

Diss. ETH No. 14951

# Molecular analysis of antimicrobial resistance determinants of commensal lactobacilli

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH  
(ETHZ)

for the degree of  
Doctor of Technical Sciences

presented by  
Karin Yvonne Gfeller  
Dipl. Lm.-Ing. ETH  
born August 15, 1974  
citizen of Vechigen (BE)

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Michael Teuber, examiner  
PD. Dr. Leo Meile, co-examiner  
Dr. Vincent Perreten, co-examiner

Zurich, 2003

## SUMMARY

Lactic acid bacteria have been used for food preservation for a long time. Particularly lactobacilli are used in a variety of food fermentations as starter cultures, i.e. in the dairy industry for the production of cheese, yoghurt and sour milk, for the production of fermented sausages and sauerkraut. Furthermore, lactobacilli belong to the microflora of the human and animal intestine. In many countries antimicrobial agents are used in farm animals for therapy and prophylaxis of bacterial infections. In consequence of this usage, antibiotic resistance determinants occurred in bacteria isolated from farm animals. Therefore, food such as fermented sausages or raw milk cheeses may serve as vectors for the resistance determinants from the human to the animal intestinal microflora.

The aim of this study was the investigation of the occurrence of antibiotic resistance in lactobacilli, as well as the characterization of resistance determinants carried by them.

First of all, the minimal inhibitory concentration (MIC) of various antimicrobial agents was determined for 123 *Lactobacillus* species isolated from fermented food products. The lactobacilli were sensitive to the majority of the 14 tested antibiotics. In contrast to this, more than 85% of the strains showed high MIC values for vancomycin and nitrofurantoin. Only 10 strains belonging to the *Lb. delbrueckii* group, as well as 2 strains from the *Lb. casei* group showed low levels of resistance to vancomycin. Therefore, vancomycin resistance cannot be regarded as intrinsic for all *Lactobacillus* species. Furthermore, most of the lactobacilli were resistant to aminoglycosides. Since 46% of the tested *Lactobacillus* strains were resistant to tetracycline, the strains were scanned for the existence of tetracycline resistance genes by PCR. In six strains a resistance gene encoding for a ribosomal protection protein Tet(M) could be located. The detected genes showed high homologies (~99%) to Tet(M) encoded on Tn916, a tetracycline resistance transposon of *Enterococcus faecalis*. Five of these genes were detected in milk isolates, whereas the sixth determinant was observed in a strain isolated from fermented sausage.

Beside this, all tested strains were susceptible to chloramphenicol and only four *Lb. fermentum* strains showed resistance to erythromycin. All these strains harbour a 19.3-kb plasmid on which the erythromycin resistance determinant is situated. Due to this observation, the nucleotide sequence of the 19.3-kb erythromycin resistance plasmid pLME300 isolated from *Lb. fermentum* ROT1 was deter-

mined.

The sequence of pLME300 revealed 19,389 basepairs (bp) and G+C content of 36.5%. Eighteen open reading frames (ORF) were proposed. Based on database searches of the obtained ORFs pLME300 was divided into four different functional regions. Region I is possibly involved in the replication of the plasmid, since ORF1 shows high homologies to different replication proteins located on different theta-replicating plasmids. In addition, a putative origin of replication (*oriR*) could be located within this region. In consequence of the determination of ORF3 as a possible methylase and the homologies of ORF4 to Mrr restriction system proteins of *Escherichia coli*, the genes of region II may encode for a restriction-modification system. The third region harbours the antibiotic resistance genes. The determinant for the macrolid-lincosamide-streptogramin B (MLS) methylase Erm(LF) and streptogramin A acetyltransferase VatE, which is 100% identical to Vat(E) from *Enterococcus faecium*. Furthermore, region III shows at 4.5 kb a high sequence identity (91%) to a DNA fragment of *Enterococcus faecium*. This fragment holds a linkage of MLS- and streptogramin A resistance determinants which is often observed in European enterococcal poultry isolates. Region IV contains ORFs that appear to be involved in plasmid mobilization, since ORF17 shows homologies with relaxases and MobA proteins. Due to the absence of any other transfer proteins, pLME300 is a mobilizable plasmid and not capable of mediating its own transfer.

pLME300 is the largest completely sequenced antibiotic resistance plasmid isolated from *Lactobacillus* so far. The presence of 3 different antibiotic resistance determinants in lactobacilli isolated from fermented food, as well as the high homologies to enterococcal resistance determinants, indicates the potential function of the food chain as a shuttle vector for antimicrobial resistance genes.

## ZUSAMMENFASSUNG

Milchsäurebakterien werden seit langer Zeit zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt. Insbesondere Laktobazillen werden bei einer Vielzahl von verschiedenen Fermentationen als Starterkulturen verwendet, so zum Beispiel in der Milchindustrie zur Herstellung von Käse, Joghurt und Sauermilch, in der Salamiproduktion, zur Herstellung von Sauerkraut und anderen Fermentationsprodukten. Weiter gehören Laktobazillen der natürlichen Darmflora von Mensch und Tier an. Antibiotika werden in den natürlichen Habitaten von Laktobazillen häufig eingesetzt, z. Bsp. bei der Behandlung von Mastitis bei Milchkühen oder therapeutisch, in manchen Ländern sogar prophylaktisch, bei der Aufzucht von Jungtieren. Der Kontakt von Laktobazillen mit Antibiotika dürfte die Ausbildung von resistenten Keimen fördern. Daher kann man davon ausgehen, dass Lebensmittel wie Rohwürste und Rohmilchkäse als Drehscheibe für antibiotikaresistente Bakterien von der tierischen zur menschlichen Mikroflora dienen.

