino a la falta de complementariedad entre la sonda y los productos de amplificación o a la ausencia de amplificación por ausencia de anillamiento de los cebadores. La inclusión del control interno de amplificación permite identificar fácilmente los resultados falsos negativos. En la solicitud de patente WO2007/085675 y en la publicación de Alvarez, J. *et al.* 2004 (J. Clin. Microbiol., 42:1734-1738) se describe la elaboración de un control interno de amplificación.

Por tanto, en una realización particular, la amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar la totalidad o parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Como se ha comentado anteriormente, existen diversos genes de resistencia a tetraciclina, por lo que la invención contempla la posibilidad de, además de detectar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, detectar otro gen de resistencia a tetraciclina, por ejemplo, uno o más de los genes *tetB*, *tetM*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetQ*, *tetW*, especialmente el gen *tetB*.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la detección de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “método 2 de detección de la invención”, que comprende

- (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una primera pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, y
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).

El significado de los términos “bacterias resistentes a tetraciclina”, “tetraciclina”, “muestra” y “preparación de ácidos nucleicos” ya ha sido indicado previamente en relación con el método 1 de detección de la invención.

En la presente invención se entiende por “la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5”, a la región o secuencia del gen *tetB* de cualquier especie o variante de bacteria resistente a tetraciclina que es homóloga a la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. El significado de “secuencias homólogas” ya ha sido indicado previamente en relación con el método 1 de detección de la invención. La homología entre secuencias de nucleótidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento múltiple de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, ClustalW (Chenna, *et al.* 2003 Nucleic Acids Res, 31:3497-3500). En la Figura 4 que acompaña a la presente descripción se muestra un alineamiento múltiple de secuencias en la que pueden verse alineadas las secuencias del gen *tetB* de distintas especies de bacterias resistentes a tetraciclina cuyas secuencias del gen *tetB* son homólogas entre sí.

Las diferentes técnicas de extracción de ácido nucleico, amplificación de la región diana, detección de productos de amplificación, etc., anteriormente descritas en relación con el método 1 de detección de la invención, son aplicables al presente método 2 de detección de la invención.

ES 2 370 850 B2

Al igual que en el método 1 de la invención, la reacción de amplificación puede llevarse a cabo en presencia de un ADN exógeno que sirva como control interno de la amplificación. Por tanto, en una realización particular, la reacción de amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando una pareja de cebadores constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, o, alternativamente, en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando una pareja de cebadores constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

La etapa (i) del método 2 de detección de la invención comprende la obtención de (1) un primer producto de amplificación, correspondiente a la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y de (2) un segundo producto de amplificación, correspondiente a la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 70 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

Efectivamente, en la etapa (i) del método 2 de detección de la invención, se amplifica:

- la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y
- la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 70 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

Por tanto, en una realización particular, se amplifica la totalidad de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 para dar lugar al primer producto de amplificación. Para ello, en una realización particular, en el paso (i) del método 2 de detección de la invención, se utiliza una primera pareja de cebadores que hibrida con los extremos de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. A modo ilustrativo, en una realización particular, uno de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; y, en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 592 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y el otro de los cebadores de dicha primera pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Por tanto, en una realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

En otra realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formado por, una parte (o fragmento) de la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1; en este caso, se amplifica una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, tal como un fragmento de dicha región que comprende 250 nucleótidos o menos, preferentemente 200 nucleótidos o menos, más preferentemente 150 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 100 nucleótidos o menos, y, todavía aún más preferentemente, 75 nucleótidos o menos. Así, en otra realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formada por, la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En una realización particular, la amplificación de dicha región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 688 y el nucleótido 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 se lleva a cabo mediante el empleo de una primera pareja de cebadores formada por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

En otra realización particular, se amplifica la totalidad de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 para dar lugar al segundo producto de amplificación. Para ello, en una realización particular, en el paso (i) del método 2 de detección de la invención, se utiliza una segunda pareja de cebadores que hibrida con los extremos de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. A modo ilustrativo, en una realización particular, uno de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 75 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; y, en otra realización particular, uno de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 75 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y el otro de los cebadores de dicha segunda pareja de cebadores hibrida con una región que comprende el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. Por tanto, en una realización particular, el segundo producto de amplificación comprende, o está formado por, la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

ES 2 370 850 B2

En otra realización particular, el segundo producto de amplificación comprende, o está formado por, una parte (o fragmento) de la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5; en este caso, se amplifica una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, tal como un fragmento de dicha región que comprende 250 nucleótidos o menos, preferentemente 200 nucleótidos o menos, más preferentemente 150 nucleótidos o menos, aún más preferentemente 100 nucleótidos o menos, y, todavía aún más preferentemente, 75 nucleótidos o menos. Así, en otra realización particular, el primer producto de amplificación comprende, o está formada por, la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En una realización particular, la amplificación de dicha región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 118 y el nucleótido 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 se lleva a cabo mediante el empleo de una segunda pareja de cebadores formada por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

En una realización particular, el primer producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, o por un fragmento de la misma, tal como el producto constituido por la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y el segundo producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 75 y 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, o por un fragmento de la misma, tal como el producto constituido por la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

En una realización concreta, el primer producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y el segundo producto de amplificación comprende o está formado por la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

El método 2 de detección de la invención, al igual que el método 1 de detección de la invención, permite detectar bacterias resistentes a tetraciclina. Así, en una realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina que pueden ser detectadas mediante cualquiera de dichos métodos (método 1 ó 2 de detección de la invención) son bacterias gram negativas. En otra realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas, especialmente bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de bacterias resistentes a tetraciclina que pueden ser detectadas usando el método 2 de detección de la invención incluyen bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, etc.; preferentemente, bacterias patógenas pertenecientes a dichos géneros, en particular, bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en particular, en humanos. En una realización particular y preferida, las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio sp.* y *Yersinia ruckeri*. En otra realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes a distintas subespecies (*subsp.*), por ejemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuus*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*, etc.

La reacción de amplificación del método 2 de detección de la invención se puede realizar por cualquier método convencional, conocido por el experto en la materia, tal como cualquiera de los métodos previamente mencionados en relación con el método 1 de detección de la invención; no obstante, en una realización particular, dicha reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR). En una realización particular, la primera pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

Asimismo, la detección de los productos de amplificación generados en el método 2 de detección de la invención (primero y segundo producto de amplificación) se puede realizar por cualquier método convencional, conocido por el experto en la materia, tal como cualquiera de los métodos previamente mencionados en relación con el método 2 de detección de la invención; no obstante, en una realización particular, la detección de dichos primero y segundo productos de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de unas sondas marcadas apropiadas, por ejemplo, sondas que comprenden en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher, preferentemente, sondas que comprenden un MGB en su extremo 3'. En una realización particular y preferida, la sonda para identificar el primer producto de amplificación comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y la sonda para identificar el segundo producto de amplificación comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

ES 2 370 850 B2

Al igual que en el método 1 de detección de la invención, en una realización particular, el método 2 de detección de la invención comprende la inclusión de un control interno de amplificación. De este modo, es posible llevar a cabo la amplificación en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y/o un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “método 1 de cuantificación de la invención”, basado en el método 1 de detección de la invención, que comprende:

- (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i), y, adicionalmente
- (iii) cuantificar las bacterias resistentes a tetraciclina.

Las etapas (i) y (ii) del método 1 de cuantificación de la invención corresponden a las etapas (i) y (ii) del método 1 de detección de la invención por lo que todo lo mencionado en relación con dicho método 1 de detección de la invención es aplicable al método 1 de cuantificación de la invención.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “cuantificación” se refiere a la determinación del número de bacterias presentes en la muestra ensayada. La cuantificación puede ser relativa o absoluta. La cuantificación relativa no requiere estándares con concentraciones determinadas y se basa en la comparación de las intensidades de detección de dos o más muestras obtenidas usando el método 1 de detección de la invención y comparando dichas intensidades con valores de referencia fijados tales como, por ejemplo, la cantidad de muestra de partida o un gen de referencia (o “housekeeping gene”). Así, a modo ilustrativo, no limitativo, se puede determinar en dos muestras de igual peso la que tiene una mayor intensidad de señal obtenida en la etapa (ii) del método 1 de detección de bacterias; o bien se puede realizar la comparación con genes de referencia (“housekeeping genes”), tales como actina, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), etc., detectados en la muestra paralelamente a los genes de resistencia a tetraciclina, e.g., *tetA*, *tetB*, etc.

En una realización particular y preferida, usando la metodología proporcionada por esta invención, es posible realizar la cuantificación absoluta de las bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra; para ello se pueden determinar, a modo ilustrativo, no limitativo, las unidades formadoras de colonia (ufc) presentes en la muestra. Así, el método 1 de cuantificación de la invención comprende, adicionalmente, las siguientes etapas:

- a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,
- b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,
- c) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenido en la etapa (iii) del método 1 de cuantificación de la invención con la curva patrón obtenida en la etapa b).

La primera etapa adicional [etapa a)] comprende efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*. Aunque prácticamente cualquier microorganismo que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* puede ser utilizado como microorganismo control en la etapa a), en una realización particular dicho microorganismo es la cepa *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4. Dicha etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la generación de diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias se lleva a cabo de manera que se defina el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en cada una de las diluciones.

La segunda etapa adicional [etapa b)] consiste en realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) utilizando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, se prepara la curva patrón utilizando los mismos métodos descritos anteriormente para la amplificación de la región

ES 2 370 850 B2

comprendida entre los nucleótidos 592 y el nucleótido 884 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En el Ejemplo 1, apartados “Ensayos cuantitativos” y “Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad”, se describe una forma particular de realizar una curva patrón para la determinación de las unidades formadoras de colonias.

5

Finalmente, en la tercera etapa adicional [etapa c)], se determinan las unidades formadoras de colonias en la muestra analizada relacionando el resultado obtenido en la cuantificación [etapa (iii) del método 1 de cuantificación de la invención] con la curva patrón obtenida en la etapa b).

10

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para la cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra, en adelante “método 2 de cuantificación de la invención”, basado en el método 2 de detección de la invención, que comprende:

15

(i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una primera pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5,

20

(ii) detectar los productos de amplificación generados en la etapa (i), y

(iii) cuantificar las bacterias resistentes a tetraciclina.

25

Las etapas (i) y (ii) del método 2 de cuantificación de la invención corresponden a las etapas (i) y (ii) del método 2 de detección de la invención por lo que todo lo mencionado en relación con dicho método 2 de detección de la invención es aplicable al método 2 de cuantificación de la invención.

30

En una realización particular y preferida, usando la metodología proporcionada por esta invención, es posible realizar la cuantificación absoluta de las bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra; para ello se pueden determinar, a modo ilustrativo, no limitativo, las unidades formadoras de colonia (ufc) presentes en la muestra. Así, el método 2 de cuantificación de la invención comprende, adicionalmente, las siguientes etapas:

35

a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,

40

b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,

45

c) realizar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonia de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB*,

50

d) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa c) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, y

55

e) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenida en la etapa (iii) del método 2 de cuantificación de la invención con las curvas patrón obtenidas en las etapas b) y d).

60

Aunque prácticamente cualquier microorganismo que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* puede ser utilizado como microorganismo control en la etapa a) y cualquier microorganismo que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB* puede ser utilizado como microorganismo control en la etapa c), en una realización particular el microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA* es la cepa *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 y el microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB* es *Escherichia coli* NCTC 50365.

65

La primera etapa adicional [etapa a)] comprende efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*, tal como, por ejemplo, *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la generación de diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias se lleva a cabo de manera que se defina el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en cada una de las diluciones.

ES 2 370 850 B2

La segunda etapa adicional [etapa b)] consiste en realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) utilizando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, se prepara la curva patrón utilizando los mismos métodos descritos anteriormente para la amplificación de la región comprendida entre los nucleótidos 592 y el nucleótido 884 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En el Ejemplo 1, apartados “Ensayos cuantitativos” y “Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad”, se describe una forma particular de realizar una curva patrón para la determinación de las unidades formadoras de colonias.

La tercera etapa adicional [etapa c)] comprende efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB*, tal como, por ejemplo, *Escherichia coli* NCTC 50365. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, la generación de diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias se lleva a cabo de manera que se defina el número de unidades formadoras de colonias por unidad de volumen en cada una de las diluciones.

La cuarta etapa adicional [etapa d)] consiste en realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa c) utilizando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. Esta etapa puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. En una realización particular, se prepara la curva patrón utilizando los mismos métodos descritos anteriormente para la amplificación de la región comprendida entre los nucleótidos 75 y el nucleótido 400 en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En el Ejemplo 1, apartados “Ensayos cuantitativos” y “Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad”, se describe una forma particular de realizar una curva patrón para la determinación de las unidades formadoras de colonias.

Finalmente, en la quinta etapa adicional [etapa e)], se determinan las unidades formadoras de colonias en la muestra analizada relacionando el resultado obtenido en la cuantificación [etapa (iii) del método 2 de cuantificación de la invención] con las curvas patrón obtenidas en las etapas b) y d).

Para la puesta en práctica de los métodos de detección y cuantificación proporcionados por esta invención, los inventores han desarrollado un conjunto de cebadores y sondas que permiten la detección específica de bacterias resistentes a tetraciclina.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un oligonucleótido cuya secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo de oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en la SEQ ID NO: 2 [cebador *tetA* F], SEQ ID NO: 3 [cebador *tetA* R], SEQ ID NO: 4 [sonda *tetA*], SEQ ID NO: 6 [cebador *tetB* F], SEQ ID NO: 7 [cebador *tetB* R] y SEQ ID NO: 8 [sonda *tetB*], y sus combinaciones.

Los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 son cebadores que pueden ser utilizados para amplificar un fragmento del gen *tetA*, tal como se menciona más abajo.

Los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7 son cebadores que pueden ser utilizados para amplificar un fragmento del gen *tetB*, tal como se menciona más abajo.

Los oligonucleótidos cuyas secuencias de nucleótidos se muestran en las SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8 son sondas que pueden ser utilizadas para identificar los productos de amplificación de los genes *tetA* y *tetB*, respectivamente, amplificados por los cebadores previamente mencionados.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una pareja de oligonucleótidos seleccionada entre las parejas de oligonucleótidos formadas por:

a) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [cebador *tetA* F] y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 [cebador *tetA* R]; y

b) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 [cebador *tetB* F] y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [cebador *tetB* R].

La primera pareja de oligonucleótidos [pareja a)] es particularmente adecuada para amplificar una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, en particular, la región comprendida entre los nucleótidos 688 y 739 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

ES 2 370 850 B2

La segunda pareja de oligonucleótidos [pareja b)] es particularmente adecuada para amplificar una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, en particular, la región comprendida entre los nucleótidos 118 y 172 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

5 Los kits que comprenden los reactivos y agentes necesarios para la puesta en práctica de los métodos de detección y cuantificación proporcionados por esta invención constituyen aspectos adicionales de la misma.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante "*kit de la invención*", que comprende una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En una realización particular del kit de la invención, dicha pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.

15 En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de dicha pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En una realización particular del kit de la invención, dicha segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

25 En una realización particular, el kit de la invención comprende una primera pareja de cebadores constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3, y una segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

30 En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además, una sonda capaz de detectar el producto de amplificación del gen *tetA* consistente en un producto que comprende la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, preferentemente entre los nucleótidos 688 y 739 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Así, en una realización particular, dicha sonda comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.

35 En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de la sonda capaz de detectar el producto de amplificación del gen *tetA*, una segunda sonda capaz de detectar el producto de amplificación del gen *tetB*, consistente en un producto que comprende la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, preferentemente entre los nucleótidos 118 y 172 de dicha secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. En una realización particular del kit de la invención, dicha segunda sonda comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

45 En una realización particular, el kit de la invención comprende una primera sonda que comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y una segunda sonda que comprende, o está constituida por, la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

50 En una realización particular, la sonda o sondas presentes en el kit de la invención comprende(n) en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento quencher, preferentemente, un MGB en su extremo 3'.

En otra realización particular, el kit comprende, un agente intercalante fluorescente, tal como SYBR Green.

55 En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además, un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, el kit de la invención comprende, además de dicho primer ADN exógeno, un segundo ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

60 El empleo del kit de la invención constituye un aspecto adicional de esta invención. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit de la invención para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra.

65 En una realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias gram negativas. En otra realización particular, las bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas, especialmente bacterias patógenas que causan una enfermedad derivada de la ingestión de alimentos infectados con dichas bacterias en animales, en

ES 2 370 850 B2

particular, en humanos. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de bacterias resistentes a tetraciclina incluyen bacterias pertenecientes a los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersinia*, etc., tales como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp.,

5 *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp., *Yersinia ruckeri*, etc. En un realización particular, dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* pertenecientes a distintas subespecies (*subsp.*), por ejemplo, *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Choleraesuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Dublin*, *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar *Kentucky*, etc.

10 En una realización particular, la muestra se selecciona del grupo que comprende una muestra ambiental, una muestra biológica y una muestra alimentaria.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos de la invención y no pretenden ser limitativos de la misma.

Ejemplo 1

*Detección y Cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina*I. *Materiales y Métodos**Cepas bacterianas y condiciones de cultivo*

25 Para realizar una curva patrón, se utilizaron dos cepas de referencia: *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (suministrada por el Instituto Pasteur), con el determinante *tetA*, y *Escherichia coli* NCTC 50365 (suministrado por el Centro Nacional de Cultivos Tipo o NCTC), con el gen *tetB*. Ambos cultivos fueron incubados a 41°C en *Violet Red Bile agar with Glucose* (VRBG) (Liofilchem).

30 Tras 24 horas de incubación, las colonias aisladas se inocularon en *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco) a 31°C hasta su saturación, cuando ambos cultivos alcanzaron una concentración de 10⁹ ufc/mL (unidades formadoras de colonias/ml).

Aislamiento del ADN

35 El ADN de cultivos puros se aisló usando *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche, Mannheim, Germany), usando el protocolo para bacterias y levaduras y siguiendo las indicaciones del fabricante. De igual manera, el ADN artificialmente inoculado a muestras de comida se aisló usando el mismo kit y protocolo. Tras la extracción, el ADN se guardó a -20°C.

Secuenciación del ADN y diseño de cebadores

45 Los determinantes *tetA* y *tetB* se eligieron como dianas para determinar y cuantificar los dos genes de resistencia a tetraciclinas en células gram negativas (Fan, W., et al. 2007. Mol. Cell. Probes. 21:245-256).

El plásmido pTOJO2 (*Gene bank accession number*: AJ313332.1) sirvió de modelo para comparar las distintas secuencias con otras bacterias, algunas de ellas patógenas, y el plásmido HB101 de *E. coli* NCTC 50365 sirvió como

50 modelo para el gen *tetB*.

Se realizaron alineamientos usando el algoritmo *ClustalX* (1.81) para las siguientes secuencias de *tetA* (*Gene bank accession number*): CP000971, AB366441, AM746674, EF679779, EF633507, AY214164.3, AY333434, DQ464880, AY458016, AF542061, X61367, AJ634602, AJ628353, AY509004, EU664602, AJ419171, AY608912, AF534183, AF502943, AF497970, AJ307714, L29404, AJ517790.2, AM261760, CR376602, CU459141, DQ645594. En la Figura 3 se muestran los resultados de dicho alineamiento.

Para *tetB* se analizaron las secuencias (*Gene bank accession number*): AB089594, EF646764, AB089592, AB089587, AB089590, AB089593, AM886293, AM746675.2, AM412236, AF250878, AL513383, AB089588, AB089595, AF223162, AB089585, AF326777.3, AB366440, AJ277653, AY528506.1, V00611.1, CP001122.1, CP000602, DQ835008, DQ316139, EF467365. En la Figura 4 aparecen los resultados de dicho alineamiento.

Tras el alineamiento se seleccionó una región altamente conservada entre todas las cepas. Los cebadores y las sondas se diseñaron usando el *software* Primer Express 2.0.

ES 2 370 850 B2

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR)

Los cebadores, sondas y el *Environmental Master Mix 2.0* (que contienen ROX como una referencia pasiva, la Taq polimerasa, así como nucleótidos y tampón necesarios) se obtuvieron de Applied Biosystems (Warrington, UK).

5

La cuantificación se realizó con un termociclador ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems).

Para un volumen total de reacción de 25 μ L, la mezcla reactivos consta de:

10

- 50 ng ADN

- 12,5 μ L *Master Mix*

15

- 2,25 μ L cebador directo

- 2,25 μ L cebador reverso y

- 0,5 μ L sonda TaqMan

20

- Agua PCR

Los cebadores (primers) y sonda Taqman diseñados para cada determinante, son los siguientes:

25

• *Para tetA:*

Cebador directo: CCGCGCTTTGGGTCATT (SEQ ID NO: 2)

Cebador reverso: TGGTCGCGTCCCAGTGA (SEQ ID NO: 3)

30

Sonda Taqman MGB: TCGGCGAGGATCG (SEQ ID NO: 4)

35

• *Para tetB:*

Cebador directo: AGGCGCATCGCTGGATT (SEQ ID NO: 6)

Cebador reverso: CAGCATCCAAAGCGCACTT (SEQ ID NO: 7)

40

Sonda Taqman MGB: CTTATTGCTGGCTTTTT (SEQ ID NO: 8)

Estos cebadores amplifican una región de 51 pb dentro del gen *tetA* y un fragmento de 55 pb en el gen *tetB*, respectivamente.

45

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

- 10 minutos/95°C, para la activación de la polimerasa (1 sola vez)

50

- 15 segundos/95°C, para la desnaturalización del ADN, y 1 min/60°C, para las fases de anillamiento y extensión (ambas 40 ciclos).

Al introducir los datos en el termociclador se indicará la concentración en ufc/ml de cada estándar, de tal modo que al acabar la amplificación se obtendrá una relación directa de estas unidades frente a los valores de Ct del equipo.

55

Las muestras para las curvas patrón se realizaron por triplicado y las muestras de comida por duplicado. Se incluyeron controles negativos en todos los tests y se realizaron añadiendo todos los elementos a excepción de la muestra de ADN.

60

Ensayos cuantitativos

Para la cuantificación, se elaboraron unas curvas patrón usando en un primer paso diluciones seriadas a partir de cultivos saturados de las cepas *E. coli* BM13 (C600 Rif^R/RP4 (*tetA*) y *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) en el medio "*Brain Heart Infusion*" (Difco), cubriendo un rango de 1 a 10⁵ ufc/mL determinados por medio de diferentes conteos en placas de Agar Court (PCA, del inglés "*Plate Court Agar*").

65

ES 2 370 850 B2

En un segundo paso, se realizan diluciones seriadas de los mismos cultivos saturados mezclados con diferentes tipos de comida en cada caso, cubriendo un rango de 10^1 a 10^6 ufc/g. Se extrajo el ADN de 200 μ L de cada dilución usando el kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

5

Preparación de las muestras para la preparación de ensayos de sensibilidad

Distintas muestras de carne (pollo y pavo) y pescado (merluza) fueron inoculadas para realizar los ensayos de cuantificación en alimentos. Para la inoculación, 35 g de cada muestra fueron cortados asépticamente y añadidos a 10 315 ml de tampón de agua de peptona (Merck) en una bolsa estéril con un filtro lateral. Posteriormente, las muestras fueron homogeneizadas durante 2 minutos con un homogeneizador (AES laboratoire, Mix 2). Se rellenaron 9 tubos para cada gen de resistencia a tetraciclina con 9 ml del homogeneizado por la parte del filtro de la bolsa. De los tubos, uno fue inoculado con 1 ml de cultivo saturado de *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4, para la cuantificación del gen *tetA* y otro tubo con *E. coli* NCTC 50365, para *tetB*. El resto de tubos fue inoculado con diluciones seriadas de orden 10, cubriendo un rango de 1 a 10^5 ufc/mL (que corresponde a una concentración final de 10 a 10^6 ufc/g). Como control negativo se analizaron dos alícuotas no inoculadas.

15

II. Resultados

20

Especificidad del ensayo

Se realizaron ensayos independientes para los genes *tetA* y *tetB*, por separado, usando diferentes cepas con y sin dicho gen de resistencia a tetraciclina. No se detectó la amplificación cuando se utilizaba ADN de bacterias sin el gen correspondiente. Solamente se amplificó el ADN de las bacterias que presentaban el gen correspondiente.

25

Sensibilidad y cuantificación del rango

El rango de cuantificación se determinó usando cultivos puros y diferentes tipos de comida como pescado y carne. Para los cultivos puros, la sensibilidad del método se determinó usando ADN insertado en plásmidos. Así, se utilizaron como muestra de DNA 200 μ L de cultivos saturados de *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) y *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) de diluciones decimales a partir de una dilución con una concentración de 10^9 ufc/mL en ambos casos.

30

La curva patrón de la Figura 5, muestra una relación lineal entre las ufc (log ufc input) y el Ct (del inglés “*threshold cycle*”). Para el gen *tetA*, la pendiente de la curva fue de -3,33 y el R^2 (del inglés “*lineal regression coefficient*” o coeficiente de regresión lineal) fue de 0,9853. El límite de detección fue de 5 ufc/mL teóricamente (Ct 35,37), con una desviación estándar (SD) de 0,34, puesto que el volumen inicial de la extracción de ADN fue de 200 μ L. Resultados similares se obtuvieron para el gen *tetB*, en donde la pendiente de la curva fue de -2,74 y el R^2 de 0,9932, calculándose así un límite de detección teórico de 50 ufc/ml (Ct 37,21, SD 0,04).

35

El límite mínimo de detección también fue examinado en muestras de carne y pescado, usando carne de pavo como estándar. Ambas muestras fueron inoculadas con *E. coli* con los genes *tetA* y *tetB*, tal y como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos. En todos los casos se observa una relación lineal entre el “log ufc input” y el Ct. La carne inoculada con *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) (Figura 6) presentaba una pendiente de la curva de -3,2067 y un coeficiente R^2 de 0,9925, por lo que el límite de detección es de 5×10^2 ufc/g (Ct 34,52, SD 0,2). La carne de pavo inoculada con *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) (Figura 6) mostraba una pendiente de -3,27 y un coeficiente R^2 de 0,9893, siendo así el límite de detección también de 5×10^2 ufc/g (Ct 38,18, SD 0,9). Estos valores se aproximan al valor óptimo de -3,32 (Higuchi, R., *et al.* 1993. Bio-Technology. 11:1026-1030).

