

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LABORATORIO DE INFECTOLOGÍA MOLECULAR

**“Diseño y estandarización de prueba PCR múltiple
para diagnóstico de microorganismos de
importancia ginecológica: *Chlamydia trachomatis*,
Mycoplasma hominis y *Ureaplasma spp.*”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:
LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

Presenta

Martínez Hernández Ana Gabriela

Directora de tesis

D.C. Pazos-Salazar Nidia Gary

noviembre 2024

Puebla, Pue.



TABLA DE CONTENIDO

Resumen.....	1
<i>Abstract</i>	1
Capítulo 1: Generalidades.....	2
1.1. Planteamiento del problema.....	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo general.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Hipótesis.....	4
Capítulo 2: Marco teórico.....	5
2.1. Características generales de los patógenos.....	5
2.1.1. <i>Mycoplasma hominis</i>	5
2.1.2. <i>Ureaplasma spp.</i>	6
2.1.3. <i>Chlamydia trachomatis</i>	7
2.2. Tasas de incidencia y prevalencia de los patógenos.....	8
2.2.1. A nivel mundial.....	8
2.2.2. En México.....	9
2.3. Cuadro clínico.....	10
2.3.1. Vaginosis bacteriana.....	11
2.5. Blancos moleculares.....	12
2.5.1. <i>Mycoplasma hominis</i>	12
2.5.2. <i>Ureaplasma spp.</i>	13
2.5.3. <i>Chlamydia trachomatis</i>	14
Capítulo 3: Marco de referencia.....	17
3.1. Diagnóstico actual de <i>Mycoplasma hominis</i>	17
3.2. Diagnóstico actual de <i>Ureaplasma spp.</i>	17
3.3. Diagnóstico actual de <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
Capítulo 4: Diseño de la investigación.....	19
4.1. Materiales y metodología.....	20
4.1.1. Esquema general de trabajo.....	20
4.1.2. Descripción del esquema general de trabajo.....	20
4.1.2.1. Fase <i>in silico</i>	20

4.1.2.2. Fase húmeda.	22
4.1.2.3. Estandarización.....	23
Capítulo 5: Resultados y discusión.....	26
5.1. Fase <i>in silico</i>	26
5.1.1. Control positivo de técnica (CPT).....	26
5.1.2. Alineamientos de secuencias.....	26
5.1.3. Diseño de iniciadores.....	27
5.1.4. Análisis <i>in silico</i> de especificidad.....	28
5.2. Diseño <i>in silico</i> de plásmido control positivo.....	28
5.3. Obtención de secuencias diana.....	33
5.4. Construcción <i>in vitro</i> del plásmido control positivo y su caracterización.....	35
5.5. Estandarización de prueba PCR.....	39
5.5.1. Pruebas de especificidad.....	39
5.5.2. Obtención de los límites de detección.....	40
Conclusiones.....	43
Perspectivas.....	44
ANEXOS.....	45
Anexo 1. Alineamientos con herramienta Clustal Omega.....	45
Alineamiento del gen <i>omp1</i> en <i>C. trachomatis</i> para iniciador positivo.....	45
Alineamiento del gen <i>omp1</i> en <i>C. trachomatis</i> para iniciador negativo.....	46
Alineamiento del gen de la ureasa en <i>Ureaplasma spp.</i>	47
Anexo 2. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para CPT.....	47
Anexo 3. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para <i>C. trachomatis</i>	48
Anexo 4. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para <i>M. hominis</i>	49
Anexo 5. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para <i>Ureaplasma spp.</i>	50
Anexo 6. Análisis fisicoquímico de estructuras secundarias formadas entre iniciadores.....	51
Anexo 7. Análisis <i>in silico</i> de la especificidad de los iniciadores.....	70
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador S CPT.....	70
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador AS CPT.....	70
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador S C. TRA.....	71
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador AS C. TRA.....	71

Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador S M. HOMI	72
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador AS M. HOMI.....	72
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador S UREA.....	73
Resultados de análisis <i>in silico</i> de especificidad de iniciador AS UREA.....	73
Referencias	74

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Colonias de <i>M. hominis</i> vistas al microscopio con aumento 10x.....	6
Imagen 2. Estructura del operón <i>OppBCDF</i> en <i>M. hominis</i>	13
Imagen 3. Secuencia parcial del gen codificante para el complejo ureasa de <i>Ureaplasma spp.</i>	14
Imagen 4. Estructura de la membrana de <i>C. trachomatis</i>	15
Imagen 5. Secuencia de gen <i>omp1</i> de <i>C. trachomatis</i>	16
Imagen 6. Base teórica del <i>Golden Gate Cloning Method</i>	22
Imagen 7. Controles de especificidad cruzada	24
Imagen 8. Expresión del gen <i>SDHA</i> en diferentes órganos	26
Imagen 9. Esquema de diseño de plásmido control positivo.....	29
Imagen 10. Representación de la restricción y ligación de fragmentos 1 y 2	30
Imagen 11. Representación de la restricción y ligación de fragmentos 2 y 3	31
Imagen 12. Representación de la restricción y ligación de fragmentos 3 y 4	31
Imagen 13. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt.....	32
Imagen 14. Mapa del vector pJET1.2-SOPU	32
Imagen 15. Obtención de amplicón de <i>Ureaplasma</i>	33
Imagen 16. Obtención de amplicón de <i>M. hominis</i>	33
Imagen 17. Obtención de amplicones de CPT y <i>C. trachomatis</i>	34
Imagen 18. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-SDHA y pJET1.2-OMP1	35
Imagen 19. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-Urea	36
Imagen 20. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-P100.....	36
Imagen 21. Obtención de amplicón control generado por método <i>Golden Gate</i>	37
Imagen 22. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-SOPU.....	38
Imagen 23. Caracterización de plásmido pJET1.2-SOPU.....	38
Imagen 24. Evaluación de especificidad de iniciadores de <i>omp1</i>	39
Imagen 25. Evaluación de especificidad de iniciadores de <i>p100</i>	40
Imagen 26. Evaluación de especificidad de iniciadores para el gen de la ureasa.....	40
Imagen 27. Determinación de límite de detección para <i>sdha</i>	40
Imagen 28. Determinación de límite de detección para <i>omp1</i>	41
Imagen 29. Determinación de límite de detección para gen de la ureasa.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de los patógenos	10
Tabla 2. Blancos moleculares para cada patógeno y características fisicoquímicas de los iniciadores	28
Tabla 3. Secuencias de iniciadores de diseño.....	29
Tabla 4. Límites de detección de cada blanco molecular	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPF: Agarosa de bajo punto de fusión.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

AS: Iniciador antisentido

ATP: Adenosín trifosfato.

