



# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A LA ERITROMICINA EN MUESTRAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA DURANTE SU MADURACIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN  
DE LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

**ALUMNA:** Lady Viviana Esteve Ambrosio

**TUTORA ACADÉMICA:** Dra. Salut Botella Grau

**DIRECTORA EXPERIMENTAL:** Dña. Aya Boukharouba

**Curso Académico:** 2017-2018

**VALENCIA,** Septiembre 2018

# **DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A LA ERITROMICINA EN MUESTRAS DE LECHE Y QUESO DE CABRA DURANTE SU MADURACIÓN**

## **RESUMEN**

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas pero su uso indebido en hombre y animales está provocando un aumento en la aparición de resistencias microbianas frente a ellos, complicando así su tratamiento y causando un incremento de la mortalidad. La evolución de las bacterias hacia la resistencia a los antibióticos, e incluso a la multiresistencia, es inevitable porque los genes que la codifican ya existen en la naturaleza. El fenómeno de la resistencia puede surgir por mutaciones de genes, pero también puede adquirirse por transmisión horizontal a partir de información genética exógena. Ambos mecanismos no son mutuamente exclusivos y pueden asociarse produciéndose una diseminación más eficiente de la resistencia. Lo único que podemos hacer es retrasar la diseminación de las bacterias resistentes o de los genes de resistencia.

El objetivo de este trabajo ha sido optimizar las condiciones de la detección de genes de resistencia a la eritromicina, antibiótico utilizado en el tratamiento de animales y en la elaboración de quesos, y valorar la relación de la presencia de genes de resistencia con el tiempo de maduración de los quesos.

Para la realización de este trabajo se han utilizado diferentes muestras de leche, obtenidas de cabras Murciano-Granadinas criadas en la granja de la Universidad Politécnica de Valencia y los quesos elaborados a partir de ellas.

Los resultados permiten valorar positivamente el tiempo de maduración de los quesos elaborados, observándose una disminución en la detección de genes de resistencia a la eritromicina intracelulares a medida que aumenta el tiempo de maduración, aunque no llegan a desaparecer y, por consiguiente, podrían llegar al consumidor con el producto final.

**Palabras clave:** genes de resistencia, eritromicina, leche, queso, maduración.

# **DETECCIÓ DE GENS DE RESISTÈNCIA A L'ERITROMICINA EN MOSTRES DE LLET I FORMATGE DE CABRA DURANT LA SEUA MADURACIÓ**

## **RESUM**

Els antibiòtics són medicaments utilitzats per a previndre i tractar les infeccions bacterianes però el seu ús indegut en home i animals està provocant un augment en l'aparició de resistències microbianes enfront d'ells, complicant així el seu tractament i causant un increment de la mortalitat. L'evolució dels bacteris cap a la resistència als antibiòtics, i inclús a la multiresistència, és inevitable perquè els gens que la codifiquen ja existixen en la naturalesa. El fenomen de la resistència pot sorgir per mutacions de gens, però també pot adquirir-se per transmissió horitzontal a partir d'informació genètica exògena. Ambdós mecanismes no són mútuament exclusius i poden associar-se produint-se una disseminació més eficient de la resistència. L'única cosa que podem fer és retardar la disseminació dels bacteris resistentos o dels gens de resistència.

L'objectiu d'este treball ha sigut optimitzar les condicions de la detecció de gens de resistència a l'eritromicina, antibiòtic utilitzat en el tractament d'animals

i en l'elaboració de formatges, i valorar la relació de la presència de gens de resistència amb el temps de maduració dels formatges.

Per a la realització d'este treball s'han utilitzat diferents mostres de llet, obtingudes de cabres Murciano-Granadinas criades en la granja de la Universitat Politècnica de València i els formatges elaborats a partir d'elles.

Els resultats permeten valorar positivament el temps de maduració dels formatges elaborats, observant-se una disminució en la detecció de gens de resistència a l'eritromicina intracel·lulars a mesura que augmenta el temps de maduració, encara que no arriben a desaparèixer i, per consegüent, podrien arribar al consumidor amb el producte final.

**Paraules clau:** gens de resistència, eritromicina, llet, formatge, maduració.

## **DETECTION OF GENE RESISTANCE TO ERYTHROMYCIN IN SAMPLES OF MILK AND GOAT CHEESE DURING ITS MATURATION**

### **ABSTRACT**

Antibiotics are drugs used to treat and treat bacterial infections but their misuse in humans and pets is causing an increase in the appearance of microbial resistance to them, thus complicating the treatment and causing an increase in mortality. The evolution of bacteria towards resistance to antibiotics, and even multidrug resistance, is inevitable because the genes that code for it already exist in nature. The phenomenon of resistance can arise from gene mutations but can also be acquired by horizontal transmission from exogenous genetic information. Both mechanisms are not mutually exclusive and can be associated producing a more efficient dissemination of resistance. All we can do is delay the spread of resistant bacteria or resistance genes.

The objective of this work has been to optimize the conditions of the detection of resistance genes to erythromycin, an antibiotic used in the treatment of animals and in the elaboration of cheeses, and to evaluate the relationship of the presence of resistance genes with the time of ripening of the cheeses.

To carry out this work, different samples of milk have been used, obtained from Murciano-Granadina goats raised on the farm of the Polytechnic University of Valencia and the cheeses made from them.

The results allow a positive evaluation of the maturation time of the processed cheeses, with a decrease in the detection of intracel·lular genes of resistance to erythromycin as the maturation time increases, although they do not disappear and, therefore, could reach the consumer with the final product.

**Key words:** resistance genes, erythromycin, milk, cheese, maturation.

## I. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas pero su uso indebido en el ser humano y animales está provocando un **aumento en la aparición de resistencias** microbianas frente a ellos, complicando así su tratamiento y causando un incremento de la mortalidad. La evolución de las bacterias hacia la resistencia a los antibióticos, e incluso a la **multirresistencia**, es inevitable porque los genes que la codifican **ya existen en la naturaleza**. El fenómeno de la resistencia puede **surgir por mutaciones** de genes estructurales o reguladores, pero también puede **adquirirse por transmisión horizontal** a partir de información genética exógena. Ambos mecanismos no son mutuamente exclusivos y pueden asociarse produciéndose una **diseminación más eficiente de la resistencia**. Lo único que podemos hacer es **retrasar la diseminación** de las bacterias resistentes o de los genes de resistencia (Gómez-Lus & Rubio, 2009; OMS, 2018).