40

45

Por otro lado, el pescado inoculado con los mismos microorganismos mostró resultados similares, resultando para *tetA* una pendiente de -2,98, un R^2 de 0,9887 y un límite de 5×10^2 ufc/g (Ct 35,00, SD 0,9), siendo estos valores similares a los recomendados por Higuchi *et al.*, (1993) citado *supra*. Para *tetB* en el pescado, la pendiente fue de -2,53 (Ct 34,88, SD 0,8), y el coeficiente R^2 fue de 0,9954 (Figura 7).

50

Detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en comida

Se analizaron 30 muestras para la detección de genes *tetA* y *tetB*: 10 muestras de carne de pavo, 10 de carne de pollo (Figura 8) y 10 muestras de merluza (Figura 9). Estas muestras sirvieron de muestra para la determinación y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina aisladas directamente de alimentos. Estos alimentos, procedentes de supermercados, se seleccionaron por ser una representación de productos de origen animal que son consumidos de manera habitual en nuestra sociedad y que frecuentemente están contaminados con bacterias entéricas, siendo en estas bacterias donde aparecen los genes seleccionados (Chopra, I. *et al.* 2001. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65:232-260). La presencia de ambos genes *tetA* y *tetB* y la cuantificación de ufc se realizó tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

55

60

65

Como se puede ver en las Figuras 8 y 9 la cuantificación de la contaminación en muestras de comida con bacterias resistentes a tetraciclinas (en ufc/g) medida con la tecnología de la invención, se correlaciona perfectamente con la cuantificación usando técnicas de microbiología tradicionales.

ES 2 370 850 B2

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra que comprende
- (i) realizar una reacción de amplificación a partir de una preparación de ácidos nucleicos derivada de dicha muestra empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
- (ii) detectar el producto de amplificación generado en la etapa (i).
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa (iii) para cuantificar dichas bacterias resistentes a tetraciclina.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas de humanos.
5. Método según la reivindicación 4, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*.
6. Método según la reivindicación 5, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo formado por *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin* y *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, que comprende, además, las siguientes etapas:
- a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,
- b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, y
- c) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenido en la etapa (iii) del método de cuantificación definido en la reivindicación 2 con la curva patrón obtenida en la etapa b).
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicha pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la detección del producto de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de una sonda marcada.
12. Método según la reivindicación 11, en el que dicha sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*.
13. Método según la reivindicación 12, en el que dicha sonda comprende en su extremo 3' un MGB (*minor groove binder*).

ES 2 370 850 B2

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que dicha sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende además realizar una segunda reacción de amplificación empleando una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.
16. Método según la reivindicación 15, que comprende además una etapa (iii) para cuantificar dichas bacterias resistentes a tetraciclina.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, en el que las bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas de humanos.
19. Método según la reivindicación 18, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*.
20. Método según la reivindicación 19, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo formado por *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Brandenburg*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Cholerasuis*, *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Dublin* y *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Kentucky*.
21. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que la reacción de amplificación se lleva a cabo en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y/o en presencia de un ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores que los usados para amplificar una región de los genes *tetB* capaces de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.
22. Método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, que comprende, además, las siguientes etapas:
- a) efectuar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonias de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetA*,
 - b) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa a) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1,
 - c) realizar diluciones seriadas de unidades formadoras de colonia de un microorganismo control que posee un plásmido que codifica para el gen de resistencia a tetraciclina *tetB*,
 - d) realizar una curva patrón de las diluciones obtenidas en la etapa c) empleando una pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, y
 - e) determinar las unidades formadoras de colonias relacionando el resultado de la cuantificación obtenida en la etapa (iii) del método de cuantificación definido en la reivindicación 16 con las curvas patrón obtenidas en las etapas b) y d).
23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, en el que la primera pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.
24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 23, en el que dicha reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

ES 2 370 850 B2

25. Método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 24, en el que la detección de los productos de amplificación se lleva a cabo mediante el empleo de sondas marcadas.

5 26. Método según la reivindicación 25, en el que dichas sondas comprenden en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*.

27. Método según la reivindicación 26, en el que dichas sondas comprenden en su extremo 3' un MGB.

10 28. Método según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27, en el que dicha primera sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y la segunda sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

15 29. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en el que dicha preparación de ácidos nucleicos comprende ADN genómico y/o plasmídico y/o ADNc obtenido a partir del ARN.

30. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en el que dicha muestra es una muestra ambiental, una muestra alimentaria, una muestra biológica o una muestra clínica.

20 31. Un oligonucleótido seleccionado del grupo de oligonucleótidos cuya secuencia de nucleótidos se muestra en las secuencias SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y sus combinaciones.

32. Una pareja de oligonucleótidos seleccionada entre las parejas de oligonucleótidos formadas por:

25 a) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3; y

30 b) una pareja de oligonucleótidos constituida por un oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

33. Un kit que comprende una primera pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de una región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.

35 34. Kit según la reivindicación 33, que comprende, además, una segunda pareja de cebadores capaz de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

40 35. Kit según la reivindicación 34, en el que dicha primera pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 y la segunda pareja de cebadores está constituida por un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 6 y un cebador que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

45 36. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, que comprende, al menos, una primera sonda capaz de identificar el producto de amplificación, amplificado mediante una reacción de amplificación en presencia de dicha primera pareja de cebadores y, opcionalmente, una segunda sonda capaz de detectar el producto de amplificación, amplificado mediante una reacción de amplificación en presencia de dicha segunda pareja de cebadores.

50 37. Kit según la reivindicación 36, en el que dicha primera y/o segunda sonda comprende en su extremo 5' un pigmento reportero y en su extremo 3' un pigmento *quencher*.

55 38. Kit según la reivindicación 37, en el que dicha sonda comprende en su extremo 3' un MGB.

39. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 36 a 38, en el que dicha primera sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y dicha segunda sonda comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 8.

60 40. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 38, que comprende, además, un primer ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetA* comprendida entre el nucleótido 592 y el nucleótido 884 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 y un segundo ADN exógeno cuyos extremos contienen secuencias que pueden ser amplificadas usando los mismos cebadores capaces de amplificar la totalidad o una parte de la región del gen *tetB* comprendida entre el nucleótido 75 y el nucleótido 400 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 5.

ES 2 370 850 B2

41. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 40 para la detección y/o cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclina en una muestra.

5 42. Uso según la reivindicación 41, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan de los géneros *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Laribacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*.

43. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 ó 42, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias patógenas de humanos.

10

44. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina se seleccionan del grupo de bacterias formado por *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas salmonicida*, *Edwardsiella tarda*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Laribacter hongkongensis*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella enterica*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Vibrio* sp. y *Yersinia ruckeri*.

15

45. Uso según la reivindicación 44, en el que dichas bacterias resistentes a tetraciclina son bacterias de la especie *Salmonella enterica* seleccionadas del grupo formado por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Brandenburg*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Cholerasuis*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Dublin* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Kentucky*.

20

46. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45, en el que dicha muestra es una muestra ambiental, una muestra alimentaria, una muestra biológica o una muestra clínica.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 370 850 B2

Figura 1

>AJ313332
GTGAAACCCAACAGACCCCTGATCGTAATTCTGAGCACTGTCGCGCTCGAC
GCTGTCGGCATCGGCCTGATTATGCCGGTGCTGCCGGCCTCCTGCGCGATCTG
GTTCACTCGAACGACGTCACCGCCACTATGGCATTCTGCTGGCGCTGTATGCG
TTGATGCAATTTGCCTGCGCACCTGTGCTGGGCGCGCTGTCGGATCGTTTCGGGG
GGCGGCCGGTCTTGCTCGTCTCGCTGGCCGGCGCTGCTGTCGACTACGCCATCA
TGGCGACGGCGCCTTTCCTTTGGGTTCTCTATATCGGGCGGATCGTGGCCGGCAT
CACCGGGGCGACTGGGGCGGTAGCCGGCGCTTATATTGCCGATATCACTGATGG
CGATGAGCGCGCGCGGCACTTCGGCTTCATGAGCGCCTGTTTCGGGTTTCGGGAT
GGTCGCGGGACCTGTGCTCGGTGGGCTGATGGGCGGTTTCTCCCCCACGGTCC
GTTCTTCGCCGCGGCAGCCTTGAACGGCCTCAATTCCTGACGGGCTGTTTCCTT
TTGCCGGAGTCGCACAAAGGCGAACGCCGGCCGTTACGCCGGGAGGCTCTCAAA
CCCCTCGCTTCGTTCCGGTGGGCCCCGGGGCATGACCGTCGTCGCCGCCCTGAT
GGCGGTCTTCTTCATCATGCAACTTGTCCGACAGGTGCCGGCCCGCTTTGGGT
CATTTTCGGCGAGGATCGCTTTCCTGAGCGGACCGGACCGGATCGGCATTTTCGCTT
GCCGATTTGGCATTCTGCATTCCTCGCCAGGCAATGATCACCGGCCCTGTA
GCCGCCCGGCTCGGCGAAAGGCGGGCACTCATGCTCGGAATGATTGCCGACGG
CACAGGCTACATCCTGCTTGCTTCGCGACACGGGGATGGATGGCGTTCCCGAT
CATGGTCCTGCTTGCTTCGGGTGGCATCGGAATGCCGGCGCTGCAAGCAATTTT
GTCCAGGCAAGGTGGATGAGGAACGTCAGGGGCAGCTGCAAGGCTCACTGGCGG
CGCTCACCAGCCTGACCTCGATCGTCGGACCCCTCCTCTTCACGGCGATCTATGC
GGCTTCTATAACAACGTGGAACGGGTGGGCATGGATTGCAGGCGCTGCCCTCTA
CTTGCTCTGCCTGCCGGCGCTGCGTCGCGGGCTTTGGAGCGGCGCAGGGCAACG
AGCCGATCGCTGA

ES 2 370 850 B2

Figura 2

>E. coli NCTC 50365

TAACCACTTTGGCGTATTGCTTGCACTTTATGCGTAAATGCAGGTTATCTTTG
CTCCTTGGCTTGGAAAAATGTCTGACCGATTTGGTCGGCGCCCAGTGCCTGTTGTT
GTCATTAATAGGCCGCAICGC TGGATTACTTATIGCTGGCTTTTTCAAGTGGCT
TGGATGCTGTATTTAGGCCGTTTGCTTTCAGGGATCACAGGAGCTACTGGGGC
TGTCGCGGCATCGGTCATTGCCGATACCACCTCAGCTTCTCAACGCGTGAAGTG
GTTTCGGTTGGTTAGGGGCAAGTTTTGGGCTTGGTTTAATAGCGGGGCCTATTATT
GGTGGTTTTGCAGGAGAGATTTACCCGCATAGTCCCTTTTTTATCGCTGCGTTGC
TAAATATTGTCACCTTTCCTTGTGGTTATGTTTTGGTCCGTGAAACCAAAAATAC
ACGTGATAATACAGATACCGAAGTAGGGGTTGAGACGCAATCGAATTCGGTAT
ACATCACTTTATTTAAAACGATGCCATTTTGTGATTATTTATTTTTCAGCGCA
ATTGATAGGCCAAATTCGCGAACGGTGTGGGTGCTATTTACCGAAAATCGTTT
TGGATGGAATAGCATGATGGTTGGCTTTTCATTAGCGGGTCTTGGTCTTTTACAC
TCAGTATTCCAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAATAGCCACtAAATGGGGCGAAAAA
ACGGCAGTAcTGCTCGGATTTATTGCAGATAGTAGTGCATTTGCCTTTTTAGCGT
TTATATCTGAAGGTTGGTTAGTTTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGGTGGTGGG
ATCKCTTACCTGCATTACAGGGAGTGATGTCTATCCAAACAAAGAGTCATCAG
CAAGGTGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGCCTTACCAATGCAACCGGTGTTATT
GGCCATTACTGTTTGCTGTTATTTATAATCATTCACTACCCTTTGGGATGGCT
GGATTGATTA

ES 2 370 850 B2

Figura 3 (cont.)

A760f912zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AM261760	TCOCHOCBACAGBCTFACA
DQ645594	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AB266441zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
IZ5474zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AJ604672zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
EP693507	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AF542061	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AJ527730.2	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AJ7413171	TCOCHOCBACAGBCTFACA
SocdaA	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AM745674	TCOCHOCBACAGBCTFACA
X61267	TCOCHOCBACAGBCTFACA
A32:41.64.2zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
DQ465880	TCOCHOCBACAGBCTFACA
A748f016zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AM221424	TCOCHOCBACAGBCTFACA
EP575779zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AJ623253	TCOCHOCBACAGBCTFACA
A7505074zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
CP103971	TCOCHOCBACAGBCTFACA
CU485141zc	TCOCHOCBACAGBCTFACA
CR275602	TCOCHOCBACAGBCTFACA
EH664602	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AJ7213282	TCOCHOCBACAGBCTFACA
TeBa	TCOCHOCBACAGBCTFACA
Forwazda	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AM521182	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AM502948	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AM491970	TCOCHOCBACAGBCTFACA
AJ707724	TCOCHOCBACAGBCTFACA



Figura 4

2B0B3854	*****
2B0B3850	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B0B3852	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B0B3857	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
Y00611.1	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B0B3858	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
Z=ampson	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2F223162	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
265-7CTC-122-E	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
DQ083070	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2M41226	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2L5120322c	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2M746675.2c	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B0B3859	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2F46764c	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2F22677.3	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B0B3855	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B0B3850	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
CP000602.1rc	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2F467255.1	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2J277852	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2B065440	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2ME62322c	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2F283878	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
DQ245159	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
2F228376.1	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA
CP001122.1rc	CTGACCBA TTGGTGGCCGCGCCGCGCTTTTTCATTAATGAGCCGCA TCGCTGGAA TTACTTA TCGCTGGCTTTTCMAJTGCGTATTTAGCCCGTTTTGCTTTCAGGCAAGGATCAACAGCA

ES 2 370 850 B2

Figura 5

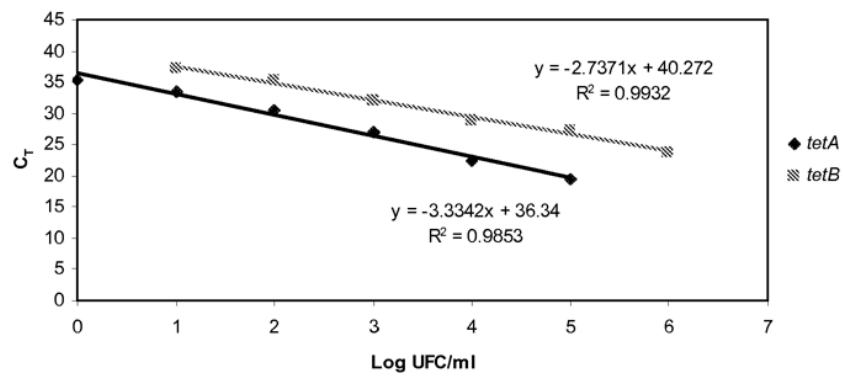
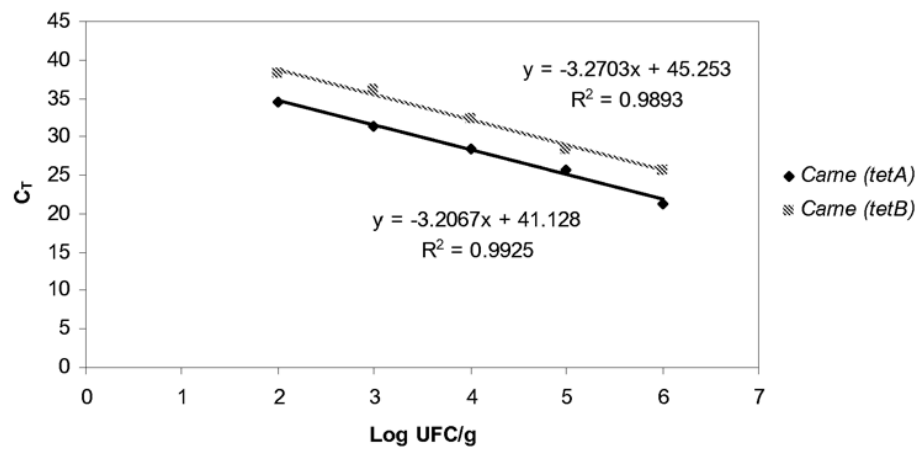


Figura 6



ES 2 370 850 B2

Figura 7

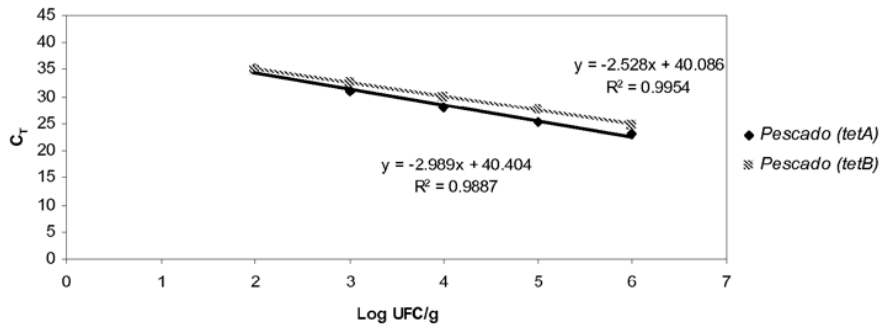


Figura 8

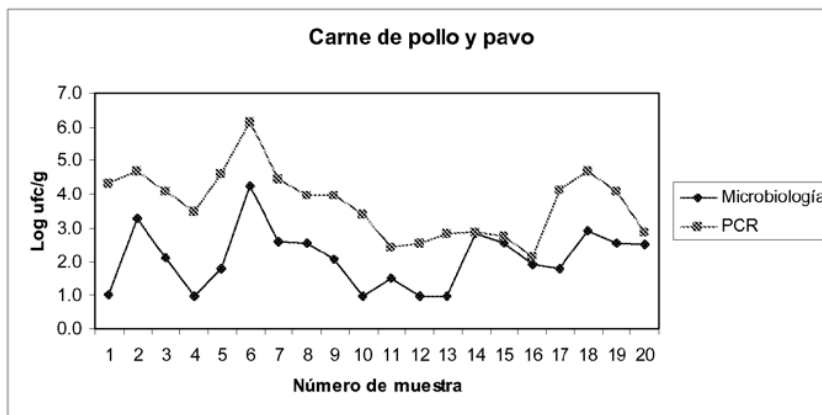
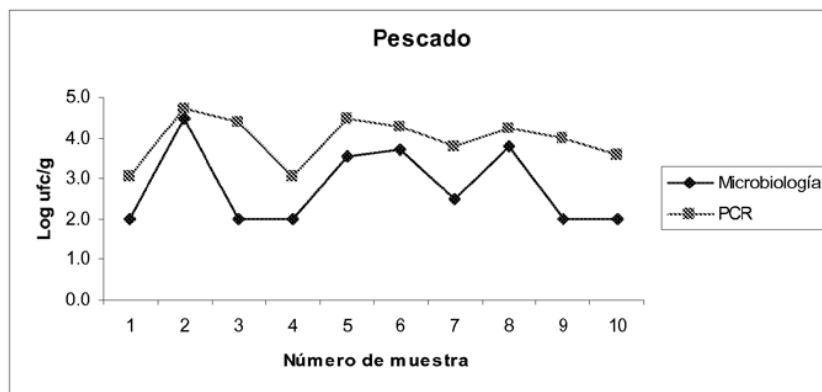


Figura 9



ES 2 370 850 B2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5 <120> MÉTODOS Y REACTIVOS PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A TETRACICLINAS

<130> P486ES00

10 <160> 8

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1

<211> 1200

<212> DNA

20 <213> *Escherichia coli*

<400> 1

25 gtgaaaccca acagaccct gatcgtaatt ctgagcactg tcgcgctcga cgctgtcggc 60

atcggcctga ttatgccggt gctgccgggc ctctgcgcg atctggttca ctggaacgac 120

30 gtcaccgccc actatggcat tctgctggcg ctgtatgctg tgatgcaatt tgctgcgca 180

cctgtgctgg gcgcgctgtc ggatcgtttc gggcgggcgc cggctctgct cgtctcgtg 240

35 gccggcgctg ctgtcgacta cgccatcatg gcgacggcgc ctttcctttg ggttctctat 300

atcggggcga tcgtggccgg catcaccggg gcgactgggg cggtagccgg cgcttatatt 360

40 gccgatatca ctgatggcga tgagcgcgcg cggcacttcg gcttcatgag cgctgtttc 420

gggttcggga tggtcgcggg acctgtgctc ggtgggctga tgggcggttt ctccccccac 480

45 ggtccgttct tcgccgcggc agccttgaac ggcctcaatt tctgacggg ctgtttcctt 540

ttgccggagt cgcacaaagg cgaacgccgg ccgttacgcc gggaggctct caaccgctc 600

50 gcttcggttc ggtgggcccg gggcatgacc gtcgtcgccg ccctgatggc ggtcttcttc 660

atcatgcaac ttgtcggaca ggtgccggcc gcgctttggg tcattttcgg cgaggatcgc 720

55 tttactggg acgcgaccac gatcggcatt tcgcttgccg catttgcat tctgattca 780

ctcggccagg caatgatcac cggccctgta gccgcccggc tcggcgaaag gcgggcactc 840

60 atgctcggaa tgattgccga cggcacaggc tacatcctgc ttgccttcgc gacacgggga 900

tggatggcgt tcccgatcat ggtcctgctt gcttcgggtg gcatcggaat gccggcgctg 960

65

ES 2 370 850 B2

	caagcaattt tgtccaggca ggtggatgag gaacgtcagg ggcagctgca aggetcactg	1020
	gcggcgctca ccagcctgac ctcgatcgtc ggaccctcc tcttcacgc gatctatgcg	1080
5	gcttctataa caacgtggaa cgggtgggca tggattgcag gcgctgccct ctacttgctc	1140
	tgcttgcgg cgctgcgtcg cgggctttgg agcggcgagc ggcaacgagc cgatcgctga	1200
10		
	<210> 2	
	<211> 17	
15	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
20	<223> cebador <i>tetA</i> directo	
	<400> 2	
25	ccgcgctttg ggtcatt	17
	<210> 3	
30	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
35	<220>	
	<223> cebador <i>tetA</i> reverso	
	<400> 3	
40	tggtcgcgctc ccagtga	17
45	<210> 4	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
50	<220>	
	<223> Sonda Taqman MGB <i>tetA</i>	
55	<400> 4	
	tcggcgagga tcg	13
60	<210> 5	
	<211> 990	
	<212> DNA	
65	<213> <i>Escherichia coli</i>	

ES 2 370 850 B2

<400> 5

5	taaccacttt ggcgtattgc ttgcaactta tgcgttaatg caggttatct ttgctccttg	60
	gcttggaaaa atgtctgacc gatttggtcg gcgccagtg ctgttggtgt cattaatagg	120
10	cgcatcgctg gattacttat tgctggcttt ttcaagtgcg ctttggatgc tgtatttagg	180
	ccgtttgctt tcagggatca caggagctac tggggctgtc gcggcatcgg tcattgccga	240
15	taccacctca gcttctcaac gcgtgaagtg gttcggttgg ttaggggcaa gttttgggct	300
	tggtttaata gcggggccta ttattggtgg ttttgcagga gagatttcac cgcatagtcc	360
20	cttttttacc gctgctgtgc taaatattgt cactttcctt gtggttatgt tttggttccg	420
	tgaaaccaaa aatacacgtg ataatacaga taccgaagta ggggttgaga cgcaatcgaa	480
25	ttcgggtatac atcaactttat ttaaaacgat gcccaatttg ttgattattt atttttcagc	540
	gcaattgata ggccaaattc ccgcaacggt gtgggtgcta tttaccgaaa atcgttttgg	600
30	atggaatagc atgatgggtg gcttttcatt agcgggtcct ggtcttttac actcagtatt	660
	ccaagccttt gtggcaggaa gaatagccac taaatggggc gaaaaaacgg cagtactgct	720
35	cggatttatt gcagatagta gtgcatttgc ctttttagcg tttatatctg aaggttggtt	780
	agttttccct gttttaattt tattggctgg tgggtggatc kctttacctg cattacaggg	840
40	agtgatgtct atccaacaa agagtcacat gcaagggtgct ttacagggat tattggtgag	900
	ccttaccaat gcaaccggtg ttattggccc attactgttt gctgttattt ataatcattc	960
45	actaccactt tgggatggct ggattgatta	990

<210> 6

<211> 17

50 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

55 <223> Cebador directo *tetB*

<400> 6

60	aggcgcacgc ctggatt	17
----	--------------------	----

<210> 7

65 <211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 370 850 B2

<220>
<223> Cebador *tetB* reverso

5 <400> 7
cagcatccaa agcgcaactt 19

10 <210> 8
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda Taqman MGB *tetB*

20 <400> 8
cttattgctg gcttttt 17

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- 21 N.º solicitud: 201030856
22 Fecha de presentación de la solicitud: 02.06.2010
32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

5 Int. Cl. : C12Q1/68 (2006.01) C12N1/20 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YU Z et al. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of Genes Encoding Tetracycline Resistance. Applied and Environmental Microbiology. Noviembre 2005. Vol. 71 (11), páginas: 6926-6933, todo el documento.	1-46
A	AMINOV RI et al. Molecular Ecology of Tetracycline Resistance: Development and Validation of Primers for Detection of Tetracycline Resistance Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins. Applied and Environmental Microbiology. Enero 2001. Vol. 67 (1), páginas: 22-32, todo el documento.	1-46
A	AMINOV RI et al. Development, Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria Applied and Environmental Microbiology. Abril 2002. Vol. 68 (4), páginas: 1786-1793, todo el documento.	1-46
A	NAWAZ M. Isolation and characterization of tetracycline-resistant Citrobacter spp. from catfish. Food Microbiology. 2008. Vol. 25, páginas: 85-91, todo el documento.	1-46
<p>Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica</p> <p>O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud</p>		
<p>El presente informe ha sido realizado <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones n.º:</p>		
Fecha de realización del informe 17.10.2011	Examinador M. D. García Grávalos	Página 1/5

INFORME DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

Nº de solicitud: 201030856

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR, EBI.

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201030856

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.10.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-46	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-46	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201030856

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	YU Z et al. Applied and Environmental Microbiology. Noviembre 2005. Vol. 71 (11), páginas: 6926-6933.	2005
D02	AMINOV RI et al. Applied and Environmental Microbiology. Enero 2001. Vol. 67 (1), páginas: 22-32.	2001
D03	AMINOV RI et al. Applied and Environmental Microbiology. Abril 2002. Vol. 68 (4), páginas: 1786-1793.	2002
D04	NAWAZ M. Food Microbiology. 2008. Vol. 25, páginas: 85-91.	2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, para detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas, en muestras alimentarias, biológicas, clínicas, etc., empleando cebadores específicos para la región del gen *tetA* comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia definida como SEQ ID NO:1 (reivindicaciones 1-35). La invención también se refiere a un kit para la puesta en marcha de dichos métodos (reivindicaciones 36-46).

