



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Biomedicina

“Desarrollo de un método multidiagnóstico para la detección de bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales zoonóticas, en muestras de humanos y perros.”

### **Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma  
de la Maestría en Ciencias en Biomedicina

### **Presenta:**

Biól. Mariana Alvarado Serrano

### **Dirigido por:**

Dra. Rosa Martha Pérez

Serrano

Dra. Ofelia Mora Izaguirre

Centro Universitario,  
Querétaro, Qro. Febrero  
2022 México



Universidad Autónoma de  
Querétaro Facultad de  
Medicina  
Maestría en Ciencias en Biomedicina

“Desarrollo de un método multidiagnóstico para la detección de bacterias causantes de enfermedades gastrointestinales zoonóticas, en muestras de humanos y perros.”

### **Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el  
Diplomado de la Maestría en Ciencias en Biomedicina

### **Presenta:**

Biól. Mariana Alvarado Serrano

### **Dirigido por:**

Dra. Rosa Martha

PérezSerrano

Dra. Ofelia Mora Izaguirre

Dra. Rosa Martha Pérez S.

Presidente

Dra. Ofelia Mora Izaguirre.

Secretario

Dra. Gabriela Aguilar T.

Vocal

Dr. Rubén A. Domínguez P.

Suplente

Dra. Ana Gabriela Hernández P.

Suplente

## ÍNDICE

DEDICATORIAS .....	8
AGRADECIMIENTOS .....	9
RESUMEN .....	10
ANDECEDENTES .....	11
ZONOSIS Y LAS MASCOTAS .....	12
ESTRATEGIAS PROPUESTAS.....	13
ZONOSIS BACTERIANAS GASTROINTESTINALES.....	15
Género <i>Salmonella</i> .....	16
Género <i>Campylobacter</i> .....	17
Género <i>Yersinia</i> .....	17
Género <i>Enterococcus</i> .....	18
SITUACIÓN EN MÉXICO.....	18
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	19
MÉTODOS DIAGNÓSTICOS.....	21
JUSTIFICACIÓN .....	23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	24
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	24
OBJETIVOS .....	25
METODOLOGÍA.....	26
Tipo de diseño: Experimental <i>in vitro</i> . .....	26
Criterios de inclusión para el grupo CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO:.....	27
Criterios de inclusión para el grupo MUESTRAS DESCONOCIDAS: .....	27
Definición de variables y unidades de medida: .....	29
Captura de Datos generales de muestras:.....	30
Procesamiento de las muestras: .....	31
1. Extracción de material genético. ....	31
2. Medición de pureza e integridad. ....	35
3. Diseño de oligonucleótidos específicos para la identificación de bacterias. ....	35
4. Pruebas de estandarización.....	36

5. Electroforesis .....	38
6. Comprobación de Identidad de los productos obtenidos .....	38
7. Sensibilidad.....	38
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
ELECCIÓN DE GENES .....	40
<i>Salmonella enterica</i> .....	40
<i>Campylobacter jejuni</i> .....	41
<i>Enterococcus faecalis</i> .....	41
<i>Yersinia enterocolitica</i> .....	42
DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS .....	43
ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ADN .....	46
Muestras bacterianas control: .....	51
EXTRACCIÓN DE ADN MUESTRAS AISLADAS .....	53
PCR CONTROLES POSITIVOS .....	55
ESTANDARIZACIÓN DE PCR MÚLTIPLE .....	57
SENSIBILIDAD .....	61
ESPECIFICIDAD.....	64
PCR MÚLTIPLE PARA EL MULTIDIAGNÓSTICO DE INFECCIONES ZONÓTICAS DESDE UNA PRESPECTIVA DE UNA SOLA SALUD (ONE HEALTH).....	66
CONCLUSIÓN .....	68
IMPLICACIONES BIOÉTICAS .....	69
REFERENCIAS.....	70
ANEXOS .....	85
CARTA DE ASENTIMIENTO .....	85
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO .....	88
VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA .....	94
GLOSARIO.....	97

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia, en humanos y animales de compañía, de bacterias gastrointestinales de mayor importancia epidemiológica. ....	13
Tabla 2. Casos de enfermedades infecciosas del aparato digestivo en México hasta la semana 53. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, secretaria de salud. 2021 .....	18
Tabla 3. Tratamiento farmacológico, específico de agente causal identificado. Guía de práctica Clínica. Consejo de Salubridad General. ....	19
Tabla 4. Condiciones idóneas para el diseño de oligonucleótidos específicos utilizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Bustin et al., 2009).....	34
Tabla 5. Concentración del ADN en cada dilución de la curva de estandarización. ....	37
Tabla 6. Genes elegidos como candidatos para la identificación de los microorganismos de interés ( <i>Salmonella entérica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> ).....	41
Tabla 7. Características de los oligonucleótidos para la identificación de las bacterias <i>Salmonella enterica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , y <i>Yersinia enterocolitica</i> . ....	42
Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de secuencias blanco para la identificación para las bacterias <i>Salmonella enterica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Enterococcus fecalis</i> , y <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	42
Tabla 9. Características de las muestras procesadas. ....	44
Tabla 10. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific. ....	45
Tabla 11. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” de OMEGA Bio-Tek. ....	45
Tabla 12. Costos promedio del procesamiento de una reacción en cada kit (E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” de OMEGA Bio-Tek y con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific). ....	49
Tabla 13. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” de OMEGA Bio-Tek y con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific a partir de muestras fecales. ....	50
Tabla 14. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific a partir de muestras bacterianas. ....	51

Tabla 15. Concentración y pureza con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA” de OMEGA Bio-Tek y con el kit “Fecal DNA Extraction de IBI Scientific a partir de muestras fecales.....	51
Tabla 16. Concentraciones reales de las cepas utilizadas en la prueba de sensibilidad.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases para el desarrollo del método multidiagnóstico para la detección de enfermedades gastrointestinales.....	26
Figura 2. Presencia e integridad del ADN las muestras humanas (Hn) y veterinarias (Vn) obtenidas con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” y el kit “Fecal DNA Extraction”.....	46
Figura 3. Identificación de <i>Salmonella enterica</i> por PCR punto final con muestras obtenidas de los dos protocolos analizados.....	54
Figura 4. Identificación de los genes <i>invA</i> de <i>Salmonella enterica</i> , <i>cdtB</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>ail</i> de <i>Yersinia enterocolitica</i> por PCR punto final en los controles positivos.....	56
Figura 5. Identificación de los genes <i>invA</i> de <i>Salmonella enterica</i> , <i>GroEI</i> de <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>cdtB</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>ail</i> de <i>Yersinia enterocolitica</i> por PCR punto final en los controles positivos, que fueron corridos de manera individual y de manera múltiple.....	57
Figura 6. Identificación de los genes <i>invA</i> de <i>Salmonella enterica</i> , <i>cdtB</i> de <i>Campylobacter jejuni</i> y <i>ail</i> de <i>Yersinia enterocolitica</i> por PCR punto final en diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000.....	60
Figura 7. Confrontación de cepas diana con cepas sin interés Por PCR punto final de manera individual y múltiple, visualizadas en gel de agarosa al 1%. .....	62

## DEDICATORIAS

A Gabriel. Tu hermosa existencia fue el soporte vital de mi integridad física y mental en estos dos años, los más complicados de nuestra vida, juntos hasta el cielo amor mío.

A mis padres. Cuando el piso de mi mundo se desmoronó, pusieron sus espaldas para que yo siguiera en el camino, jamás lo hubiera logrado sin ustedes.

A mis hermanos. Volví a nacer y ustedes me recordaron quién era en realidad, los amo.

A mi abue. Siempre mi ángel, mi alma gemela. Nuestras alas siguen volando al unísono.

A Rosita. Mi admirada directora, amada tía y divertida cómplice de locuras.

## AGRADECIMIENTOS

A mi gondi, por esas tardes tan frustrantes de trabajo donde no se lograba nada, tu sonrisa podía levantar mis ánimos sin ningún esfuerzo.

A mi mamita, por escuchar mis abrumadoras pláticas de genética, molecular y muestras olorosas...sin importar qué tan ocupada estabas, siempre te interesaste. Aprendiste tanto como yo, así que el título también es para ti.

A mi papi, siempre con bajo perfil tan de tu estilo pero sin lograr opacar la inmensidad de hombre que eres, siempre apoyándome incondicionalmente, en las buenas y en las malas, puedo ir a ciegas por el mundo simplemente tomada de tu mano.

A los bebés, éste año fue de reconstrucción, volvieron a mí en el momento indicado para recordarme lo bella que es la vida por el simple hecho de tenerlos en ella. Mis logros son para ustedes con la esperanza de que algún día, todos lleguen mucho más lejos que yo.

A Rosita, por ser una maestra extraordinaria, competente y aguerrida. Siempre serás mi ejemplo a seguir, gracias por confiarme un proyecto tan maravilloso, por enseñarme tanto y por defenderme cuando el mundo se enojó conmigo, te quiero.

Al equipo del laboratorio GENBIOM, formamos una pequeña familia, a veces algo disfuncional pero familia al fin, con travesuras, regaños, llanto y muchísimo trabajo.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, la bióloga y ahora maestra que soy se forjó en ésta gran institución que llevaré en mi corazón siempre.

## RESUMEN

A lo largo del tiempo la convivencia con los animales ha sido un tema que acompaña al hombre, y es que su historia y evolución se ha visto entrelazada con los mismos, dicha evolución ha llegado también a influir en el trato que se les da a los animales, involucrando cada vez más las actividades cotidianas en común. Esto nos lleva a compartir no solo momentos, sino también espacios, utensilios y hasta microbiota. Las enfermedades zoonóticas son el resultado de este intercambio de microorganismos que se da por el contacto entre los humanos y los animales. Las zoonosis se han abordado a nivel internacional mediante distintas iniciativas y medidas de prevención. Sin embargo, la problemática se ha acentuado en la última década. Un elemento importante acerca de las medidas resolutivas, son los métodos de detección oportunos, específicos y rápidos de dichas enfermedades. Las infecciones gastrointestinales destacan por su elevada prevalencia en la población, sin embargo, los métodos de detección actuales son lentos, inespecíficos e ineficientes para la velocidad en la que estas enfermedades afectan a la población. Por lo anterior, este proyecto se orientó en desarrollar un método multidiagnóstico por medio de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la identificación de 4 microorganismos zoonóticos gastrointestinales (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis*). La prueba fue específica, sensible y rápida. Se demostró que los oligonucleótidos identificaron exclusivamente a las cepas de interés y el rango de sensibilidad menor fue de 0.0029ng/μl perteneciente a *Campylobacter jejuni*. Por último, se requiere ampliar las pruebas comparativas contra el coprocultivo para conocer las ventajas y desventajas directas entre ambos métodos.

Palabras clave: **zoonosis, método multidiagnóstico, animales de compañía.**

## **ANDECEDENTES**

En los últimos años, el concepto de la familia ha tomado diversos significados dependiendo del contexto sociocultural en el que se emplea, sin embargo, existe un común denominador que, sin importar el país, posición social o lenguaje, está presente en la mayoría de nuestros hogares: la mascota. Con el paso del tiempo, se han convertido en un soporte fisiológico y psicológico para los dueños (González, 2019) y a pesar de que los animales de compañía están presentes en la historia de la humanidad desde hace varios siglos, la convivencia con ellos ha evolucionado. Pasaron de ser organismos que generalmente se encontraban la mayor parte del tiempo fuera de casa, a ser un inquilino más en los hogares, compartiendo con los humanos habitaciones, camas e incluso utensilios.

Tomando en cuenta las modificaciones en el comportamiento e interacción propietario-mascota, es importante mencionar que, a nivel mundial, el 56% de la población cuenta con animales de compañía en sus hogares, lo cual equivale a 4,162 millones de personas (GFK, 2016). Sin embargo, la importancia de este tema no radica en dicha cantidad, sino en el porcentaje de la población que no cuenta con agua potable ni las condiciones adecuadas de vivienda para un sano desarrollo tanto humano como animal, dando como resultado condiciones de vida insalubres.

Las modificaciones en la convivencia y problemáticas como la mencionada anteriormente, aumentaron los factores de riesgo para la propagación de infecciones convirtiéndose en una situación preocupante y hasta peligrosa, si los dueños se encuentran en un estado de salud inmunocomprometido (Peña, 2015). Esto último, es de gran interés en el sector salud, al ser un riesgo para la

transferencia de microorganismos entre humanos y animales de compañía (Chomel, 2014).

## ZOONOSIS Y LAS MASCOTAS

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define como enfermedades zoonóticas al grupo de enfermedades infecciosas que, de manera natural, se transmiten de los animales a los humanos, las cuales pueden presentarse en un ámbito agropecuario, alimenticio, silvestre o por medio de los animales de compañía. Se menciona que el 60% de las enfermedades infecciosas son de origen zoonóticos y el 75% de las emergentes son de origen animal, además se reporta que cinco nuevas enfermedades surgen cada año en personas; de las cuales 3 son trasferidas por animales (OIE, 2019).

Es importante resaltar que, los animales que consideramos como una mascota, también han ampliado en variedad, incluyendo a los animales exóticos. A pesar de esto, las especies más populares, en México, siguen siendo los perros (33%) y los gatos (23%) (GFK, 2016).

En virtud del cambio cultural que se vive en este ámbito, es de suma importancia identificar y monitorear las enfermedades zoonóticas asociadas a los animales domésticos (Chomel, 2014); así como crear una conciencia social sobre las medicinas preventivas, tanto veterinarias como humanas. Sobre tal situación, existen varios ejemplos que sirven de referencia para su abordaje. En el año 2011, en Canadá, fueron identificadas siete enfermedades zoonóticas, donde los sujetos de estudio afirmaron tener contacto con diversos animales justo antes de presentar la infección. Los microorganismos identificados fueron: *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y *Yersinia* (Whitfield et al., 2017). Sin embargo, lo más alarmante de este estudio, fue que la mayoría de las personas reportó que solo estuvieron en contacto exclusivamente

con su perro o gato. Otro estudio describió una elevada incidencia de campilobacteriosis en una muestra poblacional danesa cuya infección fue derivada de la convivencia con perros y gatos domésticos (Damborg et al., 2004).

Es importante destacar, que también se han observado perros “sanos” donde se obtuvo un diagnóstico positivo a *Salmonella*, por lo que su prevalencia se eleva de manera alarmante incluso en organismos con hábitos hogareños (Lowden et al., 2015). Por tal motivo, se están desarrollando distintas iniciativas por parte de las autoridades sanitarias de importancia internacional como la OMS, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), las cuales, de primera mano están fortaleciendo la difusión y concientización acerca de la importancia de éste tema, que poco a poco se transforma en un problema crítico dando a conocer las distintas alternativas y propuestas para solucionarlo.

## **ESTRATEGIAS PROPUESTAS**

De las más importantes, destaca el proyecto CALLISTO (Companion Animals Multisectorial interprofesional Strategic Think Tank on Zoonoses) donde se estudiaron las zoonosis asociadas a los animales de compañía en distintos países europeos (Rijks, 2016). Con esta iniciativa se pretende dar una visión general del papel de los animales de compañía en la transmisión de las zoonosis de tipo viral, bacteriano y parasitario; así como su distribución geográfica, con el fin de desarrollar tecnología preventiva que disminuya el riesgo de infección. Al final de dicho monitoreo, se reportaron 15 patógenos de gran impacto donde resalta la campylobacteriosis como una de las enfermedades con mayor prevalencia (Rijks, 2016).

Otra iniciativa internacional de gran importancia es el proyecto “One Health”. El objetivo de éste es promover la colaboración interdisciplinaria para salvaguardar el concepto de “una sola salud” en la población, tomando como referencia, la estabilidad salubre del ecosistema, los animales y el hombre (OMS, 2017). Esta

iniciativa se enfoca en el desarrollo de investigaciones integrales donde se incluya la relación que existe entre las enfermedades zoonóticas, resistencia antimicrobiana, seguridad alimentaria y equilibrio ambiental. Esta preocupación zoonosanitaria, tiene repercusiones a nivel mundial, sin embargo, ha tomado un papel importante incluso en países en vías de desarrollo como México, ya que en nuestro país se reporta que solo 19% (GFK, 2016) de la población no tiene una mascota en casa.

En este sentido existen diversos estudios que brindan evidencia acerca de las zoonosis asociadas a los animales de compañía (Tabla 1) donde se muestran además los casos de infecciones subclínicas. Entre las bacterias más frecuentes está el género *Salmonella* y ciertas especies del género *Campylobacter* como *C. upsaliensis*, *C. helveticus* y *C. jejuni*, las cuales fueron halladas en muestras de heces fecales de perros y gatos donde solo algunos presentaron una leve inflamación estomacal (Marks, 2011), lo cual toma relevancia al ser especies patógenas para el humano (Polzler, 2018).

Tabla 1. Presencia, en humanos y animales de compañía, de bacterias gastrointestinales de mayor importancia epidemiológica.

MICROORGANISMO	POBLACIÓN ESTUDIADA	ANIMAL INVOLUCRADO	REFERENCIA
<i>Salmonella sp.</i>	Población humana del Reino Unido	Perros	Lowden et al., 2019.
<i>Campylobacter sp.</i>	Población humana noruega	Animales de granja	MacDonald et al., 2019.
<i>Campylobacter sp.</i>	Dueños de perros y gatos	Perros y gatos	Anon., 2019.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Niños chilenos inmunocomprometidos	Animales de compañía	Peña et al., 2019.
<i>Campylobacter sp.</i>	Población humana austriaca	Perros y gatos	Polzler et al., 2018.
<i>Yersinia sp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella sp.</i> y <i>Campylobacter sp.</i>	Población humana canadiense	Animales de compañía	Whitfield et al., 2017.

<i>Pasteurella sp. y Staphylococcus aureus</i>	Dueños de perros y gatos	Gatos y perros	Chomel., 2019.
<i>Enterococcus faecalis</i>	Población humana tratada con antibióticos	Animales de compañía	Olse et al., 2012.

Se ha reportado, por diversas investigaciones, la relación que existe entre ciertas enfermedades y el contacto con animales de compañía representando su alta prevalencia y transmisión con las mascotas. Los microorganismos más nombrados pertenecen a los géneros *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Salmonella* y *Yersinia* (Polzler et al., 2018., Lowden et al., 2019., Whitfield et al., 2017., Olse et al., 2012.).

De manera general, las infecciones gastrointestinales provocadas por estos microorganismos, pueden tratarse sin llegar a complicaciones que puedan comprometer la vida de los pacientes, siempre y cuando el diagnóstico sea oportuno. Por otro lado, un componente adicional que se debe tomar en cuenta es la resistencia antimicrobiana que presentan dichos microorganismos puesto que el tratamiento debe ser lo más específico para que sea efectivo y desgraciadamente la mayoría de las veces, no lo es.

La velocidad con la que los agentes patógenos pueden multiplicarse, diseminarse y transformarse para desarrollar estrategias de supervivencia, obliga a desarrollar nuevos fármacos contra ellos, lo cual ha generado a su vez una respuesta recíproca por su parte, de manera que el desarrollo de tratamientos alternativos o técnicas de medicina preventiva se ha convertido en una prioridad para el sector salud. Por lo tanto, el siguiente paso es determinar las acciones que implica esta problemática y su solución, lo que nos lleva a recurrir a un abordaje molecular para el desarrollo de esta nueva medicina preventiva para los humanos, animales domésticos y fauna silvestre (Silva, 2011).

## **ZOONOSIS BACTERIANAS GASTROINTESTINALES**

En el año 2018, la OMS dio a conocer que los microorganismos que ocasionan más muertes en niños a nivel mundial son los pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia* y *Enterococcus*. Las poblaciones en riesgo para la presentación y complicación de enfermedades gastrointestinales son las mujeres embarazadas, niños menores de cinco años, adultos mayores y personas con enfermedades crónicas degenerativas (IMSS, 2015).

Las bacterias de los géneros *Salmonella*, *Campylobacter*, y *Yersinia*, son bacterias Gramnegativas que provocan manifestaciones clínicas como diarrea, dolor abdominal, vómito, náusea, cefalea y en algunos casos fiebre. En el caso del género *Enterococcus*, son bacterias Grampositivas que pueden provocar, además de los síntomas antes mencionados, infecciones urinarias (Aspiroz et al., 2000).