Desde el principio de la era antibiótica se han descrito los fenómenos de resistencia y actualmente se han identificado las cepas resistentes, tal es el caso de la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina por su capacidad de degradar a este antibiótico, posteriormente resurge esta misma cepa presentando resistencia a otro antibiótico conocido como meticilina. Se pensaba que el descubrimiento o el diseño de nuevos antibióticos podría resolver el problema, es entonces cuando aparecen medicamentos tales como los macrólidos, glicopéptidos, aminoglucósidos entre otros, con los cuáles se observa una respuesta favorable contra las enfermedades infecciosas. Sin embargo, también aparecen nuevos mecanismos de resistencia difíciles de controlar y entonces surgen las bacterias que sobreviven a la presencia de más de un antibiótico, conocidas como **multirresistentes** (Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013).

La resistencia bacteriana **tanto natural como adquirida** se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad. Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden darse simultáneamente (Pérez-Cano & Robles-Contreras, 2013).

En veterinaria, las sustancias antimicrobianas se emplean con fines terapéuticos para tratar infecciones y como profilácticos para prevenirlas. En ambos casos, los antibióticos deben ser suministrados bajo el control de un profesional veterinario y de acuerdo con la normativa vigente que controla y reduce de manera exhaustiva el empleo de los antibióticos como promotores del crecimiento en Europa (European Commission, 2018; Moreno *et al.*, 2000; Reglamento 1831/2003/CE sobre aditivos para uso en la alimentación animal).

Para controlar la presencia de los residuos veterinarios en los alimentos y proteger a la salud pública, se establecen los Límites Máximos de Residuos (LMR) definidos en el Reglamento 470/2009/CE como “la concentración máxima de residuo de una sustancia farmacológicamente activa (expresado en µg/kg o

g/kg sobre la base del peso en fresco) que puede permitirse en los alimentos de origen animal”.

El peligro de la resistencia a antibióticos no sólo se debe enfocar hacia la búsqueda de bacterias resistentes a antibióticos, sino también hacia la detección de los genes que codifican dichas resistencias, ya que éstos pueden ser transferidos de unos microorganismos a otros por transferencia horizontal mediante los mecanismos de **Transformación, Conjugación o Transfección** (Bertomeu, 2017).

**Esta transferencia horizontal de los genes de resistencia está mediatizada por plásmidos, transposones, integrones (o intrones) o casetes génicos.** La resistencia bacteriana a los antibióticos en los bacilos gramnegativos suele estar mediada por **plásmidos R**, y los genes vehiculados, por transposones, integrones y empaquetados en casetes génicas. En los cocos grampositivos, son fundamentales los **transposones conjugativos** cromosómicos, caracterizados por compartir rasgos con plásmidos R, bacteriófagos y transposones clásicos. Todos estos elementos desempeñan un papel central en la evolución, proporcionan mecanismos para generar diversidad y, con los sistemas de transferencia de DNA, para su diseminación a otras bacterias (Cortecero & Benítez, 2011; Gómez-Lus & Rubio, 2009).

Los alimentos pueden actuar como vector para la transferencia de bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos a los seres humanos ya que pueden contaminarse con bacterias resistentes y/o genes de resistencia en los alimentos seleccionados por el uso de antibióticos durante la producción agropecuaria, por la presencia de genes de resistencia en las bacterias que se añaden intencionadamente durante el procesamiento de alimentos (cultivos iniciadores, probióticos, otros) o por contaminación en la manipulación durante la elaboración de alimentos (López, 2016).

Uno de estos antibióticos es la eritromicina, perteneciente al grupo de los macrólidos, antimicrobianos descubiertos en 1952 a partir de los productos metabólicos derivados de *Streptomyces erytherus*. En cuanto a su espectro de acción, la eritromicina presenta buena actividad sobre ***Staphylococcus aureus***, *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Listeria monocytogenes*, *Bordetella pertussis*, *Actinomyces* spp., *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia* spp. y *Rickettsias* (Muñoz, 1998).

Actualmente los macrólidos se utilizan en aves de postura principalmente para el tratamiento de enfermedades respiratorias, actuando sobre bacterias del género *Mycoplasma* y bacterias Gram positivas (Muñoz, 2011). En el caso de las ovejas y las cabras, la eritromicina es utilizada principalmente para el tratamiento de patologías mamarias (Marcos-Sainero, 2009).

En cuanto a su mecanismo de acción, inhiben la síntesis proteica a nivel del ribosoma bacteriano; uniéndose a la subunidad 23s del RNAr mediante la formación de puentes de hidrógeno entre diferentes radicales hidroxilos del macrólido y determinadas bases del RNAr. Esto provoca un bloqueo en las reacciones de transpeptidación y traslocación. Es importante destacar que los ribosomas bacterianos difieren estructuralmente de sus homólogos eucariotas, por lo que los antimicrobianos que actúan sobre este orgánulo, lo hacen de manera selectiva, atacando solo a las células bacterianas.

Las metilasas que actúan sobre la subunidad 23s del RNAr son codificadas por genes *erm* (*erythromycin ribosome methylase*, *ermA*, *ermB* *ermC*, entre otros) los cuales confieren resistencia cruzada con macrólidos, lincosamidas y estreptogaminas. El gen *ermB* es el detectado con mayor frecuencia y generalmente se encuentra asociado a **plásmidos conjugativos o a transposones**, junto a otros determinantes genéticos de resistencia. Existen además los genes *ermA* y *ermC* que, al igual que *ermB*, actúan metilando la subunidad 23s del RNAr pero se detectan con menor frecuencia (Muñoz, 2011).

Entre los cocos grampositivos como *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*, la transferencia de genes de resistencia a macrólidos está mediada por transposones cromosómicos, como el Tn15452. Además, muchos de los determinantes genéticos de resistencia que ahora se encuentran en plásmidos pueden tener su origen en el cromosoma de otras especies (Gómez & Rubio, 2009).

Ya que es posible la presencia de genes de resistencia a la eritromicina en muestras de leche de cabras, y pueden aparecer en cepas de estafilococos, microorganismos presentes en alimentos con una elevada manipulación como los quesos artesanales, el objetivo de este trabajo ha sido comprobar si la maduración de los quesos elaborados con esta leche puede ser un modo de evitar esa transferencia horizontal de los genes de resistencia a otros microorganismos y al consumidor.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Diseño Experimental

Se ha estudiado la presencia de genes de resistencia a la eritromicina en tres muestras de leche cruda (L1, L2, L3) de cabras Murciano-Granadinas del rebaño experimental de la Universidad Politécnica de Valencia (UPV), y en los quesos de Tronchón elaborados a partir de las tres muestras (Q1, Q2, Q3), a diferentes tiempos de maduración ( $t_0$ ,  $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ).