El documento D01 divulga el desarrollo, validación y uso de un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, empleando cebadores adecuados, para detección y cuantificación de varios grupos de genes (*tef*), de resistencia a tetraciclinas, en bacterias procedentes de muestras de estiércol de ganado bovino y/o porcino (ver todo el documento).

El documento D02 se refiere al desarrollo, validación y uso de cebadores para detección de genes resistentes a tetraciclinas que codifican proteínas de protección ribosomal (RPPs). Basándose en el origen monofilético de estos genes, se diseñan un conjunto de cebadores capaces de reconocer fragmentos comunes en diversas especies bacterianas de distinta procedencia. Estos cebadores son empleados para detectar genes de resistencia a tetraciclinas, que codifican proteínas RPPs, en ADN aislado de bacterias procedentes de muestras de estiércol de ganado bovino y/o porcino (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere al desarrollo, validación y uso de cebadores para detección de genes relacionados con las bombas de eflujo de tetraciclina en bacterias Gram-negativas. Basándose en el origen monofilético de estos genes, que comparten 12 segmentos transmembrana, es posible diseñar un conjunto de cebadores adecuados para la detección de de un amplio rango de genes, relacionados con las bombas de eflujo en bacterias Gram-negativas, para detectar resistencia a tetraciclinas en ADN aislado de muestras de heces porcinas procedentes de aguas residuales y subterráneas profundas (ver todo el documento).

El documento D04 se refiere al aislamiento y caracterización de especies del género *Citrobacter*, resistentes a tetraciclinas en siluro (*Ictalurus punctatus*). Una vez aislados los microorganismos, se caracteriza la resistencia a tetraciclinas, detectando la presencia de los genes de resistencia (*tetA*, *tetB* y *tetC*) mediante ensayos de PCR, empleando cebadores específicos para estos genes (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente solicitud divulga un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, para detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas, en muestras alimentarias, biológicas, clínicas, etc., empleando cebadores específicos para la región del gen *tetA* comprendida entre los nucleótidos 592 y 884 de la secuencia definida como SEQ ID NO:1. La invención también se refiere a un kit para la puesta en marcha de dichos métodos.

1.1. Reivindicaciones 1-46.

El documento D01 se considera el más cercano en el estado de la técnica al objeto de la presente invención, ya que anticipa el desarrollo, validación y uso de un método *in vitro*, basado en técnicas de PCR a tiempo real, para detección y cuantificación de varios grupos de genes de resistencia a tetraciclinas (*tef*), entre ellos el gen *tetA*, empleando cebadores específicos, en ADN bacterias procedentes de muestras de estiércol de ganado bovino y/o porcino.

OPINIÓN ESCRITA

Nº de solicitud: 201030856

La diferencia fundamental entre el objeto técnico de las reivindicaciones de la presente solicitud y el documento D01 consiste en las parejas de cebadores y sondas empleadas, que además de no coincidir con las empleadas en el documento D01, son capaces de detectar, con un único ensayo, un fragmento del gen *tetA* muy conservado entre especies, por lo que se considera que el objeto de las reivindicaciones de la presente solicitud no se encuentra en el estado de la técnica y tampoco derivaría del mismo de forma evidente para un experto en la materia.

En conclusión, las reivindicaciones 1-46 cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva ((Art. 6.1 y 8.1) LP 11/1986).

Aunque los documentos D02-D04 también se refieren al desarrollo, validación y uso de cebadores específicos para detección de genes resistentes a tetraciclinas, tampoco coinciden con los desarrollados en la presente invención y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud.



5.1.2 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la detección cuantitativa de los genes de resistencia bacteriana a tetraciclina *tet(A)* y *tet(B)* en alimentos

Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tet(A)* and *tet(B)* bacterial tetracycline resistance genes in food

Mónica Guarddon, José Manuel Miranda, José Antonio Rodríguez, Beatriz Isabel Vázquez, Alberto Cepeda, Carlos Manuel Franco

Publicado en: *International Journal of Food Microbiology* (2011). Volumen 146, páginas 284-289.







Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Food Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Short Communication

Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in foodM. Guarddon^a, J.M. Miranda^a, J.A. Rodríguez^b, B.I. Vázquez^a, A. Cepeda^a, C.M. Franco^{a,*}^a Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo, Spain^b Área Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Carretera Pachuca-Tulancingo, Kilómetro 4.5, Ciudad Universitaria, 42074, Pachuca de Soto, Hidalgo, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2010

Received in revised form 21 January 2011

Accepted 21 February 2011

Keywords:

Tetracycline resistance

Food

PCR

*tetA**tetB*

ABSTRACT

A new, rapid, sensitive and specific method was developed to directly detect and quantify *tetA* and *tetB* in food. Both *tet* genes are two of the most frequently present tetracycline resistance genes in Gram-negative bacteria. A set of primers and Taqman probes was designed for each gene. The standard curves were performed using *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif^R/RP4) and *E. coli* NCTC 50365, which carry *tetA* and *tetB*, respectively. Meat and fish samples inoculated with these reference strains were used as a matrix to construct the standard curves for the analysis of 20 samples of chicken meat and 10 samples of hake (*Merluccius merluccius*). The limits of detection in pure culture were 5 cfu/mL (0.7 log cfu/mL) in the case of *tetA*, 50 cfu/mL (1.7 log cfu/mL) for *tetB* and 5×10^2 cfu/g (2.7 log cfu/g) for both genes in food samples. The results obtained by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) were compared to counts of tetracycline-resistant bacteria obtained by plating extracts of poultry and hake samples in culture media supplemented with 16 mg/L of tetracycline. Counts of tetracycline-resistant bacteria obtained by qPCR showed a positive correlation, especially interesting when compared with microbiological counts of tetracycline-resistant *Enterobacteriaceae* in poultry meat ($r = 0.5509$) and with tetracycline-resistant mesophilic aerobic bacteria in hake samples ($r = 0.7146$). The obtained results demonstrate that this method could be a useful tool for the direct quantification of the amount of bacterial strains that carry *tetA* and/or *tetB* genes in food samples.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The emergence of antimicrobial-resistant bacterial pathogens after several decades of antimicrobial use is becoming a major concern (Martinez et al., 2009). During animal production, large amounts of antimicrobials are used for disease control. As a consequence, favorable conditions have been created for the emergence and dissemination of antimicrobial-resistant bacteria (Aarestrup, 2005; Miranda et al., 2007, 2008). Accordingly, many studies have reported on the risks posed by antibiotic-resistant bacteria on human health, which is a result of the untreatable diseases caused by some bacterial pathogens (Levy, 1998; Levy and Marshall, 2004; White, 2006).

The use of antimicrobials as growth promoters has been prohibited in the European Union (EU) (Regulation (EC) 1831/2003). However, in many countries, their use is still allowed. Moreover, antimicrobials are also employed for animal therapy or prophylaxis (Aarestrup, 2005; Guardabassi and Courvalin, 2006).

Tetracyclines are broad-spectrum agents that show activity against a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria, and their favorable antimicrobial properties have extended their use in the therapy of animal infections. In fact, the widespread use of tetracyclines in clinical practice has been responsible for the selection of resistant organisms to this antimicrobial family (Chopra and Roberts, 2001).

Antimicrobial-resistance genes are transmissible between different bacteria and from bacteria carried by food-producing animals to human bacteria (Aarestrup, 2005). This ability depends on the presence and transfer of resistance genes among bacteria, mutations and selection pressure to keep antimicrobial-resistance genes in a bacterial population (Bryan et al., 2004). Thus, tetracycline resistance (*tet*) genes, which are often associated with mobile elements, have been spread among bacterial species. Currently, over 40 *tet* genes have been identified (Roberts, 2005). These antibiotic resistance genes can be studied by real-time polymerase chain reaction (qPCR), which is a rapid, effective and handy tool, compared to conventional methods that are used in microbiological research (Martinez et al., 2007).

Quantitative PCR represents an innovative and specific technique (Klein, 2002; Rodríguez-Lazaro et al., 2004) that is widely used in food microbiology (Pennacchia et al., 2009). However, most of the studies regarding tetracycline resistance in microorganisms have employed clinical samples or bacteria isolated from different matrices that can

* Corresponding author at: Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Facultad de Veterinaria pabellón 4 p.b., Campus Universitario 27002-Lugo, Spain. Tel.: +34 982285900x22454; fax: +34 982254592.

E-mail address: carlos.franco@usc.es (C.M. Franco).

grow in the presence of tetracycline (Bryan et al., 2004). Nonetheless, as far as we know, the quantification of *tet* genes has not been performed directly from food samples. Thus, the aim of this work was to develop a real-time assay using Taqman probes for the detection and quantification in different foodstuffs of two of the most frequently found tetracycline resistance genes in Gram-negative bacteria, *tetA* and *tetB* (Chopra and Roberts, 2001). Consequently, this assay may contribute to the assessment of the distribution of resistance genes in the environment and to the relationship between the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and the spread of antimicrobial resistance (Bryan et al., 2004).

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and culture conditions

Two standard curves were generated using two reference strains, *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif^r/RP4) and *E. coli* NCTC 50365, which carry the *tetA* and *tetB* genes, respectively. The first strain was supplied by the culture collection of the Institute Pasteur (Paris, France), while the second was obtained from the National Culture Type Collection (NCTC) (Health Protection Agency, Salisbury, UK). Both strains were grown at 41 °C in Violet Red Bile Glucose agar (VRBG) (Merck, Darmstadt, Germany). After 24 h of incubation, Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, Detroit, MI, USA) tubes were inoculated with these isolated strains and subsequently incubated at 31 °C to obtain a concentration of 10⁹ cfu/mL, which was determined by plating count in Plate Count Agar (PCA) (Merck, Darmstadt, Germany).

2.2. DNA isolation

DNA was isolated using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions for the isolation of nucleic acids from bacteria or yeast. After isolation, the DNA was stored at –20 °C.

2.3. DNA sequencing and primer design

The *tetA* and *tetB* genes were chosen as targets for the detection and quantification because they represent the two of the most important tetracycline resistance genes in Gram-negative bacteria (Fan et al., 2007), especially in *E. coli* (Bryan et al., 2004; Lanz et al., 2003).

The pTJO2 *E. coli* plasmid sequence (GeneBank accession number: AJ313332.1) was compared to other sequences in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database by using the Blast program for the *tetA* gene. The *E. coli* NCTC 50365 sequence served as a template for the *tetB* gene.

Alignments were performed using the Clustal X (1.81) (Thompson et al., 1994) algorithm from the following GenBank accession numbers for *tetA*: CP000971, AB366441, AM746674, EF679779, EF633507, AY214164.3, AY333434, DQ464880, AY458016, AF542061, X61367, AJ634602, AJ628353, AY509004, EU664602, AJ419171, AY608912, AF534183, AF502943, AF497970, AJ307714, L29404, AJ517790.2, AM261760, CR376602, CU459141 and DQ645594. For *tetB*, the accession numbers were: AB089594, EF646764, AB089592, AB089587, AB089590, AB089593, AM886293, AM746675.2, AM412236, AF250878, AL513383, AB089588, AB089595, AF223162, AB089585, AF326777.3, AB366440, AJ277653, AY528506.1, V00611.1, CP001122.1, DQ835008, DQ316139 and EF467365.

After alignment, Primer Express 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was employed for the design of the primers pairs and Taqman probes.

2.4. Real-time qPCR conditions

Primers, probes and Environmental Master Mix 2.0 (containing ROX as a passive reference) were obtained from Applied Biosystems (Warrington, UK). Real-time PCR was performed using 25 µL of reaction volume, which included 7.5 µL of template DNA, 12.5 µL of Environmental Master Mix, 900 nM of each primer (forward and reverse) and 200 nM of the Taqman probe. Amplification, detection and quantification were performed using an ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, USA) Sequence Detection System under the following conditions: 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C for denaturation, and 1 min at 60 °C for annealing and extension. Samples for the standard curves and food samples were processed in triplicate and duplicate, respectively. Negative controls were included in all tests, and they consisted of all the elements of the reaction except for the template DNA.

2.5. Quantification assays

Meat and fish were chosen as representative animal-origin products, which are frequently consumed in developed countries. Additionally, these foods are often contaminated with Gram-negative bacteria, and *tetA* and *tetB* genes are found exclusively in these types of microorganisms (Chopra and Roberts, 2001). Therefore, both poultry meat and hake (*Merluccius merluccius*) served as a model for detecting and quantifying the tetracycline-resistant microbiota in real samples.

Standard curves were calculated for quantification purposes using: (a) 10-fold serial dilutions of a culture of 10⁹ cfu/mL of *E. coli* BM13 (C600 Rif^r/RP4) (*tetA*) and *E. coli* (NCTC 50365) (*tetB*) in Brain Heart Infusion (Difco), covering a range from 1 to 10⁵ cfu/mL in the case of *tetA* and a range from 10 to 10⁶ cfu/mL in the case of *tetB*; (b) 10-fold serial dilutions of a culture of 10⁹ cfu/mL of these strains mixed with poultry meat or hake, covering a range from 10¹ to 10⁶ cfu/g. An aliquot of 200 µL from each dilution was subjected to DNA isolation using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

2.6. Sample preparation for sensitivity assays

A total of 30 samples were analyzed for detection and quantification of the *tetA* and the *tetB* genes: 20 samples of poultry meat and 10 samples of hake. Samples were purchased from several supermarkets in Galicia (North-Western Spain) and were transported in refrigerated conditions to the laboratory in less than 2 h for further processing.

Samples were inoculated for quantification assays. Thus, 35 g of each sample was aseptically cut from the middle of each sample and added to 315 mL of buffered peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) in a sterile plastic bag with a lateral filter and were homogenized in a masticator MIX 2 (AES, Combourg, France) for 2 min. For each resistance gene, 9 assay tubes were each filled with 9 mL of the homogenates. Two of the tubes were inoculated, one with 1 mL of the culture with 10⁹ cfu/mL of *E. coli* BM13 (C600 Rif^r/RP4), for the quantification of the *tetA* gene, and the other with 1 mL of the same concentration of *E. coli* NCTC 50365, for the quantification of the *tetB* gene. Subsequently, 10-fold serial dilutions were made with the remaining tubes, covering a range from 1 to 10⁵ cfu/mL (corresponding to a final concentration from 10¹ to 10⁶ cfu/g). Two non-inoculated aliquots were also analyzed as negative controls.

Cycle threshold (C_T) was plotted against the log concentration of the template DNA, and the slope of the regression line was used for calculating the efficiency (E), where $E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$.

2.7. Sample preparation for qPCR and conventional microbiological assays

Aliquots of 35 g from each sample were cut and added to 315 mL of buffered peptone water (Merck) in a sterile bag with a lateral filter and homogenized in a masticator MIX 2 (AES) for 2 min. Aliquots of

Table 1
Tested strains for specificity assays.

Collection number or source	Strain	Feature	Results	
			<i>tetA</i>	<i>tetB</i>
Institute Pasteur ^a	<i>Escherichia coli</i> BM13(C600 RifR)/RP4	Positive control (<i>tetA</i>)	+	–
NCTC 50268 ^b	<i>Escherichia coli</i> K12 Jm83	Positive control (<i>tetA</i>)	+	–
NCTC 50365	<i>Escherichia coli</i> HB101/Prt11	Positive control (<i>tetB</i>)	–	+
Institute Pasteur	<i>Escherichia coli</i> BM13 K12 53	Positive control (<i>tetB</i>)	–	+
Institute Pasteur	<i>Escherichia coli</i> HB101/pBR322	Harbours the <i>tetC</i> gene	–	–
Institute Pasteur	<i>Enterococcus faecalis</i> BM4130/pIP804	Harbours the <i>tetM</i> gene	–	–
Institute Pasteur	<i>Escherichia coli</i> HB101/pAT121	Harbours the <i>tetO</i> gene	–	–
Institute Pasteur	<i>Escherichia coli</i> DH5 α /pNFD13-2	Harbours the <i>tetQ</i> gene	–	–
Institute Pasteur	<i>Escherichia coli</i> JM83/pAT451	Harbours the <i>tetS</i> gene	–	–
CECT 4292 ^c	<i>Ruegeria atlantica</i>	Sensitive to oxytetracycline	–	–
CECT 4293	<i>Ruegeria atlantica</i>	Sensitive to oxytetracycline	–	–
CECT 4354	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Sensitive to tetracycline	–	–
ATCC 35677 ^d	<i>Carnobacterium divergens</i>	Unknown feature	–	–
ATCC 35983	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Unknown feature	–	–

^a Paris, France.

^b National Collection of Type Cultures (London, UK).

^c Colección Española de Cultivos Tipo (Valencia, Spain).

^d American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA).

200 μ L of the homogenates were subjected to DNA isolation and stored at -20°C until the PCR reaction.

Microbial populations (cfu/g) of samples were determined by pour plating adequate dilutions from the homogenates. Food samples were pour plated for *Enterobacteriaceae* in VRBG and total aerobic mesophilic counts were determined by pour plating in PCA. Both media were previously added with 16 mg/L of tetracycline (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005). Subsequently, plates were incubated at 31°C for 24 or 72 h in the case of VRBG and PCA, respectively. After incubation, pink to red colonies in VRBG were considered as resistant *Enterobacteriaceae* and counted, while all bacterial colonies grown in PCA were considered as resistant aerobic mesophilic microorganisms, counted and converted to log cfu/g units for comparison with qPCR data.

3. Results

3.1. Primers and probe design

Both the *tetA* and *tetB* genes were selected in order to quantify and evaluate the presence of these important tetracycline resistance genes in Gram-negative bacteria. The selected primers and probes were the following for *tetA*: forward (5'-CCGCGCTTTGGGTCAIT-3'), reverse (5'-TGGTCGCGTCCCAGTGA-3') and MGB Taqman probe (6FAM-TCCGGCAGGATCG); and for *tetB*: forward (5'-AGGCGCATCGCTGGATT-3'), reverse (5'-CAGCATCCAAGCGCACTT-3') and MGB Taqman probe (6FAM-CTTATTGCTGGCTTTT). These primers and probes amplified 51-bp and 55-bp fragments inside *tetA* and *tetB*, respectively.

The specificity of the assays was tested using purified DNA from target and nontarget bacteria. No amplifications were observed when DNA from nontarget bacteria was used as a template (Table 1). However target bacteria were always positive to the PCR reaction depending on the specific gene harboured; *tetA* or *tetB*.

3.2. Sensitivity and quantification range

Pure culture standard curves showed a linear relationship between log input cfu/mL and C_T . For the *tetA* gene, the slope of the curve was -3.33 , and the square regression coefficient (R^2) was 0.9853 . Because the original volume used for the DNA extraction was 200 μ L, the limit of detection (LOD) was 5 cfu/mL (C_T 35.37 and standard deviation (SD) 0.34). Similar results were obtained by *tetB* where the slope of the curve was -2.74 , the R^2 was 0.9932 , and the LOD was 50 cfu/mL (C_T 37.21, SD 0.04) (Fig. 1).

The LOD was also tested in hake and in poultry meat as matrices. In every case, a linear relationship between log input cfu/g and C_T was observed. The standard curve for meat inoculated with *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) had a slope of -3.21 and an R^2 coefficient of 0.9925 . The LOD was 5×10^2 cfu/g (C_T 34.52, SD 1.2). In contrast, poultry meat inoculated with *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*) showed a slope of -3.27 and a R^2 coefficient of 0.9893 . The LOD was also 5×10^2 cfu/g (C_T 38.18, SD 0.3) (Fig. 2). The efficiency was 105% and 102%, respectively.

On the other hand, hake inoculated with the same microorganisms showed different results. Thus, in the case of *tetA*, the data obtained were -2.99 for slope, 0.9887 for R^2 and a LOD of 5×10^2 cfu/g (C_T 35.00, SD 0.7). Similar LOD was obtained for *tetB*. However, the slope was -2.53 (C_T 34.88, SD 0.9), and the R^2 coefficient was 0.9954 (Fig. 3).

Linearity decreased below 5×10^2 cfu/g when standard curves were performed in food matrix. This fact means that minimal amounts of the tested genes can be detected but the quantification would not be so accurate as it would be desirable. Thus, the authors have established the LOD in 5×10^2 cfu/g to quantify with more precision.

3.3. Detection and quantification of tetracycline-resistant bacteria in food

Both *tetA* and *tetB* genes were detected and quantified separately in food samples with respect to the standard curves. However, the final results were obtained from the sum in each sample. Consequently, PCR method showed close results than those obtained by the count plate method, which demonstrates a positive correlation between both techniques.

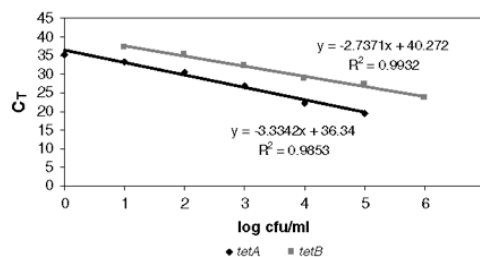


Fig. 1. Real-time quantitative PCR (qPCR) analysis of DNA extracted from 10-fold serial dilutions of *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) pure culture (●) or of *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Cycle threshold (C_T) values are plotted against a concentration of log cfu/mL.

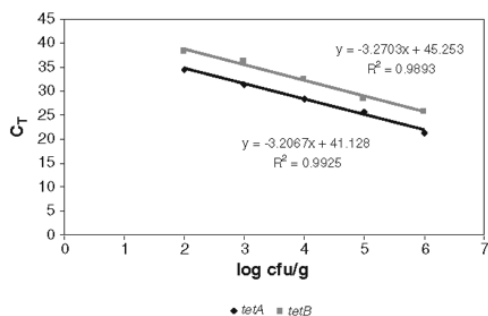


Fig. 2. Quantitative PCR analysis of DNA extracted from 10-fold serial dilutions of poultry meat inoculated with *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) (◆) or *Escherichia coli* NCTC 50365 (*tetB*) (■). Cycle threshold (C_T) values are plotted against a concentration of log cfu/mL.

Plating counts in PCA and in VRBG agar were made in meat and fish samples and PCR results showed a better correspondence in meat samples when compared to *Enterobacteriaceae* counts in plate (Fig. 4). In contrast, PCR data obtained in fish samples were closer to total counts of mesophilic aerobes (Fig. 5).

4. Discussion

In this study, a Taqman-based qPCR procedure was developed for the specific detection and quantification of the *tetA* and *tetB* genes in food samples. Many other authors have reported data about tetracycline resistance genes. However, most of them have assessed their frequency in other types of samples, such as isolates from different sources (Bryan et al., 2004; Fan et al., 2007; Smith et al., 2007). Other authors have detected or quantified *tet* genes by conventional PCR or with SYBR Green quantitative PCR (Fan et al., 2007; Jones et al., 2006). Likewise, there are many authors who used a Taqman-based qPCR in order to detect and/or quantify a particular microorganism from different foods (Elizaquível et al., 2008; Fernandez et al., 2006; Pennacchia et al., 2009). Nevertheless, there was no evidence in the scientific literature about the direct quantification of tetracycline resistance genes from foodstuffs. These studies are very important from the human health perspective, taking into consideration that this types of genes are frequently found in bacteria of the foods tested in this research, and could be transferred to human bacteria (Aarestrup, 2005).

The primers and probes that we designed enabled the specific detection of both *tetA* and *tetB* genes, which were tested in independent assays using several reference strains with and without

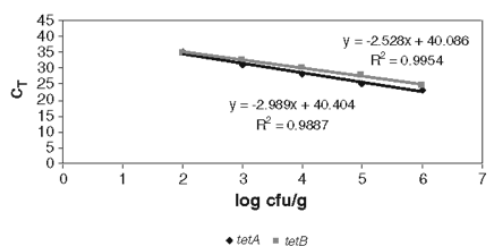


Fig. 3. Quantitative PCR analysis of DNA extracted from 10-fold serial dilutions of hake (*Merluccius merluccius*) inoculated with *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 (*tetA*) (◆) or *Escherichia coli* (NCTC 50365) (*tetB*) (■). Cycle threshold (C_T) values are plotted against a concentration of log cfu/mL.

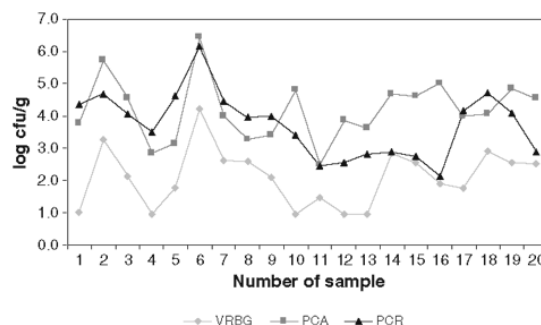


Fig. 4. Comparison, in meat samples, between the counts of the total microbiota with the *tetA* and/or *tetB* genes by qPCR and the plate counts of mesophilic aerobic microorganisms in PCA and *Enterobacteriaceae* in VRBG. In both cases, the media were supplemented with 16 mg/L of tetracycline.

the tetracycline resistance genes. Thus, the developed Taqman qPCR method, proved to be specific for the tetracycline resistance genes under the established reaction conditions.

On the other hand, the assay proved to be quite reproducible. The C_T values for the limits of detection in three independent experiments for each standard curve exhibited little variation, as indicated by an $SD < 2$, which reveals a high precision of the present method (Klein, 2002). Nonetheless, the sensitivity was lower for *tetB* compared with *tetA* as shown in Figs. 1–3, where the C_T values were higher for the *tetB* gene. This could be a result of the different number of copies of the target gene in the strains as was suggested by Fan et al. (2007).

In the present assay, quantification of tetracycline resistance *tetA* and *tetB* genes was performed by using the standard curves that were obtained from the artificial inoculation of aseptic meat and the ten-fold dilutions performed from this inoculated meat, which could be close to a real sample. In fact, meat results show good linearity and a high correspondence when compared to counts obtained by conventional microbiological methods (Fig. 4).

The limit of detection of the developed method was similar or better than the limits of detection reported by other researchers such as Fan et al. (2007), who detected 10 to 1000 cfu of tetracycline-resistant bacteria per reaction in clinical isolates, or Elizaquível et al. (2008), who obtained a limit of detection of 1.8×10^4 cfu/g of *Leuconostoc mesenteroides* in inoculated meat. Additionally, Botteldoorn et al. (2008) obtained a limit of detection of 3.3 log cfu of *Campylobacter* spp. per chicken carcass. The LOD of the present method was 50 cfu/mL (1.7 log cfu/mL) in pure culture and 5×10^2 cfu/g (2.7 log cfu/g) in food for both poultry meat and hake. Nevertheless, it must be noted that the target DNA is different from those of other studies because *tetA* and *tetB* were directly detected and quantified from foods.