CE: Cuerpo Elemental.

CO₂: Dióxido de carbono.

CPT: Control positivo de técnica.

CR: Cuerpo reticulado.

DAS: Iniciador antisentido de diseño.

DS: Iniciador sentido de diseño.

EGA: Electroforesis en gel de agarosa.

EIP: Enfermedad inflamatoria pélvica.

FCQ: Facultad de Ciencias Químicas.

HUP: Hospital Universitario de Puebla.

IFU: Inclusion-forming units.

ITS: Infección de transmisión sexual.

LPS: Lipopolisacárido.

MOMP: Proteína mayor de membrana externa.

MP: Marcador de peso.

NCBI: National Center of Biotechnology Information.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

pb: Pares de bases.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

pJET1.2-SOPU: Plásmido control positivo con las 4 secuencias diana.

S: Iniciador sentido.

VB: Vaginosis bacteriana.

VIEP: Vicerrectoría de Investigación y estudios de posgrado.

Resumen

Actualmente las infecciones cervicovaginales son un problema común en el servicio de salud, entre estas infecciones están la llamada vaginosis bacteriana y las infecciones de transmisión sexual, estas son causadas por diversos patógenos, entre los cuales destacan; debido a su relevancia estadística y complicaciones clínicas graves; *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.* y *Chlamydia trachomatis*. Además de su relevancia estadística y la importancia de sus complicaciones, existen grandes deficiencias en el actual diagnóstico de estos tres patógenos, tales como la baja sensibilidad de las pruebas, la dificultad de las técnicas utilizadas y el alto tiempo de respuesta, aunado a esto, los cuadros clínicos de estos tres patógenos son bastante similares, por lo que su diagnóstico diferencial por sintomatología tampoco es posible. Estas deficiencias en el diagnóstico de los tres patógenos se pueden solucionar con el diseño de una prueba PCR múltiple, por lo que el presente proyecto se dirige al diseño, desarrollo y estandarización de esta.

Abstract

Currently, cervicovaginal infections are a common issue in healthcare services. Among these infections are bacterial vaginosis and sexually transmitted infections, which are caused by various pathogens, notably *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.*, and *Chlamydia trachomatis*, due to their statistical relevance and severe clinical complications. In addition to the above, there are significant deficiencies in the current diagnosis of these three pathogens, such as low sensitivity, the complexity of the techniques used, and long response times. Furthermore, the clinical presentations of these three pathogens are quite similar, making differential diagnosis based on symptoms impossible. These diagnostic deficiencies can be addressed by designing a multiplex PCR test, and this project focuses on the design, development, and standardization of such a test.

Capítulo 1: Generalidades

1.1. Planteamiento del problema

Las infecciones cervicovaginales actualmente son un problema muy común en el servicio de salud, esto debido a lo frecuentes que son los casos tanto en el primer nivel de atención médica como en los servicios de ginecología y obstetricia.

Dentro de las infecciones cervicovaginales, se encuentra la vaginosis bacteriana (VB), la cual, de acuerdo con Cardona *et al.* (2014), tiene como agentes más frecuentemente aislados a *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella mobiluncus*, *Ureaplasma* y *Mycoplasma*. Por su parte, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014), *Chlamydia trachomatis* es considerada, junto con la gonorrea, como las infecciones de transmisión sexual (ITS) bacteriana con mayor prevalencia a nivel mundial.

Las complicaciones de la VB pueden llegar a ser bastante serias, en especial en pacientes en periodo de gestación, en estos pacientes la VB ha sido asociada a complicaciones como amenaza de parto prematuro, rotura prematura de membranas, parto prematuro, infección intraamniótica y endometritis posparto; mientras que en el resto de los pacientes se ha demostrado que la presencia de VB aumenta el riesgo de adquirir Infecciones de Transmisión Sexual como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o *Chlamydia trachomatis* (Romero y Andreu, 2016).

Por su parte, las complicaciones de una infección causada por *C. trachomatis* en pacientes en gestación son las mismas que causan la VB y a ellas se aumentan los nacimientos de bebés con neumonía, conjuntivitis o sepsis, además de provocar embarazo ectópico, mientras que en pacientes que no se encuentran en periodo de gestación, las principales complicaciones son enfermedad inflamatoria pélvica (EIP), infertilidad por oclusión tubárica y dolor pélvico crónico (López *et al.*, 2018).

En cuanto a diagnóstico, las principales deficiencias para *Ureaplasma spp.* y *Mycoplasma hominis* son la falta de técnicas confiables con elevados valores de sensibilidad y especificidad, además de que los tiempos de respuesta son considerablemente altos. En el caso de *C. trachomatis*, la principal dificultad es el hecho de que es una bacteria intracelular, por lo que el cultivo en medios bacterianos comunes no es aplicable y el diagnóstico por medio de la sintomatología del paciente no es de utilidad debido a que comparte

sintomatología con otros agentes. De acuerdo con Alonso *et al.* (2012), el método diagnóstico de referencia es el cultivo en línea celular, el cual tiene la limitante de ser una técnica complicada.

Entonces, el presente trabajo plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿Es posible estandarizar una prueba de diagnóstico PCR múltiple para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.* y *Chlamydia trachomatis*?

1.2. Justificación

Lo descrito anteriormente expone los criterios que se tomaron en cuenta para la selección de los patógenos a los que va dirigida esta prueba PCR múltiple; la semejanza entre los cuadros clínicos, la relevancia estadística de cada uno de los patógenos, las complicaciones causadas por sus infecciones y las deficiencias en su diagnóstico.

Por ello, el desarrollo de una PCR múltiple para *M. hominis*, *Ureaplasma spp.*, y *C. trachomatis* solucionaría los problemas que se tienen en el diagnóstico actual, como la similitud entre los cuadros clínicos y la poca especificidad y sensibilidad de los métodos de diagnóstico actuales.

Este proyecto tendrá como aporte social una prueba diagnóstica PCR múltiple para tres de los principales patógenos de importancia ginecológica que resuelva las principales dificultades del diagnóstico que se tienen actualmente; como aporte profesional, este proyecto planteará las bases necesarias para el diseño y estandarización de una prueba PCR múltiple en tiempo real para los tres patógenos, incluyendo el diseño de iniciadores específicos; y por último, el aporte personal para la tesista constará de su introducción al ámbito de la investigación así como el fortalecimiento de sus habilidades prácticas y conocimientos sobre diagnóstico microbiológico molecular.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general.