La leche se recogió, tras el ordeño mecánico, el mismo día de la elaboración del queso y se conservó refrigerada a 4 °C hasta su uso. A partir de cada muestra de leche se elaboró un lote de quesos sin antibiótico (control: L1, L2, L3) y otro lote con la leche suplementada con eritromicina (L1e, L2e, L3e), a una concentración equivalente al LMR establecido por la Unión Europea (40 µg/kg). Los quesos de tipo Tronchón se maduraron durante 60 días, realizando la toma de muestras para las determinaciones analíticas a diferentes tiempos (0, 30 y 60 días). La fabricación de los quesos y las determinaciones microbiológicas y bioquímicas se realizaron en un trabajo anterior (Esteve, 2017).

Debido a la presencia de estafilococos en todas las muestras (datos obtenidos en un trabajo anterior) se seleccionó el caldo de enriquecimiento Giolitti-Cantoni para la obtención del DNA de las muestras: con 1 mL de las muestras de leche y 1 mL del caldo de preenriquecimiento en Agua de Peptona Tamponada a partir de las muestras de queso. Se analizaron un total de 24 muestras para este estudio (**Tabla 1**). Todas las muestras se analizaron por duplicado.

**Tabla 1.** Muestras de Leche y Quesos estudiadas

	Leche		Queso	
Sin eritromicina	L1	Q1t <sub>0</sub>	Q1t <sub>30</sub>	Q1t <sub>60</sub>
	L2	Q2t <sub>0</sub>	Q2t <sub>30</sub>	Q2t <sub>60</sub>
	L3	Q3t <sub>0</sub>	Q3t <sub>30</sub>	Q3t <sub>60</sub>
Con adición de eritromicina	L1e	Q1et <sub>0</sub>	Q1et <sub>30</sub>	Q1et <sub>60</sub>
	L2e	Q2et <sub>0</sub>	Q2et <sub>30</sub>	Q2et <sub>60</sub>
	L3e	Q3et <sub>0</sub>	Q3et <sub>30</sub>	Q3et <sub>60</sub>

e: con adición de eritromicina; L: leche; Q: queso; t: tiempo de maduración del queso

## 2. Obtención del DNA de las muestras

La obtención del DNA de las muestras se realizó utilizando un Kit de extracción de DNA intracelular y por centrifugación para la obtención de DNA extracelular.

### Extracción con el Kit GenElute

La extracción de DNA de las muestras de leche y queso a partir del medio de enriquecimiento se realizó mediante el kit GenElute (Sigma-Aldrich-Merck), siguiéndose las instrucciones del fabricante para microorganismos Gram positivos con la adición de lisozima para la lisis celular.

Las muestras de enriquecimiento (1 mL Caldo Giolitti-Cantoni) se centrifugaron a 16160 g durante 2 minutos. Después se desestimó el sobrenadante y se añadió al sedimento 200 µL de lisozima (Sigma-Adrich) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 minutos. Durante el tiempo de incubación se preparó la columna, añadiendo 500 µL de reactivo específico para humedecer el filtro y se centrifugó a 12000 g durante 1 minuto. Tras el tiempo de lisis se añadió 20 µL RNAsa (90 mg lisozima en 1 mL de Reactivo Gram + de Sigma-Aldrich), 20 µL Proteinasa K (10 µg de Proteína K/0,5 µL Agua miliQ estéril) y 200 µL del reactivo de Lisis C (Sigma-Aldrich-Merck). Se incubaron las muestras a 55 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se añadió 200 µL de Etanol absoluto, se homogenizaron y centrifugaron las muestras a 6500 g durante 1 minuto. Se lavaron las muestras con 500 µL Solución de lavado 1 (Sigma-Aldrich-Merck) y 500 µL Concentrado de Solución de lavado (Sigma-Aldrich-Merck). Finalmente, se añadió 200 µL del reactivo Eluyente (Sigma-Aldrich-Merck), se centrifugaron a 6500 g durante 1 minuto y se conservaron las muestras a -20 °C para evitar que se degradaran, hasta su utilización.

### Extracción por centrifugación

Se centrifugaron las muestras de leche y queso (1 mL del caldo Giolitti-Cantoni) a 13000 g durante 8 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 µL de TE (Solución Tampón). Con este tratamiento se concentró el DNA extracelular de las muestras.

Los extractos, tanto por el Kit como por centrifugación, se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1,2 % con tampón TAE 1x (Tris-base, Ácido acético y EDTA) y Red Safe al 5 % (para la tinción de ácidos nucleicos). Se cargaron en el gel 5 µL de cada extracto con 1 µL de tampón de carga (DNA

Gel Loading, Ref. R0611, Thermo Scientific). Se utilizó el equipo de electroforesis Apelex PS 304 Minipac electroforesis, a un voltaje de 80 V durante dos horas y las bandas se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat con luz UV.

### 3. Reacción en cadena de la Polimerasa

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se basa en la copia de un fragmento de DNA mediante la acción del encima Taq polimerasa a partir de un cebador, y una posterior amplificación o aumento del número de copias para permitir su detección tras electroforesis en gel de agarosa y visualización de las bandas obtenidas por tinción específica del DNA.

Para la realización de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica sobre las condiciones desarrolladas por otros autores para detectar genes de resistencia a la eritromicina en diferentes matrices de alimentos, y se decidió partir de las condiciones descritas por Chen *et al.* en 2007.

En la detección de los genes de resistencia a la eritromicina *erm* en leche y queso, se utilizaron los cebadores siguientes: *ermA*, *ermB* y *ermC*, que amplifican un fragmento de 332, 364 y 642 pb de DNA cromosómico respectivamente, como se puede observar en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Secuencias de los cebadores *erm*, amplicones y temperatura de alineamiento específicas

Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
<i>ermA-106f</i>	GAA ATY GGR TCA GGA AAA GG	332	55
<i>ermA-437r</i>	AAY AGY AAA CCY AAA GCT C		
<i>ermB-91f</i>	GAT ACC GTT TAC GAA ATT GG	364	58
<i>ermB-454r</i>	GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC		
<i>ermC-43f</i>	TCA AAA CAT AAT ATA GAT AAA	642	50
<i>ermC-684r</i>	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT		

Chen *et al.* (2007)

#### **Selección de temperatura de alineamiento para PCR múltiple**

A partir de las condiciones descritas por Chen *et al.* (2007), se decidió realizar un gradiente de temperatura para saber cuál era la temperatura idónea de alineamiento para los tres cebadores presentes: *ermA*, *ermB* y *ermC*. Se utilizó una muestra en la que previamente se pudo amplificar el fragmento de 364 pb del gen de resistencia a la eritromicina amplificado por los cebadores *ermB* (L3e) y se realizó una amplificación con las siguientes condiciones: una fase de desnaturalización inicial de 94 °C durante 4 min, seguida de 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, un alineamiento con los cebadores a un gradiente de temperaturas: **50 °C, 51,7 °C, 55,4 °C, 56,7 °C y 57,9 °C** durante 30 s, y una extensión a 72 °C durante 45 s y finalmente una extensión final a 72 °C durante 7 min. El termociclador utilizado en este trabajo fue el Mastercycler® ep de Eppendorf.