In the set of hake samples, there was not a good correlation between VRBG counts and data from qPCR. However, this correlation was better ($r = 0.7146$) when mesophilic aerobic counts were compared with PCR results. This discrepancy could be a result of the presence of other Gram-negative microorganisms in hake, which are frequently found in seawater such as *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* or *Vibrio* spp. (Jay et al., 2005), that are not typically found in VRBG agar. Nevertheless, they can also harbour the target genes. Although microbiological and PCR results are quite similar (Fig. 5), the slope is slightly above the optimum recommended by Higuchi et al. (1993) (Fig. 3). This confirms that the food model does not always serves as an accurate replication of real cases when evaluating PCR detection limits (Taylor et al., 2005). This fact could be attributed to PCR inhibitors that are typically found in the matrix since matrix-associated compounds can interfere in the amplification

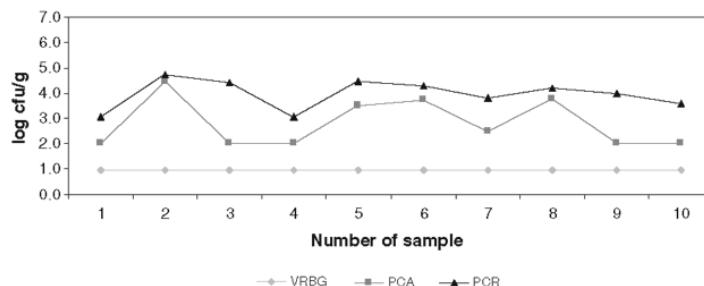


Fig. 5. Comparison, in hake (*Merluccius merluccius*) samples, between the counts of the total microbiota with the *tetA* and/or *tetB* genes by qPCR and the plate counts of mesophilic aerobic microorganisms in PCA and *Enterobacteriaceae* in VRBG. In both cases, the media were supplemented with 16 mg/L of tetracycline.

reaction. For example, this type of inhibition has been observed in matrices with a high level of proteins (Taylor et al., 2005; Uyttendaele et al., 1999). In any case, the high values obtained show that fish like hake that have grown up in the ocean, have large amounts of tetracycline-resistant bacteria. This is in agreement with Akinbowale et al. (2007) who found a high level of tetracycline resistance genes in various species of fish in Australia. It should also be noted that bacterial contamination of fish samples could be due to the water of origin, the transport, the changes in the cooling chain or any other manipulations, such as evisceration (Jay et al., 2005). Thus, we cannot explain with certainty, the unexpected high values of the *tetA* and *tetB* genes in bacterial contaminants of hake. This finding is an interesting question that requires further investigation.

In hake samples, the qPCR method showed an overestimation in the counts of tetracycline-resistant bacteria when compared to those obtained by conventional microbiological methods. However, in poultry meat, this fact was only observed when comparing *Enterobacteriaceae* counts. This overestimation could be a result of the fact that the target DNA from dead cells is quantified as well (Pennacchia et al., 2009) or because the results of *tetA* and *tetB* genes are added up.

In conclusion, in spite of the microbiological counts that give an overall view of the resistant microbiota, the present Taqman assay could serve as a rapid, specific, sensitive and accurate tool for monitoring the amount of tetracycline-resistant bacteria in foods, especially in poultry meats. Consequently, this is a contribution to the study of the distribution of tetracycline resistance genes in animal-origin foods. Otherwise, this method could help in epidemiological studies of tetracycline resistance.

It is important to improve and develop more studies to take raise awareness about the fact that these tetracycline resistance genes are being consumed with food and as a result, could pose serious problems to human health.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Institute Pasteur (France) and the Health Protection Agency (U.K.) for providing several bacterial strains for proving the specificity of the method. This work was supported by Xunta de Galicia project 09MRU010261PR. We also thank Carmen Carreira and Rodrigo García for their technical support.

References

- Aarestrup, F.M., 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 96, 271–281.
- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D., 2007. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* 103, 2016–2025.
- Botteidorn, N., Van Coillie, E., Piessens, V., Rasschaert, G., Debruyne, L., Heyndrickx, M., Herman, L., Messens, W., 2008. Quantification of *Campylobacter* spp. in chicken carcass rinse by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1909–1918.

- Bryan, A., Shapir, N., Sadowsky, M.J., 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2503–2507.
- Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 65, 232.
- Clinical and Laboratory Standard Institute, 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA.
- Elizagaivel, P., Chenoll, E., Aznar, R., 2008. A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. *FEMS Microbiology Letters* 278, 62–71.
- Fan, W., Hamilton, T., Webster-Sesay, S., Nikolich, M.P., Lindler, L.E., 2007. Multiplex real-time SYBR Green PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Molecular and Cellular Probes* 21, 245–256.
- Fernandez, M., del Rio, B., Linares, D.M., Martín, M.C., Alvarez, M.A., 2006. Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *Journal of Dairy Science* 89, 3763–3769.
- Guardabassi, L., Courvalin, P., 2006. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup, F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, Washington, DC, pp. 1–18.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis – real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., 2005. Processed meats and seafoods. In: Springer Science Business Media, Inc. (Ed.), pp. 101–124.
- Jones, C.H., Tuckman, M., Murphy, E., Bradford, P.A., 2006. Identification and sequence of a *tet(M)* tetracycline resistance determinant homologue in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 188, 7151–7164.
- Klein, D., 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine* 8, 257–260.
- Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P., 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology* 91, 73–84.
- Levy, S.B., 1998. Multidrug resistance – a sign of the times. *The New England Journal of Medicine* 338, 1376–1378.
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10, S122–S129.
- Martinez, J.L., Baquero, F., Andersson, D.I., 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 5, 958–965.
- Martinez, J.L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J.F., Martinez-Solano, L., Sanchez, M.B., 2009. A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* 33, 44–65.
- Miranda, J.M., Guarddon, M., Mondragon, A., Vazquez, B.I., Fente, C.A., Cepeda, A., Franco, C.M., 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *Journal of Food Protection* 70, 1021–1024.
- Miranda, J.M., Guarddon, M., Vazquez, B.I., Fente, C.A., Barros-Velazquez, J., Cepeda, A., Franco, C.M., 2008. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: a comparative survey. *Food Control* 19, 412–416.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F., 2009. Development of a real-time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw meat. *International Journal of Food Microbiology* 134, 230–236.
- Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union* L 268:29–43.
- Roberts, M.C., 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* 245, 195–203.
- Rodriguez-Lazaro, D., Jofre, A., Aymerich, T., Hugas, M., Pla, M., 2004. Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6299–6301.
- Smith, J.L., Drum, D.J.V., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L., Lee, M.D., 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal

- Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1404–1414.
- Taylor, T.M., Elhanafi, D., Drake, M., Jaykus, L.A., 2005. Effect of food matrix and cell growth on PCR-based detection of *Escherichia coli* O157: H7 in ground beef. *Journal of Food Protection* 68, 225–232.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. Clustal-W — improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Uyttendaele, M., van Boxtael, S., Debevere, J., 1999. PCR assay for detection of the *E coli* O157: H7 *eae*-gene and effect of the sample preparation method on PCR detection of heat-killed *E coli* O157: H7 in ground beef. *International Journal of Food Microbiology* 52, 85–95.
- White, D.G., 2006. Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In: Aarestrup, F.M. (Ed.), *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. ASM Press, Washington, DC, pp. 145–166.

5.2 CAPÍTULO 2

5.2.1 Cuantificación directa y distribución de genes de resistencia a tetraciclina en muestras de carne por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Direct quantification and distribution of tetracycline-resistant genes in meat samples by real-time polymerase chain reaction

Mónica Guarddon, José Manuel Miranda, Beatriz Isabel Vázquez, Alberto Cepeda, Carlos Manuel Franco

Publicado en *Journal of Food Science* (2012). Volumen 77, nº 7, páginas 372-376.



RESUMEN

La evolución de las bacterias resistentes a antimicrobianos se ha convertido en una amenaza para la seguridad alimentaria por lo que cada vez es más necesaria la creación de métodos nuevos para su control. En este capítulo se compararon recuentos microbiológicos de bacterias resistentes a tetraciclina con los obtenidos por qPCR en 80 muestras de carne. Los recuentos de *Enterobacteriaceae* resistentes a tetraciclina fueron similares entre los recuentos en placa y los obtenidos por qPCR ($p=0,24$), mientras que los recuentos de bacterias aerobias mesófilas resistentes a tetraciclina fueron significativamente mayores por el método microbiológico ($p>0,001$). Se estudió la distribución de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en diferentes tipos de carne. Así, *tet(A)* se detectó en pollo (40%), pavo (100%), cerdo (20%) y ternera (40%), mientras que *tet(B)* se detectó en distintas proporciones en pollo (45%), pavo (70%), cerdo (30%) y ternera (35%). También se investigó la presencia de residuos de equivalentes de tetraciclina mediante un test receptor. Este estudio ofrece un método rápido y alternativo para controlar la presencia de bacterias resistentes a tetraciclina en carne y contribuye al estudio de la distribución de los genes *tet(A)* y *tet(B)*.

Direct Quantification and Distribution of Tetracycline-Resistant Genes in Meat Samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction

Mónica Guarddon, Jose M. Miranda, Beatriz I. Vázquez, Alberto Cepeda, and Carlos M. Franco

Abstract: The evolution of antimicrobial-resistant bacteria has become a threat to food safety and methods to control them are necessary. Counts of tetracycline-resistant (TR) bacteria by microbiological methods were compared with those obtained by quantitative PCR (qPCR) in 80 meat samples. TR *Enterobacteriaceae* counts were similar between the count plate method and qPCR ($P = 0.24$), whereas TR aerobic mesophilic bacteria counts were significantly higher by the microbiological method ($P < 0.001$). The distribution of *tetA* and *tetB* genes was investigated in different types of meat. *tetA* was detected in chicken meat (40%), turkey meat (100%), pork (20%), and beef (40%) samples, whereas *tetB* was detected in chicken meat (45%), turkey meat (70%), pork (30%), and beef (35%) samples. The presence of tetracycline residues was also investigated by a receptor assay. This study offers an alternative and rapid method for monitoring the presence of TR bacteria in meat and furthers the understanding of the distribution of *tetA* and *tetB* genes.

Keywords: meat, quantitative PCR, *tetA*, *tetB*, tetracycline resistance

Introduction

Large amounts of antimicrobials are routinely used for therapeutic and prophylactic purposes for animal production. Particularly, tetracyclines (TCs) are inexpensive broad-spectrum drugs that are known to be effective against a wide range of microorganisms and their use in veterinary clinical practices has been frequently used (Chopra and Roberts 2001; Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) 2009; Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad 2011). Therefore, the widespread use of these drugs seems to be related to major human health hazards, including the potential toxicological effects of antimicrobial residues carried by foods of animal origin and the selection of tetracycline-resistant (TR) microorganisms (Chopra and Roberts 2001). Likewise, antibiotic-resistant bacteria are a serious human health concern since different diseases caused by pathogenic bacteria could become untreatable by antimicrobial therapy (Levy 1998; Levy and Marshall 2004; White 2006).

This public health hazard arises because of the ability of many bacteria to acquire resistance to different antimicrobials. Thus, the majority of the TR (*tet*) genes in bacteria have been associated with elements such as plasmids, transposons, and integrons, which facilitate the rapid dissemination of these genes among bacterial species (Chopra and Roberts 2001; Sunde and Norstrom 2006). Therefore, these resistance genes could be transmitted from bacteria within food-producing animals to those residing in humans (Aarestrup 2005).

Aside from the proliferation of antimicrobial-resistant bacteria or their potential toxicological risks, the use of TCs in food-producing animals has other adverse effects on consumers, such

as allergic reactions (Reig and Toldra 2008). Accordingly, to protect public health, the European Union has established maximum residue limits (MRLs) of certain substances, including antimicrobials, in foodstuffs of animal origin. In particular, the MRLs in muscle are 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for TC, oxytetracycline, doxycycline, and chlortetracycline (Regulation (EC) No 470/2009). The presence of drug residues and the cited harmful effects on human health have made residue monitoring essential for the prudent use of antibiotics (Reig and Toldra 2008; Pikkemaat and others 2010). Different methods, including enzyme receptor assays, can be used to investigate the presence of TC residues in food of animal origin. This sort of methods allows the analysis of a large number of samples and has been proven to be rapid, quite specific, and sensitive and is largely employed for screening purposes (Reig and Toldra 2008).

In addition to monitoring the use of antimicrobial agents, it is also essential to monitor the emergence of resistant strains in animals destined for human consumption, which could prevent the development and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in food-producing animals (Bywater and others 2004; Miranda and others 2009). For monitoring the presence of resistant bacteria, conventional microbiological methods have been used for a long time. However, these conventional techniques have some limitations (McKillip and Drake 2004; Hanna and others 2005), such as investigating the presence of resistance genes, which can neither be detected nor quantified by phenotypic methods.

For this purpose, quantitative PCR (qPCR) is an accurate, sensitive, and specific tool that can reduce the necessary time for the analysis and can facilitate the determination of the frequency and distribution of resistance genes (Martinez and others 2007). With this in mind, this method has been used to determine the amount of bacteria in food carrying *tet* genes, since these resistance genes are often associated with conjugative or mobile elements that facilitate distribution among bacterial species (Chopra and Roberts 2001).

MS 20111158 Submitted 9/27/2012, Accepted 3/27/2012. Authors are with Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos, Dept. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Univ. de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain. Direct inquiries to author Franco (E-mail: carlos.franco@usc.es).

Tetracycline-resistant genes in meat...

To the best of our knowledge, the quantification of the mesophilic aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* harboring *tetA* and *tetB* genes has not been performed in meat samples. These genes are two of the most frequently found TC-resistance genes in gram-negative bacteria (Chopra and Roberts 2001). Thus, the main goal of this work was to quantify the bacteria harboring the cited genes in different meats by qPCR, and to compare the results with the TR mesophilic aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* counts obtained by conventional microbiological methods. Consequently, this work may help to monitor the distribution of resistance genes in meat-derived bacteria and may contribute to the study of the relationship between the use of antimicrobials agents in veterinary medicine and the spread of antimicrobial resistance. A secondary objective was to evaluate the presence of TCs residues in meat through receptor tests to confirm the use of TCs in food-producing animals.

Materials and Methods

Sample collection

A total of 80 meat samples were analyzed in the present work: 20 turkey drumsticks, 20 chicken drumsticks, 20 pork steaks, and 20 beefsteaks. Packs of samples were purchased from 16 supermarkets and 4 local butcheries in Galicia (North-Western Spain) from May to October 2009.

Samples purchased in the same establishment were obtained on different days, and all samples belonged to different batches. Afterward, the samples were transported in refrigerated conditions to the laboratory in less than 2 h and were analyzed within 24 h of collection.

Sample preparation for qPCR and conventional microbiological assays

Portions of 35 g from each sample, including skin in the case of chicken and turkey samples, were cut and added to 315 mL of buffered peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) in a sterile bag with a lateral filter. Samples were homogenized in a masticator MIX 2 (AES, Combourg, France) for 2 min. Aliquots of 200 μ L of the homogenates were subjected to DNA isolation using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions for the isolation of nucleic acids from bacteria or yeast. After isolation, the DNA was stored at -20°C until PCR analysis.

Microbiological contamination (CFU/g) of each sample was determined by pour plating of 1 mL of dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) from the homogenates. *Enterobacteriaceae* contamination was determined by pour plating in Violet Red Bile Glucose agar (VRBG) (Merck) and total aerobic mesophilic counts were determined by pour plating in plate count agar (PCA) (Merck). The same method was used to count TR *Enterobacteriaceae* and aerobic mesophilic bacteria by pour plating in VRBG and PCA with previous addition of 16 mg/L TC (Sigma, St. Louis, Mo., U.S.A.) (Clinical and Laboratory Standard Institute 2005). Subsequently, plates were incubated at 37°C for 24 h, in the case of VRBG, or 31°C for 72 h in the case of PCA, respectively. After incubation, pink to red colonies in VRBG were counted as *Enterobacteriaceae*, while all bacterial colonies grown in PCA were counted as aerobic mesophilic microorganisms and converted to log CFU/g units.

PCR conditions

The material and conditions necessary to develop the PCR reaction have been previously described by Guarddon and others (2011).

Quantification assays

To create standard curves, each type of meat was inoculated with *Escherichia coli* BM13 (C600 Rif^R/R.P4, which contains the *tetA* gene, or *E. coli* NCTC 50365, which contains the *tetB* gene (Guarddon and others 2011). The first reference strain was supplied by the culture collection of the Institute Pasteur (Paris, France), while the second was obtained from the National Culture Type Collection (NCTC) (Health Protection Agency, Salisbury, U.K.). Both strains were grown at 41°C in VRBG. After 24 h of incubation, Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, Detroit, Mich., U.S.A.) tubes were inoculated with these isolated strains and were subsequently incubated at 31°C to obtain a concentration of 10^9 CFU/mL, which was determined by a McFarland densitometer (Dinko, Barcelona, Spain) and confirmed by plate counting in PCA. After incubation, 35 g portions were aseptically cut from the middle of a poultry meat sample and added to 315 mL of buffered peptone water (Merck) in a sterile plastic bag with a lateral filter. Immediately afterward, the sample was homogenized in a masticator MIX 2 for 2 min. For the quantification of the *tetA* gene, 9 assay tubes were each filled with 9 mL of the homogenate. One of these tubes was inoculated with 1 mL of the 10^9 CFU/mL culture of *E. coli* BM13 (C600 Rif^R/R.P4). Subsequently, 10-fold serial dilutions were made with the remaining tubes, until cover a range from 1 to 10^5 CFU/mL (corresponding to a final concentration from 10^1 to 10^6 CFU/g). In the case of the *tetB* gene, the tubes were inoculated with the *E. coli* NCTC 50365 culture. The same protocol was also applied to beef and pork for quantifying bacteria harboring the *tetA* and/or *tetB* genes in these different matrices. Two noninoculated aliquots were also analyzed as negative controls.

Both *tetA* and *tetB* were detected and quantified separately in meat samples with respect to the standard curves. However, the final TR bacteria obtained by qPCR were considered as the sum of bacteria that contained *tetA* and/or *tetB* genes in each sample.

An aliquot of 200 μ L from each dilution was subjected to DNA isolation and was stored at -20°C . After the qPCR reaction, cycle threshold (C_T) was plotted against the log-concentration of the template DNA.

Quantification of tetracyclines residues in meat samples

A receptor assay (Superscreen Tecna, Trieste, Italy) was used for the determination of TCs residues in meat samples. This kit is able to detect tetracycline, oxytetracycline, doxycycline, and chlortetracycline in meat samples in concentrations according to the Regulation (EC) No 470/2009. This method was carried out in duplicate, according to the manufacturer's instructions, and the results were considered as the average of both determinations for each sample. Absorbance was measured with a plate reader (Das, Roma, Italy) at 450 nm.

Statistical analysis

Comparisons between bacterial counts obtained from the microbiological method and from qPCR were analyzed using the χ^2 test. Data were grouped into 3 different categories ($2.7 \log$ CFU/g to $3.5 \log$ CFU/g; $3.6 \log$ CFU/g to $4.5 \log$ CFU/g; $>4.5 \log$ CFU/g) prior to statistical analysis. The Student's *t* test was used to compare counts obtained by qPCR and conventional microbiological methods in the different types of meat. The differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$. These analyses were performed using the Statgraphics version 5.0.1 software (SAS Institute, N.C., U.S.A.).

Results and Discussion

Many authors have reported data concerning the presence of *tet* genes in different samples. However, most of these studies have assessed the frequency of these genes in other types of samples, such as clinical isolates of *E. coli* from human and animal sources (Bryan and others 2004), *E. coli* isolated from broiler chickens (Smith and others 2007), or other gram-negative bacteria isolated from human clinical samples (Fan and others 2007). With respect to the methods employed, other authors have detected or quantified *tet* genes by conventional PCR or with Sybr Green qPCR (Jones and others 2006; Fan and others 2007). Likewise, there are many researchers who have usually employed a Taqman-based qPCR to detect and/or quantify a particular microorganism isolated from different foods (Fernandez and others 2006; Elizavil and others 2008; Pennacchia and others 2009). However, contrary to the method employed in the present work, the cited methods do not allow for the determination of the whole microbiota harboring the *tetA* and/or *tetB* genes in a food sample. This is an important matter considering the high prevalence of these genes in gram-negative bacteria and their abilities to be transferred to human bacteria (Aarestrup 2005). This idea of monitoring a gene pool instead of single bacteria was already highlighted by Hölzel and others (2011); however, they focused their research on the quantification of the *tetM* gene, which is more frequent in gram-positive bacteria.

Standard curves from poultry meat, beef, and pork determine the amount of bacteria in each type of meat harboring the genes

of interest (Table 1). Linearity decreased below 2.7 log CFU/g, which means that minimal amounts of the *tet* genes could be detected but the quantification below this limit may not be so accurate. Thus, the limit of detection established by the authors for every matrix was 2.7 log CFU/g to quantify with more precision. All the standard curves showed a linear relationship between log input CFU/g and C_T .

Meat samples were processed and bacteria with the *tetA* and/or *tetB* genes were quantified with regard to their respective standard curves. The obtained results were compared to those reached by conventional microbiological counts (Figure 1). Although the qPCR results are a few higher than the TR *Enterobacteriaceae* counts, this fact could be justified because it is possible to exist several copies of these genes in a single bacterium. In all types of meat, the results show that qPCR values were closer to TR *Enterobacteriaceae* than to TR mesophilic aerobic bacteria. Anyhow, this fact would be expected since these *tet* genes are usually present in gram-negative bacteria (Chopra and Roberts 2001). In fact, the χ^2 test was used to compare the methods of quantification and, taking into account the obtained results, no significant differences were observed between TR *Enterobacteriaceae* counted by microbiological and qPCR methods ($P = 0.24$). In contrast, counts of TR mesophilic bacteria were higher by the conventional method ($P < 0.001$) than those obtained by qPCR.

Regarding the presence of TR bacteria in the meat samples, Table 2 shows the total TR counts of aerobic mesophilic bacteria and *Enterobacteriaceae*. Thus, mean counts of *Enterobacteriaceae* in poultry meat were higher than those previously reported by us for the same sorts of meat (Miranda and others 2008b). This fact could be due to the type of sample since, in the case of poultry meat, it was analyzed with the skin intact, which is expected to contain higher counts of *Enterobacteriaceae* than skin-off drumsticks. On the other hand, pork and beef showed average counts similar to those obtained for the chicken and turkey samples, with the only exception of the *Enterobacteriaceae* count in beef, which was lower than that obtained for the chicken ($P = 0.0368$). However, mean counts of TR bacteria, for both *Enterobacteriaceae* and mesophilic

Table 1—Values of square regression coefficient (R²) and slope of the standard curves constructed from poultry meat, pork, and beef inoculated with *E. coli* BM13 (C600 Rif^R/RP4 (*tetA*) and with *E. coli* NCTC 50365 (*tetB*).

	tetA		tetB	
	R ²	Slope	R ²	Slope
Poultry meat	0.9948	-3.17	0.9888	-3.37
Beef	0.9943	-3.09	0.9896	-3.51
Pork	0.9959	-3.10	0.9865	-2.90

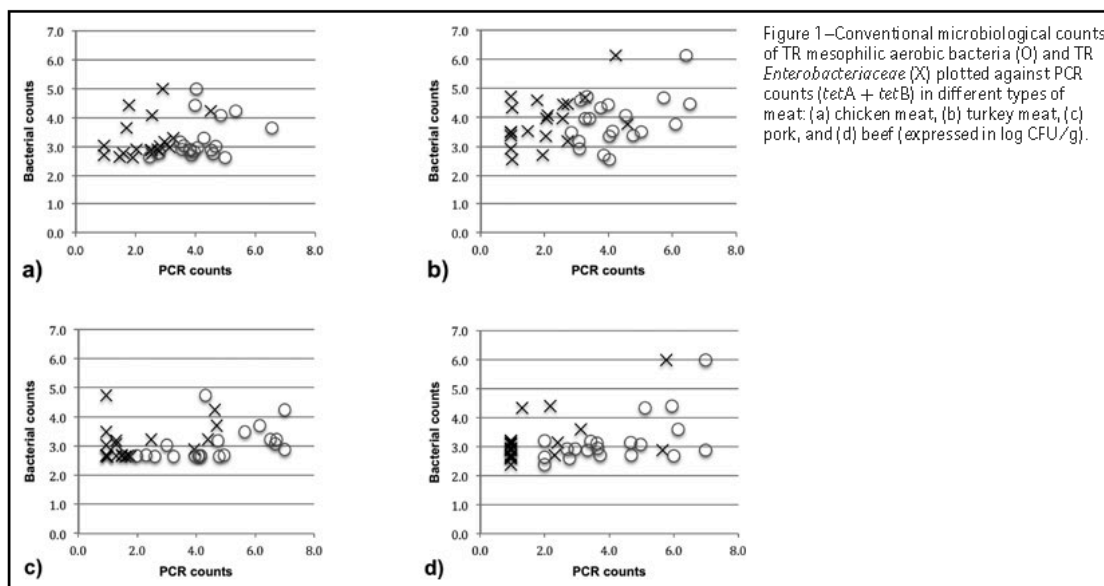


Figure 1—Conventional microbiological counts of TR mesophilic aerobic bacteria (O) and TR *Enterobacteriaceae* (X) plotted against PCR counts (*tetA* + *tetB*) in different types of meat: (a) chicken meat, (b) turkey meat, (c) pork, and (d) beef (expressed in log CFU/g).

Tetracycline-resistant genes in meat...

Table 2—Average counts (minimum; maximum) of *Enterobacteriaceae* and mesophilic aerobic bacteria from different types of meat poured in VRBG and PCA media with and without tetracycline, expressed in log CFU/g units. Average counts (minimum; maximum) of bacteria harboring *tetA* and *tetB* genes are also expressed in log CFU/g units and average (minimum; maximum) of tetracycline residues are expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$ of tetracycline equivalents.