Diseñar, desarrollar y estandarizar una prueba diagnóstica de PCR múltiple para *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.* y *Chlamydia trachomatis*.

1.3.2. Objetivos específicos.

1. Diseñar *in silico* la prueba PCR múltiple.

2. Diseñar *in silico* el plásmido control positivo.
3. Obtener las secuencias diana de muestras ya diagnosticadas.
4. Construir *in vitro* el control positivo.
5. Estandarizar las condiciones de reacción de PCR múltiple.

1.4. Hipótesis

Este proyecto sostiene la hipótesis de que es posible diseñar, desarrollar y estandarizar una prueba diagnóstica PCR múltiple para los agentes: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma spp.* y *Chlamydia trachomatis*.

Capítulo 2: Marco teórico

2.1. Características generales de los patógenos

2.1.1. *Mycoplasma hominis*.

Las especies del género de los micoplasmas pertenecen a la clase *Mollicutes*, y son organismos procariontes de pequeño tamaño que carecen de pared celular. Se han identificado más de 200 especies dentro de esta clase, de las cuales las de mayor importancia son *Mycoplasma pneumoniae*, *M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum* y *M. genitalium* (Riedel *et al.*, 2020).

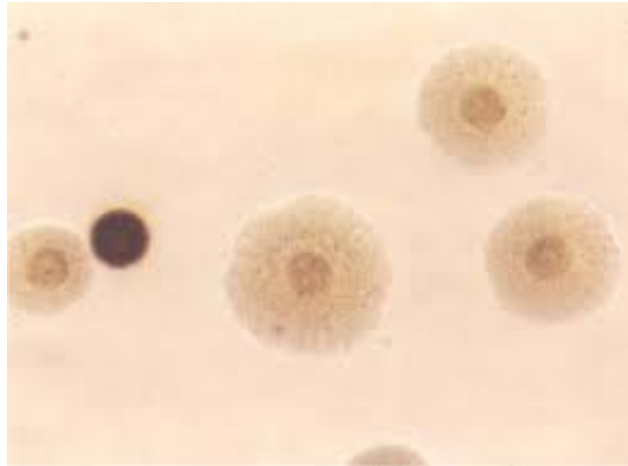
Según Riedel *et al.* (2020) los micoplasmas tienen la característica de ser muy pequeños, oscilando entre los 125 y 250 nm de diámetro, además, debido a la falta de pared celular rígida, son muy pleomórficos y tienen en su estructura una membrana unitaria de tres capas que contiene un esterol. Los micoplasmas son resistentes a la penicilina debido a su falta de pared celular y pueden reproducirse en medios libres de células.

De acuerdo con Ryan (2022) los esteroides contenidos en la membrana de los micoplasmas, no son sintetizados por el organismo mismo, sino que son adquiridos a partir del tejido en el que están creciendo y se han identificado orgánulos de superficie que median la fijación a dicho tejido. El mismo autor también menciona que el genoma de los micoplasmas se caracteriza por ser pequeño, en parte debido a la falta de genes que codifiquen para una pared celular compleja.

M. hominis es anaerobio facultativo y su crecimiento es posible en agar chocolate, formando colonias características por tomar forma de “huevo frito invertido” (Ryan, 2022).

La dosis mínima infectiva de *M. hominis* en humanos aún es desconocida, sin embargo, se han realizado estudios en diferentes animales de laboratorio para conocer este dato, como el de Kraus y colaboradores en 1977, donde de acuerdo con su experimentación, la dosis infectiva en humanos es de 100 *color-changing units* (CCU).

Imagen 1. Colonias de *M. hominis* vistas al microscopio con aumento 10x



Recuperado de: Cervantes, G. (2009).

2.1.2. *Ureaplasma spp.*

El género *Ureaplasma*, al igual que el *Mycoplasma*, pertenece a la clase *Mollicutes*, por lo que las características de estos microorganismos son muy similares.

En el caso particular del género *Ureaplasma*, este incluye 6 especies, de las cuales la única que se ha encontrado en el humano es *U. urealyticum*, esta especie posee varios serotipos, actualmente se han identificado 14 y han sido agrupados en 2 biovares (biovar 1 y biovar 2) (Lifeder, 2022).

De acuerdo con Kong *et al.* (2000), debido a diferencias genómicas, se decidió dividir la especie *U. urealyticum* en dos especies (antes llamadas biovares); *U. parvum* (anteriormente llamada *U. urealyticum* biovar 2), y *U. urealyticum* (anteriormente llamada *U. urealyticum* biovar 1). Los mismos autores refieren que *U. parvum* se separó a su vez en tres subtipos; el subtipo 1 incluye la serovariante 1, el subtipo 2 incluye las serovariantes 3 y 14 y el subtipo 3 la serovariante 6. Y también, *U. urealyticum* se separó en 3 subtipos dependiendo de las serovariantes; el subtipo 1 contiene las serovariantes 2, 5, 8 y 9; el subtipo dos incluye a las serovariantes 4, 10, 12 y 13; y, por último, el subtipo 3 contiene las serovariantes 7 y 11.

Al igual que otras especies pertenecientes a la clase *Mollicutes*, los ureaplasmas son difíciles de identificar debido a que su falta de pared celular los hace muy pleomórficos y su cultivo en el laboratorio es bastante exigente.

Se puede diferenciar al género *Ureaplasma* del *Mycoplasma* por poseer la capacidad de hidrolizar la urea (Lifeder, 2022).

En cuanto a los factores de virulencia de *U. urealyticum* y *U. parvum*, el equipo editorial de Lifeder (2022) destaca la producción de fosfolipasas, las cuales provocan la liberación de ácido araquidónico, este componente en el periodo de embarazo puede llevar a la producción de prostaglandinas, lo que puede desencadenar un trabajo de parto prematuro. Estas fosfolipasas también tienen un papel en la enfermedad pulmonar fetal.

La dosis mínima infectiva del género *Ureaplasma* en humanos aún es desconocida, sin embargo, se han realizado estudios en diferentes animales de laboratorio para conocer este dato, como el de Kraus y colaboradores en 1977, donde de acuerdo con su experimentación, la dosis infectiva en humanos es de 10 000 *color-changing units* (CCU).

2.1.3. *Chlamydia trachomatis*.

El género *Chlamydia* es perteneciente a la familia *Chlamydiaceae* y, de acuerdo con Mérida y Ostos (2003), éstas son bacterias no móviles de vida parasitaria intracelular obligada, esto debido a su incapacidad de producir ATP. *C. trachomatis*, de acuerdo con los mismos autores, presenta una morfología ovalada o redonda no ciliada y se observan como cocos gramnegativos o gramvariables, esto debido a que poseen membrana interna y externa, pero carecen de peptidoglucano, asemejando la envoltura de una bacteria gramnegativa, según los mismos autores, esta bacteria se divide por fisión binaria.