### **Género *Salmonella***

Estas bacterias pertenecen a los bacilos Gramnegativos, consideradas patógenas para muchos animales, incluido el humano, invadiendo particularmente el aparato gastrointestinal (Figueroa, et al., 2005). Al igual que muchas otras bacterias Gramnegativas, el género *Salmonella* cuenta con mecanismos de adherencia basados en adhesinas fimbriales, fimbrias, flagelos, lipopolisacáridos y cápsula dependiendo la especie de la que se habla (Humphries, et al., 2001). En cuanto a su invasión, la lleva a cabo mediante un mecanismo llamado disparo (trigger) en el tejido linfoide inicialmente hasta llegar a las células epiteliales del íleon. *Salmonella enterica* es considerada la cepa patógena en humanos y potencialmente zoonótica, ya que los perros y los gatos infectados por esta bacteria pueden estar excretando las bacterias hasta por tres meses, aun cuando no presentes síntomas, además se ha reportado transmisión uterina en mamíferos (Iowa University, 2005).

En cuanto a los signos clínicos de la salmonelosis en humanos varía desde una gastroenteritis hasta una septicemia, dependiendo de varios factores como el nivel de virulencia de la bacteria y al igual que perros y gatos, pueden estar excretando

bacterias durante varias semanas o incluso meses si se está bajo un tratamiento de antibióticos (CDC, 2004).

### **Género *Campylobacter***

Este género se compone por bacilos Gramnegativos en su mayoría, sin embargo en cultivos se han observado también formas cocoides, ambas microaerófilas (Escamilla, et al., 2005), se han descrito 25 especies muchas de las cuales presentan importancia clínica y es que se sabe que de manera particular *Campylobacter jejuni* es la bacteria más aislada a partir de muestras humanas con cuadro de gastroenteritis (Stephen LWO, 2005), además de estar involucrada en otras enfermedades como meningitis, septicemia y enfermedades autoinmunes como el síndrome de Guillain Barré. En aves, perros, cerdos y otro tipo de ganado, esta bacteria es parte de su microbioma, por lo tanto, la importancia es relevante en la transmisión potencial que presenta. Su método de invasión, cuando se habla de enfermedades del aparato gastrointestinal, se dirige a células del yeyuno y el íleon que provocan en su mayoría dolor abdominal, fiebre, náusea y vómito.

Existen varios factores que contribuyen a la patogenia de esta bacteria como los genes asociados a virulencia, adherencia y producción de toxinas, algunos de los más destacables son los asociados a la producción de citotoxinas (Purdy, et al., 2000).

### **Género *Yersinia***

Dentro del género *Yersinia* se describen tres especies de bacilos Gramnegativos que pueden ser aerobios o anaerobios facultativos que son patógenas para humanos y animales. Están asociadas a diarreas donde se afecta a las células del intestino delgado y el colon provocando una inflamación de dichos tejidos además de algunas otras afecciones como fiebre y en niños pequeños se puede presentar heces con sangre (American Academy of Pediatrics, 2006). La yersiniosis es considerada una enfermedad que puede ir desde una gastroenteritis autolimitada y hasta una septicemia grave que en algunos casos llega a ser mortal.

La patogenia de esta bacteria se centra en su capacidad de invasión mediada por factores proteicos de su membrana externa que promueve la unión en células eucariotas y resistencia a agentes nocivos (Thomson, 2019).

### **Género *Enterococcus***

Se conocen cuatro especies de cocos Grampositivos que pertenecen al género *Enterococcus*, estos muestran un metabolismo anaerobio facultativo y se ven asociadas al microbioma de algunos mamíferos y aves, sin embargo, especies como *E. faecalis* y *E. faecium* son causantes de enfermedades gastrointestinales en humanos (Bush, et al., 2019). Entre los distintos factores que contribuyen con la virulencia de esta bacteria están las proteínas de superficie extracelular, la hemolisina, gelatinasa, hialuronidasa y distintos antígenos que se asocia a la adherencia bacteriana (Padilla, et al., 2012).

La evolución de estas bacterias incluye aspectos relacionados con la resistencia antimicrobiana dada de manera general por el uso indiscriminado de antibióticos no específicos por lo que en los últimos años ha tomado gran importancia su identificación. Derivado de esta necesidad, la genética se usa como herramienta siendo el gen *groEI*, el sitio de identificación más reportado para *Enterococcus faecalis* (Hung, et al., 2019).

### **SITUACIÓN EN MÉXICO**

En el país se tiene una gran deficiencia en cuanto al diagnóstico de enfermedades gastrointestinales a pesar de que se encuentren dentro de las cinco principales causas de muerte en niños (INEGI, 2018). De todos los microorganismos que se reportan de mayor importancia como causantes de estas patologías, en el país únicamente se tienen monitoreados los cuadros clínicos asociados a *Salmonella* sp., con 78,681 defunciones en 2020 (SINAVE, 2021) de las 5,788,090 totales, de tal modo que las muertes restantes, son catalogadas como “Infecciones intestinales por otros organismos y mal definidas” (Tabla 2) según el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica del país. Cabe resaltar que los datos que se

reportan son únicamente de casos que requieren atención hospitalaria por el cuadro clínico grave que presentan, por lo tanto, hay que considerar que las cifras aumentarían si contamos los casos tratados por médicos generales en consultorios privados.

Tabla 2. Casos de enfermedades infecciosas del aparato digestivo en México hasta la semana 53. Sistema nacional de vigilancia epidemiológica, secretaria de salud. 2021

AÑO	INFECCIONES INTESTINALES MAL DEFINIDAS	SALMONELOSIS
2016	4,383,971	76,429
2017	5,606,759	90,477
2018	5,285,200	79,659
2019	5,248,788	76,670
2020	5,360,604	78,681

## RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

Con el monitoreo limitado que se realiza para la identificación de los agentes patógenos que causan enfermedades gastrointestinales, se desprende otra problemática que es la resistencia antimicrobiana ya que, en muchas ocasiones, la premura o la gravedad del cuadro clínico que los pacientes presentan amerita un tratamiento inmediato. Esto implica que se recomiende el uso de antibióticos de amplio espectro debido al desconocimiento del agente causal. La Secretaría de Salud tiene un listado del tratamiento farmacológico (Tabla 3) específico para cada

agente patógeno, sin embargo, el diagnóstico no es específico por lo que se abarca todo el abanico de posibilidades en la mayoría de los casos.

Tabla 3. Tratamiento farmacológico, específico de agente causal identificado. Guía de práctica Clínica. Consejo de Salubridad General.

PATÓGENO	RECOMENDACIONES PARA ADULTOS
<b><i>Shigella sp</i></b>	Ciprofloxacino, 500 mg dos veces al día. Tratamiento de uno a tres días. Alternativa: trimetoprim/sulfametoxazol 800/160 mg dos veces al día
<b><i>Salmonella sp, especies no typhi</i></b>	Trimetoprim/sulfametoxazol 800/160 mg; ciprofloxacino 500 mg dos veces al día durante cinco a siete días
<b><i>E. coli</i></b>	Ciprofloxacino, 500 mg dos veces al día. Tratamiento de uno a tres días Alternativa: trimetoprim/sulfametoxazol 800/160 mg durante siete días.
<b><i>Yersinia sp.</i></b>	Doxiciclina 300 mg y aminoglucósidos. Alternativa: trimetoprim/sulfametoxazol.
<b><i>Vibrio cholerae</i></b>	Dosis única de doxiciclina, 300 mg. Tetraciclinas, 500 mg cuatro veces al día durante tres días. Alternativa: ciprofloxacino, dosis única
<b><i>C. difficile</i></b>	Metronidazol, 250 mg cuatro veces al día, hasta 500 mg tres veces al día durante diez días.
<b><i>E. histolytica</i></b>	Metronidazol, 500 mg tres veces al día durante cinco a diez días, más iodoquinol, 650 mg tres

	veces al día durante diez días.
<b><i>Salmonella thypi</i></b>	Ciprofloxacino 500 mg dos veces al día por diez días, ceftriaxona 1-2 gr al día por diez días. Subsalicilato de bismuto en suspensión, se sugiere en diarreas agudas leves a moderadas no complicadas: 10 ml vía oral cada cuatro horas y 10 ml adicionales posterior a cada evacuación que se presente Loperamida, una tableta de 2 mg cada ocho horas.

Además del diagnóstico inespecífico y el tratamiento empírico, en la industria pecuaria existe también un uso alternativo de los antibióticos de manera subterapéutica como promotores del crecimiento por lo que la resistencia que presentan los microorganismos cada vez es mayor (Puig, et al., 2007). De manera particular se reporta que *Salmonella sp.* ha desarrollado resistencia al cloranfenicol, ciprofloxacino, trimetoprim-sulfametoxazol y ceftriaxona (Quesada, et al., 2016), *Escherichia coli* a trimetoprim-sulfametoxazol, ampicilina y penicilina (Betrán, et al., 2015), *Yersinia sp.* a amoxicilina, cotrimoxazol y ciprofloxacino (Martín-Pozo, et al., 2014), *Campylobacter jejuni* a ampicilina y ciprofloxacino (García, et al., 2019), y *Enterococcus faecalis* a tetraciclina, ciprofloxacino, eritromicina y cloranfenicol (Silva, et al., 2006) por mencionar a los de mayor importancia.

## **MÉTODOS DIAGNÓSTICOS**

La manera de enfrentar las enfermedades gastrointestinales hasta ahora ha sido unidireccional, de modo que los tratamientos están centrados en solucionar los síntomas con base a una historia clínica que se limita a hábitos alimenticios, viajes previos o contacto con una potencial fuente de infección, previo al reporte de una diarrea con mucosidad o sanguinolenta. En el caso de que los pacientes presenten fiebre, deshidratación o pus y/o sangre en la materia fecal, se indican estudios microbiológicos como coprocultivos y búsqueda de amebas en fresco, así

como pruebas serológicas (reacciones febriles) o Examen General de Orina (EGO) (CIE-10, 2020).

De este modo, la detección de microorganismos se realiza mediante técnicas de cultivo bacteriano, interpretación de antibiogramas o pruebas de observación morfológica por Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (Palomino-Camargo et al., 2014). Estas técnicas se consideran el Golden estándar para la identificación de microorganismos, sin embargo, son poco eficientes, sensibles y requieren de mucho tiempo de procesamiento. Lo anterior, evidencia la necesidad de desarrollar nuevos métodos más rápidos, sensibles y económicos.

Por tal motivo, el diagnóstico multidiagnóstico cada vez es más necesario debido al complejo contexto sociocultural en el que vivimos. En este caso y con la colaboración de un médico veterinario se puede comprender de mejor manera la fuente, contagio, evolución y hasta prevención de las enfermedades, además de promover su monitoreo y seguimiento para lo cual es necesario tener un diagnóstico oportuno.

En la actualidad, la biología molecular nos brinda herramientas útiles para diversas necesidades en el sector salud, entre las muchas técnicas existentes, podemos mencionar la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP) (Lu et al., 2010), Hibridación Reversa en Línea (RLB) y los microarreglos y secuenciación (Arroyo et al., 2016; León y Medina, 2014). La eficacia que representa esta alternativa está dada por la facilidad que implican las técnicas para la detección temprana (Palomino-Camargo y González-Muñoz, 2014). De las técnicas ya utilizadas, la PCR es la más sencilla y económica (Xu et al., 2018).

Actualmente, existen algunos kits de detección para algunos parásitos y otros organismos patógenos que utilizan la biología molecular como herramienta clínica. Dos ejemplos de ello son el kit de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium parvum* y *Dientamoeba fragilis* y el kit de PCR en tiempo real para detección y cuantificación

de bacterias del género *Shigella*, todas para muestras humanas. Con lo anterior, podemos asumir que la biología molecular es la clave para iniciar una nueva etapa en las pruebas diagnósticas y refuerza la necesidad y relevancia de este proyecto ya que actualmente no existe un protocolo que incluya a los patógenos que se mencionan anteriormente en un solo método de diagnóstico.

## **JUSTIFICACIÓN**

La evolución conjunta de los humanos con los animales ha ocasionado cambio en los hábitos de convivencia siendo estos mucho más cercanos que antes. Las implicaciones en la salud pública han obligado a distintas instituciones a crear iniciativas que busquen monitorear y limitar la transmisión de las zoonosis. El proyecto UNA SALUD es un esfuerzo valioso que ha resaltado la importancia de estas infecciones en la salud pública. El desarrollo de nuevas técnicas de detección temprana son una prioridad debido al incremento de las enfermedades emergentes y reemergentes de origen animal. Dichas técnicas deben cumplir con los requerimientos mínimos que le permitan una detección acertada, sin embargo, se requiere un método rápido, sensible y específico el cual se base en la aplicación de técnicas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De manera particular se pretende abordar las infecciones gastrointestinales por su gran prevalencia en la población, además de ser muchas veces cuestiones subclínicas que disminuyen su detección, pero no su importancia.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Es posible desarrollar un método multidiagnóstico sensible, rápido y específico para los cuatro géneros de microorganismos gastrointestinales de mayor relevancia patológica para humanos y perros?

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El método desarrollado permitirá la identificación simultánea de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis* en una reacción de PCR múltiple.

## OBJETIVOS

### General

1. Desarrollar un método multidiagnóstico, rápido, sensible y específico por PCR múltiple para la identificación de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis* en muestras fecales de humanos y perros.

### Particulares

1. Aislar el ADN en cantidad y pureza suficiente para análisis genómicos en muestras fecales de humanos y perros.
2. Identificar la presencia de *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis* por PCR múltiple en muestras fecales de humanos y perros.
3. Determinar la sensibilidad y especificidad de la prueba multidiagnóstica propuesta para la identificación simultánea de *Campylobacter jejuni*,

*Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis* por PCR.

## METODOLOGÍA

**Tipo de diseño:** Experimental *in vitro*.

**Población de estudio:** Población humana y población animal (perros).

**Tamaño y tipo de muestra:** A conveniencia. Muestras fecales de humanos y perros.

**Lugar de realización:** Se realizó en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular (GENBIOM) de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Querétaro.

**Grupos experimentales:**

CONTROLES POSITIVOS	CONTROLES NEGATIVOS	MUESTRAS DESCONOCIDAS
------------------------	------------------------	-----------------------

Muestras positivas obtenidas de un cepario	Agua	Muestras fecales de perros
	Bacterias distintas a las de interés, obtenidas de un cepario	Muestras fecales de humano

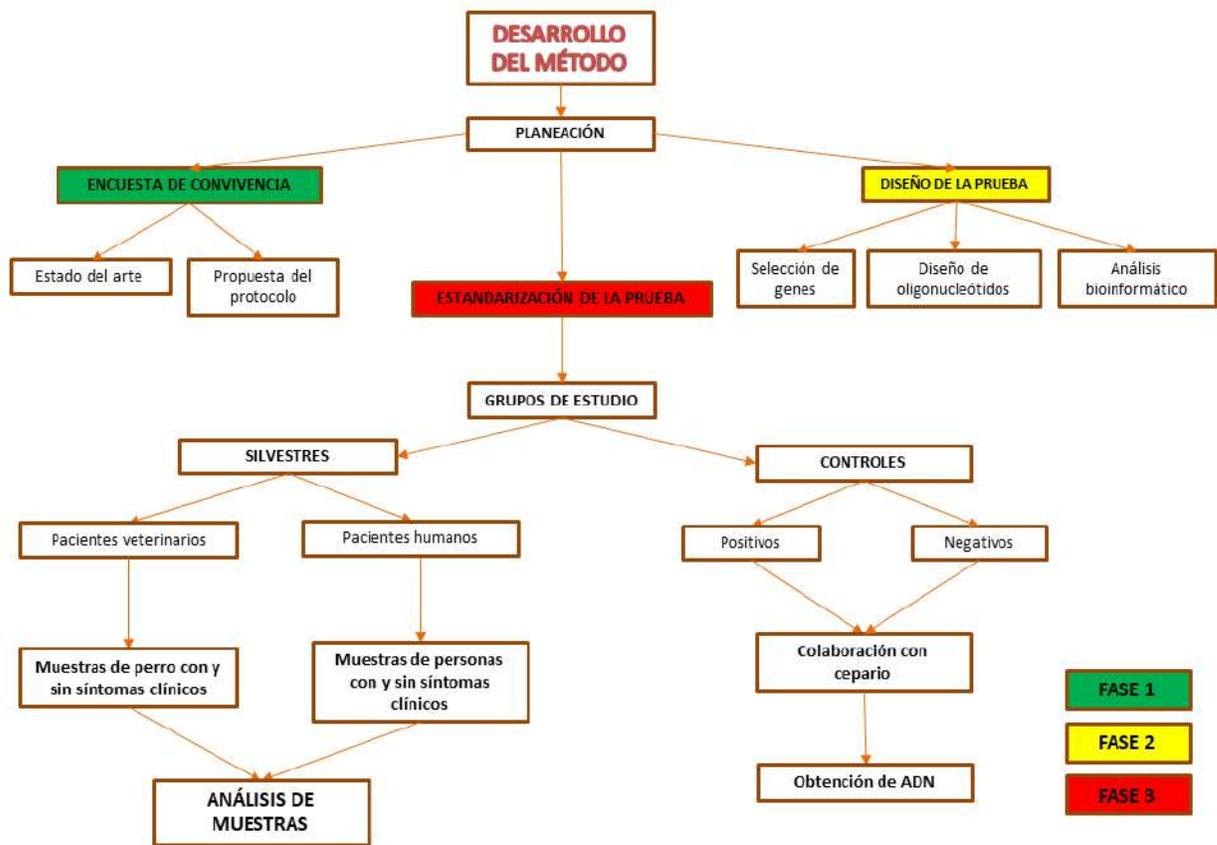
**Criterios de inclusión para el grupo CONTROL POSITIVO Y NEGATIVO:**

- Colonias bacterianas obtenidas de un cepario de los organismos de interés (*Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis*) y otras distintas (control negativo).

**Criterios de inclusión para el grupo MUESTRAS DESCONOCIDAS:**

- Materia fecal obtenida de familias voluntarias, tanto muestras animales como muestras humanas. Ambas obtenidas de pacientes con o sin síntomas clínicos gastrointestinales y sin relación entre sí.

Figura 1. Fases para el desarrollo del método multidiagnóstico para la detección de enfermedades gastrointestinales.



El desarrollo del método (Fig.1) se llevó a cabo en tres fases. En la fase uno, se contextualizó el proyecto mediante la investigación de enfermedades emergentes de origen zoonótico que tuvieran implicaciones gastrointestinales. A partir de dichos datos se redactó la propuesta del protocolo.

Para la fase dos, se realizó el diseño de la prueba que incluye la elección de los genes que fueron utilizados como marcadores para las bacterias seleccionadas: *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterococcus faecalis*, para lo cual fue necesario que estos genes sean únicos para cada especie a identificar y de preferencia que se vean involucrados en sus procesos de infección y/o virulencia. Posteriormente, se diseñaron los oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos con el fin de utilizarlos en la amplificación de las secuencias de interés. Todo este trabajo se llevó a cabo de manera bioinformática con el fin de simular los experimentos que se realizaron en el laboratorio.

Finalmente, en la tercera fase, se estandarizó el protocolo diseñado de manera experimental. Las técnicas se realizaron en el Laboratorio de Genética y Biología Molecular (GENBIOM) de la Facultad de Medicina en la Universidad Autónoma de Querétaro.