#### **PCR múltiple**

En este trabajo se desarrolló una PCR múltiple para amplificar los tres genes de resistencia a la eritromicina en la misma reacción.



Para la reacción de amplificación múltiple del DNA se prepararon tubos eppendorf de 0,2 mL con un volumen final de 29  $\mu$ L (0,25  $\mu$ L Taq polimerasa, 2,5  $\mu$ L tampón, 1,25  $\mu$ L  $MgCl_2$ , 0,2  $\mu$ L dNTPs, 0,25  $\mu$ L *ermA*-f, 0,25  $\mu$ L *ermA*-r, 0,25  $\mu$ L *ermB*-f, 0,25  $\mu$ L *ermB*-r, 0,25  $\mu$ L *ermC*-f, 0,25  $\mu$ L *ermC*-r y 22,3  $\mu$ L de agua miliQ), se añadió 1  $\mu$ L de extracto de DNA de cada muestra. En cada reacción de amplificación se incluyó un control positivo con DNA que procedía de una muestra con un fragmento de *ermB* amplificado en reacciones previas (L3e), y un control negativo sin DNA, con 1  $\mu$ L de agua miliQ.

Las condiciones de la amplificación fueron: una primera fase de desnaturalización inicial de 94 °C durante 4 min, seguida de 30 ciclos con una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, un alineamiento con los cebadores a 54 °C durante 30 s, y una extensión a 72 °C durante 45 s y finalmente una extensión final a 72 °C durante 7 min.

Finalmente, los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % con tampón TAE 1x (Tris-base, Ácido acético y EDTA) y Red Safe al 5 % (para la tinción de ácidos nucleicos). Se cargaron en el gel 5  $\mu$ L de cada amplificado con 1  $\mu$ L de tampón de carga (DNA Gel Loading, Ref. R0611, Thermo Scientific). Se utilizó el equipo de electroforesis Apelex PS 304 Minipac electroforesis, a un voltaje de 80 V durante dos horas y las bandas se visualizaron mediante un transiluminador Vilber Lourmat con luz UV.

#### 4. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos cualitativos obtenidos se llevó a cabo mediante el programa IBM SPSS Statistics (software estadístico, España). Se realizaron tablas de contingencia o tablas cruzadas (bidimensionales). Una tabulación cruzada mostró la frecuencia conjunta de los valores de datos con base las variables categóricas, en este caso hemos tenido en cuenta diversas variables como “**adición de eritromicina**”, “**% de amplificación del fragmento de *ermB***”, “**tiempo de maduración de los quesos**”, “**método de extracción**”, “**muestra de leche**” y “**muestra de queso**”.

Los datos de frecuencia conjunta se analizaron con el estadístico de Chi-cuadrado para evaluar si las variables estaban asociadas o eran independientes. El estadístico de contraste observado sigue aproximadamente una Chi-cuadrado con  $(k - 1) \times (m - 1)$  grados de libertad.

$$\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^m \frac{(n_{ij} - e_{ij})^2}{e_{ij}} = \chi_{(k-1) \cdot (m-1)}^2$$

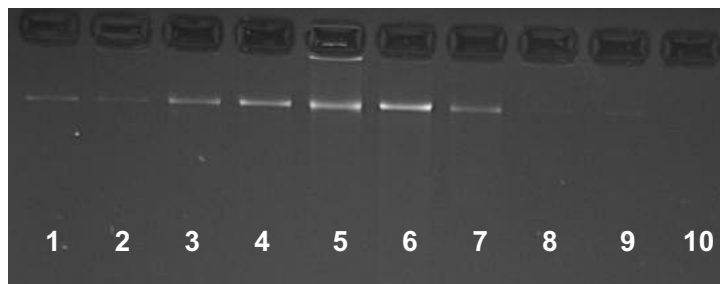
Para un nivel de significación  $\alpha = 0.05$ , representa un Intervalo de confianza del 95 %, así se puede contrastar la diferencia significativa entre las dos distribuciones empíricas o la independencia de las distribuciones empíricas.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

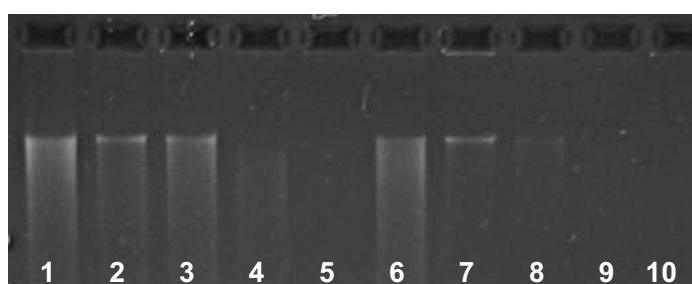
#### 1. Extracción de DNA

Se realizó la extracción de 1 mL del medio de Giolitti-Cantoni de las 24 muestras: 3 de leche control y con eritromicina, y los 3 quesos elaborados a los diferentes tiempos de maduración, con las dos metodologías detalladas en Materiales y Métodos, el kit GenElute para la extracción del **DNA intracelular (Figura 1)** y por centrifugación para concentrar el **DNA extracelular (Figura 2)**.

Se visualizó el producto de la extracción tras electroforesis en geles de agarosa de todas las muestras, observándose una banda de DNA de diferentes intensidades.



**Figura 1.** Gel de extracción de DNA con el kit GenElute: 1. Q1t<sub>60</sub>; 2. Q1et<sub>60</sub>; 3. L2; 4. L2e; 5. Q2t<sub>60</sub>; 6. Q2et<sub>60</sub>; 7. Q3e; 8. Q3t<sub>60</sub>; 9. Q3et<sub>60</sub>; 10. Control negativo

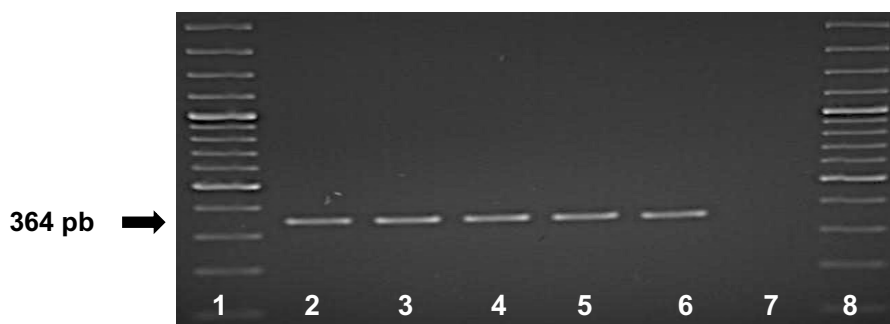


**Figura 2.** Gel de extracción de DNA por centrifugación: 1. L2; 2. L1; 3. L3; 4. L3 (caldo verde brillante); 5. L3 (caldo Tetrionato); 6. L3 (caldo Rappaport Vassiliadis); 7. *E. coli* 1; 8. *E. coli* 3; 9. *St. aureus* 1; 10. *St. aureus* 2