Según Ryan (2022), el miembro patógeno para el humano más importante del género *Chlamydia* es *C. trachomatis*.

Según Gaydos y Quinn (2022), la etiología de *C. trachomatis* divide a esta especie en dos biovariedades; tracoma y linfogranuloma venéreo, al mismo tiempo, existen al menos 18 serovariantes clasificadas en 3 grupos; tracoma, el cual contiene los serotipos A, B, Ba y C; serotipos oculogenitales, este grupo incluye los serotipos de la D a la K; y, por último, el grupo de linfogranuloma venéreo (LGV), que incluye los serotipos L₁ a L₃.

El ciclo de vida de *C. trachomatis* es descrito por Ryan (2022), quien afirma que este ciclo comprende 2 formas del microorganismo; la primera, la forma infecciosa, es llamada cuerpo elemental (CE); y la segunda, la forma replicativa, lleva el nombre de cuerpo reticulado (CR).

Según el mismo autor, este ciclo comienza con la adherencia del CE a la membrana de células blanco, causando su propia endocitosis gracias a la presencia de una “proteína reclutadora de actina translocada” (TARP), la cual provoca un reordenamiento del citoesqueleto. Una vez dentro de la célula hospedadora, el CE se convierte en CR formándose una vesícula llamada inclusión, la cual está delimitada por una membrana, de esta manera se empiezan a replicar los CR, los cuales posteriormente se reorganizarán y condensarán dando lugar a varios CE que serán expulsados de la célula hospedadora por exocitosis.

El genoma de *C. trachomatis* es relativamente pequeño, contando con un total de 1, 042, 519 pb y un plásmido críptico de 7, 493 pb, este genoma codifica para un total de 875 proteínas (Mélida y Ostos, 2003).

La dosis mínima infectiva de este patógeno en el humano es aún desconocida, sin embargo, existen estudios experimentales como el hecho por Kari y colaboradores en 2014 que estudian la dosis mínima infectiva en diferentes animales, este estudio reveló que la dosis mínima infectiva de *C. trachomatis* en ratones es de 100 000 *inclusion-forming units* (IFU).

2.2. Tasas de incidencia y prevalencia de los patógenos

Diversos estudios señalan a los micoplasmas como algunos de los principales patógenos causantes de vaginosis bacteriana y diversas complicaciones en el proceso de embarazo, por lo que, actualmente la incidencia y prevalencia de estos patógenos en tracto cervicovaginal ha sido objeto de estudio tanto a nivel mundial como en México.

En el caso de *Chlamydia trachomatis*, los datos de incidencia y prevalencia tanto a nivel nacional como mundial no son muy claros, sin embargo, se conoce como uno de los patógenos más comunes causantes de infección de transmisión sexual y esto, además de las consecuencias que puede llegar a tener en personas de sexo femenino, en especial embarazadas, ha provocado un gran interés por conocer estos datos, por lo que se han publicado varios trabajos al respecto.

2.2.1. A nivel mundial.

De acuerdo con Jaweed *et al.* (2021) las tasas de incidencia de micoplasmas genitales oscilan entre 60 y el 80% a nivel mundial. En el caso particular de *M. hominis*, de acuerdo con los mismos autores, las tasas de incidencia oscilan entre 21 a 53%, además, este patógeno es causante de alrededor del 10% de casos de enfermedad inflamatoria pélvica (EIP).

M. hominis ha sido detectado en el 24 – 75% de casos de VB y en el 13 – 22% de mujeres sin VB (Jaweed *et al.*, 2021).

Por su parte, *Ureaplasma spp.*, de acuerdo con Kokkayil y Dhawan (2015), tiene una tasa de colonización que oscila entre 40 y 80%. Este patógeno también ha sido aislado de muestras de pacientes con VB, esto en una porción entre el 62 y el 97% de los casos.

En el caso de *C. trachomatis*, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2014), la infección causada por estos patógenos es considerada, junto con la gonorrea, como la infección de transmisión sexual (ITS) bacteriana con mayor prevalencia, esto debido a que en 2008 se reportaron 106 millones de nuevos casos en adultos a nivel mundial.

La infección asintomática de este patógeno llega a afectar hasta el 90% de las mujeres (OMS, 2014).

2.2.2. En México.

A nivel nacional no hay datos oficiales disponibles acerca de la incidencia y prevalencia de estos patógenos, sin embargo, se han llevado a cabo varios estudios en diferentes hospitales de todo el país.

En un estudio realizado en el Hospital de Ginecología y Obstetricia del Instituto Materno Infantil del Estado de México (IMIEM), la incidencia general de los micoplasmas en muestras de canal endocervical fue de 62.7%, de los cuales, el 50.81% corresponde a *Ureaplasma urealyticum*, 1.62% corresponde a *M. hominis* y el 10.27% corresponde a muestras positivas para ambos patógenos (Álvarez, 2012).

Otro estudio realizado en el Hospital Universitario de Puebla (HUP) arrojó un resultado de tasa de incidencia para *U. urealyticum* de 42%, esto detectado por medio de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de 31% si el diagnóstico se hace por medio de cultivos en caldos y agares confirmatorios (Rivera *et al.*, 2004).

En el caso de *C. trachomatis*, un estudio realizado a 200 personas de sexo femenino en el servicio médico de Ginecología del Hospital General No. 29 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de la Ciudad de México, arrojó un valor de prevalencia de 8.5%, teniendo un total de 17 pruebas positivas, de las cuales 12 contenían algún otro patógeno

además de *C. trachomatis* y 5 tenían como único patógeno a *C. trachomatis* (Escobedo, *et al.*, 2021).

2.3. Cuadro clínico

Una de las principales dificultades en el diagnóstico de estos patógenos es que las manifestaciones clínicas son muy variadas y al mismo tiempo semejantes entre sí. En la tabla 1 se muestran las manifestaciones clínicas que pueden llegar a provocar cada uno de los patógenos.

Tabla 1. Manifestaciones clínicas de los patógenos

Manifestación clínica	Patógeno		
	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Flujo vaginal anómalo	X	X	X
Olor “a pescado” por volatilización de aminas	X	X	
Fiebre posparto	X	X	X
Infección intraamniótica	X		X
Infección neonatal	X	X	X
Cervicitis	X	X	X
Enfermedad inflamatoria pélvica (EIP)	X	X	X
Síndrome uretral	X	X	X
Linfogranuloma venéreo (LGV)			X
Tracoma ocular			X
Conjuntivitis			X

Elaboración propia a partir de:
Ryan K.J. (2022); Jameson J, *et al.* (2020) y Hardy R (2022).