**Definición de variables y unidades de medida:**

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de medida
<i>Campylobacter jejuni</i>	Bacteria que pertenece a la familia <i>Campylobacterace</i> . Son bacilos Gram negativo móviles por la presencia de uno o dos flagelos polares.	PCR múltiple en termociclador	Nominal dicotómica	Ausencia o presencia

<i>Salmonella enterica</i>	Bacteria que pertenece a la familia <i>Enterobacteriaceae</i> constituido por bacilos Gram negativos intracelulares anaerobios facultativos con flagelos.	PCR múltiple en termociclador	Nominal dicotómica	Ausencia o presencia
<i>Yersinia enterocolitica.</i>	Bacterias que pertenecen a la familia <i>Enterobacteriaceae</i> . Gram negativos aerobios y anaerobios facultativos.	PCR múltiple en termociclador	Nominal dicotómica	Ausencia o presencia
<i>Enterococcus faecalis.</i>	Bacterias que pertenecen a la familia <i>Enterococcaceae</i> . Son cocos Gram positivos, anaerobios facultativos.	PCR múltiple en termociclador	Nominal dicotómica	Ausencia o presencia

### **Captura de Datos generales de muestras:**

A cada participante se le realizó una historia clínica donde se obtuvieron datos generales de interés para el estudio asociados a los factores de riesgo en la transmisión de zoonosis. Dichos datos fueron: tipo de muestra (humana o veterinaria), género, edad, raza (en el caso de las muestras veterinarias) y hábitos de convivencia.

### **Toma de muestras humanas:**

1. A cada participante se le entregó un vaso de recolección de muestra.
2. Se le solicitó evacuar en el vaso y sellarlo perfectamente.
3. Se rotuló cada vaso y se conservó en hielo.
4. Al día siguiente se realizó la extracción de ADN.

### **Toma de muestras animales:**

1. Se entregó al dueño un vaso de recolección de muestra para el perro.
2. Se tomó la muestra con cuidado del piso, procurando no tomar de la porción que está en contacto directo con el piso.
3. Se rotuló cada vaso y se conservó en hielo.
4. Al día siguiente se realizó la extracción de ADN

Se eligió a una familia de seis personas (cinco adultos y un niño) con tres perros y dos gatos de mascota. Para el estudio se incluyeron a dos adultos, de 24 y 28 años y a un menor de edad de 6 años. Por otro lado, los tres perros fueron incluidos, todos adultos.

Se recolectaron las muestras una noche antes de realizar la extracción de material genético, conservando en hielo hasta el momento de su procesamiento. La colecta se repitió en tres días distintos.

### **Procesamiento de las muestras:**

#### **1. Extracción de material genético.**

Se realizó el aislamiento de ADN de las muestras obtenidas utilizando dos Kit's de extracción: "Fecal DNA Extraction" de IBI Scientific (Cat. IB47822) y "E.Z.N.A. Tissue DNA Kit" de Omega BIO-TEK (Cat. D3396-01). Para ambos se siguió el protocolo de manufactura con ciertas modificaciones.

### **KIT DE EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS FECALES "Fecal DNA Extraction" IBI Scientific (protocolo modificado)**

El kit está diseñado con la intención de aislar ADN genómico de microorganismos como bacterias y hongos a partir de muestras fecales, las cuales son homogenizadas con ayuda de reactivos de lisis y perlas de cerámica. Además, contiene columnas de remoción de inhibidores de PCR, tubos de recolección de

2ml y distintos reactivos que precipitan partículas insolubles, proteínas y ciertos inhibidores de PCR como ácido húmico.

Para los fines de este proyecto el protocolo de fábrica se modificó de la siguiente manera:

1. Transferir de 180-220 mg de materia fecal al tubo con tapa verde que contiene las perlas de cerámica.
2. Adicionar 800µl de reactivo ST1 y agitar vigorosamente antes de incubar a 70°C por 5 minutos.
3. Agitar vigorosamente a temperatura ambiente, durante cinco minutos en el vortex usando un adaptador para que los tubos se mantengan en posición horizontal.
4. Centrifugar a 8,000xg por dos minutos a 4°C y transferir 500µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5ml.
5. Adicionar 150µl del reactivo ST2 y agitar vigorosamente durante cinco segundos antes de incubar a 4°C por cinco minutos.
6. Centrifugar a 16,000xg por tres minutos a 4°C.
7. Colocar la columna con el anillo color púrpura en un tubo de recolección de 2ml para colocar 500µl del sobrenadante obtenido en el paso número seis.
8. Centrifugar a 16,000xg durante un minuto a 4°C y recuperar el líquido del tubo de recolección desechando la columna.
9. Adicionar 800µl del reactivo ST3 al líquido recuperado e inmediatamente agitar hasta homogenizar la muestra.
10. Colocar la columna con el anillo color verde en un tubo de recolección de 2ml para transferir 700µl de muestra obtenida en el paso número nueve.
11. Centrifugar a 16,000xg por un minuto a 4°C y desechar el líquido del tubo de recolección.
12. Transferir la muestra restante obtenida en el paso nueve a la columna con el anillo verde para centrifugar a 16,000xg por un minuto a 4°C y desechar el líquido del tubo de recolección.

13. Precalentar a 60°C el buffer de elución (para esto es recomendable tener una pequeña alícuota de trabajo).
14. Adicionar 400µl del reactivo ST3 a la columna con el anillo verde para centrifugar a 16,000xg a 4°C por 30 segundos y desechar el líquido obtenido en el tubo de recolección.
15. Adicionar 600µl de reactivo de lavado a la columna con el anillo color verde, el cual debe estar previamente preparado con etanol de acuerdo con las especificaciones del envase.
16. Centrifugar a 16,000xg a 4°C por 30 segundos y desechar el líquido obtenido en el tubo de recolección.
17. Repetir el paso 15 y 16 para un segundo lavado.
18. Centrifugar a 16,000xg a 4°C por tres minutos.
19. Transferir la columna con el anillo verde a un nuevo tubo de recolección de 1.5ml para adicionar 30µl de reactivo de elución en el centro de la columna.
20. Dejar reposar durante dos minutos la columna con el reactivo de elución antes de centrifugar a 16,000xg a 4°C por dos minutos.
21. El líquido que se obtiene en el tubo de recolección (ADN) debe resguardarse a -20°C.

### **KIT DE EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” Omega BIO-TEK (protocolo modificado)**

Este kit contiene columnas especializadas para la separación de material genético obtenido a partir de distintos tejidos, tubos de recolección de 2 ml, una solución de proteinasa K y distintos reactivos para la extracción efectiva del ADN.

Para los fines de este proyecto el protocolo de fábrica se modificó de la siguiente manera:

1. Colocar 50mg de materia fecal en el tubo para microcentrifuga de 1.5ml.
2. Adicionar 400µl de reactivo TL y 25µl de proteinasa K antes de agitar vigorosamente.
3. Incubar a 55°C durante cuatro horas.

4. Centrifugar a 10,000xg a 4°C por cinco minutos y transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5ml.
5. Adicionar 440µl de reactivo BL y agitar vigorosamente antes de incubar a 70°C por diez minutos.
6. Adicionar 440µl de alcohol absoluto y agitar vigorosamente.
7. Colocar la columna "HiBind" en un tubo de recolección de 2ml y transferir 700µl de muestra del paso número 6.
8. Centrifugar a 10,000xg a 4°C durante un minuto y desechar el filtrado.
9. Transferir el resto de la muestra obtenida en el paso 6 a la columna "HiBind" para centrifugar a 10,000xg a 4°C por un minuto y desechar el filtrado.
10. Precalentar el reactivo de elución a 70°C (para esto es recomendable tener una pequeña alícuota de trabajo).
11. Adicionar 500µl de reactivo HBC previamente preparado con isopropanol absoluto de acuerdo a las especificaciones del envase.
12. Centrifugar a 10,000xg a 4°C por treinta segundos y desechar el filtrado junto con el tubo de recolección.
13. Colocar la columna "HiBind" en un nuevo tubo de recolección de 2ml y adicionar 700µl de reactivo de lavado previamente preparado con alcohol absoluto de acuerdo con las especificaciones del envase.
14. Centrifugar a 10,000xg a 4°C por treinta segundos y desechar el filtrado.
15. Repetir los pasos 12 y 13 rehusando el tubo de recolección para un segundo lavado.
16. Centrifugar la columna "HiBind" a 10,000xg a 4°C por dos minutos y transferirla a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril de 1.5ml.
17. Adicionar 50µl de reactivo de elución en el centro de la columna y dejar reposar durante dos minutos antes de centrifugar a 10,000xg a 4°C por un minuto.
18. Repetir el paso 17 para una segunda elución.
19. El líquido que se obtiene en el tubo de recolección (ADN) debe resguardarse a -20°C.

## **2. Medición de pureza e integridad.**

El material genético, se cuantificó por nanospectrofotometría (NanoDrop Thermo Fisher), considerando una muestra de calidad con un valor óptimo dentro del rango de 1.7-2 (260/280) y de 2.0-2.2 (260/230), así como una concentración cercana o mayor a 30 -100 ng/μl. Se colocaron 2 μl de muestra para la medición en el pedestal y la curva de detección fue blanqueada con la solución de elución.

La integridad del material genético obtenido se determinó mediante un gel electroforético de agarosa a una concentración de 1%, para lo cual se pesaron 1 g de agarosa para ser disuelta en 100 ml de solución Tris-Acetato-EDTA al 1x (TAE) compuesto por Tris-acetato a 0,04 M, Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) a 1 mM y pH 8,0. Se calentó la mezcla de la agarosa y el TAE para disolverlo y se le agregó, con las medidas necesarias de seguridad, 10μl de bromuro de etidio para su posterior observación en un transiluminador UV.

## **3. Diseño de oligonucleótidos específicos para la identificación de bacterias.**

El diseño de los oligonucleótidos se llevó a cabo en el Software Oligo 7 y se analizaron de manera manual ajustando las condiciones de modo que cumplieran con los estándares de calidad (Tabla 4) para PCR que están incluidas en las reglas MIQE (Bustin, et al., 2009) con 17- 28 pares de bases de longitud, una composición de 40-60% de C+G, terminando en una G o C, CG o GC y con una temperatura de alineación (T<sub>m</sub>) de 60° C. Dependiendo del gen con el cual se esté trabajando los oligonucleótidos fueron diseñados para flanquear amplicones de tamaños lo suficientemente distintos para poder ser observados en un gel de electroforesis sin confundirlos.

Tabla 4. Condiciones idóneas para el diseño de oligonucleótidos específicos utilizados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Bustin et al., 2009).

CONDICIÓN	CARACTERÍSTICA
Tamaño	De 20-25 nucleótidos

Base en el extremo 3´	Debe ser una C o una G
Temperatura de fusión	50-60°C
Contenido de G-C	40-60%
Autocomplementariedad	Debe ser evitada por formación de dímeros y estructuras secundarias
Identidad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

#### **4. Pruebas de estandarización.**

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Protocolo 1):

El primer protocolo utilizado para estandarizar la técnica de PCR multiplex fue con Radiant 2x RED Taq Mix (Cat. C225) en reacciones de 25µl. Se utilizaron para la comprobación individual de los controles 12.5µl de Master mix (Radiant), 1µl de oligonucleótido sentido "*bacteriaF*", 1µl de oligonucleótido antisentido "*bacteriaR*", 2µl de ADN bacteriano y 8.5µl de agua grado biología molecular. Para las reacciones múltiples se agregaron 12.5µl de Master mix (Radiant), 0.5µl de los oligonucleótidos "*SalmoF*", "*SalmoR*", "*YersiF*", "*YersiR*", "*CampyF*" y "*CampyR*", 1µl de ADN de cada una de las bacterias y 8.5µl de agua grado biología molecular.

Las condiciones que se programaron en el termociclador fueron: un ciclo de 95°C por 1 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y un ciclo infinito de 4°C como refrigeración en caso de requerirlo.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Protocolo 2):

En el segundo protocolo utilizado se prepararon reacciones de 27µl, de los cuales 12.5µl son de Radiant 2x RED Taq Mix (Cat. C225), 8.5µl de agua grado biología molecular, 1µl de oligonucleótido sentido "*bacteriaF*", 1µl de oligonucleótido antisentido "*bacteriaR*", 1.5µl de MgCl<sub>2</sub>, 0.5µl de dntp's y 2µl de ADN bacteriano.

Las cantidades de DNTP's fueron ajustadas (aumentadas) suponiendo que el mix que se utilizó tiene 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> o que tiene 3mM de MgCl<sub>2</sub>. Basándonos en este supuesto se realizaron dos experimentos con distintas cantidades de los reactivos adicionales (DNTP's y MgCl<sub>2</sub>).

De cada experimento (1.5mM y 3mM) se realizaron tres reacciones donde en la primera no se le agregó ninguno de los dos reactivos adicionales, a la segunda y tercera reacción se le agregaron 0.5µl más que la reacción anterior.

Las condiciones que se programaron en el termociclador fueron: un ciclo de 95°C por 1 minuto, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos y un ciclo infinito de 4°C como refrigeración en caso de requerirlo.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Protocolo 3):

La técnica se realizó con un Kit específico para reacciones múltiples Jena Bioscience Multiplex PCR Master. A cada muestra (ADN) se le realizó PCR utilizando los oligonucleótidos específicos en reacciones de 50µl. La reacción tendrá las siguientes especificaciones: Para la comprobación individual de los controles se usan 25µl de Master mix, 2µl de oligonucleótido sentido "*bacteriaF*", 2µl de oligonucleótido antisentido "*bacteriaR*", 3µl de ADN bacteriano y 18µl de agua grado biología molecular. Para las reacciones múltiples se agregaron 25µl de Master mix, 2µl de los oligonucleótidos "*SalmoF*", "*SalmoR*", "*YersiF*", "*YersiR*", "*CampyF*" y "*CampyR*", 4µl de ADN de cada una de las bacterias.

Las condiciones que se programaron en el termociclador fueron: un ciclo de 95°C por 12 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 60°C por 40 segundos y 72°C por un minuto, un ciclo de 72°C por 5 minutos y un ciclo infinito de 4°C.

Unificación de concentraciones:

Las cepas fueron homogenizadas en cuanto a su concentración, ambas a 15ng/µl. Esto se realizó con la siguiente fórmula:  $C_1V_1=C_2V_2$

## **5. Electroforesis**

Se utilizaron cámaras con capacidad para geles de 100-150ml. Por cada 100ml de TAE se agregó un gramo de agarosa, se mezcló y se calentó lentamente hasta que la agarosa se disolvió por completo. Posteriormente se agregaron 10µl de bromuro de etidio y se mezcló, una vez homogenizada la solución, se vertió en el molde y se le colocaron un par de peines para formar los pozos. Cuando la mezcla gelificó, fueron retirados los peines para desmoldar el gel y colocarlo en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con una solución amortiguadora (TAE) y se conectó a un par de electrodos que proporcionaron una corriente de 100 volts por 45 min.

Para cargar las muestras en el gel, fueron necesarios 3µl de marcador molecular en el primer carril y para los siguientes, 5µl de producto de PCR más 5µl de solución de corrida.

## **6. Comprobación de Identidad de los productos obtenidos**

El producto de PCR se cargó en geles de agarosa al 1% y fue sometido a electroforesis para corroborar el tamaño del producto esperado, utilizando como referencia la escalera 1kb y 100pb (Invitrogen). Se tiñó el gel con bromuro de etidio y se observó con luz ultravioleta.

## **7. Sensibilidad**

La sensibilidad se determinó mediante diluciones seriadas (Tabla 5) de las cepas *Salmonella enterica* (concentración de 15ng/µl), *Yersinia enterocolitica* (concentración de 9.3ng/µl) y *Campylobacter jejuni* (concentración de 2.9ng/µl). Se realizaron tres diluciones, la primera tomando 1 µl de la muestra de ADN original y agregándole nueve microlitros de agua grado biología molecular (1:10), la

segunda tomando 1µl de la dilución número uno y agregándole 9µl de agua grado biología molecular (1:100) y la tercera tomando 1µl de la dilución número dos y agregándole 9µl de agua grado biología molecular (1:1000).

Tabla 5. Concentración del ADN en cada dilución de la curva de estandarización.

MUESTRA	DILUCIÓN 1:10	DILUCIÓN 1:100	DILUCIÓN 1:1000
<b>Salmonella</b>	1.5ng/µl	0.15ng/µl	0.015ng/µl
<b>Yersinia</b>	0.93ng/µl	0.093ng/µl	0.0093ng/µl
<b>Campylobacter</b>	0.29ng/µl	0.029ng/µl	0.0029ng/µl

A partir de estas diluciones se llevó a cabo una PCR individual (una por cepa) y una múltiple, todas de 50µl, lo cual se repitió en tres ocasiones distintas (tres días diferentes). Para las reacciones individuales se usaron 25µl de Master mix (Jena Bioscience), 2µl de oligonucleótido sentido “*bacteriaF*”, 2µl de oligonucleótido antisentido “*bacteriaR*”, 3µl de ADN bacteriano y 18µl de agua grado biología molecular. Para las reacciones múltiples se agregaron 25µl de Master mix (Jena Bioscience), 2µl de los oligonucleótidos “SalmoF”, “SalmoR”, “YersiF”, “YersiR”, “CampyF” y “CampyR”, 4µl de ADN de cada una de las bacterias.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## ELECCIÓN DE GENES

El primer reto al que el proyecto se enfrentó fue la correcta selección de los genes blanco para la identificación de los microorganismos, en especial de las cepas patógenas de interés clínico. Se realizó una revisión de la literatura para seleccionar los genes que participarán directamente en el proceso de infección o virulencia. A continuación, se describen los genes seleccionados para tal fin (Tabla 6).

### ***Salmonella enterica***

El gen seleccionado fue *invA* para la identificación de *Salmonella enterica*. Algunas bacterias Gram negativas utilizan una maquinaria de “inyección” que facilita la infección, para lo cual, son necesarias algunas proteínas transmembranales que forman parte de dicho complejo (Worrall et al., 2010). La virulencia del género *Salmonella*, se ha visto ligada a información almacenada tanto en plásmidos como en los cromosomas. Uno de los genes con mayor relevancia es el gen *invA*, del cual se transcribe una proteína requerida en la membrana interna de la bacteria con la función de penetrar las membranas plasmáticas y facilitar la invasión de las células epiteliales (Kadry et al., 2019). Estas proteínas son traslocadas a través de la maquinaria de inyección (inyectosoma) en procesos necesarios para concluir el proceso de motilidad bacteriana (Worrall et al., 2010). En el “Journal for Food Science” se publicó una lista de microorganismos patógenos que son transmitidos por los alimentos donde mencionan la identificación molecular de *S. enterica* a través del gen de invasión *invA* (Tao et al., 2020), el cual ya es considerado como el gen estándar para el diagnóstico de la salmonelosis (Kadry, 2019) al estar presente en la mayoría de las variedades patógenas del género *Salmonella* (Rahn et al., 1992). Utilizando técnicas de biología molecular, la detección de *S. enterica* por el gen *invA*, es efectiva al contener secuencias únicas evitando falsos positivos que pueden ser comunes en las técnicas de cultivo y pruebas bioquímicas (Yanestria et al., 2019).

### ***Campylobacter jejuni***

La identificación de *Campylobacter jejuni* fue a través del gen CdtB. Existen mecanismos moleculares relacionados con la patogenicidad bacteriana como la adherencia, invasión o capacidad citotóxica, que se relacionan directamente, con la evolución y grado de la enteritis (Rizal et al., 2010). En el caso de *Campylobacter jejuni*, el gen de la Toxina de Distención Citoletal (Cdt) está asociado a la producción de citotoxinas (Purdy et al., 2000) letales para los eritrocitos (células hospederas) y está formada a su vez por tres subunidades: CdtA, CdtB y CdtC (Gharajalar et al., 2020). Estas subunidades son usadas como genes de identificación de acuerdo con la especie (Gharajalar et al., 2020). Se ha reportado como útil para la identificación de *C. jejuni* en muestras de carne contaminada (Zoorman, 2002). Además de la acción citotóxica, se ha reportado que el gen CdtB tiene actividad de ADNasa por lo que presenta la capacidad de romper las cadenas de ADN y se cree que está involucrado en procesos cancerígenos (He et al., 2019). A partir de ello, en el 2019, He y colaboradores insertan dicho gen modificado a una población murina, que al compararla con los ratones portadores del gen “wild type”, observaron una mayor tendencia a desarrollar tumores de mayor tamaño, en comparación con los que portan el gen mutado.