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Antibiotikaresistenzprofile von Laktobazillen näher zu untersuchen und allfällige Resistenzgene näher zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt wurde die minimale Hemmstoffkonzentration (MHK) verschiedener Antibiotika bei 123 *Lactobacillus* Spezies aufgenommen. Die getesteten Stämme wurden alle aus verschiedenen fermentierten Lebensmitteln isoliert. Die untersuchten Laktobazillen waren gegen die meisten der 14 getesteten Antibiotika sensitiv. Im Gegensatz dazu stand die Beobachtung, dass mehr als 85% der Stämme resistent gegen Vancomycin und Nitrofurantoin waren. Nur gerade 10 Vertreter der *Lb. delbrueckii*, sowie 2 Vertreter der *Lb. acidophilus* Gruppe waren sensitiv gegen Vancomycin. Daraus folgte, dass Vancomycin-Resistenz nicht bei allen *Lactobacillus* Spezies als intrinsisch angenommen werden kann. Weiter wurde ein häufiges Auftreten grosser MHK's (> 64 µg/ml) bei Antibiotika die der Gruppe der Aminoglykoside angehören beobachtet. Da 46% der getesteten Laktobazillen resistent gegen Tetracyclin waren, wurden diese Stämme auf das Vorhandensein von Resistenzdeterminanten untersucht. In sechs verschiedenen Isolaten konnte mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion ein Gen, welches für ein ribosomal schützendes Protein Tet(M) codiert, nachgewiesen werden. Die Sequenzen der erhaltenen PCR Produkte waren alle unterschiedlich und zeigten hohe Homologien (~99%) zu *tet(M)*, lokalisiert auf dem *Enterococcus* Transposon Tn916. Fünf der untersuchten Resistenzdeterminanten stammten aus Milch-Isolaten, das sechste Tetracyclinresistenzgen hingegen wurde in einem

Rohwurst-Isolat nachgewiesen.

Alle getesteten *Lactobacillus* Stämme waren sensitiv gegen Chloramphenicol und nur gerade vier *Lb. fermentum* Isolate zeigten Resistenz gegen Erythromycin. Diese Stämme tragen alle ein 19.3-kb Plasmid, auf welchem die Erythromycinresistenz lokalisiert werden konnte. Aus diesem Grund wurde die Nukleinsäuresequenz von pLME300, einem 19.3-kb Erythromycin-Resistenz Plasmid isoliert aus *Lb. fermentum* ROT1, bestimmt.

Die Länge der gesamten Sequenzen von pLME300 beträgt 19'389 Basenpaare (bp) und der G+C Gehalt ist 36.5%. Achtzehn offene Leseraster (ORF) wurden auf pLME300 identifiziert. pLME300 konnte anhand der Sequenzanalyse von verschiedenen ORF's in vier verschiedene funktionelle Regionen unterteilt werden. Die erste Region kodiert für die putative Replikationsregion des Plasmids. Dabei weist ORF1 hohe Homologien zu verschiedenen Replikationsproteinen theta-replizierender Plasmide auf und der putative Replikationsursprung (*oriR*) konnte innerhalb dieser Region bestimmt werden. Da ORF3 als eine putative Methylase identifiziert und ORF4 eine grosse Ähnlichkeit zu Mrr Restriktionsproteinen aufweist, wurde die zweite Region als Kodierungsstelle für ein mögliches Restriktions-Modifikationssystem identifiziert. Die dritte funktionelle Region von pLME300 trägt zwei Antibiotika-Resistenzdeterminanten. Es handelt sich dabei um eine Erythromycinmethylase (*ermLF*) sowie eine Streptogramin-A-actetyltransferase (*vatE*), welche 100% identisch zu *vatE* aus *Enterococcus faecium* ist. Weiter weist diese Region über 4.5 kb eine sehr grosse Homologie (91%) zu einem DNA Fragment aus *Enterococcus faecium* auf. Dieses Enterokokken Fragment trägt die in Europa häufig in Poulet-Isolaten gefundene Verknüpfung zwischen Makrolid-Lincosamid-Streptogramin B- und Streptogramin A-Resistenzdeterminanten. In der vierten und letzten Region konnte eine putative Mobilisierungsregion bestimmt werden. Dabei zeigt ORF17 Homologien zu verschiedenen MobA Proteinen. Da weitere Transfergene auf pLME300 fehlen, handelt es sich bei diesem Plasmid nicht um ein selbstmobilisierbares Plasmid. Für eine mögliche Mobilisierung ist es auf Funktionen anderer Transfergene angewiesen, welche auf chromosomal oder auf anderen Plasmiden kodiert sind.

pLME300 ist das bis heute grösste, vollständig sequenzierte Resistenzplasmid, das aus einem *Lactobacillus*-Stamm isoliert wurde. Der Nachweis von 3 unterschiedlichen Antibiotika-Resistenzdeterminanten in Laktobazillen, welche aus fermentierten Lebensmitteln isoliert wurden, sowie die hohen Homologien zu Determinanten isoliert aus Enterokokken, zeigt deutlich, dass Laktobazillen als Vektoren für Resistenzgene dienen können.