El flujo vaginal en el caso de infección por micoplasmas suele ser de blanquecino a grisáceo, mientras que el flujo vaginal de una infección causada por *C. trachomatis* tiende a ser más amarillento. El síndrome uretral incluye disuria interna y piuria. Por su lado, la cervicitis mucopurulenta es una inflamación del epitelio cilíndrico y el subepitelio del cuello uterino y

es causada por los tres patógenos. La EIP es una infección que asciende desde el cuello uterino o la vagina hasta el endometrio y/o las trompas de Falopio.

De acuerdo con Gaydos y Quinn (2022) el LGV comienza como una pápula indolora pequeña que tiende a ulcerarse en el sitio de la inoculación. Se han aislado cepas de LGV de *C. trachomatis* de úlceras genitales y endocérvix en mujeres que presentan adenopatía inguinal.

Tanto el tracoma endémico como la conjuntivitis en el adulto se manifiestan al inicio como una conjuntivitis característica por folículos linfoides en la conjuntiva (Gaydos y Quinn, 2022).

2.3.1. Vaginosis bacteriana.

El Instituto Mexicano del Seguro Social (2009) define a la vaginosis bacteriana (VB) como una infección a nivel vaginal sin respuesta inflamatoria y afirma que aproximadamente el 50% de los casos son asintomáticos. Por otro lado, Jiménez *et al.* (2020) definen a la VB como una alteración de la microbiota vaginal que consiste en una disminución de lactobacilos y un aumento de bacterias anaerobias.

De acuerdo con Romero y Andreu (2016), este síndrome es caracterizado por un importante aumento de la secreción vaginal que se adhiere a las paredes vaginales con un olor definido como “olor a pescado”, producido por la volatilización de aminas producidas por el metabolismo de bacterias anaerobias. Los mismos autores afirman que, sin importar si la VB es sintomática o asintomática, en pacientes en gestación ha sido asociada a complicaciones como amenaza de parto prematuro, rotura prematura de membranas, parto prematuro, infección intraamniótica y endometritis posparto; mientras que en el resto de los pacientes se ha demostrado que la presencia de VB aumenta el riesgo de adquirir Infecciones de Transmisión Sexual (ITS) como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o *Chlamydia trachomatis*. Los mismos autores también afirman que, en cuanto al diagnóstico para los agentes etiológicos de la VB como *Ureaplasma spp.* y *Mycoplasma hominis*, el método de referencia aún es la tinción de Gram y la sensibilidad que presenta va del 62 al 100% mientras que la especificidad oscila entre el 79 y el 100%. Además de este método, existen también 2 grupos de criterios que se usan en el actual diagnóstico de VB; el primer grupo son los criterios de Amsel, donde se requiere la presencia de 3 de los 4 siguientes criterios: 1. Flujo blanco – grisáceo, homogéneo, delgado y pegado a las paredes vaginales, 2. Presencia de

células clave, 3. pH mayor a 4 y 5. Liberación de aminas volátiles (Jiménez *et al.*, 2020); el segundo grupo son los criterios de Nugent, los cuales están basados en la tinción de Gram y “otorgan una puntuación en función de la proporción de *Lactobacillus*, *G. vaginalis/Bacteroides* y *Mobiluncus* observados al microscopio y se interpreta como flora normal, flora vaginal intermedia y VB” (Romero y Andreu, 2016). Existen también otros métodos para el diagnóstico de los agentes productores de VB como los cultivos bacterianos, sin embargo, los autores anteriormente citados, hacen énfasis en que estos no son recomendados debido a que no hay un único agente causal de VB y su naturaleza microbiológica es muy compleja. Otro método actual de diagnóstico es la citología cervical, cuyos valores de especificidad y sensibilidad varían de un estudio a otro, pero en términos generales, según los mismos autores, son valores bajos, de hecho, un estudio realizado por López (citado en Valencia y Yepes, 2014), arrojó valores de sensibilidad y especificidad de 48 y 66% respectivamente.

2.5. Blancos moleculares

2.5.1. *Mycoplasma hominis*.

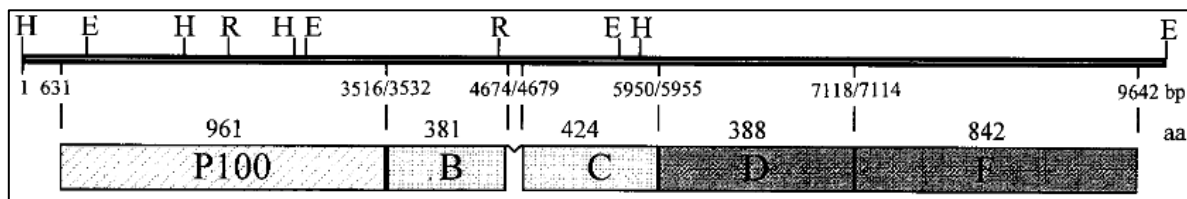
Los micoplasmas, debido a que poseen un genoma muy pequeño, no cuentan con las proteínas necesarias para la síntesis de productos esenciales como aminoácidos, colesterol o purinas, por ello cuentan con mecanismos para obtener estos productos esenciales de la célula hospedadora a la que se encuentren adheridos. Para el transporte de estos productos a través de la membrana celular, existe una superfamilia de proteínas capaces de transportar productos en contra del gradiente, esta superfamilia se llama transportadores ABC.

De acuerdo con los hallazgos de Henrich *et al.* (1999), para la orden de los *Mollicutes* existe un transportador ABC codificado por el operón *OppBCDF* y, en algunas especies, este operón cuenta con un dominio de unión a oligopéptidos fuera de la zona que codifica para el operón, este dominio se nombró *OppA*. En el caso específico de *M. hominis*, de acuerdo con los mismos autores, existe una proteína de adherencia que tiene la misma función que *OppA*, con la diferencia de que está codificada en la misma zona que el operón, esta proteína recibe el nombre de P100.

La imagen 2 ilustra la estructura del *OppBCDF* con la participación del gen P100.

El blanco molecular elegido para la detección de este patógeno es una secuencia dentro del gen que codifica para la proteína P100, se eligió este gen como blanco molecular debido a que es específico de la especie *M. hominis* y es altamente conservado.

Imagen 2. Estructura del operón *OppBCDF* en *M. hominis*



Recuperado de: Henrich, Hopfe, Kitzerow, y Hadding, (1999).