### ***Enterococcus faecalis***

La identificación de *Enterococcus faecalis* se realiza a través de una proteína de “Choque térmico” que evolutivamente se ha conservado en la especie y la cual es transcripta del gen GroEI (flis-740R); (Viale et al., 1994; Wei-Wen et al., 2019). Una de las principales funciones relacionadas es la participación directa en la restauración de la actividad biológica de las proteínas mal plegadas, utilizando proteínas auxiliares como las chaperonas. Desde 1997 se han realizado pruebas inmunológicas para estudiar estas proteínas en distintas condiciones llegando a la conclusión de que esta proteína otorga resistencia a cambios térmicos extremos a los organismos que lo portan, lo cual se considera como una ventaja para los procesos de infección bacteriana (Flahaut et al., 1997). Por tal motivo, desde el

año 2005 ya es considerado un gen de referencia para su identificación molecular (Tsai et al., 2005).

### ***Yersinia enterocolitica***

Fue identificada *Yersinia enterocolitica* a partir del gen ail. Este gen está relacionado con la capacidad de infección a través de técnicas de ataque o invasión a la célula blanco; así como por la capacidad de resistencia que tiene ante las defensas celulares (Sihvonen et al., 2011). La proteína codificada por el gen ail es multifuncional y se encuentra en el exterior de la membrana, la cual le provee a *Yersinia enterocolitica* resistencia sérica (Thomson et al., 2019). Es un marcador usado para la identificación molecular de esta bacteria en productos alimenticios (Tao et al., 2020) ya que se ha comprobado, mediante confrontaciones con métodos de identificación convencionales (fenotípicos), que es efectivo para su reconocimiento (Kraushaar et al., 2011). Tres de las 19 especies del género *Yersinia* son patogénicas para los humanos, siendo la especie *Y. enterocolitica* la de mayor importancia, por lo que su identificación ha sido una prioridad desde hace muchos años, y aún hoy en día se utiliza gen ail como marcador de referencia (Joutsen et al., 2020).

Tabla 6. Genes elegidos como candidatos para la identificación de los microorganismos de interés (*Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis* y *Yersinia enterocolitica*)

ESPECIE	NOMBRE DEL GEN	ACCESO GENBANK	MECANISMO	REFERENCIA
<i>Salmonella enterica</i>	invA	M90846.1	INVASIÓN	Rahn et al., 1992 Yanestria., 2019 Kadry et al., 2019 Tao et al., 2020
<i>Campylobacter jejuni</i>	CdtB	904405	TOXINA	Zoorman., 2002 Zhen et al., 2018 Gharajalar et al., 2020 Wysok et al., 2020
<i>Enterococcus faecalis</i>	GroEI (flis-740R)	MH109120.1	TÉRMICO	Flahaut et al., 1997 Tsai et al., 2005 Wen et al., 2019
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ail	GU722202.1	PROTECCIÓN	Kraushaar et al., 2011 Sihvonen et al., 2011 Thomson et al., 2019 Tao et al., 2020 Joutsen et al., 2020

## DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Posterior a la selección de los genes candidatos para la identificación de los microorganismos, se diseñaron cuatro pares de oligonucleótidos (Tabla 8), un par para cada microorganismo, para la amplificación de la secuencia blanco por medio de la PCR. El diseño se realizó en el programa “Primer designing tool” de NCBI y Software Oligo 7 (Tabla 7).

Tabla 7. Características de los oligonucleótidos para la identificación de las bacterias *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, y *Yersinia enterocolitica*.

NOMBRE (F/R)	SITIO DE RECONOCIMIENTO	TEMPERATURA DE ALINEACIÓN	PORCENTAJE DE G/C	FORMACIÓN DE DÍMEROS	FORMACION DE HORQUILLAS	PORCENTAJE DE IDENTIDAD
SALMOF/SALMOR	+559F/-248R	60°C	42%F/57%R	AUSENTE	AUSENTE	100%
CAMPYF/CAMPYR	+115F/-148R	60°C	42%F/50%R	AUSENTE	AUSENTE	100%
ENTEROF/ENTEROR	+243F/-35R	60°C	50%F/42%R	AUSENTE	AUSENTE	100%
YERSIF/YERSIR	+48F/-134R	60°C	50%F/42%R	AUSENTE	AUSENTE	100%

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de secuencias blanco para la identificación para las bacterias *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis*, y *Yersinia enterocolitica*.

NOMBRE (F/R)	SENTIDO 5'-3'	ANTISENTIDO 5'-3'	TM	PRODUCTO pb
SALMOF/SALMOR	GAAGGCCGGTATTATTGATG	CTGAGGAAGGTACTGCCAG	60° C	1,329 pb
ENTEROF/ENTEROR	GATATTGCTGGTGACGGAAC	GTCAACAATCACTGATCCTTC	60° C	1,108 pb
CAMPYF/CAMPYR	GGAGTGTTAGTGTAAGACAAC	CTTGCTTGAGTTGCGCTAGT	60° C	493 pb
YERSIF/YERSIR	GCGTCTGTTAATGTGTACGC	TCTTACTTGACTGACTGACC	60° C	314 pb

El diseño de los oligonucleótidos fue uno de los puntos más críticos del proyecto. Existen muchos programas y sitios web que incluso, de manera gratuita, te permiten diseñar oligonucleótidos libres de formación de estructuras secundarias y autocomplementación (Rodríguez et al., 2015) y a pesar de que los presentes oligonucleótidos fueron diseñados inicialmente con un software especializado, se refinaron manualmente apegados a la guía MIQE publicada en 2009 donde se mencionan diversos requisitos de calidad como la usencia de formación de dímeros o estructuras autocomplementarias (Bustin et al., 2009), horquillas, formación de productos inespecíficos y otras características que intervienen en la acción de la RNA polimerasa (Thornton et al., 2015). En 2020 dicha guía fue actualizada y se menciona que además de las condiciones óptimas de diseño, hay información necesaria que se debe reportar para posibles réplicas del experimento en laboratorios distintos, tales como la secuencia específica de los

oligonucleótidos, el número de acceso o símbolo oficial del gen a amplificar y la localización y extensión del amplicón (dMIQE Group, 2020).

Es necesario seguir, de manera sistemática, los pasos que a continuación se enuncian para realizar pruebas moleculares exitosas a partir de un buen diseño de oligonucleótidos: correcta selección del gen blanco, diseño del oligonucleótidos (mediante programas adecuados), validación *in silico*, optimización de las condiciones de PCR, evaluación experimental de la especificidad (electroforesis, secuenciación y comparación con secuencias publicadas) y evaluación experimental de la eficiencia (curva estándar) (Rodríguez et al., 2015). Apegados a lo anterior, este diseño de oligonucleótidos para la identificación de los cuatro microorganismos cumple con los requerimientos antes mencionados.

En la literatura se han reportado diferentes paneles de oligonucleótidos que han demostrado el gran potencial que presentan las pruebas basadas en la identificación de genómica de los microorganismos, en especial aquellas que son multidiagnósticas. Un ejemplo de esto es la prueba desarrollada para la identificación de diversas cepas de *Salmonella*, en especial aquellas patógenas, en muestras de camarón para su consumo humano, donde fue exitoso el procesamiento y diagnóstico en poco tiempo sin pasar las 4 hrs (Sahu et al., 2019). Es importante resaltar que se utilizó el mismo gen candidato que el presente estudio. En cuanto a las pruebas para identificar microorganismos causantes de gastroenteritis, se han propuesto diversas pruebas como la desarrollada por Zhang y colaboradores (2015).

Los resultados obtenidos con las pruebas moleculares, en especial las pruebas multidiagnósticas por PCR, han demostrado que superan la eficacia, especificidad y sensibilidad en comparación con los diagnósticos convencionales que incluyen los cultivos microbianos, identificación y clasificación basada en el metabolismo bioenergético, inmunoensayo y microscopia (Zhang et al., 2015).

## ESTANDARIZACIÓN DE EXTRACCIÓN DE ADN

Muestras silvestres:

Con la finalidad de probar la efectividad de los oligonucleótidos diseñados y los métodos de aislamiento de ADN, se procesaron un total de 6 muestras (Tabla 9) de tres pacientes humanos (H1, H2 y H3) y tres pacientes veterinarios (H1, H2 y H3) con tres repeticiones.

Tabla 9. Características de las muestras procesadas.

NOMBRE	TIPO DE MUESTRA	GÉNERO	EDAD (humanos) RAZA (perros)
H1	HUMANA	MASCULINO	6 AÑOS
H2	HUMANA	FEMENINO	29 AÑOS
H3	HUMANA	MASCULINO	24 AÑOS
V1	VETERINARIA	FEMENINO	BOXER
V2	VETERINARIA	FEMENINO	MESTIZO
V3	VETERINARIA	FEMENINO	CHIHUAHUA

Se compararon dos métodos de extracción de ADN. El kit “Fecal DNA Extraction”, facilitó la obtención de ADN genómico de microorganismos a partir de muestras fecales con la ventaja de contar con un reactivo que precipita los compuestos reportados como inhibidores de la acción de la ARN polimerasa como son el ácido húmico, hemoglobina, melanina, partículas insolubles y proteínas.

Las extracciones se realizaron con 180-220 mg de materia fecal y se siguió el protocolo de manufactura con mínimas modificaciones obteniendo distintas lecturas de concentración y pureza (Tabla 10). Dichas modificaciones fueron el ajuste de las cantidades de reactivos dependiendo de la materia orgánica inicial, esto respetando las indicaciones del fabricante.

Tabla 10. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific.

	CONCENTRACIÓN			260/280			260/230		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
H1	380.3	163.1	297	1.85	1.89	1.84	1.89	1.84	2
H2	282.7	234.2	165.6	1.88	1.89	1.87	2.19	2.2	2.03
H3	45.5	318.7	261.8	1.82	1.87	1.86	1.28	2.17	2.13
V1	486.3	97.1	388.7	2.07	1.9	2.1	2.25	1.79	2.31
V2	236.3	80.2	248.3	1.95	2.06	2	1.75	1.99	2.15
V3	194.9	153.1	385.6	1.97	1.9	1.99	2.27	2	2.3

El kit E.Z.N.A. Tissue DNA nos permite obtener ADN a partir de tejidos, hisopos bucales, cultivos celulares, sangre, fluidos corporales, tejidos conservados en parafina entre otros con ayuda de una columna. Entre las ventajas que presenta este kit es evitar el paso de precipitación con alcohol, el uso disminuido de algunos compuestos tóxicos como el fenol y el cloroformo; así como un tiempo reducido de la técnica.

En las extracciones se usaron 50mg de materia fecal y se siguió el protocolo de manufactura, obteniendo distintas lecturas de concentración y pureza (Tabla 11).

Tabla 11. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” de OMEGA Bio-Tek.

	CONCENTRACIÓN			260/280			260/230		
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
H1	205	353.8	403.6	1.71	1.88	1.82	0.93	1.59	1.66
H2	85.3	186.9	421.5	1.78	2.03	2.08	1.25	2.21	2.28
H3	240.9	447.7	367	1.98	2.04	1.87	1.64	2.07	2.18
V1	91.11	479.7	762.2	2.2	2.09	2.14	0.68	2.29	2.43
V2	102.5	558.4	595.9	2.1	2.09	2.1	0.73	2.16	2.26
V3	344.4	893.4	863.4	2.08	2.08	2.13	2.1	2.26	2.29

A partir de estas muestras se determinó la integridad del material genético obtenido por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 2.).

Figura 2. Presencia e integridad del ADN las muestras humanas (Hn) y veterinarias (Vn) obtenidas con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” y el kit “Fecal DNA Extraction”.



En la sección superior de la figura, se observan las muestras humanas (Hn) procesadas con ambos kits de extracción de ADN. De izquierda a derecha se observan seis carriles con presencia de material genético, el carril número 7 (Día 1/H3/ Fecal DNA Extraction Kit) y el 11 (Día 1/H1/E.Z.N.A. Tissue DNA Kit) se visualizan vacíos. A partir de los resultados anteriores, fueron descartadas las muestras Hn del día uno, por lo que la extracción de ADN de esas muestras se repitió posteriormente.

En cuanto a las muestras veterinarias (Vn) (sección inferior de la figura) procesadas con el Fecal DNA Extraction Kit, en el carril correspondiente al día dos no se observa presencia de ADN, así como en los carriles correspondientes al día uno con muestras procesadas con E.Z.N.A. Tissue DNA Kit. También estas muestras fueron repetidas posteriormente.

De manera general las bandas observadas se muestran en barrido, lo cual nos indica dos posibilidades. La primera es que el material genético se encuentra degradado y fragmentado, obteniéndose secuencias de ADN de diferentes tamaños. Por otro lado, la segunda posibilidad es que el material genético presente buena integridad, pero al ser de origen fecal, la diversidad de organismos y presencia de alimento implica una gran variedad de tamaños en el ADN, por lo que las bandas ocuparan distintas alturas en el carril, sin embargo, hace falta evidencia que sostenga dicha afirmación.

Durante el periodo de lisis es común utilizar reactivos con acción detergente y alguna proteasa para la ruptura de las membranas (Wang, et al., 2002) en el presente proyecto, solo el kit E.Z.N.A. Tissue DNA incluye una solución de proteinasa K en el proceso de lisis. El Fecal DNA Extraction por el contrario, no da especificaciones del contenido de su reactivo de lisis pero se observó que la ruptura de las membranas se ocasiona por una acción mecánica por medio de perlas de cerámica. En cuanto a la eliminación de DNAsas, proteínas, contaminantes y otros componentes que son considerados como inhibidores de la reacción de PCR, Sthahl y colaboradores (1988) utilizaron fenol y cloroformo y desde entonces este método ha sido utilizado de manera común en todos los laboratorios de biología molecular.

A pesar de ello, las técnicas diseñadas actualmente tratan de disminuir las sustancias nocivas y corrosivas que dañen la integridad del ADN. Los kits utilizados no mencionan ninguno de estos dos componentes ni recomiendan el uso de campanas de extracción durante el proceso por lo que se sugiere que estarían involucrados otros tipos de componentes como co-precipitantes tales como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que se usan para el mismo fin disminuyendo la exposición al fenol. En cuanto a la precipitación del ADN los kits utilizados son conservadores ya que, de manera general, se recomienda utilizar etanol absoluto o isopropanol para lograrlo y efectivamente en ambos protocolos los reactivos son adicionados con alcohol absoluto.

El kit E.Z.N.A. Tissue DNA, ha demostrado ser un protocolo efectivo para la extracción de microorganismos zoonóticos como la cepa 19 de Brucella, donde se comparó con otras 3 técnicas (Qiagen DNeasy, GE Illustra, Quanta Extracta y el kit IBI Science DNA Tissue) en muestras obtenidas de tejido de bovino contaminado. Los resultados obtenidos fueron suficientemente prometedores al evidenciar una mayor extracción de ADN y de mejor calidad, lo que se reflejó en un menor ciclo de cuantificación de la expresión del gen estándar por PCR en tiempo real (Hull et al., 2018). Al ser un kit bastante potente en la extracción del ADN, se ha usado en muestras complicadas como las obtenidas de ostras del pacífico, donde se reporta una dificultad metodológica para el éxito de la extracción del ADN, logrando obtener concentraciones útiles para los estudios genómicos (Pathirana et al., 2019). En el presente estudio, el kit permitió una correcta y suficiente extracción para su posterior análisis e identificación de las cepas zoonóticas de interés, a pesar de utilizar muestras fecales, las cuales no estaban incluidas en la hoja técnica del producto.

Es una gran dificultad extraer ADN de calidad óptimas condiciones que garantice los resultados obtenidos de estudios genómicos, en especial en las muestras fecales donde existen una composición heterogénea de microorganismos, alimento y células presentes. Esta situación, ha sido una de las principales razones que limitan la estandarización del método de extracción y genera gran incertidumbre para su procesamiento (Greathouse et al., 2019). Existen protocolos que se ofertan como especializados en el manejo y obtención de material genómico de este tipo de muestras, como el kit probado en el presente estudio el Fecal DNA Extraction y los resultados han evidenciado su gran potencial en obtener muestras que registraron concentraciones aceptables y que fueron exitosas en la identificación de genes por PCR. Una de las grandes ventajas que presentan los protocolos especializados en obtención de ADN a partir de muestras fecales, es la adición de un paso inicial donde se somete la muestra completa a un proceso de homogenizado vigoroso con perlas de cerámica. Este paso ha sido reportado como clave en la obtención de ADN óptimo para análisis genómicos

(Lim et al., 2020). Entre los kits con mayor popularidad se reporta el PowerFecal ProDNA, QIAamp (Cat. 51804) (Lim et al., 2020) no analizado en el presente estudio, sin embargo, los resultados obtenidos son bastante similares con los obtenidos con el Fecal DNA Extraction. A la fecha, no se encontraron reportes comparativos sobre la eficacia del kit Fecal DNA Extraction en muestras de humanos y animales, por lo tanto, los resultados del presente estudio serán un importante antecedente que abrirá oportunidades de estudio para estandarizar, a mayor detalle, su uso con fines de diagnóstico clínico para infecciones zoonóticas.

Por último, en relación con el costo del procesamiento (Tabla 12) el kit Fecal DNA Extraction, tienen un costo de \$508 dls (\$10,444.48 MXN) con un total de 100 reacciones, lo que equivale a \$ 104.44 MXN. Sumando los costos adicionales de reactivos y consumibles usados, el costo total del procesamiento total de una muestra, solo relacionado con la extracción de ADN es \$110.00 MXN. En cuanto al kit E.Z.N.A. Tissue DNA tiene un costo de 89 dls (\$1,832.51 MXN) con un total de 50 reacciones, lo que equivale a \$36.65 MXN, considerando los costos adicionales, una muestra procesada sale en \$43.00 MXN.

Tabla 12. Costos promedio del procesamiento de una reacción en cada kit (E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” de OMEGA Bio-Tek y con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific).

PRODUCTO	NÚMERO DE CATÁLOGO	TIEMPO DE PROCESAMIENTO	NÚMERO DE REACCIONES	COSTO TOTAL	COSTO POR REACCIÓN
E.Z.N.A. Tissue DNA	Cat. D3396-01	6 horas	50 reacciones	\$1,832.51 MXN	\$43.00 MXN
Fecal DNA Extraction	Cat. IB47822	2 horas	100 reacciones	\$10,444.48 MXN	\$110.00 MXN

### Muestras bacterianas control:

Las cepas de *Salmonella enterica* fueron obtenidas del cepario perteneciente a la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, a cargo de la Dra.

Montserrat Hernández. Las cepas *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni* se adquirieron en la empresa ATCC (American Type Culture Collection) y la cepa *Enterococcus faecalis* fue proporcionada por el Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro, a cargo del Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez.

A la cepa de *Salmonella enterica*, se les extrajo ADN con ambos kits (E.Z.N.A. Tissue DNA Kit y Fecal DNA Extraction) a partir de 700 y 300 microlitros obteniendo las siguientes lecturas de concentración y pureza (Tabla 13).

Tabla 13. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA Kit” de OMEGA Bio-Tek y con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific a partir de muestras fecales.

Fecal DNA Extraction				E.Z.N.A. Tissue DNA Kit			
MUESTR A	CONCENTRACI ÓN ng/µl	260/28 0	260/23 0	MUESTR A	CONCENTRACI ÓN ng/µl	260/28 0	260/23 0
Salmo 700	36.4	1.96	2.86	Salmo 700	49.3	1.9	2.2
Salmo 300	19.2	2.12	4.27	Salmo 300	37.5	1.8	2.1

A las siguientes tres cepas adquiridas (*Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni* y *Enterococcus faecalis*) se les extrajo ADN únicamente con el kit Fecal DNA Extraction por disponibilidad del material, obteniendo las siguientes lecturas concentración y pureza (Tabla 14).

Tabla 14. Concentración y pureza de las muestras procesadas con el kit “Fecal DNA Extraction” de IBI Scientific a partir de muestras bacterianas.