	EB	TRE	MAB	TRMAB	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>	<i>tetA</i> + <i>tetB</i>	TR
Chicken meat ($n = 20$)	3.9 (2.3; 6.3)	2.4 (1.0; 4.5)	5.3 (3.1; 7.0)	4.2 (2.5; 6.6)	2.7 (1.8; 4.4)	2.9 (2.5; 5.0)	3.3 (2.6; 5.0)	115.8 (49.0; 376.1)
Turkey meat ($n = 20$)	3.6 (1.6; 6.1)	2.0 (1.0; 4.6)	5.1 (3.6; 7.1)	4.3 (2.8; 6.6)	3.6 (2.5; 6.1)	2.7 (0.0; 5.0)	3.9 (2.6; 6.1)	279.8 (49.0; 544.5)
Pork ($n = 20$)	3.5 (1.8; 6.0)	1.9 (1.0; 4.7)	5.4 (2.5; 7.0)	4.6 (2.0; 7.0)	1.9 (1.1; 4.0)	3.0 (2.6; 4.7)	3.1 (2.7; 4.7)	225.5 (56.0; 530.3)
Beef ($n = 20$)	2.9 (1.0; 6.0)	1.8 (1.0; 5.8)	5.0 (3.0; 7.0)	4.2 (2.0; 7.0)	2.9 (2.2; 6.0)	2.5 (1.8; 3.1)	3.2 (2.4; 6.0)	130.4 (40.0; 304.7)

EB: *Enterobacteriaceae*; TRE: tetracycline-resistant *Enterobacteriaceae*; MAB: Mesophilic aerobic bacteria; TRMAB: Tetracycline-resistant mesophilic aerobic bacteria; TR: Tetracycline residues.

aerobic bacteria, were significantly lower than those obtained for total counts ($P < 0.001$) in all of the tested species.

In the present work, all of the analyzed animal species showed the presence of both *tetA* and/or *tetB* genes. Thus, in chicken meat, 40% of the samples had the *tetA* gene and a 45% contained *tetB*, whereas in the case of turkey meat, these percentages reached 100% for *tetA* and a 70% for *tetB*. Of the pork samples, 20% contained *tetA* and a 30% *tetB* and, in the case of beef, 40% were positive for *tetA* and 35% were positive for *tetB*. However, other authors such as Sengeløv and others (2003) found that among 100 isolates of *E. coli* from pigs, cattle, and broiler chickens, *tetA* was the most abundant gene (71%) followed by *tetB* (25%). Similar results were obtained by Schwaiger and others (2010) and Lanz and others (2003) in *E. coli* of porcine origin, where *tetA* was the most frequent TC resistance mediator, with 58% and 87% incidence, respectively. In the present work, only in the case of turkey meat, *tetA* was significantly more frequent than *tetB* ($P = 0.020$).

It is important to highlight that although the percentages of *tetB* are quite similar, the frequency of the *tetA* gene of the present assay is lower than the results obtained by the cited authors. This difference could be explained by the fact that meat microbiota also includes gram-positive microorganisms and the presence of these genes is more common in gram-negative bacteria (Chopra and Roberts 2001). Thus, the main difference with the data reported here and previous studies is that this assay has quantified the whole microbiota population and *Enterobacteriaceae* harboring the mentioned genes, instead of isolates of *E. coli*. Therefore, this method offers an overview, in meat samples, of the quantification of two of the most frequent TC resistance genes in gram-negative bacteria.

According to the sanitary guidelines of most countries, all meats present in retail markets should be obtained from animals previously submitted to a residue withdrawal period. Many authors have argued that antimicrobial-resistant bacteria will decrease when the selective pressure caused by the antimicrobial treatment is removed (Levy 1998; Aarestrup 2005). However, other authors have reported that in some cases, resistant strains from animal microbiota can persist in the absence of the selective pressure (Pedersen and Wedderkopp 2003) or even until the end of the withdrawal period, when it is legal to use the animals for human consumption (Miranda and others 2008a).

On the other hand, because of the unknown origin of the samples purchased in different supermarkets, the authors wanted to investigate the presence of TCs residues in every type of the tested meats through a screening method. The receptor assay used to verify the presence of these compounds in different types of meat showed that the average concentrations of TCs residues for all meat types were higher than the European MRL established for individual TCs (Table 2). However, the nature of the TCs residues is unknown since these results represent the whole group

of TCs (De Wasch and others 1998). Forty-five percent of the chicken samples and 60% of the beef samples showed TCs residues concentrations higher than $100 \mu\text{g}/\text{kg}$, whereas in the cases of pork and turkey meat, these residues reached more than $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ in almost 100% of the samples. These results are comparable with those obtained by De Wasch and others (1998) who also found a high proportion of samples containing TCs residues in pork (63.16%) and chicken meat (90.48%).

Thus, the results provided by this technique show that, according to data reported by other authors, such as the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) (2009) or Aarestrup (2005), TCs are commonly employed in animal rearing, and consequently, TCs residues can be found in a high proportion of meats obtained from retail markets.

Conclusions

High counts of TR bacteria confirmed by both microbiological and molecular methods have been found in meat samples. Thus, the present method has been proven to be a useful tool to quantify TR bacteria in meat, which is especially important when comparing microbiological to qPCR results for TR *Enterobacteriaceae*, in which the presence of *tetA* and *tetB* is quite frequent. Besides, this article furthers the understanding of the distribution of TC-resistance genes in animal-origin foods and reveals that high amounts of TCs residues have been detected in meat samples purchased in retail markets, which may therefore reach the food chain. It would be useful to conduct more studies on this issue since these kinds of genes and residues are being consumed with food and could pose serious problems to human health.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Institute Pasteur for providing the *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 strain (*tetA*) and to the Health Protection Agency for providing the *E. coli* NCTC 50365 strain (*tetB*). Xunta de Galicia, Project 09MRU010261PR, supported this work. They also thank Carmen Carreira and Rodrigo García for their technical support.

References

- Aarestrup FM. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol* 96:271–81.
- Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. 2004. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Appl Environ Microbiol* 70:2503–7.
- Bywater R, Deluyker H, Dercoover E, de Jong A, Marion H, McCosville M. 2004. A European survey of antimicrobial susceptibility among zoonotic and commensal bacteria isolated from food-producing animals. *J Antimicrob Chemother* 54:744–54.
- Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:232–60.
- Clinical and Laboratory Standard Institute. 2005. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement M100-S15. CLSI, Wayne, PA.
- Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

Tetracycline-resistant genes in meat...

- De Waele K, Okerman L, Croubels S, De Brabander H, Van Hoof J, De Backer P. 1998. Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests. *Analyst* 123:2737-41.
- Elizaguiñe P, Chenoll E, Aznar R. 2008. A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. *FEBS Microbiol Lett* 278:62-71.
- Fan W, Hamilton T, Webster-Sera S, Nikolich MP, Lindler LE. 2007. Multiplex real-time SYBR Green I-PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Mol Cell Probes* 21:245-56.
- Fernandez M, del Rio B, Linares DM, Martín MC, Akaröz MA. 2006. Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: use in cheese production. *J Dairy Sci* 89:3763-9.
- Guarddon M, Miranda JM, Rodríguez JA, Vázquez BI, Cepeda A, Franco CM. 2011. Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. *Int J Food Microbiol* 146:284-9.
- Hanaa S, Connor C, Wang H. 2005. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *J Food Sci* 70:R49-53.
- Höfel CS, Huther SK, Schwaiger K, Kaempf P, Bauer J. 2011. Quantity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* differs substantially between meat at slaughterhouses and at retail. *J Food Sci* 76:M318-23.
- Jones CH, Tuckman M, Murphy E, Bradford PA. 2006. Identification and sequence of a *tet(B)* tetracycline resistance determinant homologue in clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188:7151-64.
- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91:73-84.
- Levy SB. 1998. Multidrug resistance—a sign of the times. *N Engl J Med* 338:1376-8.
- Levy SB, Marshall B. 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 10:S122-9.
- Martinez JL, Baquero F, Andersson DI. 2007. Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 5:958-65.
- McKillop JL, Drake M. 2004. Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food. *J Food Prot* 67:823-32.
- Ministerio de Salud, Política Social e Igualdad. 2011. <http://www.emps.gob.es/informacion/informacion/medicamentos/veterinarios/home.htm> Datos de Ventas de Antimicrobianos en Veterinaria año 2009. Accessed 2011 April 14.
- Miranda J, Mondragon A, Martínez B, Guarddon M, Rodríguez J. 2009. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from different raw foods in Mexico. *J Food Prot* 72:966-71.
- Miranda J, Vázquez B, Rente C, Barros-Vélezquez J, Cepeda A, Franco C. 2008a. Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poult Sci* 87:1643-8.
- Miranda JM, Guarddon M, Vázquez BI, Rente CA, Barros-Vélezquez J, Cepeda A, Franco CM. 2008b. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: a comparative survey. *Food Control* 19:412-6.
- Pedersen K, Wedderkopp A. 2003. Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers: a farm level. *J Appl Microbiol* 94:1111-9.
- Petracchia C, Eroolini D, Villani F. 2009. Development of a real-time PCR assay for the specific detection of *Escherichia thermophilus* in fresh and spoiled raw meat. *Int J Food Microbiol* 134:230-6.
- Pihkemaat M, Rapallini M, Karp M, Elferink J. 2010. Application of a luminescent bacterial biosensor for the detection of tetracyclines in routine analysis of poultry muscle samples. *Food Addit Contam A* 27:1112-7.
- Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May. 2009. Laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. L152/11.
- Reig M, Toldrà F. 2008. Veterinary drug residues in meat: concerns and rapid methods for detection. *Meat Sci* 78:60-7.
- Schwaiger K, Holzel C, Bauer J. 2010. Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol* 142:329-36.
- Sergelev G, Halling-Sørensen B, Aarestrup F. 2003. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E. coli* from food animals. *Vet Microbiol* 95:91-101.
- Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Mauer JJ, Hofacre CL, Lee MD. 2007. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commercial *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microb* 73:1404-14.
- Sunde M, Norstrom M. 2006. The prevalence of associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother* 58:741-7.
- White DG. 2006. Antimicrobial resistance in pathogenic *Escherichia coli* from animals. In: Aarestrup FM, editor. *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. 1st ed. Washington, D.C. ASM Press. p 145-66.



5.3 CAPÍTULO 3

5.3.1 **Detección cuantitativa de microorganismos resistentes a tetraciclina en carne convencional y ecológica de ternera, cerdo y pollo.**

Quantitative detection of tetracycline-resistant microorganisms in conventional and organic beef, pork and chicken meat.

Mónica Guarddon, José Manuel Miranda, José Antonio Rodríguez, Beatriz Isabel Vázquez, Alberto Cepeda, Carlos Manuel Franco.

Enviado a *CyTA Journal of Food* en octubre de 2013

RESUMEN

El uso abusivo de antimicrobianos ha incrementado sustancialmente el número de bacterias resistentes a estos fármacos. La producción ecológica, que a menudo se cree que es más segura que la convencional, ha limitado el uso de estos medicamentos. Los objetivos del trabajo son evaluar los recuentos obtenidos de bacterias resistentes a tetraciclina mediante microbiología convencional, obtener recuentos de bacterias con los genes *tet(A)* y *tet(B)* mediante RT-PCR e investigar la distribución de ambos genes en carne convencional y ecológica. Solo el gen *tet(B)* fue significativamente mayor en carne convencional de cerdo y de pollo que en sus homólogas ecológicas. El gen *tet(A)* se encontró en casi todas las muestras mientras que el *tet(B)* varió según la especie. La presencia de los genes *tet* sugiere que están ampliamente distribuidos, especialmente *tet(A)*, en alimentos de origen animal, incluso en aquellos derivados de animales en los que el uso de antimicrobianos está seriamente restringido.

Quantitative detection of tetracycline-resistant microorganisms in conventional and organic beef, pork and chicken meat

MÓNICA GUARDDON^a, JOSE M. MIRANDA^a, JOSE A. RODRÍGUEZ^b, BEATRIZ I. VÁZQUEZ^a, ALBERTO CEPEDA^a & CARLOS M. FRANCO^{a*}

^aLaboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002-Lugo. Spain.

^bÁrea Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Carretera Pachuca-Tulancingo, Kilómetro 4.5, Ciudad Universitaria, 42184, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

***Corresponding Author:** Dr. Carlos M. Franco Abuín

Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos. Facultad de Veterinaria pabellón 4 p.b. Campus Universitario 27002-Lugo. Spain. E-mail: carlos.franco@usc.es
phone +34982285900 ext. 22454; fax +34982254592

ABSTRACT

The indiscriminate use of antimicrobial agents in conventional animal production has substantially increased the number of bacteria that are resistant to these drugs. Against this type of production it has emerged the organic farming production method, in which the use of allopathic medicines is quite restricted. Because of these restrictions, this type of animal rearing is thought to be healthier and safer than conventional methods. The main goal of the work was to assess counts of tetracycline-resistant bacteria using conventional microbiology, to obtain counts of bacteria that harbor the *tet(A)* and *tet(B)* genes by quantitative PCR and to investigate the distribution of both genes in conventional and organic chicken, beef and pork. With regard to the type of farming method, only *tet(B)* was significantly higher in conventional pork and chicken meat than in their organic counterparts. The *tet(A)* gene was found in almost 100% of the samples, whereas the detection of the *tet(B)* gene changed according to the animal species. The frequency and amount of *tet* genes suggest that they are widely distributed, especially *tet(A)*, in food of animal origin, even in organic meat samples obtained from animals in which the use of antimicrobial agents is seriously restricted.

Keywords: tetracycline-resistance, meat, quantitative PCR, *tet(A)*, *tet(B)*.

INTRODUCTION

Consumer interest in organic products has increased in recent years because this product type is often perceived to be healthier and safer than the products obtained from conventional farming [1,2]. Furthermore, conventional production is not favorably regarded because of the crowding conditions of the animals on the farms, which facilitates the appearance of infectious diseases and, therefore, encourages the disproportionate use of antimicrobial agents [3].

The use of veterinary drugs in food-producing animals has become a major concern in food safety [1]. In particular, infectious diseases are traditionally treated with antimicrobial agents in animals, which contributes to the appearance of resistant bacteria that could contaminate the meat derived from these animals and pose a human health hazard through the food chain [4-6]. Moreover, another important factor in conventional production methods is the withdrawal period. This period is not always enough to reduce the resistant bacterial population [7,8] because the adapted microbiota are difficult to replace by susceptible flora [9]. Contrary to this type of animal rearing, the Regulation 889/2008/EC [10] provides details of the restrictive rules for obtaining organic products, which are guaranteed by the community logo on the label of the product. Regarding sickness encountered in organic farming, synthetic allopathic medicines should be limited to the minimum possible and the withdrawal period must be twice that established for conventional production.

Due to the broad-spectrum activity against both gram-positive and gram-negative bacteria, the group of tetracyclines (TCs) has extended its use in animals and is one of the most used in Europe for the treatment of animal infections [11]. In Spain, in particular, the

TCs were the best-selling antimicrobial family in 2009 [12]. The indiscriminate use of this agent has favored the appearance and distribution of TC-resistant bacteria [13]. Thus, the majority of the TC-resistance (*tet*) genes in bacteria have been associated with genetic mobile elements, such as plasmids, transposons and integrons, which facilitate the rapid dissemination of these genes among bacterial species [13,14]. With reduced antimicrobial selection pressure in organic farming, it is logical to assume that bacterial counts would be higher than in conventional meat, whereas higher TC-resistant bacterial counts would be expected in conventional meat. In fact, this difference in the microbial contamination of meat has already been reported in other research [15,16].

To the authors' knowledge, the direct quantification of all microbiota harboring the *tet(A)* and the *tet(B)* genes has not been previously performed in organic meat samples. These genes are two of the most frequently found TC-resistance genes in gram-negative bacteria [13]. Thus, one aim of the present work was to quantify the bacteria harboring the *tet* genes in conventional and organic meats by qPCR. Additionally, the results were compared to the TC-resistant mesophilic aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* counts obtained by conventional microbiological methods. This research strives to provide a global perspective regarding TC-resistant bacteria because *tet* genes are not solely transferred by pathogenic bacteria. A second objective was to study the frequency and distribution of the *tet* genes among different species and farming methods. Despite the effort to obtain organic food, little is known about the pros and cons of this sort of production and more comparative surveys should be conducted to support the theory that organic is safer than conventional farming.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. A total of 200 meat samples were analyzed: pork steaks (40 conventional and 40 organic), chicken thighs (30 conventional and 30 organic) and beefsteaks (30 conventional and 30 organic). All samples were purchased from 15 supermarkets in Galicia (northwestern Spain) and 3 supermarkets and 2 organic retail stores in Madrid from March 2010 to March 2011.

The samples purchased in the same establishment were obtained on different days and all samples belonged to different batches. After purchase, the samples were transported under refrigerated conditions to the laboratory and were analyzed within 48 h of collection.

Sample preparation for qPCR and conventional microbiological assays. Portions (35 g) from each sample were cut and added to 315 ml buffered peptone water (Merck) in a sterile bag with a lateral filter. The samples were homogenized in a masticator MIX 2 (AES, Combourg, France) for 2 min. DNA was isolated from 200 μ l aliquots of the homogenates using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's instructions for the isolation of nucleic acids from bacteria or yeast. After isolation, purified DNA was recovered in 50 μ l elution buffer and stored at -20°C until PCR analysis.

The microbiological contamination (CFU g^{-1}) of each sample was determined by pour plating dilutions (10^{-1} to 10^{-6}) from 1 ml aliquots of the homogenates. The *Enterobacteriaceae* contamination was determined by pour plating in violet red bile glucose agar (VRBG; Merck, Darmstadt, Germany), and the total aerobic mesophilic

counts were determined by pour plating in plate count agar (PCA; Merck). The same method was used to count TC-resistant *Enterobacteriaceae* and aerobic mesophilic bacteria by pour plating in VRBG and PCA, respectively, with the previous addition of TC (16 mg/L) (Sigma, St. Louis, MO, USA) [17]. Subsequently, the plates were incubated at 37°C for 24 h (VRBG) or 31°C for 72 h (PCA). After incubation, the pink to red colonies in VRBG were counted as *Enterobacteriaceae*, while all bacterial colonies grown in PCA were counted as aerobic mesophilic microorganisms and converted to log CFU g⁻¹ units.

Quantitative PCR conditions. The primers and probes previously designed by Guarddon et al. [18], and the Environmental Master Mix 2.0 (containing ROX as a passive reference) were obtained from Applied Biosystems (Warrington, UK). qPCR was performed using 25 µl reaction volumes, which included 7.5 µl template DNA, 12.5 µl Environmental Master Mix, 900 nM of each primer (forward and reverse) and 200 nM Taqman probe. Amplification, detection and quantification were performed using an ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA). The following qPCR conditions were used: 10 min at 95°C for Taq-polymerase enzyme activation, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing and extension. The standard curves and the food samples were processed in duplicate. Negative controls, which consisted of the complete reaction except for template DNA, were included in all tests.

Quantification assays. The standard curves were created based on the method reported by Guarddon et al. [19]. To quantify the bacteria that harbored the *tet(A)* gene, a piece of meat was artificially inoculated with *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4

provided by the Institute Pasteur (Paris, France). Similarly, *E. coli* NCTC 50365, which was obtained from the National Culture Type Collection (NCTC; Health Protection Agency, Salisbury, UK), was used for the *tet(B)* gene. Both strains were grown at 41°C in VRBG for 24 h. After incubation, brain-heart infusion (BHI; Difco, Detroit, MI, USA) tubes were inoculated with the isolated strains. The inoculated bacterial cultures were subsequently incubated at 31°C to obtain a concentration of 10^9 CFU ml⁻¹ as determined by a McFarland densitometer (Dinko, Barcelona, Spain) and confirmed by plate counting in PCA.

A portion of meat (35 g) was aseptically cut from the middle of the sample, added to 315 ml buffered peptone water (Merck) in a sterile bag with a lateral filter and homogenized in a masticator for 2 min. Then, 8 tubes were filled with 9 ml of the homogenate, and one of them was filled with 1 ml of the saturated culture of *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4. Subsequently, the standard curves were created from this inoculated tube by making 10-fold serial dilutions in the remaining tubes until a range of 10^1 CFU ml⁻¹ to 10^5 CFU ml⁻¹ was covered, that corresponded to a final concentration of 10^2 CFU g⁻¹ to 10^6 CFU g⁻¹. The same protocol was repeated to create the standard curves from meat inoculated with the *E. coli* NCTC 50365 strain.

To quantify the TC-resistant bacteria, 35 g portions were cut from the meat samples and added to 315 ml buffered peptone water in a sterile plastic bag with a lateral filter. All samples were homogenized in a MIX 2 masticator for 2 min. Two non-inoculated aliquots were also analyzed as negative controls.

DNA was isolated from a 200 µl aliquot of each dilution or sample and was stored at -20°C. After the qPCR reaction, the cycle threshold (C_T) was plotted against the log

concentration of the template DNA. The standard curves and samples were made in duplicate, and the averaged C_T values were calculated in all cases.

Statistical analysis. Student's *t*-test was used to compare the counts that were obtained by qPCR and by conventional microbiological methods. The differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. χ^2 Pearson test was also used to assess the relationship between the method of production and the presence of the *tet(A)* and *tet(B)* genes. All analyses were performed using Predictive Analytics Software (PASW) (version 18.0) (IBM, Chicago, IL, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Mesophilic aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, TC-resistant mesophilic aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* and bacteria harboring the *tet(A)* and/or *tet(B)* genes were counted (Table 1). In all cases, the global microbiological counts were significantly higher in normal media than in media supplemented with tetracycline. In contrast, there were no differences when comparing conventional with organic meat, with the exception of beef, where the counts of mesophilic aerobic bacteria and resistant mesophilic aerobic bacteria were significantly higher in organic meat. However, in chicken meat, the *Enterobacteriaceae* counts were only significantly higher in conventional meat.

Few articles have compared mesophilic aerobic bacteria and *Enterobacteriaceae* plate counts in meat samples and even fewer have compared these microbiota in media supplemented with tetracycline. In the present work, the results in organic beef meat confirmed that bacterial contamination in organic food is often higher than that obtained

from their conventionally produced counterparts [1,3,20]. However, no significant differences were found in the case of the *Enterobacteriaceae* counted in beef. Furthermore, Miranda et al. [15] did not find differences between organic and conventional beef, although they made this comparison exclusively in pathogenic strains and not in all microbiota. Contrary to the beef experiments, the results of the *Enterobacteriaceae* counts in chicken meat are different than the results obtained by Miranda et al. [20], who found higher counts of *Enterobacteriaceae* but less antimicrobial resistance in organic poultry meat. Because TC-resistant strains and resistance genes are becoming more widely distributed in the environment, this prevalence could explain the lack of significant differences between both types of farming.

In fact, many authors have assessed the *tet* genes in different kinds of samples, but little is known about the direct quantification of bacteria harboring these genes. Although *E. coli* is frequently studied following isolation from clinical samples [21] or from food of animal origin [22], there are no investigations that can offer a global overview of all microbiota that carry *tet(A)* and/or *tet(B)* genes in food samples. In this work, the authors applied the Taqman qPCR method described by Guarddon et al. [19] in different types of meat.

Standard curves were created to quantify bacteria harboring the *tet(A)* and *tet(B)* genes using pork, beef and chicken meat as matrices. A linear relationship between log input CFU g⁻¹ and C_T was observed in all cases. To calculate the amount of bacteria with a *tet* gene, each type of meat was inoculated with *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 and *E. coli* NCTC 50365 to calculate the presence of *tet(A)* and *tet(B)*, respectively. Consequently, the standard curve for *tet(A)* in pork had a slope of -3.02 and a square regression coefficient (R²) of 0.9879, whereas *tet(B)* had a slope of -3.01 and an R² coefficient of 0.9656.

Chicken meat inoculated in the same manner exhibited different results. For *tet(A)*, the slope was -3.53, and the R^2 coefficient was 0.9983, whereas the slope was -3.09 for *tet(B)*, and the R^2 coefficient was 0.9470. Finally, the beef standard curve had a slope of -3.17 and an R^2 coefficient of 0.9937 for *tet(A)* and a slope of -3.05 and an R^2 coefficient of 0.9963 for *tet(B)*.

The linearity of standard curves decreased below 5×10^2 CFU g^{-1} when the calculations were performed in the aforementioned food matrices. Therefore, minimal amounts of the tested genes could be detected; however, the quantification was not as accurate as desired. Thus, the authors established the limit of detection (LOD) to be 5×10^2 CFU g^{-1} to allow more precise quantification.

The amount of bacteria harboring *tet(A)* and *tet(B)* genes was evaluated among the different types of meat, and the results showed that the *tet(A)* gene was detected in almost 100% of the samples. However, the presence of *tet(B)* changed according to the tested species. This corroborates other research that also found the *tet(A)* gene more frequently than *tet(B)* in porcine *E. coli* [21,23], *E. coli* isolated from foods of animal origin [22], *E. coli* isolated from food animals [24] or gram-negative clinical isolates [25]. Nevertheless, these rates changed regarding the LOD of the genes. The *tet(A)* gene was only more frequent in chicken meat, whereas pork and beef showed greater percentages of bacteria with the *tet(B)* gene. These results differ from those obtained by the cited authors. However, it must be considered that the data presented in this work are obtained from the total microbiota in the meat samples rather than from isolates, which offers a different perspective on the bacteria that harbor these genes. This is a highly relevant issue because these kinds of genes are transferred from many different genera and species of bacteria and

not solely from pathogens such as *E. coli*; therefore, these microorganisms can also reach humans through the food chain.

The counts of bacteria harboring the *tet(A)* and/or *tet(B)* genes were also compared between conventional and organic meat. These results revealed that only *tet(B)* was significantly higher in conventional pork and chicken meat compared to the organic meat. The counts for both genes (*tet(A)* + *tet(B)*) were significantly higher in conventional chicken meat as well. These differences are shown in Figure 1, where the box plot represents the results of the concentrations of counts of TC-resistant bacteria in 5 different groups: TC-resistant mesophilic aerobic bacteria, TC-resistant *Enterobacteriaceae*, bacteria harboring the *tet(A)* gene, bacteria harboring the *tet(B)* gene and bacteria harboring the both *tet* genes. The values of *tet(A)* above the median are more distributed than those reached by *tet(B)*, for which the data are more concentrated in low values. Surprisingly, these results can be found in animal species in which the frequency of the *tet(A)* gene is lower, despite the high quantity of the gene. Therefore, the authors emphasize that the percentage of strains with *tet* genes can differ from the amount in the sample. Thus, in conventional beef, the average amount of bacteria harboring *tet(A)* was 2.8 log CFU g⁻¹ with 36.67% of the samples over the LOD versus 2.7 log CFU g⁻¹ with 53.33% of *tet(B)* gene. This difference may be due to the number of copies of the gene in each bacterium because they are encoded on plasmids, and therefore, the *tet(B)* gene could be present at a lower number per cell than *tet(A)*, as observed by Fan et al. [25].