La proteína P100 no ha presentado mutaciones de ningún tipo, por lo que se considera una proteína altamente conservada, además es específica de *M. hominis*. Funciona en la adherencia del patógeno a la célula huésped y se demostró también su función como dominio de unión a sustrato del operón *OppBCDF* (Henrich *et al.*, 1999).

2.5.2. *Ureaplasma spp.*

Del género *Ureaplasma* solo se conocía un único miembro que se considera patógeno para el humano, este ejemplar recibía el nombre de *Ureaplasma urealyticum*.

En el año 2002 se acordó que las dos biovars pertenecientes a la especie *U. urealyticum* se dividieran en dos especies diferentes; la biovar 1 ahora recibe el nombre de *U. urealyticum*, mientras que la biovar 2 se reconoce como la especie *U. parvum* (Kong y Gilbert, 2004).

Para la diferenciación de estas dos especies, los autores compararon las secuencias de cuatro genes “core” de las 14 serovariantes existentes. Una de las regiones “core” que utilizaron fue aquella que codifica para el complejo de la ureasa. Las regiones core que se utilizaron para cambiar la taxonomía de los ureaplasmas humanos tienen regiones altamente conservadas y regiones variables específicas de especie y serovariante (Kong *et al.*, 1999; Kong y Gilbert, 2004).

El blanco molecular elegido para la detección de los ureaplasmas humanos es una región conservada dentro del gen que codifica para los diferentes componentes del complejo ureasa. La imagen 3 ilustra una parte de la secuencia del gen codificante de este complejo, la región resaltada en gris corresponde a la codificante del componente UreF y la región resaltada en morado corresponde a la que codifica para el componente UreG.

La ureasa es una metaloenzima dependiente de níquel, esta enzima es la responsable de catalizar el proceso de hidrólisis de la urea, descomponiendo este compuesto en amoníaco y dióxido de carbono (CO₂). Su participación en el metabolismo de *Ureaplasma spp.* es de vital importancia debido a que permite el uso de la urea externa y producida internamente como fuente de nitrógeno (Lu *et al.*, 2020).

Imagen 3. Secuencia parcial del gen codificante para el complejo ureasa de *Ureaplasma spp.*

```

TAAGCAAAAAATAAATGCTATTTGAGAAATTGATCAAATGATAAACTTTCAAGGTTTAGCAAGAGAGACT
CGTGAAGGCCAACGTCGAATTGGCCAACAAATGGTAAAGATATATAATGAGCTTTTTGATTGTGAACTTT
TAGTTGAATATGCCCAAAGAATAAAAGATCGAAAATCTTATGGTAATCCAGCTGTTGCGTTTGCTTTATT
AGCTATGCATTTAAAGATCGACTTAAAAACTGCTTTATATACTCATCTTTACTCTACAGTTGCTGCGCTA
ACGCAAACTGTGTACGTGCAATTCGCTAGGACAAGTTAAGGGACAAAAAATCATTATAAACTAAAAC
ATGTTTTATTTTCGATGACATTATCGATAAAGTCTTTAGTTTAGATTTTTAAAACAGATTTTTGTAAGAATAT
TCCTGGTCTTGAAATTGCACAAATGGAACATGAGGACACACCTGTTGCTTGTTTCATGTCATAATTAAG
TTTTAGTAAATCTTAATCGTAAAAATATCACTTCAATATTTTAAAAAAGCAAGAGAAAGAGGATTAATT
ATGAAAAGACCATTAATTATTGGTGTAGGTGGGCTGTTGGTGTCTGGAAAGACAATGTTAATTGAAAGAT
TAACAAGATACCTTTCAACAAAAGGGTATAGCATGGCAGCGATTACTAATGATATCTACACTAAAAGAAGA
TGCTAGAATTTTATTAAATACTTCTGTTTTACCAGCTGATCGTATTGCTGGTGTGAAACTGGGGATGT
CCACATACAGCGATTTCGTAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAATCGATGAAATGTGTGATAAACACC
CTGATTTACAATTATTATTTTTAGAACTGTTGGTGGAGATAAATTTATCAGCAACATTTAGTCCAGATTTAGT
AGATTTTTCAATTTACATCATCGACGTTGCCCAAGGGGAAAAAATTCCTCGTAAAGGCGGACAAGGAATG
ATTAAATCAGATTTATTCATCATCAATAAAGTTGATTTAGCTCCTTATGTTGGTGTCTAATGTGGAAGTAA
TGAAAGCTGATACATTTAAATCACGTGGTAATAAAGATTTCTTTGTAACAAATTTAAAAACAGATGAAGG
TCTAAATCTGTTGCTGATTGAGTTGAAAAACGTTTACAATTAGCTTTACTTGAAGAATAAGACTAACAA

```

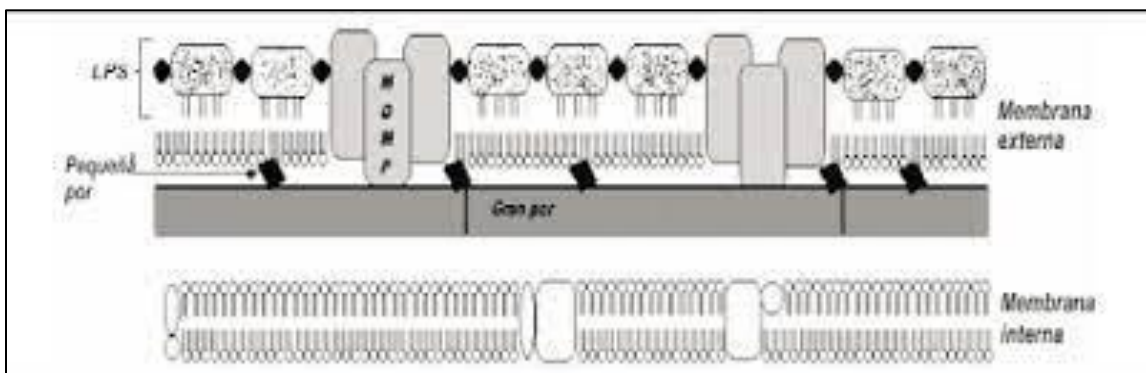
Elaboración propia a partir de: Kong, Zhenfang, Wang y Gilbert (1999).

2.5.3. *Chlamydia trachomatis*.