<b>Fecal DNA Extraction</b>			
<b>MUESTRA</b>	<b>CONCENTRACIÓN ng/μl</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
Yersi 700	9.3	2.01	1.74
Yersi 300	7.4	1.93	1.56
Campy 700	2.9	1.78	0.94
Campy 300	2.7	1.64	0.84
Entero 700	7.1	2.24	1.31
Entero 300	4.5	1.82	0.95

### **EXTRACCIÓN DE ADN MUESTRAS AISLADAS**

Se obtuvieron muestras humanas (H1, H2, H3) y muestras veterinarias (V1, V2, V3) que no estuvieran relacionadas entre ellas para corroborar la eficacia de las técnicas de extracción, las cuales fueron medidas en el nanoespectrofotómetro dando las siguientes lecturas:

Tabla 15. Concentración y pureza con el kit “E.Z.N.A. Tissue DNA” de OMEGA Bio-Tek y con el kit “Fecal DNA Extraction de IBI Scientific a partir de muestras fecales.

<b>Fecal DNA extract Kit</b>			
<b>MUESTRA</b>	<b>CONCENTRACIÓN ng/μl</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>V1</b>	76.5	2.03	1.38
<b>V2</b>	117	2.09	2.76
<b>V3</b>	403.1	1.94	2.43
<b>H1</b>	292.5	1.92	2.27
<b>H2</b>	32.4	2.17	2
<b>H3</b>	176.5	1.91	2.53
<b>E.Z.N.A. Tissue DNA Kit</b>			
<b>MUESTRA</b>	<b>CONCENTRACIÓN ng/μl</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>V1</b>	126.5	1.99	1.98
<b>V2</b>	129	2.08	2.03
<b>V3</b>	122.1	2.02	1.96

<b>H1</b>	188	1.94	1.86
<b>H2</b>	55	1.71	0.96
<b>H3</b>	57.6	2.04	1.37

En los métodos moleculares que involucran el uso de ácidos nucleicos, se debe asegurar una buena concentración, pureza e integridad en la extracción de material genético para la validez del análisis posterior (Nordgard, et al., 2005). En este proyecto la confiabilidad en el diagnóstico se logró usando la técnica de PCR, por lo que únicamente se utilizaron muestras que después de la extracción de ADN mostraron valores adecuados que reflejaran dicha calidad como una concentración de ADN alrededor de 30-100ng/μl y valores cercanos a 1.8- 2.0 en lecturas de los rangos 260/280 y 260/230. Además, el origen de estas, al ser materia fecal, conlleva una variable alimenticia que, por su diversidad en los individuos, el exceso de fragmentación y los contaminantes, se consideró un desafío para lograr estas condiciones óptimas.

En el 2002, Blau y colaboradores, reportaron que en especial la fragmentación y la variación del bolo alimenticio, eran las principales limitantes en su estudio para las técnicas moleculares que realizaron. Los resultados del presente estudio refuerzan lo anterior, al presentar una amplia diversidad de material inicial y por lo tanto el proceso de extracción no fue sencillo en algunas ocasiones, sin embargo, se logró con resultados favorables. Además de tener en cuenta la dieta del paciente, Li y colaboradores (2003) recomiendan que antes de iniciar con el proceso de extracción, sean retirados los fragmentos de alimento más grandes que interfieran en el proceso. En el caso de protocolos probados actualmente, esto se realizó posterior al periodo de lisis con ayuda de una centrifugación a baja velocidad para eliminar todos esos fragmentos grandes presentes, debido a que se menciona que entre menor sea el tamaño de los fragmentos mayor podrá ser el rendimiento del ADN obtenido (Holden, et al., 2003).

El kit de extracción Fecal DNA Extraction, nos permitió obtener concentraciones desde 97 hasta 380ng/μl por muestra, los cuales están dentro de los rangos aceptables según Cavaluzzi (2004), donde se reportó que en una lectura de

absorbancia a 260 nm es esperado un valor alrededor de 50ng/μl para ADN de muestras fecales.

El tiempo en el que se completa el protocolo con el kit de muestras fecales, es de aproximadamente tres horas incluyendo el proceso de lisis y la cantidad de muestra inicial es bastante reducida (180-220mg). Por otro lado, con el kit E.Z.N.A. Tissue DNA se obtienen concentraciones muy por encima de las obtenidas con el kit de muestras fecales obteniéndose en un rango que va desde los 91ng/μl hasta los 890ng/μl a partir de una muestra inicial de 50mg de materia fecal. De manera general en los kits comerciales se tiene un rango de cantidad de muestra inicial que va de 20-200mg (Jenkins, 2010). Sin embargo, el tiempo que se le debe dedicar a este protocolo es de aproximadamente seis horas y media incluyendo el proceso de lisis.

La integridad del material genético obtenido a partir de ambos protocolos fuera la esperada ya que se realizó la extracción un día después de su recolección, esto debido a que Nordgard y colaboradores (2005) reportaron que los periodos largos de almacenaje y la exposición al aire modifican la composición microbiana de la muestra, lo que se puede compensar, en caso de no tener la posibilidad de procesarlas de inmediato, congelando el material hasta su uso según Withford (1998), lo cual en muchas ocasiones se implementó ya que el acceso a las instalaciones del laboratorio no era permitido diariamente.

A pesar de ello, las pruebas moleculares que se llevaron a cabo posteriormente tuvieron muy buenos resultados en cuanto a amplificación de los fragmentos esperados y a la sensibilidad de la prueba incluso con concentraciones muy bajas de material genético como nos mostraron las reacciones con diluciones seriadas.

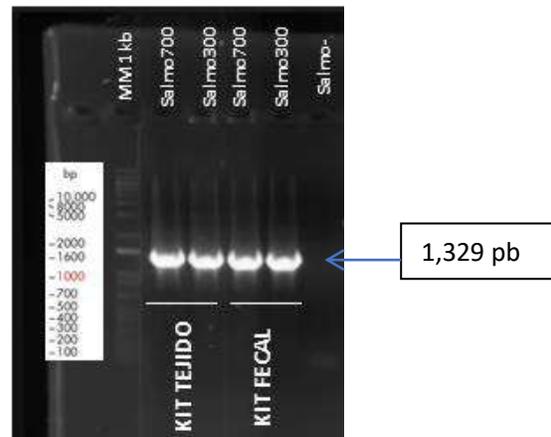
## **PCR CONTROLES POSITIVOS**

Con la finalidad de corroborar la eficacia de los oligonucleótidos diseñados para la prueba, se realizaron PCR con muestras positivas obtenidas de los ceparios antes

mencionados. Fueron analizadas las cepas control de manera individual y de manera múltiple conforme se obtuvieron. Posteriormente fueron visualizadas en geles de agarosa al 1%.

La primera en ser obtenida fue *Salmonella enterica* (Figura 3). Se procesaron 4 muestras diferenciadas por el volumen de muestra procesado (700µl o 300µl) con ambos Kits el E.Z.N.A. Tissue DNA Kit y el DNA Fecal DNA Extract.

Figura 3. Identificación de *Salmonella enterica* por PCR punto final con muestras obtenidas de los dos protocolos analizados por medio de la expresión del gen de referencia invA.



En el primer carril se observa el marcador de paso molecular de 1 Kb, el cual fue utilizado como referencia para afirmar que la banda que se visualiza en los carriles subsecuentes corresponde a la cepa *Salmonella enterica* al encontrarse en la altura que corresponde a fragmentos de 1,329 pares de bases, el cual es el tamaño esperado de dicho fragmento.

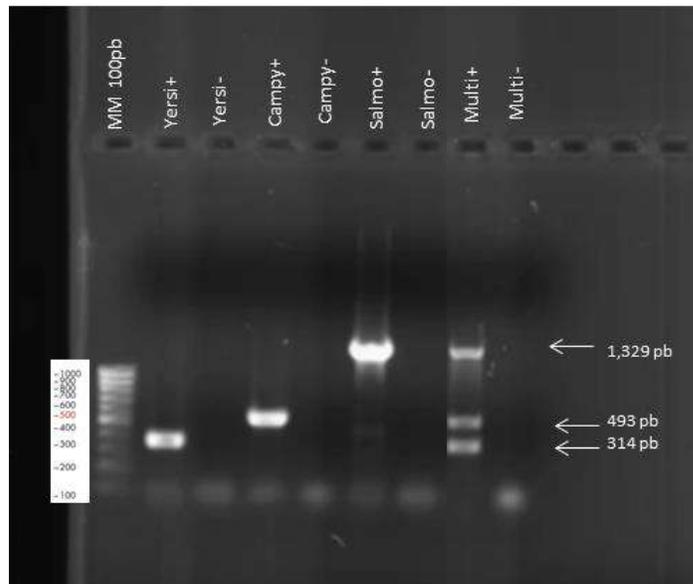
Una interesante diferencia con los resultados obtenidos por Nair y colaboradores (2019) fue el gen utilizado para la identificación de *Salmonella*. Ellos utilizaron una serie de genes (*ttr*, *sseJ*, *srfJ*, *tvfB*, *staG*, *SPA2308*, and *SPC0869*) los cuales fueron eficaces en diagnosticar las diferentes cepas de interés clínico como son *S. Typhi*, *Paratyphi A*, *Paratyphi B*, *Paratyphi C*, y *Salmonella* no tifoidea. En este

estudio, se utilizó el gen *invA*, similar a lo reportado por Heymans y colaboradores (2018) donde diseñaron satisfactoriamente una PCR múltiple para la identificación de *Salmonella spp.*, *S. enterica serovar Typhimurium* y *S. enterica serovar Enteritidis*. Este gen ha sido propuesto desde ya tiempo atrás (Rahn et al., 1992) y ha sido ampliamente usado para la identificación de *Salmonella spp.* en especial en las cepas virulentas para los humanos y animales hasta en la actualidad, al ser específico de aquellas serovariedades que invaden las células eucariotas. De hecho, ambos genes (*ttr* e *invA*) han sido integrados en pruebas diagnósticas para aumentar la sensibilidad y especificidad de la prueba, en especial en estudios que solo pretenden la identificación de *Salmonella* (Chirambo et al., 2021). Lo anterior, refuerza la relevancia de utilizar alguno de estos dos genes para identificación de esta cepa, en especial su incorporación a la PCR múltiple para el multidiagnóstico de bacterias relacionadas con gastroenteritis.

#### **ESTANDARIZACIÓN DE PCR MÚLTIPLE**

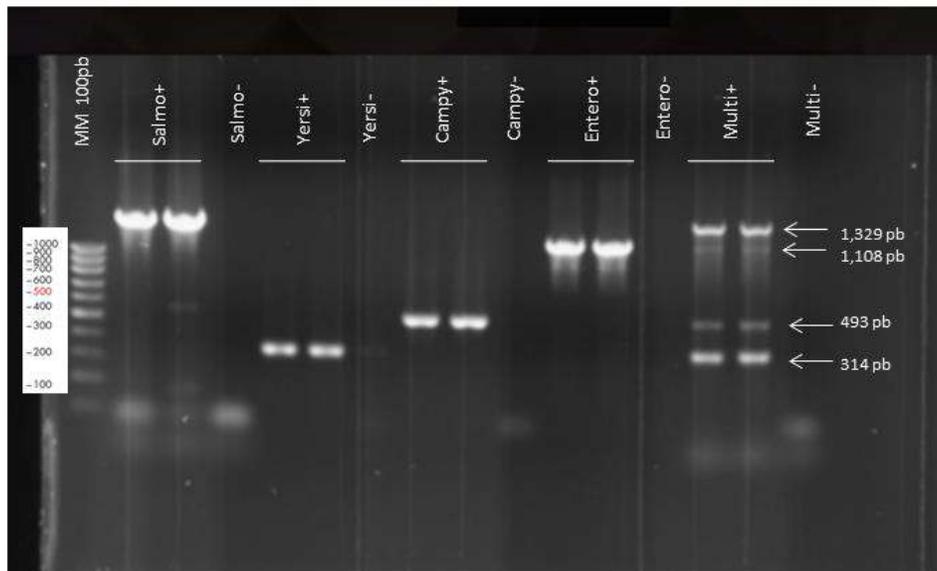
Se utilizaron las cepas de *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica* y *Campylobacter jejuni*. La PCR se realizó de manera individual para cada una de las cepas y posteriormente de manera múltiple para ser analizadas por electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura4). El resultado obtenido mostró que los controles positivos amplificaron para todas las cepas.

Figura 4. Identificación de los genes *invA* de *Salmonella enterica*, *cdtB* de *Campylobacter jejuni* y *ail* de *Yersinia enterocolitica* por PCR punto final en los controles positivos.



Se logró amplificar las cuatro cepas de referencia: *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterococcus faecalis* y *Campylobacter jejuni* (Figura 5), de manera individual y de manera múltiple, con lo cual queda evidenciado que los métodos moleculares abonan numerosas ventajas al diagnóstico clínico por su eficacia en tiempo, sensibilidad y especificidad. Huang y colaboradores, en el 2018, realizaron un metaanálisis en donde denotan las ventajas de utilizar técnicas moleculares con el respaldo de 20 estudios que involucraron 5,510 muestras de pacientes procesadas con la técnica de PCR en contraste con cultivos celulares, ensayos de inhibición de hemoaglutinación, enzimoimmunoensayos y fluorescencia de anticuerpos. Por lo que día con día la biología molecular toma fuerza en el ámbito clínico.

Figura 5. Identificación de los genes *invA* de *Salmonella enterica*, *GroEI* de *Enterococcus faecalis*, *cdtB* de *Campylobacter jejuni* y *ail* de *Yersinia enterocolitica* por PCR punto final en los controles positivos, que fueron corridos de manera individual y de manera múltiple.



Existen estudios donde se realiza una reacción de PCR múltiple para identificar distintas cepas de *Escherichia coli*, utilizando genes de referencia como *hlyA* dando soporte y comprobando que incluso en la misma especie, podemos identificar distintas cepas patógenas con técnicas moleculares (Akomoneh et al., 2020, Awad et al., 2020). Siguiendo las descripciones de diseño de oligonucleótidos para genes de virulencia en *E. coli* de Paton y Paton (Paton et al., 1998). Estos antecedentes dan fuerza al uso de técnicas moleculares para detección de agentes patógenos como bacterias, virus, hongos, entre otros como apoyo epidemiológico. Es el caso de la detección de 12 serotipos virales de porcinos utilizando la técnica de PCR múltiple (Xiju Shi et al., 2016), aunado a esto existen proyectos que describen la efectividad de dichas técnicas en comparación a los métodos convencionales de detección, en especial para los cuadros clínicos

de gastroenteritis donde participan diversos microorganismos como bacterias, protozoarios, virus y parásitos (Zhang et al., 2015), destacando en especial el papel preponderante que representan las cuatro bacterias incluidas en el este estudio.

Existen reportes de diversos paneles multidiagnósticos por PCR para bacterias relacionadas con la inocuidad de alimentos y bebidas donde se incluyen algunas de las bacterias estudiadas en el presente proyecto (Kim et al., 20216; Liu et al., 2019). Sin embargo, no han demostrado efectividad para su aplicación en muestras fecales con fines clínicos, sobre todo con fines de identificación de las cepas en muestras obtenidas de humanos y animales, como lo ha demostrado el panel de este estudio.

A la fecha, en países en desarrollo sigue predominando la identificación de bacterias por cultivos microbiológicos y clasificación metabólica, sin embargo, en países desarrollados, las técnicas de biología molecular como el PCR han ganado terreno en la última década. Lo anterior debido a que se consideran más eficaces, sensibles, con menos falsos negativos y con mayor rapidez en la emisión del resultado (Auckenthaler et al., 2015). Las infecciones diarreicas son un cuadro clínico que obliga a la aplicación de tratamientos rápidos y en las mayorías de las ocasiones sin previo diagnóstico diferencial microbiano, esto ha prevalecido como uno de los factores que promueven la resistencia antimicrobiana. Para evitar lo anterior, han existido esfuerzos focalizados para la creación de paneles diagnósticos para microorganismos relacionados con cuadros clínicos diarreicos (Wiemer et al., 2011), similares al presente proyecto. Sin embargo, existen pocas aplicaciones directas en especial por su poca estandarización y comercialización.

En la presente investigación se identificó un kit comercial que incluía las mismas cepas del presente panel de multidiagnóstico, nombrado RIDA®GENE Bacterial Stool Panel, marca R-Biopharm (Cat. PG2405) sin incluir la cepa de *Enterococcus faecalis* (que si incluye el presente estudio). Entre las ventajas que tiene la prueba comercial se describe la estandarización de un método cuantitativo, el kit listo para

usarse y tiempo reducido de procesamiento. En cuanto a las desventajas que presenta es la poca facilidad de su manejo, el equipo e infraestructura costoso para su procesamiento y la fácil contaminación. En comparación con el panel propuesto, al ser una prueba cualitativa, requiere de un equipo con menor nivel de sofisticación y por lo tanto, un costo por mucho más accesible. Lo anterior, es sumamente atractivo para países que invierten poco dinero en métodos diagnósticos.

A pesar de lo descrito previamente, en la actualidad, se siguen confrontando las técnicas convencionales con las herramientas moleculares, para el procesamiento de muestras complicadas como materia fecal, llegando a la misma conclusión y denotar las múltiples ventajas de la detección molecular en comparación con los coprocultivos utilizados en este caso de identificación de patógenos con materia fecal (Nielsen et al., 2021).

## **SENSIBILIDAD**

Con la finalidad de conocer la sensibilidad de la prueba, se realizaron las diluciones seriadas para cada uno de los controles positivos. Posteriormente se realizó PCR de punto final y los productos obtenidos fueron visualizados por electroforesis en gel de agar al 1% (Figura 6). Se puede observar que los pares de oligonucleótidos propuestos fueron eficaces en la identificación de forma individual y múltiple para las cepas. En cuanto a la sensibilidad diagnóstica, las diluciones seriadas fueron utilizadas para determinar la concentración mínima requerida para la detección del agente patógeno, la cual hasta el momento es de 0.0029ng/μl perteneciente a la dilución 1:1000 de la cepa *Campylobacter jejuni*.

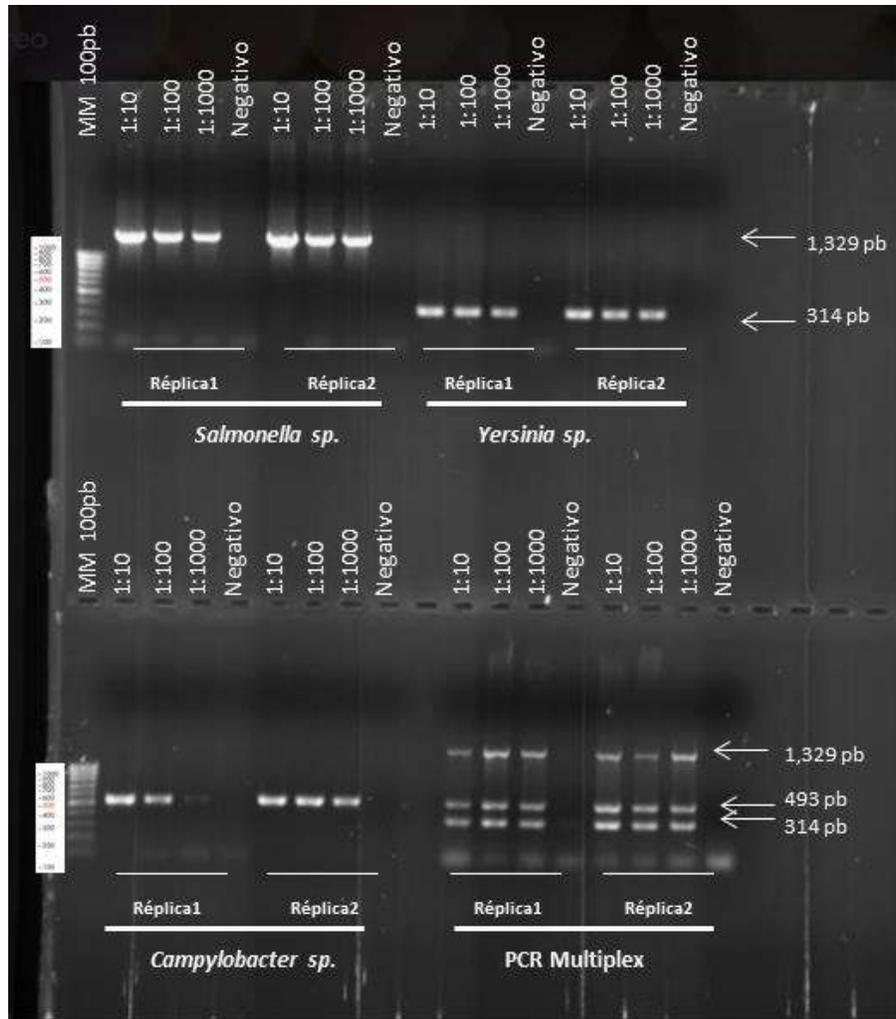
Tabla 16. Concentraciones de las cepas utilizadas en la prueba de sensibilidad.