## 2. Detección de genes de resistencia a la Eritromicina por PCR

### Selección de la Temperatura de alineamiento para PCR múltiple

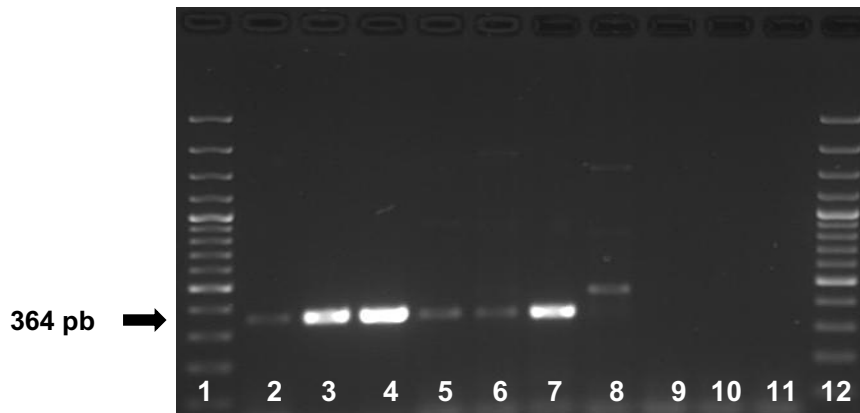
El resultado de la amplificación de la muestra L3 a diferentes temperaturas (gradiente de temperaturas) se visualizó tras electroforesis en gel de agarosa, pero no se observó gran diferencia de intensidad de las bandas *ermB* (**Figura 3**), por lo que se decidió utilizar la temperatura intermedia de 54 °C para favorecer también la amplificación de los fragmentos de 332 pb y 642 pb respectivamente por los cebadores de los genes *ermA* y *ermC*.



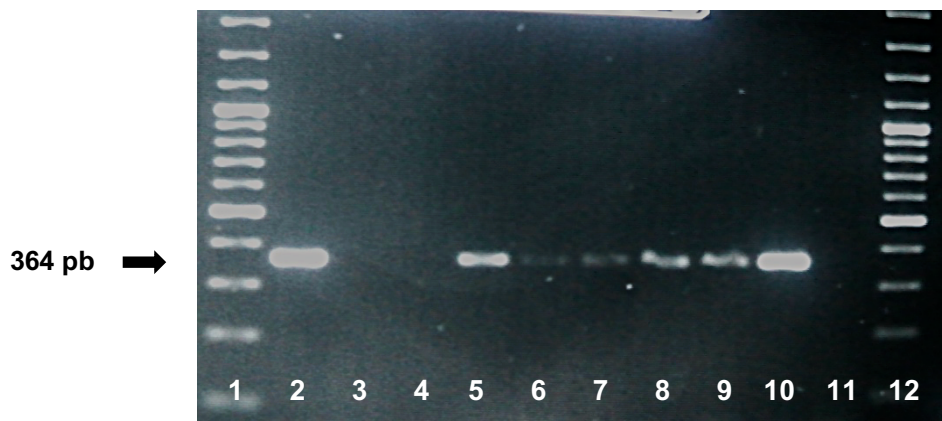
**Figura 3.** Gradiente de temperatura de alineamiento del cebador. La muestra utilizada es L3. 1. Marcador 100 pb; 2. 50 °C; 3. 51,7 °C; 4. 55,4 °C; 5. 56,7 °C; 6. 57,9 °C; 7. Control negativo; 8. Marcador 100 pb.

### PCR múltiple

Se amplificó el DNA de los genes de resistencia a la eritromicina en las muestras de leche y queso, extraído por Kit GenElute y por centrifugación. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa tras electroforesis y se observó bajo luz UV (**Figura 4** y **Figura 5**).



**Figura 4.** Resultados de detección de genes de resistencia a *ermB*. Extracción por el Kit. 1. Marcador 100 pb; 2. L2; 3. L3; 4. L3e; 5. Q3; 6. Q2; 7. Q2e; 8. *E. coli* 2; 9. *St. Aureus* 1; 10. *St. aureus* 2; 11. Control negativo; 12. Marcador 100 pb



**Figura 5.** Resultados de detección de genes de resistencia a la eritromicina (PCR). Extracción por centrifugación. 1. Marcador 100 pb; 2. Control positivo L3e; 3. L1; 4. Q1; 5. Q1t<sub>30</sub>; 6. Q1t<sub>60</sub>; 7. L1e; 8. Q1e; 9. Q1et<sub>30</sub>; 10. Q1et<sub>60</sub>; 11. Control negativo; 12. Marcador 100 pb.

En nuestros resultados de amplificación por PCR múltiple no obtuvimos en ningún caso presencia de las bandas de los genes de resistencia a la eritromicina *ermA* y *ermC* con los cebadores específicos. Solo se detectó el fragmento de 364 pb correspondiente al gen de resistencia *ermB* en el 62,5 % de las muestras (30/48). Estos resultados se presentan en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.** Detección de genes de resistencia a la eritromicina (*ermB*) extracelular (Centrifugación) e intracelular (Kit GenElute)

Centrifugación			
L1	–	L1e	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q1 t <sub>0</sub>	–	Q1e t <sub>0</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q1 t <sub>30</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>	Q1e t <sub>30</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q1 t <sub>60</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q1e t <sub>60</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>
L2 C	–	L2e C	–
Q2 t <sub>0</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>	Q2e t <sub>0</sub>	–
Q2 t <sub>30</sub>	–	Q2e t <sub>30</sub>	–
Q2 t <sub>60</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q2e t <sub>60</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
L3	–	L3e GC	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q3 t <sub>0</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q3e t <sub>0</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q3 t <sub>30</sub>	–	Q3e t <sub>30</sub>	–
Q3 6 t <sub>60</sub>	–	Qe3 t <sub>60</sub>	–
Kit GenElute			
L1	–	L1e	<b>++</b> <i>ermB</i>
Q1 t <sub>0</sub>	–	Q1e t <sub>0</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>
Q1 t <sub>30</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q1e t <sub>30</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q1 t <sub>60</sub>	–	Q1e t <sub>60</sub>	–
L2c	<b>++</b> <i>ermB</i>	L2e C	<b>++</b> <i>ermB</i>
Q2 t <sub>0</sub> C	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q2e t <sub>0</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>
Q2 t <sub>30</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>	Q2e t <sub>30</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>
Q2 t <sub>60</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q2e t <sub>60</sub>	<b>++</b> <i>ermB</i>
L3	<b>++</b> <i>ermB</i>	L3e	<b>++</b> <i>ermB</i>
Q3 t <sub>0</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q3e t <sub>0</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q3 t <sub>30</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>	Q3e t <sub>30</sub>	<b>+</b> <i>ermB</i>
Q3 t <sub>60</sub>	–	Q3e t <sub>60</sub>	–