On the other hand, the frequency of the *tet* genes was also assessed in all analyzed species. Regardless of the type of animal production, the *tet(A)* gene was found in approximately 100% of the samples, whereas the detection of the *tet(B)* gene changed according to the animal species. Thus, this gene was detected in organic (76%) and

conventional (70.9%) chicken meat; organic (95%) and conventional (55%) pork meat; and organic (83.3%) and conventional (96.7%) beef. The percentages of samples that showed the presence of the cited genes over the LOD are represented in Table 2.

The use of antimicrobials, such as tetracycline, in clinical practices acts as a selective pressure that may increase drug resistance and the variety of resistance genes in the environment [26]. Considering the specifications of the Regulation 889/2008/EC [10] for organic production and, particularly, the restrictions on the use of antimicrobials, differences depending on the farming method were expected in the amount of bacteria that would be found to harbor the *tet(A)* and the *tet(B)* genes. Thus, counts of bacteria with the *tet(B)* gene were significantly greater in conventional pork and chicken meat than in organic meats. These differences were also observed when both genes were present in the same species. These differences seem to be related to the farming method; however, beef samples did not show the expected results because no differences were found for any of the tested genes. Surprisingly, in several studies, the prevalence of antimicrobial resistance genes could be not related to the use of veterinary antimicrobials [7,8,26]. In fact, Smith et al. [26] observed a high prevalence of resistance to antimicrobial agents that are not frequently used in chicken husbandry. Khachatryan et al. [8] related the high rate of resistant bacteria to the age of the animal, finding this relationship greater in younger calves independent of antimicrobial administration.

CONCLUSIONS

Many factors can influence the prevalence of drug resistance in bacteria found in food of animal origin. This type of study may serve to warrant food security and to let the

consumer know if organic products are actually better than conventional products. Furthermore, it would inform the consumer whether the purchase of organic products is worth the high price at the market. In this work, the results have shown a lack of microbiological differences between organic and conventional meat, and because of that, the authors cannot conclude that organic is better than conventional meat for the studied parameters. As suggested by Magkos et al. [1], diseases in farming animals are inevitable. Although in organic production homeopathic treatment has priority in the case of sickness, allopathic medicines are not banned, so it is possible that antimicrobial agents are used more than expected. However, it should be noted that the withdrawal period, which is doubled in organic farming, is not enough to remove the TC-resistance genes in meat bacteria and qPCR could be a useful tool for monitoring the presence of these genes.

Moreover, because of the obtained results, the authors propose the improvement of not only hygiene practices in farms but also surveillance in animal production, particularly in the use of antimicrobial agents. Nevertheless, the data for the frequency and amount of *tet* genes also suggest that they are widely distributed, especially *tet(A)*, in food of animal origin. These genes are even present in organic food originating from animals in which the use of antimicrobial treatment is seriously restricted.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Institute Pasteur for providing the *E. coli* BM13 (C600 RifR)/RP4 strain (*tet(A)*) and to the Health Protection Agency for providing the *E. coli* NCTC 50365 strain (*tet(B)*). Xunta de Galicia (project 09MRU010261PR) supported this work. We also thank Carmen Carreira and Rodrigo García for their technical support.

REFERENCES

- 1 Magkos F, Arvaniti F and Zampelas A, Organic food: Buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Crit Rev Food Sci* **46**:23-56 (2006).
- 2 Young I, Rajic A, Wilhelm BJ, Waddell L, Parker S and McEwen SA, Comparison of the prevalence of bacterial enteropathogens, potentially zoonotic bacteria and bacterial resistance to antimicrobials in organic and conventional poultry, swine and beef production: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect* **137**:1217-1232 (2009).
- 3 Bailey J and Cosby D, *Salmonella* prevalence in free-range and certified organic chickens. *J Food Prot* **68**:2451-2453 (2005).
- 4 Aarestrup FM, Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol* **96**:271-281 (2005).
- 5 Hamer D, Gerald J, Friedman D and Gill C, From the farm to the kitchen table: The negative impact of antimicrobial use in animals on humans. *Nutr Rev* **60**:261-264 (2002).
- 6 Tollefson L and Karp BE, Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med Maladies Infect* **34**:514-521 (2004).
- 7 Enne V, Livermore D, Stephens P and Hall L, Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet* **357**:1325-1328 (2001).
- 8 Khachatryan A, Hancock D, Besser T and Call D, Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Appl Environ Microbiol* **70**:752-757 (2004).

-
- 9 Lipsitch M and Samore M, Antimicrobial use and antimicrobial resistance: A population perspective. *Emerg Infect Dis* **8**:347-354 (2002).
- 10 Anonymous, Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control.
- 11 Kools SAE, Moltmann JF and Knacker T, Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regul Toxicol Pharm* **50**:59-65 (2008).
- 12 Anonymous. Ministerio de Sanidad, Política Social e igualdad, Datos de Ventas de Antimicrobianos en Veterinaria año 2009. <http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios/home.htm> [14 April 2011].
- 13 Chopra I and Roberts M, Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol R* **65**:232 (2001).
- 14 Sunde M and Norstrom M, The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemother* **58**:741-747 (2006).
- 15 Miranda JM, Mondragon A, Vazquez BI, Fente CA, Cepeda A and Franco CM, Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Sci* **82**:284-288 (2009).
- 16 Miranda JM, Guarddon M, Mondragon A, Vazquez BI, Fente CA, Cepeda A and Franco CM, Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic

- chicken, conventional chicken, and turkey meat: A comparative survey. *J Food Prot* **70**:1021-1024 (2007).
- 17 Clinical and Laboratory Standard Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplemented M100-S15. CLSI, Wayne, PA. (2005).
- 18 Guarddon M, Miranda JM, Franco CM, Martinez B, Vazquez BI and Cepeda A, Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas. Spanish patent application P201030856 (2010).
- 19 Guarddon M, Miranda JM, Rodriguez JA, Vazquez BI, Cepeda A and Franco CM, Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. *Int J Food Microbiol* **146**:284-289 (2011).
- 20 Miranda JM, Guarddon M, Vazquez BI, Fente CA, Barros-Velazquez J, Cepeda A and Franco CM, Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food Control* **19**:412-416 (2008).
- 21 Schwaiger K, Holzel C and Bauer J, Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol* **142**:329-336 (2010).
- 22 Jouini A, Ben Slama K, Saenz Y, Klibi N, Costa D, Vinue L, Zarazaga M, Boudabous A and Torres C, Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis. *J Food Prot* **72**:1082-1088 (2009).

- 23 Lanz R, Kuhnert P and Boerlin P, Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* **91**:73-84 (2003).
- 24 Sengeløv G, Halling-Sorensen B and Aarestrup F, Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E-coli* from food animals. *Vet Microbiol* **95**:91-101 (2003).
- 25 Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, Nikolich MP and Lindler LE, Multiplex real-time SYBR Green IPCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Mol Cell Probe* **21**:245-256 (2007).
- 26 Smith JL, Drum DJV, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL and Lee MD, Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *App Environ Microbiol* **73**:1404-1414 (2007).

Figure Legend

Figure 1 Counts of TC-resistant bacteria in conventional and organic meat samples.

Box plots showing a comparison of the counts of TC-resistant mesophilic aerobic bacteria (MATE), TC-resistant *Enterobacteriaceae* (EBTE) and bacteria harboring the *tet(A)* and/or *tet(B)* genes between organic and conventional beef, pork and chicken meat (expressed in log CFU g⁻¹). The box limits are in the 25th and 75th percentile, and the band in the middle of the box is the median; the whiskers are in the 1.5 interquartile range. Data not included between the whiskers are plotted as outliers with small circles (mild) or stars (extreme outlier).

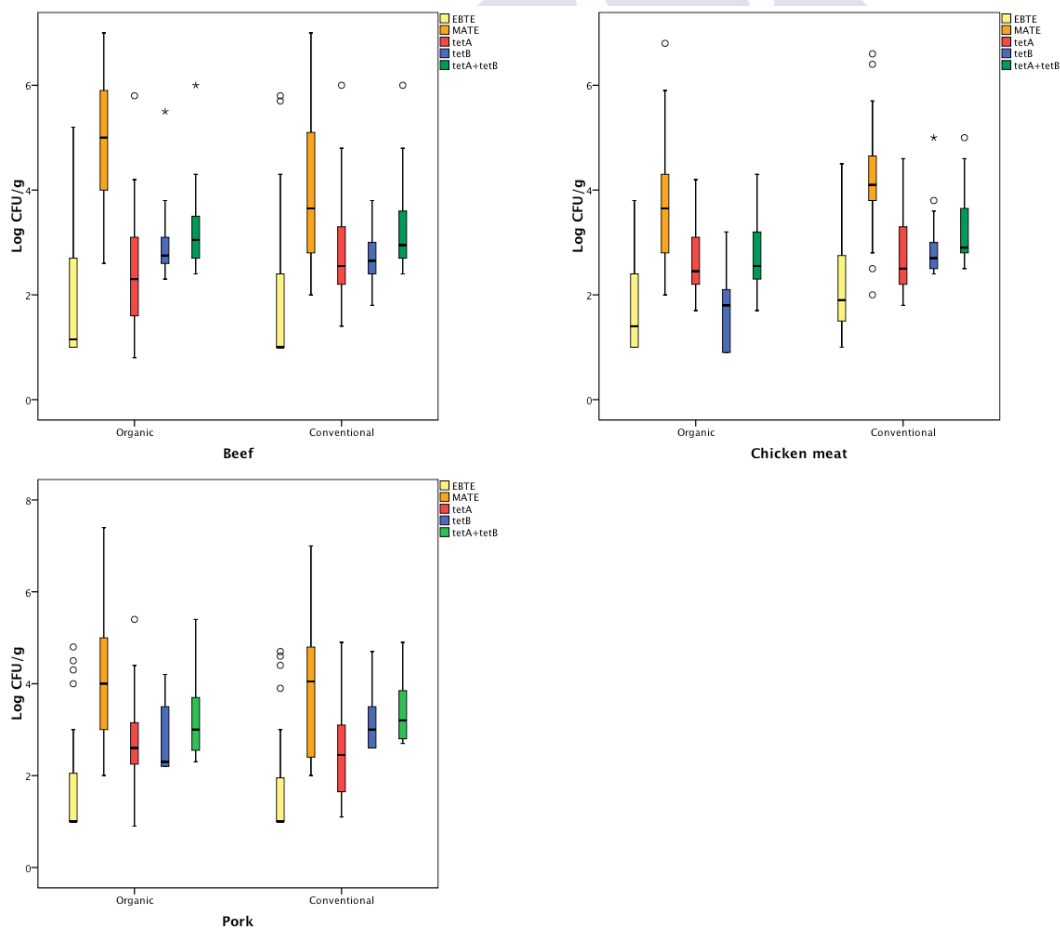


Table 1 The counts of mesophilic aerobic bacteria (MA), *Enterobacteriaceae* (EB), TC-resistant mesophilic aerobic bacteria (MATE), TC-resistant *Enterobacteriaceae* (EBTE) and the total counts of bacteria harboring the *tet* genes in organic and conventional chicken meat, beef and pork, expressed in log CFU g⁻¹.

Production Method	Meat Samples	Counts (log CFU g ⁻¹)						
		EB	EBTE	MA	MATE	<i>tet</i> (A)	<i>tet</i> (B)	<i>tet</i> (A) + <i>tet</i> (B)
Organic	Chicken (30)	2.8	1.8	4.7	3.7	2.7	1.8	2.8
	Beef (30)	3.4	1.8	5.9	5.1	2.4	2.9	3.2
	Pork (40)	2.8	1.7	5.1	4.2	2.7	2.7	3.1
Conventional	Chicken (31)	3.7	2.1	5.3	4.3	2.8	2.8	3.3
	Beef (30)	3.0	1.8	5.0	4.0	2.8	2.7	3.3
	Pork (40)	3.0	1.7	4.7	4.0	2.5	3.2	3.4

Table 2 The percentages and numbers of samples with bacteria harboring *tet(A)*, *tet(B)* and both *tet* genes over the LOD in organically and conventionally produced pork, beef and chicken meat.

Meat Samples	<i>tet(A)</i>		<i>tet(B)</i>		<i>tet(A) + tet(B)</i>	
	Organic	Conventional	Organic	Conventional	Organic	Conventional
Pork	42.5 (17)	45 (18)	35 (14)	67.5 (27)	57.5 (23)	100 (40)
Beef	36.67 (11)	36.67 (11)	63.33 (19)	53.33 (16)	73.33 (22)	80 (24)
Chicken	43.33 (13)	41.9 (13)	6.67 (2)	58.1 (18)	40 (12)	90.32 (28)

5.4 CAPÍTULO 4

5.4.1 Evaluación de residuos de tetraciclinas y bacterias resistentes a tetraciclina en preparados alimenticios infantiles convencionales y ecológicos

Assessment of tetracyclines residues and tetracycline resistant bacteria in conventional and organic baby foods

Mónica Guarddon, Jose Manuel Miranda, Beatriz Isabel Vázquez, Alberto Cepeda,
Carlos Manuel Franco

Pendiente de publicación



RESUMEN

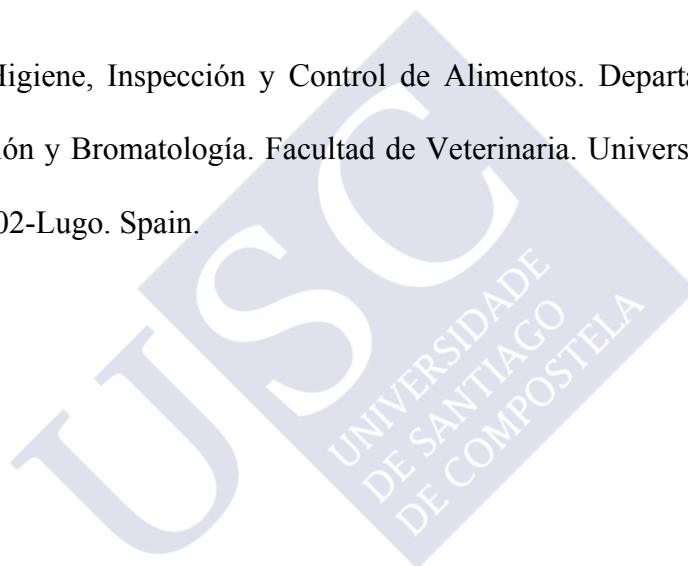
Los bebés y los niños son muy vulnerables a las infecciones bacterianas y el uso de antimicrobianos ha de ser controlado cuidadosamente en esta población, especialmente para evitar que aparezcan bacterias resistentes a estos agentes, lo que puede reducir las opciones de tratamiento en casos de enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron, por un lado, comparar la cantidad de genes de resistencia a tetraciclinas, *tet(A)* y *tet(B)*, entre alimentos preparados para bebés y niños de corta edad convencionales y ecológicos y, por otro evaluar la presencia de residuos de tetraciclinas en estas muestras. Los recuentos de bacterias con el gen *tet(A)* fueron significativamente más altos que aquellos con el gen *tet(B)* y no existieron diferencias significativas en la cantidad de estos genes entre las muestras convencionales y las ecológicas. Además, las muestras que tuvieron ciertas cantidades de residuos de tetraciclinas también fueron positivas para la presencia de los genes *tet* y, al revés, cuanto no se detectó la presencia de los genes en las muestras, el resultado también fue negativo para la presencia de residuos. Sorprendentemente, los porcentajes de residuos de tetraciclina fueron mayores en muestras ecológicas que en convencionales (37% de preparados ecológicos de carne de ave y 27% en los de ternera). Dados los resultados, no se puede concluir que los preparados ecológicos para bebés y niños de corta edad sean más seguros que los convencionales para los parámetros estudiados. La cuantificación de los citados genes sirven como indicador de la materia prima de los preparados antes de su tratamiento térmico.

Full title: **Assessment of tetracyclines residues and tetracycline resistant bacteria in conventional and organic baby foods**

Short version of title: **Resistant bacteria in baby food**

MÓNICA GUARDDON, JOSE M. MIRANDA, BEATRIZ I. VÁZQUEZ, ALBERTO CEPEDA & CARLOS M. FRANCO*

Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos. Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Santiago de Compostela. 27002-Lugo. Spain.



***Corresponding Author:** Dr. Carlos M. Franco Abuín

Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de Alimentos. Facultad de Veterinaria pabellón 4 p.b. Campus Universitario 27002-Lugo. Spain. E-mail: carlos.franco@usc.es
phone +34982285900 ext. 22454; fax +34982254592

ABSTRACT

Infants and children are very vulnerable to bacterial infections and the use of antimicrobials has to be carefully controlled in this population group, particularly to avoid the appearance of bacteria that are resistant to these agents, which can reduce the treatment options in cases of sickness. The aims of this work were to compare the amount of tetracycline resistance genes, *tet(A)* and *tet(B)*, between conventional and organic meat-based baby foods and to use the quantification of these genes to assess the presence of tetracycline residues in these samples. General counts of bacteria harboring the *tet(A)* gene were significantly higher than those containing *tet(B)*, and there was no significant difference in the amount of these genes between the organic and the conventional samples. Moreover, samples with certain amounts of tetracycline residues were also positive for the presence of *tet* genes, and when the presence of the genes was not detected, the samples were also negative for the presence of residues. Surprisingly, the percentages of tetracycline residues were higher in organic samples than in conventional (37% of organic poultry meat-based samples and 27% in the case of beef). It cannot be concluded that organic formulas are safer than conventional formulas for the studied parameters. The quantification of the cited genes serves as an indicator of the raw material of the samples before being processed.

Keywords: tetracycline-resistance, baby foods, qPCR, *tet(A)*, *tet(B)*

INTRODUCTION

The use of antimicrobials in infants and children is quite controlled because this population group is very susceptible to bacterial infections; their immune systems are not completely developed (Rodriguez and others 2011), and some of these agents are still not adequate for them. One example is the use of tetracycline (TC) in children, which can permanently damage the enamel of their teeth (Keep antibiotics working 2002). Additionally, recent investigations revealed that antimicrobial use in early life is associated with consistent increases in body mass and could therefore contribute to the growing childhood obesity (Trasande and others 2012).

Animal infectious diseases are frequently treated with antimicrobial agents, which contribute to the appearance of resistant bacteria that could pose a human health hazard through the food chain (Hamer and others 2002; Tollefson and Karp 2004; Aarestrup 2005). As a consequence, conventional farming is not favorably regarded due to the crowding conditions of the animals on farms, which facilitate the appearance of infectious diseases and, therefore, encourage the disproportionate use of antimicrobial agents (Bailey and Cosby 2005). Contrary to this type of animal rearing, Regulation 889/2008/EC provides details of the restrictive rules for obtaining organic products, which are guaranteed by the community logo on the label of the product. Thus, in regards to sickness encountered in organic farming, synthetic allopathic medicines should be limited to the minimum number possible, and the withdrawal period must be twice the established amount of time for conventional production. Because of this regulation, organic products have become an attractive option for consumers who often perceive these products as

being healthier and safer than the products obtained from conventional farming (Magkos and others 2006; Young and others 2009).

One of the antimicrobials most used in Europe for the treatment of animal infections is the tetracycline (TC) group (Kools and others 2008). Particularly in Spain, TCs were the best-selling antimicrobial family in 2009 (Ministerio de Sanidad, Política Social e igualdad 2009). The indiscriminate use of these agents has favored the selection and distribution of tetracycline-resistant (TR) bacteria (Chopra and Roberts 2001). The majority of TC-resistance (*tet*) genes in bacteria have been associated with genetic elements, which facilitate the rapid dissemination of these genes among bacterial species (Chopra and Roberts 2001; Sunde and Norstrom 2006). Nevertheless, due to the reduced antimicrobial selection pressure in organic farming, it is reasonable to think that TR bacterial counts should be higher in conventional products than in organic products. Because bacterial antimicrobial resistance could reduce the number of effective drugs available to treat sick infants and children, this issue is important (Keep antibiotics working 2002). Hence, it would be interesting to know if organic baby foods are a healthier alternative to conventional products because they are expected to have fewer tetracycline residues and, therefore, fewer tetracycline resistant bacteria.

To investigate this topic, the *tet(A)* and the *tet(B)* genes have been used for the first time as biomarkers to quantify, by qPCR, the TR bacteria in organic and conventional meat-based baby foods because these genes are two of the most frequently found *tet* genes in Gram-negative bacteria (Chopra and Roberts 2001). Taking into account the nature of the samples, the main objective of the present work was to compare the obtained results between the conventional and the organic samples and among the tested species. A secondary objective was to assess the presence of tetracycline residues in baby foods with

a screening method, such as a receptor assay. Presently, the majority of the reported methods have been employed to verify the presence of different residues in baby foods; however, they are usually often used as confirmation methods, including liquid chromatography (Rodriguez and others 2011; Aguilera-Luiz and others 2012).

MATERIALS AND METHODS

Sample collection

A total of 151 samples of conventional (68) and organic (83) baby foods for infants and young children were analyzed in the present work. The choice of the samples, in the form of puree, was made according to the composition: 67 with poultry meat (38 conventional and 29 organic), 67 with beef (34 conventional and 33 organic) and 17 vegetable baby foods (11 conventional and 6 organic). All of the samples were bought in supermarkets and pharmacies in Galicia (North-Western Spain), Madrid (Spain), Dresden (Germany) and Milan (Italy) from September 2010 to June 2011.

The composition of the different samples according to the labels was based on poultry meat (chicken or turkey meat) (4.5-40%), beef (8-40%) and vegetable-based baby foods, in which case the content varied from 67 to 99%. Other ingredients such as rice, pasta or vegetables, among others, were also integrated in the sample. The presence of milk was only reported in the label of some chicken meat-based products (18%).

The number of trademarks varied according to the animal species used and the farming method used. Thus, the research was carried out with 8 trademarks of conventional beef and 6 of organic beef, 7 of conventional chicken meat and 8 of organic

chicken meat and 5 trademarks of vegetable samples. Samples purchased in the same establishment were obtained on different days, and all samples belonged to different batches. Afterward, the samples were transported to the laboratory and were analyzed within 48 hours of collection.

Sample preparation for qPCR and conventional microbiological assays

Portions of 35 g from each sample were taken and added to 315 ml buffered peptone water (Merck) in a sterile bag with a lateral filter. Samples were homogenized in a masticator MIX 2 (AES, Combourg, France) for 2 min. Aliquots of 200 μ l of the homogenates were subjected to DNA isolation using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions for the isolation of nucleic acids from bacteria or yeast. After isolation, purified DNA was recovered in 50 μ l of elution buffer and stored at -20°C until PCR analysis.

PCR conditions

Primers, probes previously designed by Guarddon and others (2010) (Table 1) and Environmental Master Mix 2.0 (containing ROX as a passive reference) were obtained from Applied Biosystems (Warrington, UK). qPCR was performed using 25 μ l reaction volumes, which included 7.5 μ l template DNA, 12.5 μ l Environmental Master Mix, 900 nM each primer (forward and reverse) and 200 nM Taqman probe. Amplification, detection and quantification were performed using an ABI PRISM 7000 Sequence

Detection System (Applied Biosystems, USA) under the following conditions: 10 min at 95°C for Taq-polymerase enzyme activation, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C for denaturation and 1 min at 60°C for annealing and extension. Standard curves and food samples were processed in duplicate. Negative controls, consisting of all of the elements of the reaction except for the template DNA, were included in all tests.

Quantification assays

The steps to create the standard curves were based on the method reported by Guarddon and others (2011). To quantify bacteria harboring the *tet(A)* gene, an aliquot of each type of baby food was artificially inoculated with *Escherichia coli* BM13 (C600 RifR)/RP4, provided by the Institute Pasteur (Paris, France), whereas *Escherichia coli* NCTC 50365, obtained from the National Culture Type Collection (NCTC) (Health Protection Agency, Salisbury, UK), was used for the *tet(B)* gene. Both strains were grown at 41°C in Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) (Merck, Darmstadt, Germany) for 24 hours. After incubation, Brain Heart Infusion (BHI) (Difco, Detroit, MI, USA) tubes were inoculated with these isolated strains and were subsequently incubated at 31°C to obtain a concentration of 10⁹ CFU/ml, which was determined by a McFarland densitometer (Dinko, Barcelona, Spain) and confirmed by plate counting in PCA (Merck).

Standard curves were created using 10-fold serial dilutions from the cited pure cultures, ranging from 10⁹ CFU/ml to 10² CFU/ml. A portion of 35 g from the puree was aseptically added to 315 ml of buffered peptone water (Merck) in a sterile bag with a lateral filter and homogenized in a masticator for 1 min. Then, 5 tubes were filled with 9 ml of the homogenate, and each tube was filled with 1 ml of each dilution of the pure

cultures, from 10^6 CFU/ml to 10^2 CFU/ml (corresponding to a final concentration from 10^7 CFU/g to 10^3 CFU/g).

For quantifying tetracycline resistant bacteria in the samples, 35 g aliquots were added to 315 ml of buffered peptone water in a sterile plastic bag with a lateral filter. All of the samples were homogenized in a masticator MIX 2 for 1 min. Additionally; two non-inoculated aliquots were filtered through a syringe filter of 0.45 μ m and analyzed as negative controls.

An aliquot of 200 μ l from each dilution/sample was subjected to DNA isolation, recovered in 50 μ l of elution buffer and stored at -20°C until PCR analysis. After the qPCR reaction, the cycle threshold (C_T) was plotted against the log concentration of the template DNA. Samples for the standard curves and food samples were processed in triplicate and duplicate, respectively, and the averaged C_T values were calculated in all cases.

Quantification of tetracyclines residues in baby foods

A receptor assay (Superscreen Tecna, Trieste, Italy) was used for the determination of TCs residues in samples of baby food. This kit was designed to detect tetracycline, oxytetracycline, doxycycline and chlortetracycline in meat samples at concentrations according to the Regulation (EC) No 470/2009. Considering there are no specific enzyme immunoassays for the detection of tetracyclines in baby foods and due to the content of meat in the samples, the authors have carried out the assays according to the manufacturer's instructions as if the types of baby food were samples of meat. Every sample was analyzed in duplicate, and the results were considered the average of both

determinations for each sample. Absorbance was measured with a plate reader (Das, Roma, Italy) at 450 nm.