<b>MUESTRA</b>	<b>CONCENTRADO</b>	<b>DILUCIÓN 1:10</b>	<b>DILUCIÓN 1:100</b>	<b>DILUCIÓN 1:1000</b>
<b>Salmonella</b>	15ng/μl	1.5ng/μl	0.15ng/μl	0.015ng/μl
<b>Yersinia</b>	9.3ng/μl	0.93ng/μl	0.093ng/μl	0.0093ng/μl

<b>Campylobacter</b>	2.9ng/μl	0.29ng/μl	0.029ng/μl	0.0029ng/μl
----------------------	----------	-----------	------------	-------------

De esta forma, se demuestra una alta sensibilidad de la prueba propuesta al identificar cada cepa en el punto más diluido (1:1000). Lo anterior, es aún más sensible que la prueba reportada por Kim y colaboradores (2016) donde realizaron un panel multidiagnóstico para diversos microorganismos reportando una concentración límite de sensibilidad de 500 pg/μl, a diferencia de la presente prueba que registro 2.9 pg/μl. Para el caso de *Campylobacter jejuni*, previamente se reportó un rango de sensibilidad entre los 1.0 – 3.0 pg/μl en una prueba de PCR múltiple para la detección de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Campylobacter lari* (Saiyudthong et al., 2015) resultados similares a los reportados para la misma cepa en la presente prueba.

Figura 6. Identificación de los genes *invA* de *Salmonella enterica*, *cdtB* de *Campylobacter jejuni* y *ail* de *Yersinia enterocolitica* por PCR punto final en diluciones seriadas 1:10, 1:100 y 1:1000.



En relación con los resultados obtenidos para la cepa de *Salmonella sp.* Son similares a los reportados previamente por Zuo y colaboradores (2020) donde realizaron una prueba focalizada exclusivamente en identificar 12 serovariedades de esta cepa registrando una sensibilidad límite de 1.0 – 2.0 pg/μl. Para el caso de *Yersinia enterocolitica* la sensibilidad obtenida en los presentes resultados fue mayor a la reportada previamente en un estudio relacionado con la discriminación entre dos cepas de *Yersinia* (*Yersinia enterocolitica* y *Yersinia pseudotuberculosis*) (Kot y Jakubczak, 2007).

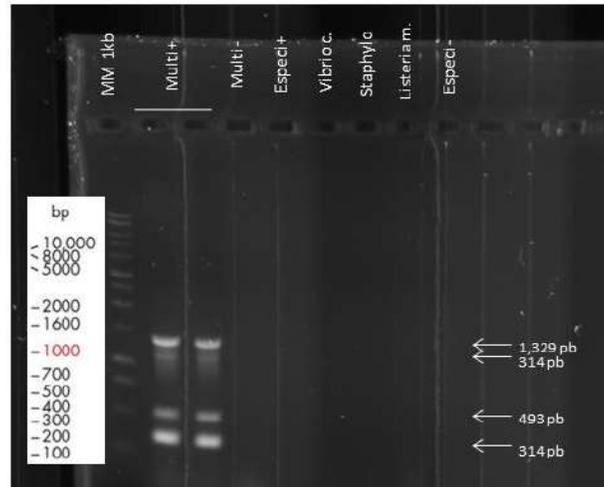
Con los resultados obtenidos para la sensibilidad del panel propuesto para el multidiagnóstico de la prueba, se determinó que cumplía con los estándares

necesarios para señalar que es una candidata prometedora para ser utilizada con fines clínicos. Sin embargo, faltaría conocer el límite mínimo de la esta prueba, aumentando las diluciones seriadas hasta que se conozca el punto no detectable para ninguna de las cepas incluidas.

## ESPECIFICIDAD

Por último, se determinó que la especificidad para los microorganismos de interés. Para ello, se realizaron confrontaciones mediante una reacción múltiple con diversos microorganismos a la que se nombró: “Especi+” (con los mismos oligonucleótidos pero con ADN bacteriano de *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*), una reacción individual de *Vibrio cholerae* nombrada: “Vibrio c.” (con los mismos oligonucleótidos pero con ADN bacteriano de *Vibrio cholerae*), una reacción individual de *Staphylococcus aureus* nombrada “Staphylo” (con los mismos oligonucleótidos pero con ADN bacteriano de *Staphylococcus aureus*) y una reacción individual de *Listeria monocytogenes* nombrada: “Listeria m.” (con los mismos oligonucleótidos pero con ADN bacteriano de *Listeria monocytogenes*) (Figura 7). Esto para corroborar que incluso en presencia de otros agentes patógenos, la prueba confirma únicamente la presencia de *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Enterococcus faecalis* y *Yersinia enterocolitica*.

Figura 7. Confrontación de cepas diana con cepas sin interés Por PCR punto final de manera individual y múltiple, visualizadas en gel de agarosa al 1%.



Se observan productos de PCR de la reacción múltiple positiva con las cepas *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica* en el segundo y tercer carril, el cuarto carril presenta la reacción con los oligonucleótidos para las cepas anteriores y agua por lo cual, no se observa amplificación de productos. El carril “Especi+” no mostró amplificación de productos, ésta fue una reacción múltiple con las cepas de confrontación, en los carriles posteriores se encuentran las reacciones individuales que contienen el ADN de cada una de las bacterias de confrontación junto a los oligonucleótidos de las cepas diana. Ninguna de las confrontaciones mostró amplificación de productos, por lo que podemos confiar en la especificidad de la prueba.

Rahn y colaboradores (1992) reportaron la identificación de géneros bacterianos con la técnica de PCR la cual describen como “rápida y específica” en comparación con los cultivos celulares, en este proyecto la contingencia sanitaria acortó de manera importante los tiempos, impidiendo replicar las confrontaciones que realizó Rahn con los cultivos bacterianos. Sin embargo, la especificidad fue demostrada al no amplificar ni generar productos inespecíficos se demostró en la presente prueba.

Los resultados obtenidos son idénticos a los reportados para dos pruebas comerciales de agentes microbianos gastrointestinales (xTAG® Gastrointestinal Pathogen Panel y BioFire FilmArray gastrointestinal test) (Zhang et al., 2015). Sin

embargo, ambas pruebas requieren de equipo más sofisticado y caro, a diferencia de la técnica propuesta en el presente proyecto. Lo anterior es debido a que se requiere de equipos de PCR en tiempo real y sondas específicas, lo que hace más cara cada reacción.

## **PCR MÚLTIPLE PARA EL MULTIDIAGNÓSTICO DE INFECCIONES ZONÓTICAS DESDE UNA PRESPECTIVA DE UNA SOLA SALUD (ONE HEALTH)**

Los métodos convencionales para la identificación de bacterias, requiere de cultivos los cuales se deben enriquecer respecto a las necesidades de cada organismo, lo cual implica de 4 hasta 7 días de trabajo por lo que en 1992, Rahn, reportó ciertas ventajas de técnicas como inmunoensayos, técnicas de hibridación e inmunofluorescencia como alternativas, además Mona Kadry y colaboradores (2019) realizó la identificación del género *Salmonella* a partir del gen *invA* por medio de PCR, comparándola con técnicas de crecimiento celular y pruebas bioquímicas posteriores, con lo que concluyó la efectividad de las técnicas moleculares. Esto refuerza la relevancia del panel propuesto en el presente estudio.

En el 2020, Gharajalar y colaboradores, utilizaron la técnica de PCR múltiple para identificar varias especies del género *Campylobacter Sp*, haciendo énfasis en la ventaja temporal de utilizar herramientas de biología molecular en comparación con la identificación fenotípica que requiere hasta seis días de trabajo. En ese mismo año, Wysok y colaboradores, determinaron con éxito la presencia de distintas bacterias utilizando identificación molecular a partir de sus genes de virulencia. Aunado a esto Tsai y colaboradores (2005) mencionaron la ineficiencia de los métodos de identificación por cultivo y bioquímico ya que no es certero en situaciones donde el fenotipo es atípico como el caso de *Enterococcus gallinarum*.

Para evitar la identificación errónea, las técnicas moleculares son consideradas las más viables (Angeletti et al., 2001) lo que reafirma la necesidad de actualizar los métodos diagnósticos con propuestas innovadoras basadas en la identificación

genética. Derivado de esto, se encuentra además la importancia en la identificación de mecanismos de resistencia antimicrobiana y factores de virulencia bacteriana los cuales involucran diversos genes, como lo menciona Rogers (2018) quien logró establecer una relación entre el mal diagnóstico y la resistencia antimicrobiana, identificando organismos zoonóticos. Es necesario que los métodos desarrollados tengan la capacidad de procesar varias muestras de manera simultánea (Wolff et al., 2020).

Las ventajas que nos dan las técnicas moleculares nos ayudan a subsanar la problemática derivada de la zoonosis que desde hace varios años arriesga la salud pública. Con anterioridad, se ha mencionado la importancia de las enfermedades transmitidas por los animales, haciendo énfasis a las repercusiones que representan para la sociedad (Goscienski, 1983). Sin embargo, a la fecha, el papel que juegan las zoonosis transmitidas por las mascotas sigue siendo un área poco descrita y que requiere de un mayor seguimiento epidemiológico, en especial por el impacto negativo en la salud tanto de los propietarios como de los propios animales de compañía.

Es indudable los beneficios que traen consigo las mascotas a sus propietarios. Se ha demostrado como el vínculo emocional repercute de forma positiva en la vida de los humanos tanto mental como físicamente, sin embargo, no debe subestimarse el riesgo biológico que representan las infecciones zoonóticas (Overgaaauw et al., 2020).

Actualmente se sabe mucho más sobre dichas enfermedades, sin embargo, esto solo ha aumentado la preocupación ya que, en su mayoría, estas enfermedades no son mortales, pero debido a que no se tratan oportunamente llegan a desenlaces fatales y al ser tratadas de forma empírica, favorecen la resistencia antimicrobiana (Kahn et al., 2017).

Su detección, por lo tanto, es un área de oportunidad que requiere de esfuerzos importantes que permitan generar herramientas biotecnológicas que sean

eficaces, eficientes, sensibles, específicas, rápidas y a costos accesibles que fortalezcan el monitoreo epidemiológico de las zoonosis emergentes, olvidadas o transfronterizas, (Bird et al., 2018).

En este sentido, se han realizado diversas pruebas con resultados controversiales, entre los que destacan paneles variados de microorganismos analizados, métodos de procesamiento y aplicaciones diversas (Pouletty et al., 2019; Wang et al., 2020; Tao et al., 2020). Sin embargo, poco o nula ha sido su aplicación para infecciones zoonóticas de interés que surgen entre la convivencia de las mascotas y sus propietarios.

Esto demuestra la gran importancia de crear un vínculo entre la medicina humana y la medicina veterinaria ya que el contexto que vivimos actualmente implica que la convivencia aumente las posibilidades de contraer enfermedades de origen animal (Day., 2016), de las cuales ya existen investigaciones en varios países. El monitoreo incluye microorganismos, vías de transmisión y riesgos, sobre todo para personas inmunodeprimidas (Mani & Maguire., 2009), aspectos cuyo conocimiento sería de gran relevancia en la protección de la población mexicana.

## **CONCLUSIÓN**

Existe una gran necesidad de eficientizar el diagnóstico clínico para infecciones gastrointestinales. El presente proyecto ha generado un precedente para el desarrollo de un método multidiagnóstico que ofrezca una alternativa viable,

rápida, sensible y específica para la detección de las 4 principales bacterias intestinales zoonóticas. Sin embargo, se requiere de continuar con pruebas que permitan la estandarización y validación, a mayor detalle, del panel propuesto para la prueba multidiagnóstica, con la finalidad de fortalecer el diagnóstico oportuno, incentivar la cultura de la medicina preventiva y suscitar el trabajo interdisciplinario.

## **IMPLICACIONES BIOÉTICAS**

Para la realización del proyecto, se cuenta con la colaboración de profesionales en el área de la salud de dos instituciones de educación superior, la Facultad de

Medicina y la Facultad de Ciencias Naturales, ambas pertenecientes a la Universidad Autónoma de Querétaro, además, participará también la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, así como miembros de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies del Estado de Querétaro.

Se realizará un evento para promover la cultura del bienestar animal con énfasis en la medicina preventiva y la atención profiláctica, para evitar la transmisión de enfermedades infecciosas. Al término de la plática, se les explicará de manera sencilla y completa el proyecto de investigación y se les invitará a participar. Se responderán las dudas o inquietudes que de lo anterior pudieran surgir y se les pedirá a los interesados, que firmen el consentimiento informado y el asentimiento a quienes deseen participar. Dichos formatos están basados en los sugeridos por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) (<https://www.insp.mx/insp-cei/consentimiento-informado.html>).

Se trabajará en conjunto con el PROMARE (Programa de Manejo de Residuos) de la Universidad Autónoma de Querétaro para llevar a cabo de manera responsable la limpieza de las instalaciones donde se llevará a cabo el proyecto y para la recolección de material tipo RP (residuos peligrosos), y así canalizarlos con las empresas pertinentes quienes de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-052-ECOL-1993, que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente, publicada en el **Diario Oficial de la Federación** el 22 de octubre de 1993, serán incinerados para evitar daños al ambiente y a la población.

## REFERENCIAS

1. Abarca, K., Weitzel, T., Gallegos, J., Cerda, J., & Garc, P. (2015). One Health in Practice : A Pilot Project for Integrated Care of Zoonotic Infections in Immunocompromised Children and Their Pets in Chile.
2. Acke, E. (2018). Campylobacteriosis in dogs and cats : a review. *New Zealand Veterinary Journal*, 0(0),
3. Akomoneh, E. A., Esemu, S. N., Jerome Kfusi, A., Ndip, R. N., & Ndip, L. M. (2020). Prevalence and virulence gene profiles of Escherichia coli O157 from cattle slaughtered in Buea, Cameroon. *PloS one*, 15(12), e0235583. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235583>
4. Anderson AC, Andisha H, Hellwig E, Jonas D, Vach K, Al-Ahmad A. Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic Susceptibility of Oral Enterococcus faecalis Isolates Compared to Isolates from Hospitalized Patients and Food. *Adv Exp Med Biol*. 2017 Jun 11. doi: 10.1007/5584\_2017\_53. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28601926.
5. Angeletti, S., G. Lorino, G. Gherardi, F. Battistoni, M. De Cesaris, and G. Dicuonzo. 2001. Routine molecular identification of enterococci by genespecific PCR and 16S ribosomal DNA sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 39: 794–797.
6. Article, O. (2018). Original Article Prevalence of most common human pathogenic Campylobacter spp . in dogs and cats in Styria , Austria
7. Aslantaş Ö, Yilmaz EŞ. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and plasmidic AmpC  $\beta$ -lactamase (pAmpC) producing Escherichia coli in dogs. *J Vet Med Sci*. 2017 Jun 16;79(6):1024-1030. doi: 10.1292/jvms.16-0432. Epub 2017 Apr 27. PubMed PMID: 28450661; PubMed Central PMCID: PMC5487777.
8. Aspiroz C, Navarro C, Aspiroz T. Urinary tract infection due to mucoid phenotype Enterococcus faecalis: an emerging phenotype. Infección urinaria causada por Enterococcus faecalis con fenotipo mucoside: un morfotipo inusual. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000;18(7):369-370.
9. Auckenthaler, R., & Risch, M. (2015). Verdrängt Multiplex PCR den klassischen Kulturnachweis in der Mikrobiologie? [Do Multiplex PCR

techniques displace classical cultures in microbiology?]. *Therapeutische Umschau. Revue therapeutique*, 72(2), 77–85. <https://doi.org/10.1024/0040-5930/a000647>

10. Awad, W. S., El-Sayed, A. A., Mohammed, F. F., Bakry, N. M., Abdou, N., & Kamel, M. S. (2020). Molecular characterization of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic and in-contact cattle and buffalo calves. *Tropical animal health and production*, 52(6), 3173–3185. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02343-1>
11. BALLAGI-PORDÁNY A. & BELÁK S. (1996). The use of mimics as internal standards to avoid false negatives in diagnostic PCR. *Mol. Cell. Probes*, 10, 159–164.
12. Barrett, T. J., J. B. Kaper, A. E. Jerse, and I. K. Wachsmuth. 1992. Virulence factors in Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans and cattle. *J. Infect. Dis.* 165:979–980.
13. Betrán A, Cortés AM, López C. Evaluación de la resistencia antibiótica de *Escherichia coli* en infecciones urinarias adquiridas en la comunidad del Sector Sanitario de Barbastro (Huesca) [Evaluation of antibiotic resistance of *Escherichia coli* in urinary tract infections in Primary Care Barbastro Sector (Huesca)]. *Rev Esp Quimioter.* 2015 Oct;28(5):263-6. Spanish. PMID: 26437757
- Brooks, H.J.L., O'Grady, F., McSherry, M.A. and Cattell, W.R., (1980) Urophatogenic properties of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *J. Med. Microbiol.* 15, 11.
14. Bird, B. H., & Mazet, J. (2018). Detection of Emerging Zoonotic Pathogens: An Integrated One Health Approach. *Annual review of animal biosciences*, 6, 121–139. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014628>
15. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
16. Cavaluzzi MJ, Borer PN (2004) *Nucleic Acids Res* 32:1–9

17. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. Salmonella infection (salmonellosis) and animals [on- line]. CDC; 2004 Sept. Available at: <http://www.cdc.gov/healthypets/diseases/salmonellosis.htm>
18. Chirambo, A. C., Nyirenda, T. S., Jambo, N., Msefula, C., Kamng'ona, A., Molina, S., Mandala, W. L., Heyderman, R. S., Iturizza-Gomara, M., Henrion, M., & Gordon, M. A. (2021). Performance of molecular methods for the detection of *Salmonella* in human stool specimens. *Wellcome open research*, 5, 237. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16305.2>
19. Chomel, B. B. (2014). Emerging and Re-Emerging Zoonoses of Dogs and Cats.
20. Chung YS, Park YK, Park YH, Park KT. Probable secondary transmission of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* between people living with and without pets. *J Vet Med Sci*. 2017 Mar 18;79(3):486-491. doi: 10.1292/jvms.16-0585. Epub 2017 Feb 11. PubMed PMID: 28190823; PubMed Central PMCID: PMC5383166.
21. Daszak, P. (2013). Emerging Infectious Diseases of Wildlife — Threats to Biodiversity and Human Health.
22. Daszak, P., Tabor, G. M., Kilpatrick, A. M., Epstein, J. O. N., & Plowright, R. (2004). Conservation Medicine and a New Agenda for Emerging Diseases.
23. Day M. J. (2016). Pet-Related Infections. *American family physician*, 94(10), 794–802.
24. dMIQE Group, & Huggett, J. F. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical chemistry*, 66(8), 1012–1029. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125>
25. Dobson, A., & Foufopoulos, J. (2001). Emerging infectious pathogens of wildlife.
26. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres Ecology of emerging infectious diseases and wild species conservation. (2010).
27. Escamilla AE. “Géneros: *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Helicobacter*”. En