C: Caldo Verde Brillante; e: adición de eritromicina; ++: banda del fragmento de *ermB* muy intensa; +: banda del fragmento de *ermB* de intensidad media; -: sin banda *ermB*

En otros trabajos similares, también detectaron únicamente el gen de resistencia a la eritromicina *ermB* en el 55,5 % de las muestras de agua de depuradoras, 86 % de muestras de queso, 48,6 % y 18,89 % de muestras de la microbiota intestinal de gallinas (Bertomeu 2017; Hummel *et al.*, 2007; Muñoz, 2011 y Ripoll, 2017).

Ramos *et al.* (2014) demostraron que los transposones tienen gran impacto en la difusión de resistencia a macrólidos (*ermB*) y contribuyen a la diseminación de marcadores de resistencia a otros antibióticos. Estos autores también detectaron genes de resistencia a la eritromicina *ermB* en el 98 % de las muestras clínicas estudiadas.

A diferencia de nuestros resultados, otros trabajos no detectaron el gen de *ermB*, y sí detectaron *ermA* y *ermC* en muestras clínicas (Lina *et al.*, 1999 y Merino-Díaz *et al.* 2007).

### 3. Análisis estadístico de los resultados

#### Muestras de Leche de cabra

Las variables contempladas en este estudio para la leche fueron las siguientes: “adición de eritromicina”, “% de amplificación del fragmento de *ermB*”, “método de extracción” y “muestra de leche”. Los resultados se muestran en las **Tablas 4 y 5**.

Se detectó más veces el fragmento de *ermB* en las muestras extraídas con el Kit GenElute (50 % L1 + 100 % L2 + 100 % L3 = **83,3 %**) que por centrifugación (50 % L1 + 0 % L2 + 50 % L3 = **33,3 %**). Sin tener en cuenta el método de extracción, la leche **L3** es en la que más veces se detectó el fragmento de *ermB*.

Se observaron bandas más intensas de *ermB* en las muestras de leche con adición de eritromicina (**Le, Tabla 5**) que en la leche control (**L, Tabla 5**).

**Tabla 4.** Relación entre las variables: “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y “método de extracción” según cada muestra de leche

Detección +/-	Extracción con Kit GenElute			Extracción por centrifugación		
	L1k	L2k	L3k	L1c	L2c	L3c
<i>ermB</i> +	50 %	100 %	100 %	50 %	0 %	50 %
<i>ermB</i> -	50 %	0 %	0 %	50 %	100 %	50 %

+/-: presencia/ausencia; Lk: extracción del DNA por el kit GenElute en muestras de leche; Lc: extracción del DNA por centrifugación en muestras de leche

**Tabla 5.** Relación entre las variables: “adición de eritromicina” y “% de amplificación del fragmento de *ermB*”; “método de extracción” y “% de amplificación del fragmento de *ermB*”; “muestra de leche” y “% de amplificación del fragmento de *ermB*”

Amplificación del fragmento (intensidad de la banda ++ / + / -)	+/- Eritromicina		Método extracción		Muestra de leche		
	L	Le	Kit	Ctf	L1	L2	L3
<i>ermB</i> ++	33,3 %	50 %	<b>83,3 %</b>	0 %	25 %	50 %	50 %
<i>ermB</i> +	0 %	33,3 %	0 %	<b>33,3 %</b>	25 %	0 %	25 %
<i>ermB</i> -	66,7 %	16,7 %	16,7 %	66,7 %	50 %	50 %	25 %

++: muy intensa la banda del fragmento de gen amplificado de *ermB*; +: intensa la banda del fragmento de gen amplificado de *ermB*; -: negativo el fragmento de gen de *ermB*; L: leche sin eritromicina; Le: adición de eritromicina en la leche; kit: extracción por el kit GenElute; Ctf: extracción por centrifugación

El tratamiento estadístico de estos resultados demostró que la variable “método de extracción” y “% de amplificación del fragmento de *ermB*” son dependientes entre sí, con un  $\alpha < 0,05$  (**Tabla 6**), el resto de las relaciones entre variables fueron independientes.

**Tabla 6.** Asociación entre las variables: “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y “el método de extracción del DNA” en la leche de cabra

Chi-cuadrado Pearson	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
MÉTODO x <i>ermB</i> +	8,800	2	<b>0,012</b>

(\*) Estadísticamente significativo ( $\alpha < 0,05$ - IC 95 %). Las variables no son independientes.

### **Muestras de Queso de cabra**

Las variables contempladas en este estudio para el queso fueron las siguientes: “adición de eritromicina”, “tiempo de maduración de los quesos”, “% de amplificación del fragmento de *ermB*”, “método de extracción” y “muestra de queso”. Los resultados se muestran en las **Tablas 7-9**.

En la **Tabla 7** podemos observar que se detectó más veces el fragmento de *ermB* en las muestras extraídas con el Kit GenElute (50 % Q1 + 100 % Q2 + 66,7 % Q3 = **72,2 %**) que por centrifugación (83,3 % Q1 + 50 % Q2 + 33,3 % Q3 = **55,6 %**). Además, estas bandas fueron más intensas en las muestras de los quesos extraídas con el Kit GenElute (**Kit, Tabla 8**) que por centrifugación (**Ctf, Tabla 8**).

Sin tener en cuenta el método de extracción, el queso **Q2** es en el que más veces se detectó el fragmento de *ermB* (**Tabla 8**), así como en los quesos frescos ( $t_0$ ) en general (**Tabla 9**). También se observaron bandas más intensas de *ermB* en las muestras de queso con adición de eritromicina (**Qe, Tabla 9**) que en el queso control (**Q, Tabla 9**).