La membrana de *C. trachomatis* está conformada por dos membranas celulares que no contienen peptidoglucano. Esta membrana contiene proteínas ricas en cisteína que se encuentran unidas entre ellas por medio de puentes disulfuro en los CE, esto provee a esta forma de la bacteria una estructura más resistente que la de los CR. Dentro de las proteínas ricas en cisteína que contiene esta membrana chlamydial se encuentran; una proteína de 60 kDa en el espacio periplásmico que provee a la bacteria con una integridad semejante a la dada por el peptidoglucano; y, la proteína mayor de membrana externa (MOMP), esta proteína es mayormente expresada en la envoltura del CE y constituye aproximadamente el 60% de las proteínas de la membrana externa, tiene una función de porina, es glicosilada como proceso postraduccional y contiene epítopes antigénicos de superficie (Ostos y Mérida, 2003).

La imagen 4 es una representación de la estructura de la membrana chlamydial, ilustra las membranas interna y externa, así como algunas proteínas como la MOMP y los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa.

Imagen 4. Estructura de la membrana de *C. trachomatis*



Recuperado de: Ostos y Mérida (2003).

La proteína MOMP está codificada en el gen *omp1*, el cual, según Sayada *et al.* (1992), codifica para cuatro dominios variables (DV) intercalados por cinco dominios constantes (DC) de la proteína mayor de membrana externa. Las diferencias que se dan en los DV son las responsables de la creación de los serotipos, mientras que los DC se han visto implicados en la respuesta de células T.

El blanco molecular elegido para la detección de *C. trachomatis* es una secuencia que se encuentra dentro del DC IV, esto debido a que pertenece a la proteína mayormente expresada en la membrana del patógeno, además de ser una secuencia altamente conservada en los diferentes serotipos existentes de *C. trachomatis*.

La imagen 5 contiene la secuencia del gen *omp1* en la serovariante Da de *C. trachomatis*. Resaltado en color amarillo se ubican los DV y en color verde la secuencia elegida como blanco molecular.

Imagen 5. Secuencia de gen omp1 de *C. trachomatis*

```
>X62921.1 C.trachomatis (Da/TW-448) omp1 gene for major outer membrane protein
TTCCTCAGGCCATTAATTGCTACAGGACATCTTGTCTGGCTTTAACTAGGACGCAGTGCCGCCAGAAAA
GATAGCGAGCACAAAGAGAGCTAATTATACAATCTTAGAGGTAAGAATGAAAAAACTCTTGAAATCGGTA
TTAGTATTTGCCGCTTTGAGTCTGCTTCCTCCTTGCAAGCTCTGCCTGTGGGGAATCCTGCTGAACCAA
GCCTTATGATCGACGGAATCTGTGGGAAGGTTTCGGTGGAGATCCTTGCATCCTTGCACCACTTGGTG
TGACGCTATCAGCATGCGTATGGGTTACTATGGAGACTTTGTTTTCGACCGTGTGGAAACAGATGTG
AATAAAGAATTCCACATGGGTGCCAAGCCTACAACCTGATACAGGCAATAGTGCAGCTCCATCCACTCTTA
CAGCAAGAGAGAAATCCTGCTTACGGCCGACATATGCAGGATGCTGAGATGTTTACAAATGCCGCTTGCAT
GGCATTGAATATTTGGGATCGTTTTGATGTATTCTGTACATTAGGAGCCACCAGTGGATATCTTAAAGGA
AACTCTGCTTCTTTCAATTTAGTTGGATTGTTTGGAGATAAATGAAAATCAAAAAACGGTCAAAGCGGAGT
CTGTACCAAATATGAGCTTTGATCAATCTGTTGTTGAGTTGTATACAGATACTACTTTTGCCTGGAGCGT
CGGCGCTCGCGCAGCTTTGTGGGAATGTGGATGTGCAACTTTAGGAGCTTCATTCCAATATGCTCAATCT
AAACCTAAAGTAGAAGAATTAACGTTCTCTGCAATGCAGCAGAGTTTACTATTAATAAACCTAAAGGGT
ATGTAGGTAAGGAGTTTCCTCTTGATCTTACAGCAGGAACAGATGCTGCGACAGGAACTAAGGATGCCTC
TATTGATTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTTACAGACTGAATATGTTCACTCCCTACATT
GGAGTTAAATGGTCTCGAGCAAGCTTTGATGCCGATACGATTTCGTATAGCCCAGCCAAAA TCAGCTACAG
CTATCTTTGATACTACCACGCTTAACCCAACTATTGCTGGAGCTGGCGATGTGAAAACCTGGCACAGAGGG
TCAGCTCGGAGACACAATGCAAATCGTTTCCTTGCAATTGAACAAGATGAAATCTAGAAAATCTTGCGGT
ATTGCAGTAGGAACAAC TATTGTGGATGCAGACAAATACGCAGTTACAGTTGAGACTCGCTTGATCGATG
AGAGAGCAGCTCACGTAAATGCACAATTCGCTTCTAATAATTGTATAATTATATTAGGATCTTT
```

Elaboración propia a partir de: Sayada, Denamur, y Elion (1992).

Capítulo 3: Marco de referencia

3.1. Diagnóstico actual de *Mycoplasma hominis*

El diagnóstico actual de este agente, según Meseguer *et al.* (2012), está basado en el cultivo del microorganismo en medios específicos y en su detección por PCR, las pruebas serológicas no se aplican actualmente para el diagnóstico de esta bacteria.

El cultivo de *M. hominis* se debe hacer en medios especializados, como el caldo arginina y los agares diferenciales A7 y sus modificaciones A7b y A8, los cuales son útiles para diferenciar por morfología colonial a *M. hominis* y *Ureaplasma spp.* (Meseguer *et al.*, 2012). De acuerdo con los mismos autores, los caldos se deben incubar a 37 °C en aerobiosis durante 5 días, mientras que los agares preferentemente deben incubarse con 5 a 10% de CO₂ bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que los caldos.

Las principales deficiencias en el diagnóstico actual específico de este patógeno, según Rodríguez *et al.* (2012), son sus complicados requerimientos nutricionales y su marcada sensibilidad a cambios en sus condiciones de crecimiento como pH, temperatura, presión osmótica y presencia de agentes tensoactivos.

A pesar de que el método de referencia para el diagnóstico de *M. hominis* sigue siendo el cultivo del microorganismo, ya se han desarrollado pruebas de PCR como la propuesta por Rodríguez *et al.* (2007) para identificar especies de micoplasmas y ureaplasmas en una PCR múltiple.

3.2. Diagnóstico actual de *Ureaplasma spp.*

El diagnóstico de las especies de *Ureaplasma* se hace actualmente por métodos convencionales como lo son los cultivos bacteriológicos y pruebas bioquímicas (Fernández *et al.*, 2007).