- Lugo de la Fuente G. Bacteriología Médica. Ed. Cuellar, México. 3a edición, 2005: 57-62
28. Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1997). Relationship between the thermotolerance and the increase of DnaK and GroEL synthesis in *Enterococcus faecalis* ATCC19433. *Journal of basic microbiology*, 37(4), 251–258. <https://doi.org/10.1002/jobm.3620370404>
  29. Freitas AR, Tedim AP, Francia MV, Jensen LB, Novais C, Peixe L, Sánchez-Valenzuela A, Sundsfjord A, Hegstad K, Werner G, Sadowy E, Hammerum AM, Garcia-Migura L, Willems RJ, Baquero F, Coque TM. Multilevel population genetic analysis of vanA and vanB *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986-2012). *J Antimicrob Chemother.* 2016 Dec;71(12):3351-3366. Epub 2016 Aug 15. PubMed PMID: 27530756.
  30. García PC, Valenzuela NS, Rodríguez MV, León EC, Fernández HJ. Susceptibilidad antimicrobiana de *Campylobacter jejuni* aislado de coprocultivos en Santiago de Chile [Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* isolates from stool cultures in Santiago, Chile]. *Rev Chilena Infectol.* 2009 Dec;26(6):511-4. Spanish. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20098784.
  31. GfK. 2016. Pet ownership. Global GfK survey. <http://www.gfk.com/global-studies/global-studies-pet-ownership/>
  32. Gharajalar Nouri, S., Hassanzadeh, P., & Hosseinali Nejad, N. (2020). Molecular detection of *Campylobacter* species and Cytotolethal distending toxin isolated from chicken livers in Tabriz. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 71, 101474. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101474>
  33. González , A. (2019). Petn´go. Recuperado de:<https://www.petngo.com.mx>
  34. Goscienski P. J. (1983). Zoonoses. *Pediatric infectious disease*, 2(1), 69–81. <https://doi.org/10.1097/00006454-198301000-00018>
  35. Greathouse, K. L., Sinha, R., & Vogtmann, E. (2019). DNA extraction for human microbiome studies: the issue of standardization. *Genome biology*, 20(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1843-8>

36. Guérillot R, Gonçalves da Silva A, Monk I, Giulieri S, Tomita T, Alison E, Porter J, Pidot S, Gao W, Peleg AY, Seemann T, Stinear TP, Howden BP. Convergent Evolution Driven by Rifampin Exacerbates the Global Burden of Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mSphere*. 2018 Jan 24;3(1). pii: e00550-17. doi: 10.1128/mSphere.00550-17. eCollection 2018 Jan-Feb. PubMed PMID: 29404415; PubMed Central PMCID: PMC5784246.
37. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Kajino A, Usui M, Tamura Y, Kimura Y, Miyamoto T, Tsuyuki Y, Ohki A, Kataoka Y. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Enterobacter* spp. isolates from companion animals in Japan. *PLoS One*. 2017 Mar 22;12(3):e0174178. doi: 10.1371/journal.pone.0174178. eCollection 2017. PubMed PMID: 28328967; PubMed Central PMCID: PMC5362103.
38. Hefazi M, Damlaj M, Alkhateeb HB, Partain DK, Patel R, Razonable RR, Gastineau DA, Al-Kali A, Hashmi SK, Hogan WJ, Litzow MR, Patnaik MM. Vancomycin-resistant *Enterococcus* colonization and bloodstream infection: prevalence, risk factors, and the impact on early outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Transpl Infect Dis*. 2016 Dec;18(6):913-920. doi: 10.1111/tid.12612. Epub 2016 Nov 11. PubMed PMID:27642723.
39. Helmy OM, Kashef MT. Different phenotypic and molecular mechanisms associated with multidrug resistance in Gram-negative clinical isolates from Egypt. *Infect Drug Resist*. 2017 Dec 8;10:479-498. doi: 10.2147/IDR.S147192. eCollection 2017. PubMed PMID: 29263684; PubMed Central PMCID: PMC5726372.
40. Heymans, R., Vila, A., van Heerwaarden, C., Jansen, C., Castelijin, G., van der Voort, M., & Biesta-Peters, E. G. (2018). Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PloS one*, 13(10), e0206316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206316>
41. Huang, H. S., Tsai, C. L., Chang, J., Hsu, T. C., Lin, S., & Lee, C. C. (2018). Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection:

- systematic review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(10), 1055–1063. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.018>
42. Hull, N., Miller, J., Berry, D., Laegreid, W., Smith, A., Klinghagen, C., & Schumaker, B. (2018). Optimization of *Brucella abortus* Protocols for Downstream Molecular Applications. *Journal of clinical microbiology*, 56(4), e01894-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01894-17>
43. Humphries A.D., S.M. Townsend, R.A. Kingsley, T.L. Nicholson, R.M. Tsois & A.J. Bäumlner. 2001. Role of fimbriae as antigens and intestinal colonization factors of *Salmonella* serovars. *FEMS Microbiol. Lett.* 201:121-125.
44. Hung WW, Chen YH, Tseng SP, Jao YT, Teng LJ, Hung WC. Using groEL as the target for identification of *Enterococcus faecium* clades and 7 clinically relevant *Enterococcus* species. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019 Apr;52(2):255-264. doi: 10.1016/j.jmii.2018.10.008. Epub 2018 Nov 14. PMID: 30473144.
45. Holden MJ, Blasic JR, Bussjaeger L, Kao C, Shokere LA, Kendall DC, Freese L, Jenkins GR (2003) *J Agric Food Chem* 51:2468– 2474.
46. Immunizations & infectious diseases : an informed parent's guide Fisher, Margaret C; American Academy of Pediatrics. Washington, D.C. : American Academy of Pediatrics, c2006. NLM ID: 101513439
47. Jeffrey JS, Atwill ER, Hunter A. Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* at a squab (young pigeon) processing plant. *Poult Sci.* 2001;80:151-5.
48. Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases.
49. Kadry, M., Nader, S. M., Dorgham, S. M., & Kandil, M. M. (2019). Molecular diversity of the invA gene obtained from human and egg samples. *Veterinary world*, 12(7), 1033–1038. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.1033-1038>
50. Kahn L. H. (2017). Antimicrobial resistance: a One Health perspective. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 111(6), 255–260. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trx050>

51. Kim, S. Y., Chung, B., Chang, J. H., Jung, G. Y., Kim, H. W., Park, B. Y., Oh, S. S., & Oh, M. H. (2016). Simultaneous Identification of 13 Foodborne Pathogens by Using Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism Coupled with Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Its Application in Foods. *Foodborne pathogens and disease*, 13(10), 566–574. <https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2143>
52. Kimura A, Yossapol M, Shibata S, Asai T. Selection of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in the feces of healthy dogs after administration of first-generation cephalosporins. *Microbiol Immunol*. 2017 Jan;61(1):34-41. doi: 10.1111/1348-0421.12466. PubMed PMID: 28111794.
53. Kot, B., Trafny, E. A., & Jakubczak, A. (2007). Application of multiplex PCR for monitoring colonization of pig tonsils by *Yersinia enterocolitica*, including biotype 1A, and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of food protection*, 70(5), 1110–1115. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.5.1110>
54. Lim, M. Y., Park, Y. S., Kim, J. H., & Nam, Y. D. (2020). Evaluation of fecal DNA extraction protocols for human gut microbiome studies. *BMC microbiology*, 20(1), 212. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01894-5>
55. Liu, Y., Cao, Y., Wang, T., Dong, Q., Li, J., & Niu, C. (2019). Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Frontiers in microbiology*, 10, 222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>
56. Lowden, P., Wallis, C., Gee, N., & Hilton, A. (2015). Investigating the prevalence of *Salmonella* in dogs within the Midlands region of the United Kingdom. *BMC Veterinary Research*.
57. Macdonald, E., White, R., Mexia, R., & Bruun, T. (2015). Risk Factors for Sporadic Domestically Acquired *Campylobacter* Infections in Norway 2010 – 2011 : A National Prospective Case-Control Study.
58. Malhotra, B., Swamy, M. A., Reddy, P. V., Kumar, N., & Tiwari, J. K. (2016). Evaluation of custom multiplex real - time RT - PCR in comparison to fast - track diagnostics respiratory 21 pathogens kit for detection of multiple respiratory viruses. *Virology journal*, 13, 91. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0549-8>
59. Mani, I., & Maguire, J. H. (2009). Small animal zoonoses and immunocompromised pet owners. *Topics in companion animal*

- medicine, 24(4), 164–174. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2009.07.002>
60. Martín-Pozo A, Arana DM, Fuentes M, Alós JI. Sensibilidad a azitromicina y otros antibióticos en aislados recientes de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* [Susceptibility to azithromycin and other antibiotics in recent isolates of *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014 Jun-Jul;32(6):369-71. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2014.02.010. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24698008.
61. Muñoz-Price LS, Lolans K, Quinn JP. Emergence of resistance to daptomycin during treatment of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* infection. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug 15;41(4):565-6. PubMed PMID: 16028170.
62. Nair, S., Patel, V., Hickey, T., Maguire, C., Greig, D. R., Lee, W., Godbole, G., Grant, K., & Chattaway, M. A. (2019). Real-Time PCR Assay for Differentiation of Typhoidal and Nontyphoidal *Salmonella*. *Journal of clinical microbiology*, 57(8), e00167-19. <https://doi.org/10.1128/JCM.00167-19>
63. Narayanan AM, Ramsey MM, Stacy A, Whiteley M. Defining Genetic Fitness Determinants and Creating Genomic Resources for an Oral Pathogen. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Jun 30;83(14). pii: e00797-17. doi: 10.1128/AEM.00797-17. Print 2017 Jul 15. PubMed PMID: 28476775; PubMed Central PMCID: PMC5494627.
64. Nielsen, M. K., Facison, C., Scare, J. A., Martin, A. N., Gravatte, H. S., & Steuer, A. E. (2021). Diagnosing *Strongylus vulgaris* in pooled fecal samples. *Veterinary parasitology*, 296, 109494. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109494>
65. Olsen RH, Schønheyder HC, Christensen H, Bisgaard M. *Enterococcus faecalis* of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of *E. faecalis*. *Zoonoses Public Health*. 2012 Jun;59(4):256-63. doi:10.1111/j.1863-2378.2011.01442.x. Epub 2011 Nov 28. PubMed PMID: 22122842.
66. OMS, 2016. Plan de Acción Mundial sobre la Resistencia a los Antimicrobianos 2016. Organización Mundial de la Salud. World Health Organization. ISBN 978 92 4 350976 1 Subject headings are available from

WHO institutional repository.

67. Overgaauw, P., Vinke, C. M., Hagen, M., & Lipman, L. (2020). A One Health Perspective on the Human-Companion Animal Relationship with Emphasis on Zoonotic Aspects. *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3789. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113789>
68. Padilla E C, Núñez A M, Padilla G A, Lobos G O. Genes de virulencia y bacteriocinas en cepas de *Enterococcus faecalis* aisladas desde diferentes muestras clínicas en la Región del Maule, Chile [Virulence genes and bacteriocins in *Enterococcus faecalis* strains isolated from different clinical samples in Maule Region, Chile]. *Rev Chilena Infectol.* 2012 Feb;29(1):55-61. Spanish. doi: 10.4067/S0716-10182012000100010. Epub 2012 Apr 10. PMID: 22552513.
69. Pathirana, E., McPherson, A., Whittington, R., & Hick, P. (2019). The role of tissue type, sampling and nucleic acid purification methodology on the inferred composition of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) microbiome. *Journal of applied microbiology*, 127(2), 429–444. <https://doi.org/10.1111/jam.14326>
70. Paton AW, Paton JC. Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Using Multiplex PCR Assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology.* 1998; 36(2): 598–602. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998> PMID: 9466788
71. Pouletty, M., De Pontual, L., Lopez, M., Morin, L., Poilane, I., Pham, L. L., Carbonnelle, E., Titomanlio, L., Faye, A., & Bonacorsi, S. (2019). Multiplex PCR reveals a high prevalence of multiple pathogens in traveller's diarrhoea in children. *Archives of disease in childhood*, 104(2), 141–146. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2017-314327>
72. Poulin, R., & Forbes, M. R. (2012). interactions : past and future, 1169–1185.
73. Puig Y, Espino M, Leyva V, Martino T, Mendez D, Soto P, et al. Susceptibilidad antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp. de origen clínico y alimentario. *Rev Panam Infectol.* 2007;9(3):12-6.
74. Purdy D, Buswell CM, Hodgson AE, McAlpine K, Henderson I, Leach SA. 2000. Characterization of cytotoxic distending toxin (CDT) mutants of

- Campylobacter jejuni. J. Med. Microbiol. 49:473-479.
75. Quesada A, Reginatto GA, Ruiz Español A, Colantonio LD, Burrone MS. Resistencia antimicrobiana de Salmonella spp aislada de alimentos de origen animal para consumo humano [Antimicrobial resistance of Salmonella spp isolated animal food for human consumption]. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2016 Mar;33(1):32-44. Spanish. PMID: 27384620.
76. Rahn, K., De Grandis, S. A., Clarke, R. C., McEwen, S. A., Galán, J. E., Ginocchio, C., Curtiss, R., 3rd, & Gyles, C. L. (1992). Amplification of an invA gene sequence of Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. Molecular and cellular probes, 6(4), 271–279. [https://doi.org/10.1016/0890-8508\(92\)90002-f](https://doi.org/10.1016/0890-8508(92)90002-f)
77. Rijks, J. M., Cito, F., Cunningham, A. A., Rantsios, A. T., & Giovannini, A. (2016). ScienceDirect Disease Risk Assessments Involving Companion Animals : an Overview for 15 Selected Pathogens Taking a European Perspective. Journal of Comparative Pathology.
78. Rodríguez, A., Rodríguez, M., Córdoba, J. J., & Andrade, M. J. (2015). Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1275, 31–56. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_3)
79. Rogers, S. W., Shaffer, C. E., Langen, T. A., Jahne, M., & Welsh, R. (2018). Antibiotic-Resistant Genes and Pathogens Shed by Wild Deer Correlate with Land Application of Residuals. EcoHealth, 15(2), 409–425. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1316-7>
80. Roug, A., Byrne, B. A., Conrad, P. A., & Miller, W. A. (2013). Comparative Immunology , Microbiology and Infectious Diseases Zoonotic fecal pathogens and antimicrobial resistance in county fair animals. “Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases,”
81. Sahu, B., Singh, S. D., Behera, B. K., Panda, S. K., Das, A., & Parida, P. K. (2019). Rapid detection of Salmonella contamination in seafoods using multiplex PCR. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 50(3), 807–816. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00072-8>

82. Saiyudthong, S., Phusri, K., & Buates, S. (2015). Rapid Detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in Fresh Chicken Meat and By-Products in Bangkok, Thailand, Using Modified Multiplex PCR. *Journal of food protection*, 78(7), 1363–1369. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-415>
83. Sárvári KP, Sóki J, Kristóf K, Juhász E, Miszti C, Melegh SZ, Latkóczy K, Urbán E. Molecular characterization of Multidrug Resistant *Bacteroides* isolates from Hungarian clinical samples. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017 Oct 31. pii: S2213-7165(17)30207-2. doi: 10.1016/j.jgar.2017.10.020. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29101081.
84. Shi, X., Liu, X., Wang, Q., Das, A., Ma, G., Xu, L., Sun, Q., Peddireddi, L., Jia, W., Liu, Y., Anderson, G., Bai, J., & Shi, J. (2016). A multiplex real-time PCR panel assay for simultaneous detection and differentiation of 12 common swine viruses. *Journal of virological methods*, 236, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.08.005>
85. Silva A J, Asserella R L, Bolados G N, Herrera H N, Leyton O J. Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Enterococcus* sp aisladas en hospitales del norte de Chile [Resistance to antimicrobial drugs in *Enterococcus* sp. strains isolated in hospitals of Northern Chile]. *Rev Chilena Infectol*. 2006 Sep;23(3):226-31. Spanish. doi: 10.4067/s0716-10182006000300005. Epub 2006 Aug 4. PMID: 16896495.
86. Stephen LWO. “Taxonomy, phylogeny and methods for the identification of *Campylobacter* Species”. En Ketley JM, Konkel ME. (Eds.) *Campylobacter. Molecular and cellular biology*. Reino Unido, Horizon Bioscience, 2005: 13-42
87. Smith, K. F., & Pedersen, A. B. Æ. (2009). The role of infectious diseases in biological conservation.
88. Tao, J., Liu, W., Ding, W., Han, R., Shen, Q., Xia, Y., Zhang, Y., & Sun, W. (2020). A multiplex PCR assay with a common primer for the detection of eleven foodborne pathogens. *Journal of food science*, 85(3), 744–754. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15033>
89. Thornton, B., & Basu, C. (2015). Rapid and simple method of qPCR primer design. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1275, 173–179.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2365-6_13)

90. Timofte D, Maciucă IE, Williams NJ, Wattret A, Schmidt V. Veterinary Hospital Dissemination of CTX-M-15 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* ST410 in the United Kingdom. *Microb Drug Resist.* 2016 Oct;22(7):609-615. Epub 2016 Jun 17. PubMed PMID: 27314838; PubMed Central PMCID: PMC5073239.
91. Trongjit S, Angkititrakul S, Tuttle RE, Pongseree J, Padungtod P, Chuanchuen R. Prevalence and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* isolated from broiler chickens, pigs and meat products in Thailand-Cambodia border provinces. *Microbiol Immunol.* 2017 Jan;61(1):23-33. doi: 10.1111/1348-0421.12462. PubMed PMID: 28042666.
92. Tsai, J. C., Hsueh, P. R., Lin, H. M., Chang, H. J., Ho, S. W., & Teng, L. J. (2005). Identification of clinically relevant enterococcus species by direct sequencing of *groES* and spacer region. *Journal of clinical microbiology*, 43(1), 235–241. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.235-241.2005>
93. Vasco, K., & Graham, J. P. (2016). Detection of Zoonotic Enteropathogens in Children and Domestic Animals in a Semirural Community in Ecuador.
94. Viale AM, Arakaki AK, Soncini FC, Ferreyra RG. Evolutionary relationships among eubacterial groups as inferred from GroEL (chaperonin) sequence comparisons. *Int J Syst Bacteriol* 1994; 44: 527-33.
95. Vellappally S, Divakar DD, Al Kheraif AA, Ramakrishnaiah R, Alqahtani A, Dalati MHN, Anil S, Khan AA, Harikrishna Varma PR. Occurrence of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the oral cavity of patients with dental caries. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2017 Sep 1;64(3):343-351. doi: 10.1556/030.64.2017.033. Epub 2017 Sep 11. PubMed PMID: 28889756.
96. Wallis, C. V, Lowden, P., Marshall-jones, Z. V, & Hilton, A. C. (2018). Distinct fermentation and antibiotic sensitivity profiles exist in salmonellae of canine and human origin.