Statistical analysis

Comparison between the counts obtained by qPCR and conventional microbiological methods were determined by Student's *t* test. The differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$. All of the analyses were performed using the PASW (version 18.0) (IBM, Chicago, IL, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

All of the standard curves, created from each type of baby food, exhibited a linear relationship between log input CFU/g and C_T , and the values of slope were close to those recommended by Higuchi (1993). These values, shown in Table 1, are better than those previously obtained by Guarddon and others (2011) because the efficiency of the reaction was improved. Linearity decreased below 3.7 log CFU/g, which means that minimal amounts of the *tet* genes could be detected, but quantification below this limit may have decreased the accuracy of the results. Thus, the limit of detection established by the authors for every matrix was 3.7 log CFU/g to quantify the amounts with more precision.

Bacteria presumptively harboring the *tet(A)* and/or *tet(B)* genes were quantified with respect to the standard curves. The results showed that, comparing the production methods, counts of *tet(A)* were significantly higher in the conventional products than in the organic products, which would be expected due to the restricted use of antibiotics in

organic production (Figure 1). However, in the case of *tet(B)*, the counts were significantly greater in the organic samples compared to the conventionally produced samples. No differences were found when the sum of both genes was compared in both types of production. Contrary to other studies in which the prevalence of resistant bacteria were mainly higher in conventional meat (Miranda and others 2007; Miranda and others 2008; Young and others 2009), the authors of this work have not found clear evidence of this difference for the tetracycline resistance parameter between both types of farming methods. This fact was also highlighted by other researchers such as Wilhelm and others (2009), who did not find significant differences between organic and conventional dairy production in four of seven articles, which were cited in their review article about the prevalence of multidrug resistant bacteria.

Regarding the samples containing poultry meat, there were no significant differences between organic and conventional production in the case of the *tet(A)* gene (Table 2). Interestingly, the counts of bacteria presumed to contain *tet(B)* were significantly higher in organic farming. In contrast, with respect to the beef-based samples, the counts of bacteria presumed to harbor the *tet(A)* gene were higher in conventional baby foods than in organic baby foods. However, no significant differences were found when the two types of production systems were compared for *tet(B)*. Taking into account the importance of both *tet(A)* and *tet(B)* genes in Gram-negative bacteria, the authors have also added the results for both genes to make an estimation of their prevalence in this group as well as in other resistant bacterial populations that could be present in the raw material of the baby foods before the heat treatment. Nevertheless, the results showed that there were no significant differences between poultry meat-based conventional and organic samples, whereas samples with beef contained significantly higher TR genes in the

conventional samples than in the organic samples. These results differ from other studies in which *Enterobacteriaceae* spp. isolated from organic poultry meat (Miranda and others 2008) or isolates of *E. coli* and *S. aureus* from organic beef (Miranda and others 2009) have shown that organic production may limit the presence of antibiotic resistant bacteria in meat. However, in this work, the lack of significant differences between organic and conventional production correlates with the work of Sato and others (2004) (Sato and others 2004) about the antimicrobial susceptibility of *S. aureus* in organic and conventional milk.

Based on the nature of the samples and regardless the farming method, the amount of TR bacteria detected within the poultry meat-based products was significantly higher than the amount detected in beef- or vegetable-based products (Figure 2). However, in the beef-based samples, this difference was only observed for the *tet(B)* gene; bacteria harboring this gene were greater in the beef-based food than in the vegetable-based baby foods. Conversely, no differences were found either for the *tet(A)* gene or for the addition of both genes. These results would be expected because TCs are frequently used in animal medicine, which could increase the amount of TR bacteria in the animal (Chopra and Roberts 2001; Aarestrup 2005). In fact, the presented data are in accordance with those reported in the DANMAP (2009), where percentages of TR *E. coli* were higher in poultry meat than in beef.

In all types of baby foods, the counts of bacteria harboring the *tet(A)* gene were significantly higher than *tet(B)* in both types of production (Table 2). This result is in accordance with other authors who also found the presence of *tet(A)* more frequently than *tet(B)* in porcine *E. coli* (Lanz and others 2003; Schwaiger and others 2010), *E. coli* isolated from foods of animal origin (Jouini and others 2009), *E. coli* isolated from food

animals (Sengelov and others 2003) and Gram-negative clinical isolates (Fan and others 2007). However, it is necessary to highlight that the data presented in this work were obtained from the total microbiota in the baby food samples rather than from isolates, which offers a complete perspective on the amount of bacteria that harbor these genes. This difference is a highly relevant issue because, although almost all of the bacteria present in these types of samples are dead, extracellular segments of DNA with *tet* genes could be transmitted by horizontal transfer to other live bacteria (Thomas and others 2005; Agero and others 2006), such as the intestinal microbiota of babies. Moreover, it must be noted that the quantification of the cited genes serves as an indicator of the raw material in the samples before being processed.

In the case of vegetable-based baby foods, mean counts of bacteria harboring the *tet(A)* gene were also higher than those harboring the *tet(B)* gene. The sum of both genes in these samples was also compared with those that are meat-based because these types of samples contained high amounts of vegetables in addition to the meat. The results showed that poultry meat-based samples exhibited higher counts than those reached by vegetable-based samples. However, no significant differences were found when compared with beef-based samples ($p=0.303$). In fact, there were remarkably high counts of bacteria harboring *tet* genes in vegetable-based samples, although the presence of antimicrobial resistant bacteria in vegetable products has also been detected by other authors (Vidaver 2002; Phillips and others 2004; Miranda and others 2009). The high rates of tetracycline resistant bacteria in this type of sample could be explained by the presence of tetracycline residues and *tet* genes transmitted to vegetable crops through different routes, such as manure, sewage and surface or irrigation waters (Khachatourians 1998; McGowan 2007), which

may have human health consequences. Hence, vegetables could serve as a route of transmission for antimicrobial resistant bacteria to consumers (Vidaver 2002).

The amount of tetracycline residue equivalents was analyzed with an enzyme immunosorbent assay to verify whether there was any correlation between the amount of residues and the amount of tetracycline resistant bacteria in the baby foods (Table 2). Almost all of the samples had less than 50 µg/kg tetracycline residue equivalents and the analyzed genes were present in almost all of them. Although there was no correlation between the amount of residues and the amount of resistant bacteria, it was observed that the samples with certain amounts of tetracycline residue equivalents were also positive for the presence of *tet* genes. In contrast, when the presence of the genes was not detected, the sample was also negative for the presence of tetracycline residues. In addition, both types of farming methods, conventional and organic, were compared, and 37% of organic poultry meat-based samples were positive versus 21% of conventional samples. In the case of organic beef-based samples, 27% were positive in contrast with 18% from conventional production. Surprisingly, the higher average of residues was obtained in samples of vegetables and in organic baby foods, especially in beef-based samples, in which a total of 5 samples were over the maximum residue limit allowed for tetracycline in muscle (Commission Regulation (EU) No 37/2010).

CONCLUSIONS

Regarding the results obtained for the *tet(A)* and *tet(B)* genes, it can be concluded that this study may serve to assess the quality of raw baby food material before being sterilized and to let the consumer know if organic products are actually better than

conventional products. Surprisingly, both *tet* genes were present in all types of organic baby foods, and it must be noted that animals reared under organic conditions have severely limited possibilities of being treated with antimicrobials. Therefore, the authors cannot conclude that organic formulas are better than conventional formulas for the studied parameters. Furthermore, the amount of *tet* genes also suggests that they are widely distributed, especially *tet(A)*, in foods of animal origin and, what is more surprising, in vegetable-based products as well.

ACKNOWLEDGMENT

The authors are grateful to the Institute Pasteur for providing the *E. coli* BM13 (C600 Rif^R)/RP4 strain (*tet(A)*) and to the Health Protection Agency for providing the *E. coli* NCTC 50365 strain (*tet(B)*). We also thank Carmen Carreira and Lucía Calvo for their technical support.

REFERENCES

- Aarestrup FM. 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol* 96(4):271-81.
- Agerso Y, Wulff G, Vaclavik E, Halling Sorensen B, Jensen L. 2006. Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene *tet(M)* in soil microcosms. *Environ Int* 32(7):876-82.
- Aguilera-Luiz MM, Martinez Vidal JL, Romero-Gonzalez R, Garrido Frenich A. 2012. Multiclass method for fast determination of veterinary drug residues in baby food by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 132(4):2171-80.
- Bailey J, Cosby D. 2005. *Salmonella* prevalence in free-range and certified organic chickens. *J Food Protect* 68(11):2451-3.
- Chopra I, Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol R* 65(2):232.
- Commission Regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 834/2007 on organic production and labelling of organic products with regard to organic production, labelling and control.
- Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.

Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP). 2009. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

Fan W, Hamilton T, Webster-Sesay S, Nikolich MP, Lindler LE. 2007. Multiplex real-time SYBR Green I PCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Mol Cell Probe* 21(4):245-56.

Guarddon M, Miranda JM, Rodriguez JA, Vazquez BI, Cepeda A, Franco CM. 2011. Real-time polymerase chain reaction for the quantitative detection of *tetA* and *tetB* bacterial tetracycline resistance genes in food. *Int J Food Microbiol* 146(3):284-9.

Guarddon M, Miranda JM, Franco CM, Martínez B, Vázquez BI, Cepeda A, inventors; 2010 Jun 2. Métodos y reactivos para la detección y cuantificación de bacterias resistentes a tetraciclinas. Spanish patent ES2370850B2. (The corresponding PCT application with publication number WO2011151498A1).

Hamer D, Gerald J, Friedman D, Gill C. 2002. From the farm to the kitchen table: The negative impact of antimicrobial use in animals on humans. *Nutr Rev* 60(8):261-4.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. 1993. Kinetic Pcr Analysis - Real-Time Monitoring of Dna Amplification Reactions. *Bio-Technol* 11(9):1026-30.

Jouini A, Ben Slama K, Saenz Y, Klibi N, Costa D, Vinue L, Zarazaga M, Boudabous A, Torres C. 2009. Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunisia. *J Food Protect* 72(5):1082-8.

Keep antibiotics working. Antibiotic resistance and its impact on children [Internet]; 2002 [Accessed 18th April 2012] Available from:

- http://www.keepantibioticsworking.com/new/resources_library.php?categoryID=657&submit=Browse. Antibiotic Resistance and its Impact on Children
- Khachatourians G. 1998. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can Med Assoc J* 159(9):1129-36.
- Kools SAE, Moltmann JF, Knacker T. 2008. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regul Toxicol Pharm* 50(1):59-65.
- Lanz R, Kuhnert P, Boerlin P. 2003. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet Microbiol* 91(1):73-84.
- Magkos F, Arvaniti F, Zampelas A. 2006. Organic food: Buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Crit Rev Food Sci* 46(1):23-56.
- McGowan E. 2007. Comment on "Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado". *Environ Sci Technol* 41(7):2651-2.
- Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Datos de ventas de antimicrobianos en veterinaria año 2009. [Internet]; Updated 4th May 2011 [Accessed 14th September 2012] Available from:
<http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios/2011/home.htm>
- Miranda JM, Mondragon A, Vazquez BI, Fente CA, Cepeda A, Franco CM. 2009. Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Sci* 82(2):284-8.
- Miranda JM, Guarddon M, Vazquez BI, Fente CA, Barros-Velazquez J, Cepeda A, Franco CM. 2008. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic

chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food Control* 19(4):412-6.

Miranda JM, Guarddon M, Mondragon A, Vazquez BI, Fente CA, Cepeda A, Franco CM. 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: A comparative survey. *J Food Protect* 70(4):1021-4.

Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemoth* 53(1):28-52.

Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council.

Rodriguez E, Moreno-Bondi MC, Marazuela MD. 2011. Multiresidue determination of fluoroquinolone antimicrobials in baby foods by liquid chromatography. *Food Chem.* 127(3):1354-60.

Sato K, Bennedsgaard T, Bartlett P, Erskine R, Kaneene J. 2004. Comparison of antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in organic and conventional dairy herds in the midwestern United States and Denmark. *J Food Protect* 67(6):1104-10.

Schwaiger K, Holzel C, Bauer J. 2010. Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Vet Microbiol* 142(3-4):329-36.

- Sengelov G, Halling-Sorensen B, Aarestrup F. 2003. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E-coli* from food animals. *Vet Microbiol* 95(1-2):91-101.
- Sunde M, Norstrom M. 2006. The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J Antimicrob Chemoth* 58(4):741-7.
- Thomas C, Nielsen K, Nielsen K. 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* 3(9):711-21.
- Tollefson L, Karp BE. 2004. Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Med Maladies Infect* 34(11):514-21.
- Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM, Blaser JM. 2012. Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *Int J Obes*. doi:10.1038/ijo.2012.132
- Vidaver A. 2002. Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clin Infect Dis*.
- Wilhelm B, Rajic A, Waddell L, Parker S, Harris J, Roberts KC, Kydd R, Greig J, Baynton A. 2009. Prevalence of zoonotic or potentially zoonotic bacteria, antimicrobial resistance, and somatic cell counts in organic dairy production: current knowledge and research gaps. *Foodborne Pathog Dis* 6(5):525-39.
- Young I, Rajic A, Wilhelm BJ, Waddell L, Parker S, McEwen SA. 2009. Comparison of the prevalence of bacterial enteropathogens, potentially zoonotic bacteria and bacterial resistance to antimicrobials in organic and conventional poultry, swine and beef production: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiol Infect* 137(9):1217-32.

Table 1 Values of square regression coefficient (R²) and slope of the standard curves constructed from baby foods based on poultry meat, beef and vegetables inoculated with *E. coli* BM13 (C600 Rif^R/RP4 (*tet*(A))) and with *E. coli* NCTC 50365 (*tet*(B))

	<i>tet</i> (A)		<i>tet</i> (B)	
	R ²	Slope	R ²	Slope
Poultry meat	0.9997	-3.32	0.9996	-3.29
Beef	0.9887	-3.17	0.9876	-2.97
Vegetables	0.9985	-3.26	0.9747	-3.20

Table 2 Mean counts of bacteria harboring the *tet(A)* and/or the *tet(B)* genes in conventional and organic baby foods based on poultry meat, beef and vegetables, expressed in log CFU/g; and mean counts of tetracycline residues expressed in $\mu\text{g}/\text{kg}$ of tetracycline equivalents.

Farming method	Type of sample	Genes			Tetracycline residues
		<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(A)</i> + <i>tet(B)</i>	
Conventional	Poultry meat	4.5	3.2	4.6	51.2
	Beef	4.2	2.7	4.2	51.2
Organic	Poultry meat	4.6	3.9	4.7	53.1
	Beef	3.7	2.9	3.8	66.2
	Vegetables	3.9	2.5	3.9	53.3

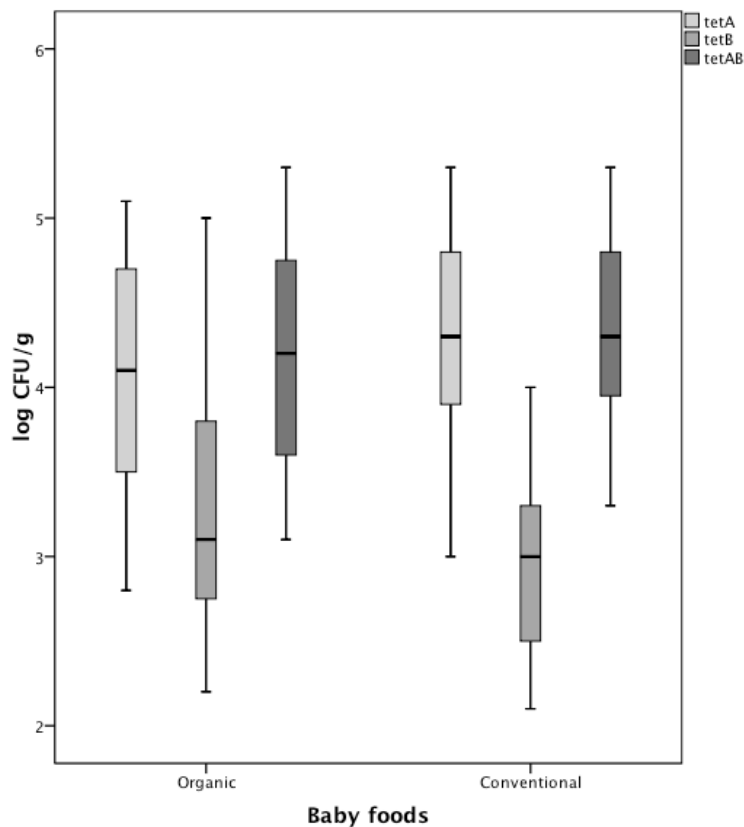


Figure 1 Counts of TC-resistant bacteria in conventional and organic baby foods. Box plots showing a comparison of the counts of bacteria harboring the *tet(A)* and/or *tet(B)* genes between organic and conventional baby foods (expressed in log CFU/g). The box limits are in the 25th and 75th percentile, and the band in the middle of the box is the median; the whiskers are in the 1.5 interquartile range.

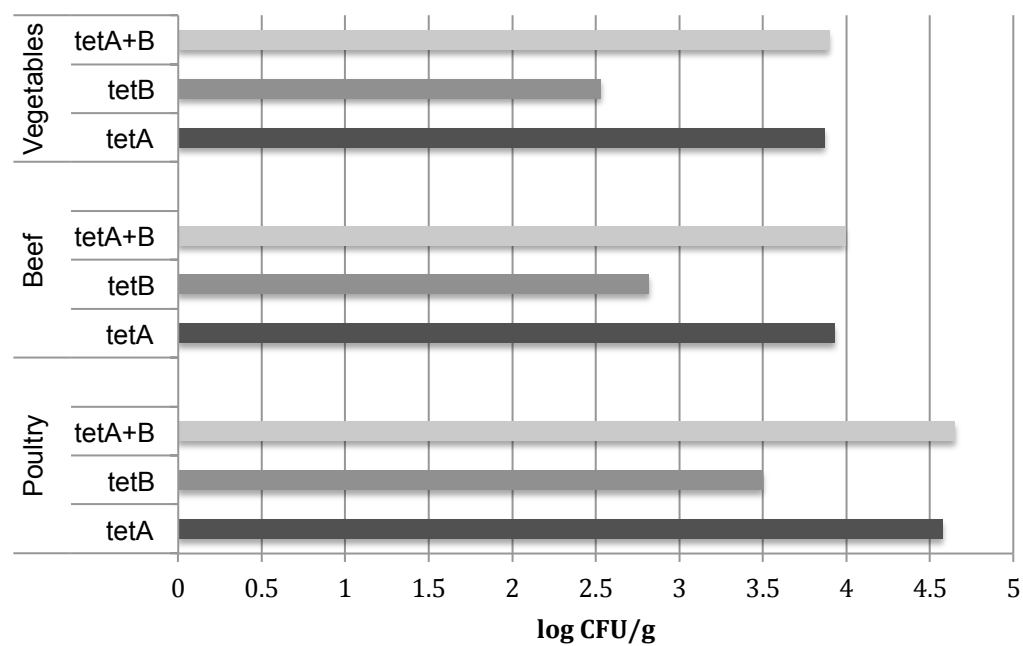


Figure 2 Quantity of bacteria harboring the *tet(A)* and/or *tet(B)* genes in baby foods for infants and young children based on vegetables, poultry meat and beef, expressed in log CFU/g.



6 DISCUSIÓN





En este trabajo, se ha desarrollado un método para la detección y la cuantificación de los genes de resistencia a tetraciclina *tet(A)* y *tet(B)* en alimentos. Son muchos los autores que han publicado datos acerca de la presencia de estos y otros genes *tet*. Sin embargo, la mayoría de ellos son estudios relacionados con la frecuencia de estos genes en cepas aisladas de diferentes fuentes (Bryan y col., 2004; Fan y col., 2007; Smith y col., 2007). Otros autores detectaron o cuantificaron estos genes con otras técnicas, como PCR convencional o con PCR cuantitativa utilizando agentes intercaladores fluorescentes no específicos como SYBR Green (Jones y col., 2006; Fan y col., 2007).

Por otra parte, muchos investigadores han utilizado la PCR en tiempo real con sondas Taqman para detectar y cuantificar determinadas especies bacterianas a partir de diferentes alimentos (Elizaquível y col., 2008; Fernández y col., 2006; Pennacchia y col., 2009). No obstante, no hay evidencia en la literatura científica sobre la cuantificación directa de bacterias portadoras de los genes de resistencia a tetraciclina *tet(A)* y *tet(B)* en alimentos. Si bien es cierto que se ha cuantificado el gen *tet(M)* en la superficie de la carne, este gen está presente principalmente en bacterias gram positivas (Hölzel y col., 2011).

Poder disponer de métodos que nos permitan la detección de estos genes es de gran importancia desde el punto de vista sanitario, ya que en el caso de que estén presentes en los alimentos, podrían ser transferidos a la flora bacteriana humana a través de la cadena alimentaria. Como resultado de este trabajo, hemos conseguido desarrollar un método válido para este propósito que además es reproducible, ya que se hicieron tres ensayos independientes para cada curva patrón con una desviación estándar mínima. Sin embargo, la sensibilidad varió de un gen a otro. Así, la sensibilidad para *tet(B)* fue menor que para el gen *tet(A)* y teniendo en cuenta que estos genes están codificados en plásmidos, esto

podría deberse a que las células bacterianas posean un número de copias variable para cada uno de ellos, tal y como sugieren Fan y col. (2007) en su trabajo. De hecho, al igual que en nuestro caso, estos autores también obtuvieron una menor sensibilidad para el gen *tet(B)* en cepas aisladas de *E. coli*.

La cuantificación de los genes *tet(A)* y *tet(B)* se hizo a partir de rectas de calibrado obtenidas para cada uno de los genes. Para obtener dichas rectas se inocularon alícuotas asépticas de carne y pescado con bacterias portadoras de estos genes y, posteriormente, se realizaron diluciones decimales a partir de estas, con el fin de aproximarse, en la medida de lo posible, a una muestra real.

El límite de detección (LOD) obtenido por este método fue de 50 ufc/ml en cultivo puro y 5×10^2 ufc/g en muestras de carne y pescado para ambos genes. Estos resultados coinciden con trabajos anteriores de otros autores como Fan y col. (2007), en cuyo estudio enfocado a bacterias resistentes a tetraciclina, pudieron detectar entre 10 y 1000 ufc por reacción en aislamientos clínicos. Otros autores, Elizaquível y col. (2008) obtuvieron un LOD de $1,8 \times 10^4$ ufc/g de *Leuconostoc mesenteroides* en carne inoculada por un método similar, lo que es sustancialmente superior al límite alcanzado por el método desarrollado en esta tesis.

En las muestras de pescado, no hubo buena correlación cuando se compararon los recuentos obtenidos por qPCR con los recuentos de enterobacterias resistentes a tetraciclina. Sin embargo, sí hubo una correlación positiva al compararlos con los recuentos de aerobios mesófilos resistentes. Esto puede deberse a que las muestras de pescado están contaminadas no solo con enterobacterias, sino también con otros microorganismos gram negativos como *Pseudomonas*, *Aeromonas* o *Vibrio* que también puede albergar genes *tet*. Estas bacterias no se contabilizaron en los recuentos

microbiológicos, sin embargo, sí fueron tenidas en cuenta en los recuentos de PCR ya que esta técnica se utilizó para cuantificar de forma global todas las bacterias que tuviesen el gen *tet(A)* y/o el gen *tet(B)* sin discriminar la especie.

Como curiosidad, también es importante resaltar los altos valores obtenidos de bacterias resistentes a tetraciclina en muestras de merluza (*Merluccius merluccius*), cuyo hábitat natural es el fondo del mar y que *a priori* no deberían portar genes de resistencia a antibióticos. La explicación podría basarse en la contaminación de las aguas marinas, en los transportes u otras manipulaciones como la evisceración (Jay y col., 2005), pero esto es una conjetura que no puede confirmarse sin un estudio más exhaustivo de este tipo de muestras.

En el segundo capítulo de esta tesis se aplicó el método en distintos tipos de carne convencional. Las rectas de calibrado creadas a partir de carne de aves de corral, ternera y cerdo sirvieron para determinar la cantidad de bacterias con los genes de interés en los distintos tipos de carne. La linealidad disminuyó por debajo de 5×10^2 ufc/g, lo que significa que, aunque se podrían detectar cantidades muy pequeñas de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en este tipo de muestras, la cuantificación por debajo de este valor podría no ser tan precisa y, por lo tanto, fue este el establecido como LOD.

Los recuentos microbiológicos de microorganismos resistentes a tetraciclina fueron comparados con los obtenidos por qPCR y, en todos los tipos de carne, los valores de qPCR estuvieron más próximos a valores de enterobacterias que a los de aerobios mesófilos. De hecho, no se encontraron diferencias significativas entre los recuentos de enterobacterias resistentes y los de qPCR. Este hecho era previsible si tenemos en cuenta que los genes *tet(A)* y *tet(B)* se encuentran exclusivamente en bacterias gram negativas y que la mayoría de ellas pertenecen al grupo de las bacterias entéricas (Chopra y Roberts,

2001). Por el contrario, las cantidades de aerobios mesófilos resistentes obtenidos a través de métodos convencionales fueron significativamente superiores que los recuentos obtenidos mediante el método molecular.

La presencia de los genes *tet(A)* y *tet(B)* varió según la especie analizada. Mientras que otros autores (Sengelov y col., 2003; Schwaiger y col., 2010; Lanz y col., 2003) encontraron el gen *tet(A)* como el más frecuente en cerdos, broilers y ganado vacuno, en este trabajo dicho gen sólo fue significativamente más frecuente en el caso de la carne de pavo. Sin embargo, la principal diferencia obtenida entre los resultados obtenidos en este trabajo y los anteriormente obtenidos por estos autores es que, en nuestro caso, se consideró toda la microbiota portadora de estos genes en lugar de evaluar su presencia únicamente en aislamientos de *E. coli*. Por lo tanto, este método ofrece una perspectiva novedosa, necesaria y global acerca de la cuantificación de los genes *tet(A)* y *tet(B)* en carnes.

Por otra parte, en base a la legislación sanitaria de la mayoría de los países, la carne destinada al consumo humano debe proceder de animales que hayan pasado el período de supresión en caso de haber sido tratados con antibióticos. En este sentido, muchos investigadores sostienen que las bacterias resistentes a los agentes antimicrobianos desaparecen en cuanto se retira el tratamiento con estos fármacos (Levy y col., 1998; Aarestrup y col., 2005). No obstante, otros autores señalaron que en algunas ocasiones existen cepas resistentes en la microbiota del animal que puede persistir en ausencia de la presión selectiva que ejerce el antibiótico (Pedersen y Wedderkopp, 2003) o al menos hasta el final del período de supresión cuando ya es legal el consumo de la carne de estos animales (Miranda y col., 2008).