**Tabla 7.** Relación entre las variables: “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y “método de extracción” según cada muestra de queso

Detección +/-	Extracción con Kit GenElute			Extracción por centrifugación		
	Q1k	Q2k	Q3k	Q1c	Q2c	Q3c
<i>ermB</i> +	50 %	100 %	66,7 %	83,3 %	50 %	33,3 %
<i>ermB</i> -	50 %	0 %	33,3 %	16,7 %	50 %	66,7 %

+/-: presencia/ausencia; Qk: extracción del DNA por el kit GenElute en muestras de queso; Qc: extracción del DNA por centrifugación en muestras de queso

**Tabla 8.** Relación entre las variables: “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y “método de extracción”; “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y “muestra de queso”

	Método de extracción		Muestra de Queso		
	Kit	Ctf	Q1	Q2	Q3
<i>ermB</i> ++	27,8 %	16,7 %	25 %	41,7 %	0 %
<i>ermB</i> +	44,4 %	38,9 %	41,7 %	33,3 %	50 %
<i>ermB</i> -	27,8 %	44,4 %	33,3 %	25 %	50 %

++: muy intensa la banda del fragmento de gen amplificado de *ermB*; +: intensa la banda del fragmento de gen amplificado de *ermB*; -: negativo el fragmento de gen de *ermB*; kit: extracción por el kit GenElute y Ctf: extracción por centrifugación

**Tabla 9.** Relación entre las variables: “adición de eritromicina” y “% de amplificación del fragmento de *ermB*”; “tiempo de maduración de los quesos” y “% de amplificación del fragmento de *ermB*”

Amplificación del fragmento (intensidad de la banda)	+/- Eritromicina		Maduración		
	Q	Qe	t <sub>0</sub>	t <sub>30</sub>	t <sub>60</sub>
<i>ermB</i> ++	16,7 %	27,8 %	25 %	25 %	16,7 %
<i>ermB</i> +	44,4 %	38,9 %	50 %	41,7 %	33,3 %
<i>ermB</i> -	38,9 %	33,3 %	25 %	33,3 %	50 %

++: muy intensa la banda del fragmento de gen amplificado de *ermB*; +: intensa la banda del fragmento de gen amplificado de *ermB*; -: negativo el fragmento de gen de *ermB*; Q: queso sin eritromicina; Qe: adición de eritromicina en el queso; t: tiempo de maduración de los quesos

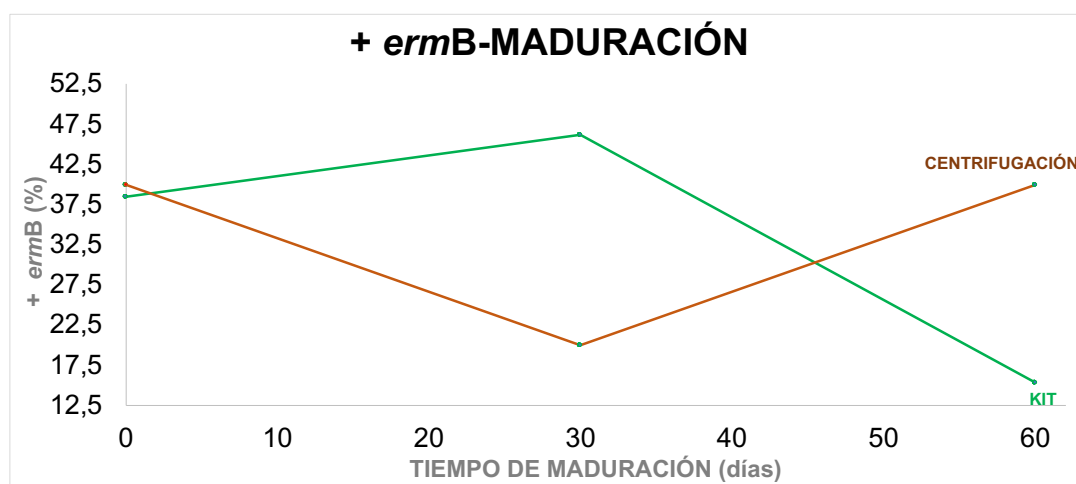
El tratamiento estadístico de estos resultados demostró que la variable “método de extracción” y “tiempo de maduración de los quesos” son dependientes entre sí, con un  $\alpha < 0,05$  (Tabla 10), el resto de las relaciones entre variables fueron independientes.

**Tabla 10.** Asociación entre las variables: “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y “ tiempo de maduración en el queso de cabra”

Chi-cuadrado Pearson	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
MADURACIÓN * KIT	7,200	2	<b>0,027</b>

(\*) Estadísticamente significativo ( $\alpha < 0,05$ - IC 95 %). Las variables no son independientes.

Con la maduración, ambos métodos de extracción han resultado ser complementarios: a medida que aumenta el tiempo de maduración se observa un aumento de detección del fragmento por centrifugación del DNA extracelular, de modo inverso se observa una disminución de la detección del gen *ermB* en los extractos por el Kit de extracción del DNA intracelular. Esto puede ser debido a la pérdida de viabilidad celular a medida que avanza el tiempo de maduración, como se observa en la Figura 6.



**Figura 6.** Relación entre las variables: “% de amplificación del fragmento de *ermB*” y el “tiempo de maduración del queso de cabra”

El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria desarrolló el Programa Nacional de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana para el control en los animales destinados al consumo humano. En la actualidad establece los niveles de resistencia en bacterias procedentes de animales para consumo humano.

De esta manera, buscarán determinar y monitorear la prevalencia de resistencia a diferentes antimicrobianos en bacterias zoonóticas, es decir, aquellas capaces de enfermar a humanos. Esto dará lugar a evaluar medidas que puedan retrasar la emergencia y diseminación de bacterias resistentes y minimizar su riesgo en la salud pública y animal (Esperbent & Migliorati, 2017).

#### **IV. CONCLUSIONES**

En nuestros resultados de amplificación por PCR múltiple no obtuvimos en ningún caso presencia de las bandas de los genes de resistencia a la eritromicina *ermA* y *ermC* con los cebadores específicos. Solo se detectó el fragmento de 364 pb correspondiente al gen de resistencia *ermB* en el 62,5 % de las muestras (30/48).

La leche **L3** y el queso **Q2** han sido las muestras en las que más veces se detectó el fragmento de *ermB*, así como en los quesos frescos ( $t_0$ ), en general.

Se observaron bandas más intensas de *ermB* en las muestras de leche y quesos con adición de eritromicina que en la leche o queso control. Se debería cuantificar la cantidad del fragmento detectado para confirmar que la adición de eritromicina a las muestras, aumenta la cantidad de genes de resistencia.

Se detectó más veces *ermB* en las muestras extraídas con el Kit GenElute (83,3 % en leche y 72,2 % en queso) que por centrifugación (33,3 % en leche y 55,6 % en queso). El tratamiento estadístico de estos resultados demostró que el “% de amplificación del fragmento de *ermB*” en las muestras de leche es significativamente mayor por el Kit de extracción que por centrifugación.