97. Walther, B., Tedin, K., & Lübke-becker, A. (2016). Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control. *Veterinary Microbiology*.
98. Wang, C., Zhou, X., Zhu, M., Yin, H., Tang, J., Huang, Y., Zheng, B., Jin, Y., & Liu, Z. (2020). The application research of xTAG GPP multiplex PCR in the diagnosis of persistent and chronic diarrhea in children. *BMC pediatrics*, 20(1), 309. <https://doi.org/10.1186/s12887-020-02206-6>
99. Wang S, Xiao SZ, Gu FF, Tang J, Guo XK, Ni YX, Qu JM, Han LZ. Antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of clinical *Enterobacter cloacae* bloodstream isolates in Shanghai, China. *PLoS One*. 2017 Dec 15;12(12):e0189713. doi: 10.1371/journal.pone.0189713. eCollection 2017. PubMed PMID: 29244831; PubMed Central PMCID: PMC5731700
100. Weis, A. M., Storey, D. B., Taff, C. C., Townsend, A. K., Huang, B. C., Kong, N. T., & Clothier, K. A. (2016). Genomic Comparison of *Campylobacter* spp . and Their Potential for Zoonotic Transmission between Birds , Primates , and Livestock.
101. Whitfield, Y., Johnson, K., Hobbs, L., Middleton, D., Dhar, B., & Vrbova, L. (2017). Descriptive study of enteric zoonoses in Ontario , Canada , from 2010 – 2012.
102. Wiemer, D., Loderstaedt, U., von Wulffen, H., Priesnitz, S., Fischer, M., Tannich, E., & Hagen, R. M. (2011). Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species in fecal samples. *International journal of medical microbiology* : *IJMM*, 301(7), 577–584. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.06.001>
103. Wipler J, Čermáková Z, Hanzálek T, Horáková H, Žemličková H. [Sharing bacterial microbiota between owners and their pets (dogs, cats)]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2017 Jun;23(2):48-57. Czech. PubMed PMID: 28903168.
104. Wolff, N., Geiss, A. F., & Barišić, I. (2020). Crosslinking of PCR primers reduces unspecific amplification products in multiplex PCR. *Journal of*

- microbiological methods, 178, 106051. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106051>
105. Woolhouse, M. E. J. (2002). Population biology of emerging and re-emerging pathogens.
106. Woolhouse, M. E. J., & Gowtage-sequeira, S. (2005). Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens.
107. Woolhouse, M. E. J., Haydon, D. T., & Antia, R. (2005). Emerging pathogens : the epidemiology and evolution of species jumps.
108. Worrall, L. J., Vuckovic, M., & Strynadka, N. C. (2010). Crystal structure of the C-terminal domain of the Salmonella type III secretion system export apparatus protein InvA. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 19(5), 1091–1096. <https://doi.org/10.1002/pro.382>
109. Wysok, B., Wojtacka, J., & Kivistö, R. (2020). Pathogenicity of Campylobacter strains of poultry and human origin from Poland. *International journal of food microbiology*, 334, 108830. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108830>
110. Yanestria, S. M., Rahmaniar, R. P., Wibisono, F. J., & Effendi, M. H. (2019). Detection of invA gene of Salmonella from milkfish (*Chanos chanos*) at Sidoarjo wet fish market, Indonesia, using polymerase chain reaction technique. *Veterinary world*, 12(1), 170–175. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.170-175>
111. Zhang, H., Morrison, S., & Tang, Y. W. (2015). Multiplex polymerase chain reaction tests for detection of pathogens associated with gastroenteritis. *Clinics in laboratory medicine*, 35(2), 461–486. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.006>
112. Zhen He., Gharaibeh, R. Z., Newsome, R. C., Pope, J. L., Dougherty, M. W., Tomkovich, S., Pons, B., Mirey, G., Vignard, J., Hendrixson, D. R., & Jobin, C. (2019). Campylobacter jejuni promotes colorectal tumorigenesis through the action of cytolethal distending toxin. *Gut*, 68(2), 289–300.
113. Zuo, L., Jiang, Y., Wan, M., Jiang, M., Shi, X., Li, Y., Qiu, Y., Lin, Y., & Hu, Q. (2020). *Wei sheng yan jiu = Journal of hygiene research*, 49(5), 823–

## ANEXOS

### CARTA DE ASENTIMIENTO

**Dirigido a:** Menores de edad que tienen en su casa un perro y gato

**Título de proyecto:** DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTIDIAGNÓSTICO DE BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES ZOONÓTICAS Y GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN MUESTRAS DE HUMANOS Y SUS MASCOTAS EN EL ESTADO DE QUERÉTARO

**Nombre del Investigador Principal:** Dra. Rosa Martha Pérez Serrano.

#### Resumen breve del proyecto

Sabemos que tu mascota es tu mejor amigo y por eso estamos interesados en cuidarlos a ambos. El que convivas con tu mascota te da muchos beneficios a parte de todo el amor que te brinda, pero es importante recordar que pueden contagiarte de enfermedades y que por eso debes siempre lavarte las manos antes y después de jugar con él y nunca dejarte besar la cara. Nosotros estamos interesados en crear una prueba que sea rápida y que permita reconocer a varios microbios al mismo tiempo para detectarlos en las muestras tanto de las mascotas como en las de su dueño. Esto tiene la finalidad de que el médico pueda mandar

un tratamiento oportuno con la intención de mejorar la salud de quien este infectado con estos microbios.

Hola mi nombre es Rosa Martha Pérez Serrano y trabajo en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Actualmente la Facultad de Medicina está realizando un estudio que requiere de tu apoyo si estás de acuerdo en participar.

Tu participación en el estudio consistiría en darnos una muestra de heces en un vaso limpio que te entregaremos nosotros. Esto es no te dolerá no generará ninguna molestia en tu cuerpo.

Tu participación en el estudio es voluntaria, es decir, aun cuando tu papá o mamá hayan dicho que puedes participar, si tú no quieres hacerlo puedes decir que no. Es tu decisión si participas o no en el estudio. También es importante que sepas que, si en un momento dado ya no quieres continuar en el estudio, no habrá ningún problema, o si no quieres responder a alguna pregunta en particular, tampoco habrá problema.

Toda la información que nos proporcionas nos ayudarán a lograr un prueba diagnóstica correcta para conocer si están los microbios en las muestras de lo humanos y sus mascotas. Esta información será confidencial, esto quiere decir que no diremos a nadie tus respuestas, solo lo sabrán las personas que forman parte del equipo de este estudio.

Si aceptas participar, te pido que por favor pongas una ( ✓ ) en el cuadrado de abajo que dice “Sí quiero participar” y escribe tu nombre. Si no quieres participar, no pongas ninguna ( ✓ ), ni escribas tu nombre.

Sí quiero participar

Nombre: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de la persona que obtiene el asentimiento:

\_\_\_\_\_

Fecha: a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

Observaciones: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Es importante comentarte que si tienes alguna duda sobre este tema, puedes pedirle a tu papa o a tu mama que se pongan en contacto conmigo para platicar y resolver tu inquietud. Con gusto estoy para atenderte.

## CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

**Dirigido a:** Padres y sus hijos

**Título de proyecto:** DESARROLLO DE UN MÉTODO MULTIDIAGNÓSTICO DE BACTERIAS CAUSANTES DE INFECCIONES GASTROINTESTINALES ZONÓTICAS Y GENES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN MUESTRAS DE HUMANOS Y SUS MASCOTAS EN EL ESTADO DE QUERÉTARO

**Nombre del Investigador Principal:** Dra. Rosa Martha Pérez Serrano.

### Resumen del proyecto

La convivencia con las mascotas ha cambiado y las personas cada vez están en una relación más estrecha con ellos, lo que aumenta los factores de riesgo para la transmisión de las zoonosis y los perfiles de RAM asociados a estas infecciones. Lo anterior, pone en riesgo la salud de los propietarios y en especial de los menores de edad o personas vulnerables como las embarazadas o personas de la tercera edad. Para hacerle frente a esta amenaza es indispensable la participación multidisciplinaria de profesionales de la salud que estén enfocados en vigilar las zoonosis y la RAM, lo cual es una prioridad para el fortalecimiento de Una Salud. Un gran reto para monitorear esta situación son los métodos diagnósticos tardados y poco confiables para la identificación de los microorganismos y el espectro de RAM presente en ellos. Por lo anterior, la presente investigación pretende diseñar un método de multidiagnóstico, sensible, específico, rápido, con un costo-beneficio atractivo que identifique las bacterias gastrointestinales

zoonóticas y su perfil de RAM que sirva para muestras de humanos y sus mascotas (perro y gato).

**Estimado(a)**

**Señor/Señora:**\_\_\_\_\_.

Usted ha sido invitado a participar en el presente proyecto de investigación, el cual es desarrollado por la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro en colaboración con la Facultad de Ciencias Naturales de la misma universidad y la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México. El estudio se realizará en el Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria (LIOM) de la Facultad de Medicina de la UAQ.

Si Usted decide participar y que su hijo(a) participe también en el estudio, es importante que considere la siguiente información. Siéntase libre de preguntar cualquier asunto que no le quede claro.

El propósito del presente estudio es diseñar un método que identifique varios microbios, que sea sensible, específico, rápido, con un costo-beneficio atractivo; así como determinar a qué antibióticos es resistente en muestras de humanos y sus mascotas (perro y gato).

Le pedimos participar en este estudio porque usted forma parte de las personas que tienen hijos y mascotas y porque sabemos que está interesado en la salud de ambos.

**Procedimientos:**

Su participación consistirá en:

- Darnos una muestra de heces de usted, su hijo, su perro y gato en vasos diferentes con una etiqueta de identificación. Este procedimiento no generará ningún daño a su cuerpo.
- El haremos una entrevista para conocer acerca del historial médico de su hijo, usted, su perro y gato que durará alrededor de 30 min y abarcará varias preguntas sobre la medicina preventiva, hábitos de convivencia e historial médico.

**Beneficios:** No hay un beneficio directo por su participación ni la de su hijo(a), perro y gato en el estudio, sin embargo, si usted acepta participar estará colaborando con la Facultad de Medicina de la UAQ para crear un nuevo método de diagnóstico se sirva, en un futuro, para tratar en menos tiempo las infecciones gastrointestinales.

**Es importante mencionar** que no hay un beneficio directo para usted ni su hijo(a), perro y gato por proporcionar estas muestras ni por la información genética que se genere, pero estos datos ayudarán a comprender mejor cómo los genes afectan la salud y de esta manera poder ayudar a más personas en el futuro).

**Confidencialidad:** Toda la información que Usted nos proporcione para el estudio será de carácter estrictamente confidencial, será utilizada únicamente por el equipo de investigación del proyecto y no estará disponible para ningún otro propósito. Usted, su hijo(a), su perro y gato quedarán identificados(as) con un número y no con su nombre. Los resultados de este estudio serán publicados con fines científicos, pero se presentarán de tal manera que no podrá ser identificado(a).

**Participación Voluntaria/Retiro:** Su participación y la de su hijo(a) en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted y su hijo(a) están en plena libertad de negarse a participar o de retirar su participación del mismo en cualquier momento. Su decisión de participar o no en el estudio no implicará ningún tipo de consecuencia o afectará de ninguna manera en su puesto de trabajo o en el servicio que se le brinda por parte de su médico tratante.

**Es necesario recalcar** que su participación y la de su hijo(a) en este estudio es absolutamente voluntaria. Usted y su hijo(a) están en plena libertad de decidir qué muestras son las que están de acuerdo en proporcionar o de negarse a participar o de retirar su participación en el estudio en el momento en que desee. Podrá solicitar también que se retiren sus muestras, las de su hijo(a), perro y gato del estudio sin que ello implique ningún tipo de consecuencia, para ello le pedimos dirigirse al investigador/a responsable del estudio Dra. Rosa Martha Pérez Serrano al correo [rositaperezserrano@gmail.com](mailto:rositaperezserrano@gmail.com)

**Riesgos Potenciales/Compensación:** Los riesgos potenciales que implican su participación, la de su hijo(a), su perro y gato en este estudio son: **son mínimos.** Si alguna de las preguntas le hiciera sentir un poco incomodo(a) a usted y su hijo(a), tienen el derecho de no responderla.

**Aviso de Privacidad Simplificado:** La investigadora principal de este estudio, Dra. Rosa Martha Pérez Serrano, es responsable del tratamiento y resguardo de los datos personales que nos proporcionen usted y su Hijo(a), los cuales serán protegidos conforme a lo dispuesto por la **Ley**

**General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.** Los datos personales que les solicitaremos serán utilizados exclusivamente para las finalidades expuestas en este documento. Usted y su hijo(a) pueden solicitar la corrección de sus datos o que sus datos se eliminen de nuestras bases o retirar su consentimiento para su uso. En cualquiera de estos

casos les pedimos dirigirse al investigador responsable del proyecto a la siguiente dirección de correo [rositaperezserrano@gmail.com](mailto:rositaperezserrano@gmail.com)

**Números a Contactar:** Si usted tiene alguna pregunta, comentario o preocupación con respecto al proyecto, por favor comuníquese con la investigadora responsable del proyecto: Dra. Rosa Martha Pérez Serrano al siguiente número de teléfono 442 192 1297 ext: 62541 en un horario de 8:00 am a 4:00 pm ó al correo electrónico [rositaperezserrano@gmail.com](mailto:rositaperezserrano@gmail.com)

Si usted acepta participar en el estudio, le entregaremos una copia de este documento que le pedimos sea tan amable de firmar.

Declaración de la persona que da el consentimiento

- Se me ha leído esta Carta de consentimiento.
- Me han explicado el estudio de investigación incluyendo el objetivo, los posibles riesgos y beneficios, y otros aspectos sobre mi participación en el estudio.
- He podido hacer preguntas relacionadas a mi participación en el estudio, y me han respondido satisfactoriamente mis dudas.

Si usted entiende la información que le hemos dado en este formato, está de acuerdo en participar en este estudio, de manera total o parcial, y también está de acuerdo en permitir que su información de salud sea usada como se describió antes, entonces le pedimos que indique su consentimiento para participar en este estudio.

**Registre su nombre y firma en este documento del cual le entregaremos una copia.**

**PARTICIPANTE:**

**Nombre:**  
\_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Fecha/hora** \_\_\_\_\_

**TESTIGO 1**

**Nombre:**  
\_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Relación con  
la participante:** \_\_\_\_\_

**Fecha/hora:** \_\_\_\_\_

**TESTIGO 2**

**Nombre:**  
\_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Relación con  
la participante:** \_\_\_\_\_

**Fecha/hora:** \_\_\_\_\_

**Nombre y firma del investigador o persona que obtiene el consentimiento:**

**Nombre:**  
\_\_\_\_\_

**Firma:** \_\_\_\_\_

**Fecha/hora** \_\_\_\_\_

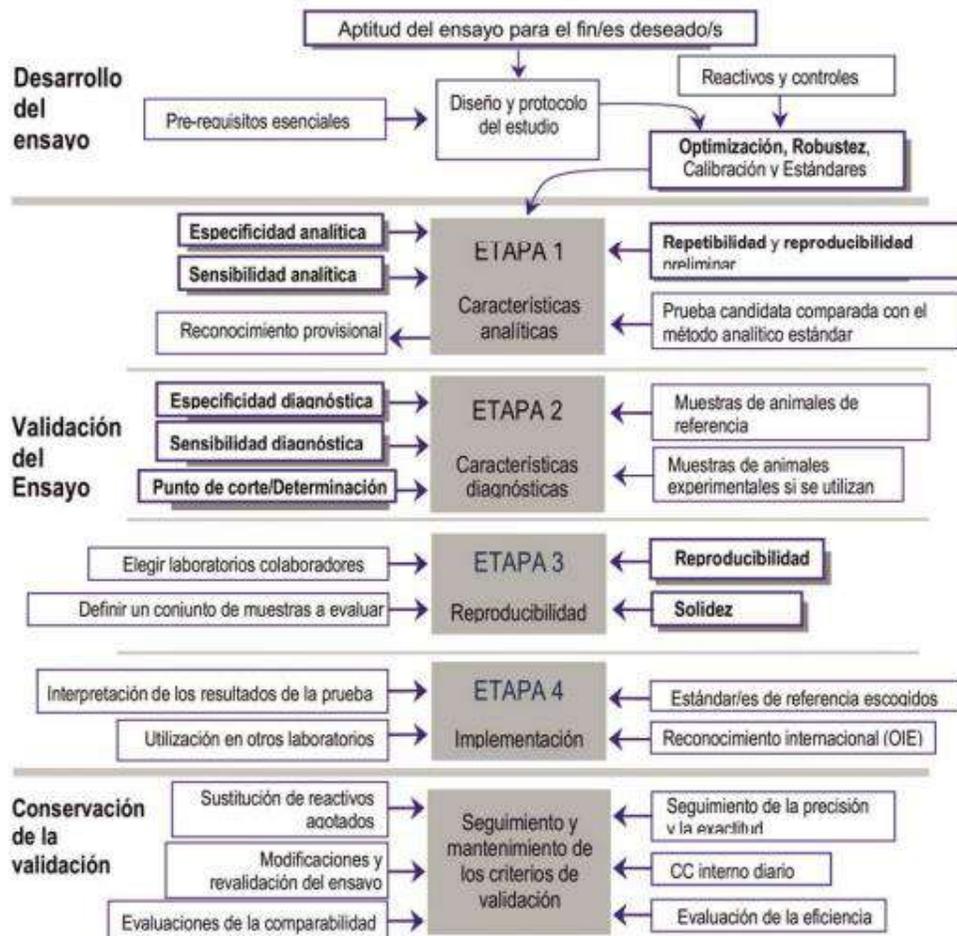
## **VALIDACIÓN DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA**

La validación de las pruebas nos sirve para determinar qué tan idónea es de acuerdo a su rendimiento, deseando alta sensibilidad y baja especificidad para una prueba de cribado o alta especificidad y baja sensibilidad para pruebas confirmativas (Ballahi-Pordany, et al., 1996). Este es un método de detección directo ya que identifica partículas o componentes del agente infeccioso como ácidos nucleicos, proteínas o enzimas por lo que debemos tener en cuenta tres variables: la composición de la matriz en la cual está contenido el analito buscado, en este caso las heces, los factores que interfieren en el rendimiento analítico que se refiere al instrumental, error técnico, controles, calidad de reactivos, etc., y la interpretación de la prueba asociada a la predicción precisa del estado del individuo en relación con el analito (OIE, 2009). Para llevar a cabo la validación de la prueba es necesario seguir con las etapas pertinentes (Figura 1 (Anexo)) establecidas para su efectividad.

Los aspectos que se deben considerar indispensables para el desarrollo de la prueba son:

1. Aptitud para el fin deseado.
2. Optimización.
3. Normalización.
4. Robustez.
5. Repetibilidad.
6. Sensibilidad analítica.
7. Especificidad analítica.
8. Umbrales (puntos de corte).
9. Sensibilidad diagnóstica.
10. Especificidad diagnóstica.
11. Reproducibilidad.
12. Solidez.

Figura 1 (Anexo). Fases de desarrollo y validación de la prueba. Asamblea Mundial de delegados de la OIE. 2009.



## GLOSARIO

**Factor de riesgo**: característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión.

**Transmisión infecto-contagiosa vertical**: comprende todas aquellas infecciones que transmite la madre al feto/recién nacido durante los procesos inherentes a la maternidad.

**Transmisión infectocontagiosa horizontal**: comprende aquellas infecciones que no están en una relación padre-progenie ni al éxito reproductivo del huésped.

**Huésped**: organismo que alberga a otro en su interior o lo soporta sobre sí, ya sea un parásito, comensal o mutualista.

**Vector**: organismo vivo que puede transmitir patógenos infecciosos entre personas o de animales a personas y viceversa.

**Zoonosis**: grupo de enfermedades infecciosas que de manera natural se pueden transmitir de los animales a los seres humanos.

**Zoonosis emergente**: enfermedad zoonótica provocada por un agente infeccioso recientemente identificado y anteriormente desconocido, capaz de causar problemas de salud a nivel local, regional o mundial.

**Zoonosis reemergente**: resurgimiento de enfermedades zoonóticas que ya habían sido aparentemente erradicadas o su incidencia se había visto disminuida, a menudo vuelven tomando proporciones epidémicas.

**Zoonosis transfronteriza**: enfermedades zoonóticas epidémicas altamente contagiosas que pueden propagarse muy rápidamente sin tener en cuenta las fronteras nacionales.

**Zoonosis olvidada**: conjunto de enfermedades zoonóticas que afectan principalmente a las poblaciones más pobres y con un limitado acceso a los servicios de salud como áreas rurales.

**Control positivo:** control que contiene el analito en una concentración superior a un límite especificado.

**Control negativo:** control que contiene el analito en una concentración inferior a un límite especificado.

**Muestra silvestre:** muestra de material como orina, sangre, tejido, células, ADN, ARN o proteínas de seres humanos, animales o plantas.

**Prevalencia:** proporción de individuos de una población que presenta el evento en un momento o periodo de tiempo determinado.

**Incidencia:** cantidad de casos nuevos de una enfermedad, un síntoma, muerte o lesión que se presenta durante un periodo de tiempo específico.

**Brote epidémico:** clasificación usada en la epidemiología para denominar la aparición repentina de una enfermedad.

**Reproducibilidad:** capacidad de un método de prueba o procedimiento, dadas las mismas entradas, para proporcionar los mismos datos de forma consistente en las pruebas en diferentes laboratorios.

**Repetición:** que repite mecánicamente un proceso.

**Réplicas:** múltiples corridas experimentales con la misma configuración de variables.

**Exactitud:** probabilidad de que el resultado del test prediga correctamente la presencia o ausencia de la enfermedad.

**Precisión:** se refiere a que todas las mediciones hechas de manera repetida han arrojado un resultado similar.

**Valor predictivo positivo:** probabilidad de que el paciente tenga la enfermedad dado que el test sea positivo.

**Valor predictivo negativo:** probabilidad de que el paciente no tenga la enfermedad dado que el test sea negativo.