En base a lo anterior, se ha considerado interesante averiguar la cantidad de residuos de tetraciclinas presentes en la carne mediante una prueba de cribado y los resultados obtenidos mostraron que, en todos los tipos de carne estudiados, las concentraciones medias de tetraciclinas fueron superiores a los LMR establecidos para cada tipo de tetraciclina de forma individual. No obstante, hay que señalar que estas muestras se analizaron de forma global y que para saber la cantidad correspondiente a cada sustancia en particular sería necesario valerse de métodos de confirmación no utilizados en este estudio. En cualquier caso, los resultados obtenidos demuestran que, tal y como han indicado otros autores (DANMAP, 2009; Aarestrup, 2005), las tetraciclinas se usan habitualmente en producción animal y, en consecuencia, es fácil encontrar la presencia de residuos de dichos antibióticos en carnes compradas en el comercio minorista.

En la carne producida por métodos ecológicos, salvo excepción, no se encontraron diferencias significativas en los recuentos microbiológicos en comparación con la carne convencional. Los resultados obtenidos en carne de ternera ecológica confirmaron que la contaminación bacteriana en estos alimentos es con frecuencia mayor que en sus homólogos convencionales (Bailey y col., 2005; Magkos y col., 2006). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en lo referente a la contaminación por enterobacterias. Si bien es cierto que no existen muchas referencias en la literatura científica para contrastar estos datos, hay autores que tampoco han encontrado diferencias en cuanto a la prevalencia de determinados microorganismos patógenos en este tipo de carne (Miranda y col., 2009).

Por otra parte, cuando se comparó la carne de pollo convencional con la ecológica, solo se encontraron diferencias significativamente mayores para los recuentos de enterobacterias de las muestras convencionales. Sin embargo, el hecho de no encontrar

diferencias entre los recuentos de aerobios mesófilos y enterobacterias resistentes, puede deberse a que tanto estos microorganismos como los genes de resistencia están ampliamente distribuidos en el medio ambiente.

De hecho, el gen *tet(A)* se detectó prácticamente en el 100% de las muestras, mientras que la presencia del *tet(B)* varió dependiendo de la especie analizada. Esto concuerda con otros trabajos que también encontraron con más frecuencia el primer gen que el segundo en aislamientos de *E. coli* de cerdos (Schwaiger y col., 2010; Lanz y col., 2003), *E. coli* en alimentos de origen animal (Jouini y col., 2009), *E. coli* en animales de producción (Sengelov y col., 2003) o en gram negativos de muestras clínicas (Fan y col., 2007). No obstante, estas proporciones cambiaron cuando se tuvo en cuenta el LOD de los genes. De este modo, el *tet(A)* solo fue más frecuente en carne de pollo, mientras que en el cerdo y la ternera se obtuvieron mayores porcentajes de *tet(B)*. Esto hace que los resultados difieran de aquellos obtenidos por los autores previamente citados, aunque hay que destacar que la microbiota valorada también fue diferente.

Cuando se comparó la cantidad de bacterias portadoras de estos genes entre ambos tipos de carne, solo el *tet(B)* fue significativamente mayor en carne convencional de cerdo y de pollo que en la ecológica. Esto es relevante teniendo en cuenta la alta restricción en el uso de medicamentos alopáticos que establece el Reglamento 889/2008 relativo a la producción ecológica, por lo que cabría esperar diferencias más notables entre ambos tipos de producción. En este sentido hay autores que afirman que la prevalencia de genes de resistencia podría no estar relacionada con el uso de agentes antimicrobianos de uso veterinario (Enne y col., 2001; Khachatryan y col., 2004; Smith y col., 2007). Un ejemplo de esto es el estudio de Smith y col. (2007) en el cual se observaron altos niveles de resistencia a agentes antimicrobianos no usados típicamente en la cría de pollos.

Al investigar los alimentos infantiles, las rectas de calibrado, igual que en el caso de la carne, mostraron relación lineal entre la concentración de bacterias resistentes y el Ct y los valores de la pendiente también fueron cercanos a los recomendados por Higuchi y col. (1993). A pesar de esto, la linealidad disminuyó por debajo de 5×10^3 ufc/g, por lo tanto, este valor fue el establecido como LOD para este experimento. Esta diferencia de una unidad logarítmica con respecto a los trabajos anteriores, puede deberse a que la matriz alimentaria es mucho más compleja que en el caso de la carne, ya que los preparados infantiles están constituidos por diferentes ingredientes que pueden suponer un problema a la hora de aislar el ADN diana o incluso de llevar a cabo la reacción de PCR.

Al igual que en el caso de la carne, los recuentos de bacterias portadoras de los genes *tet(A)* y/o *tet(B)*, fueron realizadas a partir de las rectas patrón y para el gen *tet(A)* los recuentos fueron significativamente mayores en los productos convencionales que en los ecológicos, lo que se corresponde con las expectativas creadas para ambos tipos de producción. Por el contrario, los recuentos de bacterias portadoras del gen *tet(B)* fueron significativamente mayores en las muestras ecológicas. Al contrario que otros estudios en los que la prevalencia de bacterias resistentes fue mayor en la carne convencional (Miranda y col., 2007; Miranda y col., 2008; Young y col., 2009), en esta tesis no se han encontrado evidencias de esta diferencia para el parámetro de resistencia a tetraciclina, lo que hace pensar que la presencia de genes de resistencia en estos alimentos no está vinculada al tipo de producción con el que obtuvieron los ingredientes. De este modo, en los tarritos que contenían carne de ave solo se obtuvieron diferencias significativas en el caso del gen *tet(B)*, el cual se encontró en mayor cantidad en muestras orgánicas, mientras que en los preparados con carne de ternera solo fueron mayores los resultados para *tet(A)* en productos convencionales. Estos resultados difieren de los de otros investigadores que

demonstraron que el sistema de cría animal podría limitar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en carne (Miranda y col., 2008). Sin embargo, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas entre ambos sistemas de producción, lo cual concuerda con otros estudios como el de Sato y col., (2004), quienes estudiaron la susceptibilidad a antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* en leche orgánica y convencional y tampoco encontraron diferencias significativas.

Atendiendo a la naturaleza de las muestras, y coincidiendo con los resultados publicados en el DANMAP (2009), la cantidad de bacterias portadoras de los genes de resistencia a tetraciclinas encontradas en los preparados a base de carne de ave fue significativamente mayor que en los de ternera o en los vegetales.

De manera general, sin tener en cuenta la naturaleza de las muestras ni el sistema de producción por el cual se obtuvieron los ingredientes de los preparados infantiles, los recuentos de bacterias portadoras del gen *tet(A)* también fueron significativamente superiores a los del gen *tet(B)*, al igual que en el caso de la carne.

Además, este trabajo también se ha evaluado la microbiota global en alimentos infantiles. En este sentido, la diferencia con los trabajos elaborados anteriormente radica en que el ADN procede de células bacterianas muertas, tras el proceso de esterilización de los preparados. Sin embargo, esto no elimina totalmente los riesgos ya que los genes *tet* pueden transferirse de forma horizontal a otras bacterias (Thomas y col., 2005; Agerso y col., 2006).

En el caso de los productos vegetales, cabe destacar que se encontraron altos recuentos de bacterias con los genes *tet*. De hecho, otros autores también encontraron genes de resistencia a tetraciclinas en manzanos o en ensaladas listas para el consumo (Schnabel y Jones, 1999; Campos, 2013). Una de las posibles causas, según estos autores,

que podría explicar la presencia de genes *tet* en las muestras podría ser la contaminación por manipulación. Los elevados recuentos observados en los preparados infantiles también podrían deberse a la presencia de residuos de tetraciclinas y la transmisión de genes de resistencia a cultivos vegetales por distintas vías como el uso de estiércol, aguas residuales o aguas superficiales y de riego (Khachatourians, 1998; Phillips y col., 2004; McGowan, 2007). Por lo tanto, los vegetales podrían servir como vía de transmisión de bacterias resistentes a antimicrobianos a los consumidores (Vidaver, 2002).

La cantidad de residuos de tetraciclinas en los preparados infantiles se analizó mediante un ensayo tipo ELISA para conocer la relación entre estos y la resistencia bacteriana a tetraciclina. El resultado mostró que no existe correlación entre estos parámetros, aunque sí se observó que muestras con ciertas cantidades de residuos también contenían genes de resistencia, del mismo modo que cuando no se detectó la presencia de estos genes tampoco se detectó la presencia de residuos. En este trabajo se ha usado un método de cribado para probar esta relación pero, a pesar de las ventajas que ofrecen esta técnica, como el coste o la velocidad de análisis, los resultados podrían ser más precisos usando métodos de confirmación. Estos pueden evaluar de forma más específica una molécula concreta, en comparación con el test receptor usado en este ensayo, que cuantifica varias sustancias al mismo tiempo sin poder conocer la cantidad de cada una de ellas por separado.



7 CONCLUSIONES





7.1 Conclusiones generales

En este trabajo se ha diseñado un método robusto y eficaz, capaz de detectar y cuantificar de forma directa, rápida, sensible y específica dos de los genes de resistencia a tetraciclina más frecuentes en microorganismos gram negativos, *tet(A)* y *tet(B)*, lo cual puede servir como herramienta de control para estos genes en la industria alimentaria, especialmente en aquellas donde la contaminación por bacterias entéricas sea frecuente, como puede ser la industria cárnica.

7.2 Conclusiones específicas

1. Los kits de cebadores y sondas Taqman diseñados a partir de las secuencias genéticas de los genes *tet(A)* y *tet(B)*, para su uso mediante la RT-qPCR, resultaron ser específicos y eficaces para la detección de ambos genes.

2. El método desarrollado en este trabajo constituye una herramienta rápida, específica, sensible y precisa para monitorizar la cantidad de bacterias portadoras de los genes de resistencia a tetraciclina, *tet(A)* y *tet(B)*, en alimentos, especialmente en aves de corral. Debido a su especificidad, esta herramienta también es útil para el estudio de la distribución de los genes de resistencia a tetraciclina en animales productores de alimentos.

3. Una vez comparados los recuentos microbiológicos, especialmente de enterobacterias resistentes, con los recuentos obtenidos por RT-qPCR, se constató que el método desarrollado en esta tesis doctoral es un método válido y útil para cuantificar bacterias resistentes a tetraciclina en carne de pavo, pollo, cerdo y ternera.

4. De manera general existe el convencimiento de que la carne ecológica es más saludable que la convencional. Sin embargo, dada la ausencia de diferencias significativas entre los recuentos microbiológicos obtenidos en ambos tipos de carne, no se puede concluir que, para los parámetros de estudio, dicha afirmación sea correcta.

5. Los resultados obtenidos sugieren que los genes *tet* están ampliamente distribuidos en la naturaleza y, por tanto, es fácil encontrarlos en alimentos de origen animal, incluyendo los ecológicos, los cuales provienen de animales para cuya producción el uso de agentes antimicrobianos está seriamente restringido.

6. Los genes *tet(A)* y *tet(B)* se detectaron tanto en preparados infantiles ecológicos como convencionales, por lo que su presencia parece ser independiente del método de cría de los animales.

7. La presencia de residuos de tetraciclinas en los distintos tipos de carne y preparados infantiles, tanto convencionales como ecológicos, conduce a pensar que estos fármacos se usan con frecuencia, lo que, a su vez, se ve reforzado con la presencia de genes de resistencia a tetraciclina.

8 BIBLIOGRAFÍA





Aarestrup, F.M., (2005) Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96: 271-281.

Agerso, Y., Wulff, G., Vaclavik, E., Halling-Sorensen, B., Jensen, L. (2006) Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene *tet(M)* in soil microcosms. *Environment International*, 32(7): 876-882.

Anthony, F., Acar, J., Franklin, A., Gupta, R., Nicholls, T., Yamura, S., Thompson, S., Threlfall, E. J., Vose, D., Van Yuuren, M., White, D. G. (2001) Antimicrobial resistance: responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine. *Revue Scientifique Technique-Office International des Epizooties*, 20: 829-839.

Bailey, J., Cosby, D. (2005) *Salmonella* prevalence in free-range and certified organic chickens. *Journal of Food Protection* 68: 2451-2453.

Bartholomai, A. (1991) *Fábricas de alimentos*. Ed. Acribia. Zaragoza (España).

Bryan, A., Shapir, N., Sadowsky M. J. (2004) Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 2503-2507.

Campos, J., Mourão, J., Pestana, N., Peixe, L., Novais, C., Antunes, P. (2013) Microbiological quality of ready-to-eat salads: An underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 464-470.

Chopra, I., Roberts, M. (2001) Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology Molecular Biology Reviews*, 65: 232-260.

Codex Alimentarius (2010) Informe de la cuarta reunión del grupo de acción intergubernamental especial del Codex sobre la resistencia a los antimicrobianos. (REP11/AMR). Muju (República de Corea).

Codex Alimentarius (2011) Documento: CAC/GL 77-2011. Sitio web:
http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/11776/CXG_077s.pdf
Fecha acceso: 3 de junio de 2013.

Collignon, P., Powers, J. H., Chiller, T. M., Aidara-Kane, A., Aarestrup, F. M. (2009) World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical Infectious Diseases*, 49: 132-141.

Comisión Europea. Agricultura ecológica (2013). Sitio web:
http://ec.europa.eu/agriculture/organic/organic-farming/what-organic_es
Fecha de acceso: 1 de septiembre de 2013.

Costa, J. (2004) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(5): 299-305.

Cubas, C. D. (2005) *Actualización en la terapéutica de las discromías dentales: tetraciclinas*. Ed. Vison Net. Madrid (España).

Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) (2009) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark.

Daza Pérez, R. M. (1998) Resistencia a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(3): 57-67.

Díaz-Cruz, M. S., Barceló, D. (2006) Determination of antimicrobial residues and metabolites in the aquatic environment by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386: 973–998.

Dinh, Q. T., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Eurin, J., Chevreuil, M., Labadie, P. (2011) Measurement of trace levels of antibiotics in river water using on-line enrichment and triple-quadrupole LC-MS/MS. *Talanta*, 85: 1238–1245.

Directiva 2006/125/CE de la Comisión de 5 de diciembre de 2006 relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 6.12.2006, L339/16.

Directrices para el análisis de riesgos de resistencia a los antimicrobianos transmitida por los alimentos (CAC/GL 77-2011). Sitio web:

http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCoQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.codexalimentarius.org%2Finput%2Fdownload%2Fstandard%2F11776%2FCXG_077s.pdf&ei=h8BRUPG9D6eV0QWY_4CgCg&usg=AFQjCNFRu-1MVLIH_s1uI2J6rpWmRzrI0A

Fecha de acceso: 6 de agosto de 2013.

Elizaquível, P., Chenoll, E., Aznar, R. (2008) A TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection and quantification of *Leuconostoc mesenteroides* in meat products. *FEMS Microbiology Letters*, 278: 62-71.

Enne, V., Livermore, D., Stephens, P., Hall, L. (2001) Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. *Lancet*, 357: 1325-1328.

European Medicines Agency (EMA) (2010) Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010. London, United Kingdom.

- Falkow S. (1975) Infectious Multiple Drug Resistance. Pion Limited, London.
- Fan, W., Hamilton, T., Webster-Sesay, S., Nikolich, M.P., Lindler, L.E. (2007) Multiplex real-time SYBR Green IPCR assay for detection of tetracycline efflux genes of Gram-negative bacteria. *Molecular and cellular probes*, 21: 245-256.
- Fernández, M., del Río, B., Linares, D. M., Martín, M. C., Álvarez, M. A. (2006) Real-time polymerase chain reaction for quantitative detection of histamine-producing bacteria: Use in cheese production. *Journal of Dairy Science*, 89: 3763-3769.
- Fonseca Mendoza, D., Mateus Arbeláez, H., Contreras Bravo, N. (2010). PCR cuantitativa en tiempo real. *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*. 1ª ed. Ed. Universidad del Rosario. Bogotá (Colombia).
- Forbes, B., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. (2009) Principios de la actividad de los agentes antimicrobianos. *Bailey and Scott, Diagnóstico microbiológico*, 12ª ed. Ed. Médica Panamericana, S.A. Madrid (España).
- Griggs, D. J., Johnson, M. M., Frost J. A., Humphrey, T., Jørgensen, F., Piddock, L. K. V. (2005) Incidence and mechanism of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter* spp. isolated from comercial poultry flocks in the United Kingdom before, during and after fluoroquinolone treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2): 699-707.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis — Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*, 11: 1026–1030.
- Hölzel, C. S., Huther S. K., Schwaiger, K., Kaempf, P., Bauer, J. (2011) Quantity of the tetracycline resistance gene *tet(M)* differs substantially between meat at slaughterhouses and at retail. *Journal of Food Science*, 76: 318-323.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. (2005). Processed meats and seafoods, *In Springer Science Business Media, Inc. (Ed.)*, pp. 101-124.

Jones, C. H., Tuckman, M., Murphy, E., Bradford, P. A. (2006). Identification and sequence of a *tet(M)* tetracycline resistance determinant homologue in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188: 7151-7164.

Jouini, A., Ben Slama, K., Saenz, Y., Klibi, N., Costa, D., Vinue, L., Zarazaga, M., Boudabous, A., Torres, C., (2009) Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis. *Journal of Food Protection*, 72: 1082-1088.

Kangethe, E. K.; Gathuma, J. M.; Lindqvist, K. J. (1986) Identification of the species of origin of fresh, cooked and canned meat and meat products using antisera to termostable muscle antigens by Ouchterlony's double diffusion test. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37: 157-164.

Kemper, N. (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8: 1-13.

Kesmen, Z., Yetiman, A. E., Sahin, F., Yetim, H. (2012) Detection of chicken and turkey meat in meat mixtures by using real-time PCR assays. *Journal of Food Science*, 77(2): 167-173.

Khachatourians, G. (1998) Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Canadian Medical Association Journal*, 159(9): 1129-1136.

Khachatryan, A., Hancock, D., Besser, T. and Call, D. (2004) Role of calf-adapted *Escherichia coli* in maintenance of antimicrobial drug resistance in dairy calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 752-757.

Koike, S., Krapac, I. G., Oliver, H. D., Yannarell, A. C., Chee-Sandford, J. C., Aminov, R. I., Mackie, R. I. (2007) Monitoring and source tracking of tetracycline

resistance genes in lagoons and groundwater adjacent to swine production facilities over a 3-year period. *Applied and Environmental Microbiology*, 7(15): 4813-1823.

Kools, S. A. E., Moltmann, J. F., Knacker, T. (2008). Estimating the use of veterinary medicines in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 50: 59-65.

Lanz, R., Kuhnert, P., Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary Microbiology*, 91: 73-84.

Latham, M. C. (2002) Composición corporal, funciones de los alimentos, metabolismo y energía. *Nutrición humana en el mundo en desarrollo*. Colección FAO: Alimentación y nutrición, nº 29. FAO. Roma (Italia).

Levy, S.B. (1998). Multidrug resistance - A sign of the times. *New England Journal of Medicine*, 338: 1376-1378.

Lilley, A. (2000) *Farmacología en enfermería*. 2ª ed. Ed. Harcourt S.A., Madrid (España).

Magkos, F., Arvaniti, F., Zampelas, A. (2006) Organic food: Buying more safety or just peace of mind? A critical review of the literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46: 23-56.

McGowan, E. (2007) Comment on "Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: Studies in Northern Colorado". *Environmental Science and Technology* 41(7): 2651-2652.

McPherson, M., Møller, S. (2006) Understanding PCR. *PCR*. 2ª edición. Ed.: Taylor & Francis Group. pp. 9-20.

Michalova, E., Novotna, P., Schlegelova, J. (2004) Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinary Medicine – Czech Republic*, 49(3): 79–100.

Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente (MAGRAMA) (2012). Agricultura ecológica. Estadísticas 2011. Sitio web:
http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/INFORME_NACIONAL_2011_190912_tcm7-220494.pdf

Fecha de acceso: 12 de agosto de 2013.

Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente (MAGRAMA) (2013). La agricultura ecológica en España. Sitio web:
<http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/la-agricultura-ecologica/default.aspx>

Fecha de acceso: 25 de agosto de 2013.

Miranda, J. M., Guarddon, M., Mondragón, A., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Cepeda, A., Franco, C. M. (2007) Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: A comparative survey. *Journal of Food Protection*, 70: 1021-1024.

Miranda, J. M., Guarddon, M., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., Franco, C. M., (2008). Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food Control*, 19: 412-416.

Miranda, J. M., Mondragon, A., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Cepeda, A., Franco, C. M. (2009) Influence of farming methods on microbiological contamination and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates from beef. *Meat Science*, 82: 284-288.

Moulin, G., Cavalié, P., Pellanne, I., Chevance, A., Laval, A., Millemann, Y., Colin, P., Chauvin, C. (2008) A comparison of antimicrobial usage in human and veterinary medicine in France from 1999 to 2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 617–625.

Nunnery, J., Angulo, F. J., Tollefson, L. (2006) Public health and policy. *Preventive Veterinary Medicine*, 73: 191-195.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2013). Fuentes de carne. Sitio web:

http://www.fao.org/ag/againfo/themes/es/meat/backgr_sources.html

Fecha de acceso: 8 de agosto de 2013.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2012). Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Nota descriptiva N° 194. Sitio web:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>

Fecha de acceso: 1 de agosto de 2013.

Parida, R. K., Nayak, J. R., Biswal, B., Karna, N. (2010) Glycylcyclines – the new class of antimicrobial. *Der Pharmacia Lettre*, 2, 180-185.

Pastor Navarro, N. (2011) Tesis doctoral “Síntesis de inmunorreactivos para la determinación de sulfonamidas y tetraciclinas en alimentos”. Presentada en la Universidad politécnica de Valencia. España.

Pedersen, K., Wedderkopp., A. (2003) Resistance to quinolones in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish broilers at farm level. *Journal of Applied Microbiology*, 94(1): 111-119.

Pennacchia, C., Ercolini, D., Villani, F. (2009). Development of a Real-Time PCR assay for the specific detection of *Brochothrix thermosphacta* in fresh and spoiled raw

meat. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 230-236.

Pérez-Trallero, E., Iglesias, L. (2003) Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21(9):520-9.

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., Nightingale, C., Preston, R., Waddell, J. (2004) Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1):28-52.

Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D. (2000) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*. 3rd edition. Ed.: Wiley. Iowa State University Press, Ames. p. 277.

Puppini, B., Tamburlini, F., Persic, L. And Paleologo, P (2008). SuperscreenTetra, an enzyme-receptor assay for high throughput detection of tetracyclines in foodstuffs. Poster presentation at 122nd AOAC Annual meeting & exposition. Dallas, Texas, USA.

Red Internacional de Autoridades en Materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) (2008). Nota informativa nº 2/2008. Resistencia a los antimicrobianos transferida por animales productores de alimentos.

Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 18.10.2003, L268/29.

Reglamento (CE) nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 16.6.2009,

L152/11.

Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el Reglamento (CEE) nº 2092/91. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 20.7.2007, L189/1.

Reglamento (CE) nº 889/2008 de la Comisión de 5 de septiembre de 2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y su control. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 18.9.2008, L250/1.

Reglamento (UE) nº 271/2010 de la Comisión de 24 de marzo de 2010 que modifica el Reglamento (CE) nº 889/2008 por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, en lo que atañe al logotipo de producción ecológica de la Unión Europea. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 31.3.2010, L84/19.

Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 20.1.2010, L15/1.

Roberts, M. C. (2005) Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 245, 195-203.

Rodríguez, M. A., García, T., González, I., Asensio, L., Hernández, P. E., Martín, R. (2003) PCR cuantitativo en tiempo real (I): una nueva herramienta para evaluar la calidad y seguridad de los alimentos. *Eurocarne*, 115, 1-12.

Sato, K., Bennedsgaard, T., Bartlett, P., Erskine, R., Kaneene, J. (2004) Comparison of antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bulk tank milk in organic and conventional dairy herds in the midwestern United States and Denmark. *Journal of Food Protection* 67(6):1104-10.

Schnabel, E., Jones, A. (1999) Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:4898-4907.

Schwaiger, K., Hölzel, C., Bauer, J., (2010) Resistance gene patterns of tetracycline resistant *Escherichia coli* of human and porcine origin. *Veterinary Microbiology*. 142: 329-336.

Sengeløv, G., Halling-Sorensen, B., Aarestrup, F. (2003) Susceptibility of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecium* isolated from pigs and broiler chickens to tetracycline degradation products and distribution of tetracycline resistance determinants in *E-coli* from food animals. *Veterinary Microbiology*, 95: 91-101.

Shea, K., Florini, K., Barlam, T. (2001) Executive summary. En: *When wonder drugs don't work*. 2^a ed. Ed.: Environmental defense. Washington, DC., (EE.UU.), pp. 1-39.

Smith, J. L., Drum, D. J. V., Dai, Y., Kim, J. M., Sanchez, S., Maurer, J. J., Hofacre, C. L., Lee, M. D. (2007) Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 1404-1414.

Thomas, C. M., Nielsen, K. M. (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9):711-21.

Tollefson, L., Karp, B. E. (2004) Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Medecine et Maladies Infectieuses*, 34: 514-521.

Trasande, L., Blustein, J., Liu, M., Corwin, E., Cox, L. M., Blaser, J. M. (2012) Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International Journal of Obesity*, 1-8.

Tsankov, N., Broshtilova, V., Kazandjieva, J. (2003) Tetracyclines in dermatology. *Clinics in Dermatology*, 21: 33–39.

Vadillo, S. (2002) *Manual de microbiología veterinaria*. 1ª ed. Ed. McGraw-Hill/ Interamericana de España. España, pp.133-144.

Vicente, D., Pérez-Trallero, E. (2010) Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28: 122-130.

Vidaver, A. (2002) Uses of antimicrobials in plant agriculture. *Clinical Infectious Disease*, 34(Suppl 3): S107–110.

Vignoli, R., Seija, V. (2006) Principales mecanismos de resistencia antibiótica. *Temas de bacteriología y Virología*. 2ª edición. Ed.: Oficina del libro FEFMUR. Instituto de Higiene, Montevideo (Uruguay) pp. 649- 662.

Watanabe, T. (1963) Infectious heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 27: 87–115.

Watson, J. D., Gilman, M., Witkowski, J., Zoller, M. (1992) The polymerase chain reaction. *Recombinant DNA*, 2ª edición. Ed.: Scientific American Books, EE.UU., pp. 79-95.

Young, I., Rajic, A., Wilhelm, B. J., Waddell, L., Parker, S. McEwen, S. A. (2009) Comparison of the prevalence of bacterial enteropathogens, potentially zoonotic bacteria and bacterial resistance to antimicrobials in organic and conventional poultry, swine and beef production: a systematic review and meta-analysis. *Epidemiology and Infection*, 137: 1217-1232.