Por último, nuestros resultados han demostrado que la variable “tiempo de maduración de los quesos” y “método de extracción” son dependientes entre sí. Con la maduración, ambos métodos de extracción han resultado ser complementarios: a medida que aumenta el tiempo de maduración se observa un aumento de detección del fragmento por centrifugación del DNA extracelular, mientras que se observa una disminución de la detección del gen *ermB* por extracción del DNA intracelular con el Kit, a medida que aumenta el tiempo de maduración. Esto puede ser debido a la pérdida de viabilidad celular, con una mayor concentración de DNA extracelular, a medida que avanza el tiempo de maduración.

#### **V. BIBLIOGRAFÍA**

BERTOMEU, A., 2017. Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincia de València. Trabajo fin de grado en Biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia, España.

CORTECERO, L.K & BENÍTEZ, J.L., 2011. Evaluación de resistencia bacteriana a antibióticos oxitetraciclina y eritromicina en quesos frescos costeños del Departamento de Bolívar provenientes de los municipios de Arjona y Villanueva. Universidad de Cartagena. Facultad de Ingeniería. Programa de



Ingeniería de Alimentos Cartagena de Indias D.T. y C, Colombia.  
<http://190.242.62.234:8080/jspui/bitstream/11227/525/1/TESIS%20DE%20GRADO.pdf>

- ESPERBENT, C. & MIGLIORATI, M., 2017. Bacterias multirresistentes: una amenaza oculta que crece. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, vol. 43, núm. 1, abril, 2017, pp. 6-10. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Buenos Aires, Argentina.
- ESTEVE, L., 2017. Interferencia de la presencia de eritromicina en la leche de cabra sobre la microbiota del queso de tronchón durante la maduración. Trabajo final de grado. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- EUROPEAN COMMISSION, 2018. Ban on antibiotics as growth promoters in animal feed enters into effect. [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-05-1687\\_en.htm?locale=EN](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm?locale=EN). Última visualización 11 de Julio del 2018.
- GÓMEZ-LUS & RUBIO, C., 2009. Mecanismos de evolución y resistencias bacterianas. Unidad de Microbiología. Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública. Universidad de Zaragoza. GH CONTINUADA. Vol. 8 N° 5.
- HUMMEL, A.; HOLZAPFEL, W. & FRANZ, CH., 2007. Characterization and transfer of antibiotic resistance genes from enterococci isolated from food. *Systematic and Applied Microbiology*. 30: 1-7.
- CHEN, J.; ZHONGTANG, YU.; FREDERICK, C.; MICHEL, JR.; THOMAS WITTUM & MARK MORRISON., 2007. Development and Application of Real-Time PCR Assays for Quantification of *erm* Genes Conferring Resistance to Macrolides-Lincosamides-Streptogramin B in Livestock Manure and Manure Management Systems. Columbus.
- LINA, G.; QUAGLIA, A.; REVERDY, M.; LECLERCQ, R.; VANDENESCH, F. & ETIENNE, J., 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 43:1062-6.
- LÓPEZ, R.E., 2016. Determinación de la resistencia microbiana de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de quesos frescos provenientes de mercados de Lima Metropolitana. Tesis doctoral, Perú.
- MARCOS-SAINERO, J., 2009. Ovino-caprino: la Sanidad de la ubre, clave de la producción lechera. Publireportaje. Director Veterinario Farco Veterinaria. Última visualización 16 de julio de 2018.
- MERINO-DÍAZ, L.; CANTOS DE LA CASA, A.; TORRES-SÁNCHEZ, MJ. & AZNAR-MARTÍN, J., 2007. Detección de resistencia inducible a clindamicina en aislados cutáneos de *Staphylococcus* spp. por métodos fenotípicos y genotípicos. Departamento de Microbiología. Universidad de Sevilla. España.
- MORENO, M.A.; DOMÍNGUEZ, L.; TESHAGER, T.; HERRERO, I.A & PORRERO, M.C., 2000. Antibiotic resistance monitoring: the Spanish programme. *Int. J. Antimicrobial Agents*. 14:285-90.

- MUÑOZ, E. A., 2011. Identificación de genes de resistencia a macrólidos y aminoglucósidos en bacterias indicadoras aisladas de la microbiota intestinal de gallinas de postura. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.
- MUÑOZ, J.L.; GARCÍA-SÁENZ, J.A.; ALONSO, M.A.; GUTIÉRREZZUFIAURRE, M.N. & GARCÍA-RODRÍGUEZ, J.A., 1998. Resistencia a los macrólidos en *Streptococcus pyogenes*. Rev. Esp. Quimioter. (11-3).  
[http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0398/revista.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0398/revista.html)
- OMS (Organización Mundial de la Salud), 2018. Resistencia de antibióticos. <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibioticos>. Última visualización 5 de junio de 2018.
- PÉREZ-CANO, H.J. & ROBLES-CONTRERAS, A., 2013. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista médica MD. Centro de Investigación Biomédica, Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P.
- RAMOS, V.; DUARTE, C.; DÍAZ, A. & MORENO, J., 2014. Elementos genéticos móviles asociados con resistencia a eritromicina en aislamientos de *Streptococcus pneumoniae* en Colombia. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.
- REGLAMENTO N° 1831/2003/CE sobre los aditivos en la alimentación animal. Parlamento Europeo y del Consejo.
- REGLAMENTO N° 470/2009/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, 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) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- RIPOLL, P., 2017. Estudio de sensibilidad antimicrobiana y detección de genes de resistencia antibiótica en cepas de *E. coli* aisladas en producción avícola. Trabajo fin de grado en biotecnología. Universidad Politécnica de Valencia, España.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco a Dios y a mi familia (FEA) por acompañarme en esta etapa de mi vida, por ser mi apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad. Gracias por estar siempre a mi lado, animándome en este proceso, enseñándome que no hay que rendirse nunca y que no hay nada imposible. Recordándome que: “Dios es bueno todo el tiempo, todo el tiempo Dios es bueno”.

También agradecerle enormemente a mi directora académica Salut Botella, por ser una persona extraordinaria, llena de valores y experiencia. Gracias por darme la oportunidad de crecer como persona y orientarme profesionalmente hacia la Investigación. También muchas gracias por tu dedicación, por tu paciencia, por enseñarme que el trabajo y la constancia trae sus frutos.

Por otra parte, también quisiera agradecerle la disposición y ayuda que me ha brindado María Ángeles profesora del Departamento de Biotecnología.

Finalmente, quisiera agradecerle a Aya Boukharouba, mi directora experimental, por su ayuda incondicional en este trabajo, por su comprensión y atención ante mi expresión lingüística en inglés.