De acuerdo con Acosta *et al.* (2011) los caldos 10B de Shepard y urea- arginina pueden ser utilizados en el diagnóstico de *Ureaplasma spp.* y *M. hominis*, también existen medios comerciales; como el Mycotrim Triphasic®, que incluye un medio bifásico con agar diferencial A8 y caldo urea-arginina en un frasco de cultivo celular; o el sistema Micoplasma IST bioMérieux® que tiene la ventaja de ser cuantitativo.

En cuanto a las condiciones de incubación específicas para *Ureaplasma spp.*, de acuerdo con Acosta, *et al.* (2011), “los caldos se incuban a 37°C en atmósfera aerobia. Las placas de agar deben incubarse en atmósfera suplementada con 5-10% de CO₂ (utilizando sistema generador), ya que *Ureaplasma spp.* requiere CO₂ para su crecimiento” (p. 503).

Para este patógeno también se han desarrollado pruebas PCR, sobre todo en pruebas múltiples en conjunto con especies de micoplasmas.

3.3. Diagnóstico actual de *Chlamydia trachomatis*

El diagnóstico de este agente es, definitivamente, el más complejo de los tres patógenos a los que va dirigido este proyecto.

Según Van Der Pol y Unemo (2014), algunas de las técnicas de diagnóstico más utilizadas para este agente son la serología, inmunofluorescencia directa (IFD), enzimoimmunoanálisis de absorción en fase sólida (ELISA) y el cultivo celular. Según los mismos autores, las principales deficiencias de las técnicas como la serología, la IFD y el ELISA son la baja sensibilidad y especificidad, por ello, el cultivo celular se consideró como la prueba estándar para el diagnóstico de *C. trachomatis* durante mucho tiempo, sin embargo, este también presenta grandes desventajas como las que mencionan los mismos autores en 2014, “la necesidad de que la bacteria se mantenga viva exige condiciones estrictas de transporte y conservación que limitan la utilización de esta prueba a los consultorios que colaboran con laboratorios más avanzados técnicamente” (p. 58).

Para los cultivos celulares, Alonso *et al.* (2012) mencionan que las líneas más recomendadas para el diagnóstico de *C. trachomatis* son las HeLa 229 y McCoy, también hacen mención del uso de la técnica de hibridación de ácidos nucleicos, cuya sensibilidad y especificidad son comparables con las de técnicas de diagnóstico por PCR actuales, sin embargo, tiene la desventaja de ser una técnica que requiere adaptarse dependiendo de la naturaleza de la muestra, sean muestras cervicales o de orina.

Actualmente las técnicas por PCR están desplazando al cultivo celular como método de referencia, esto debido a la sensibilidad y especificidad que ofrecen, además de ser más prácticas en comparación con los cultivos celulares.

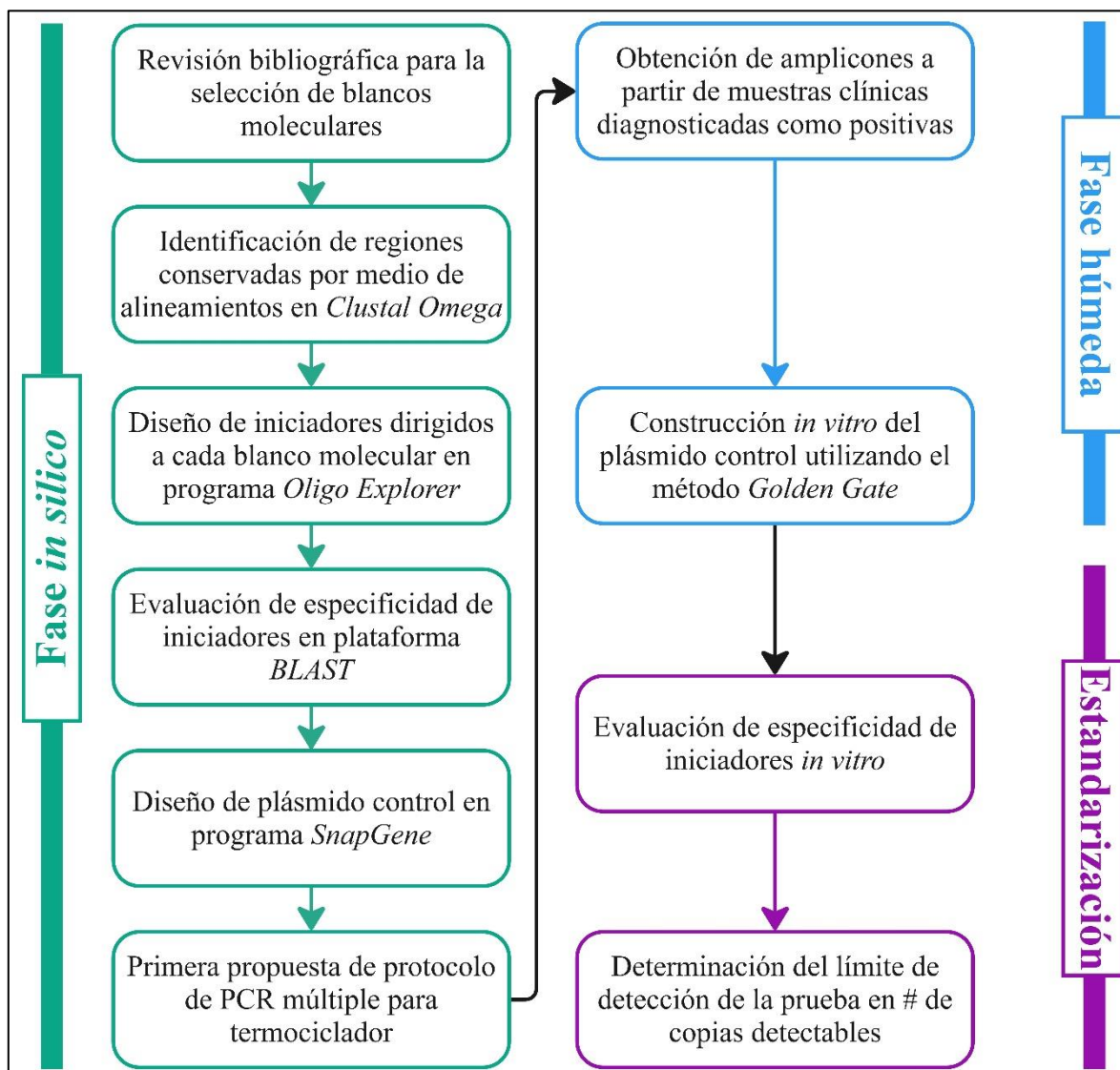
Capítulo 4: Diseño de la investigación

Este proyecto de investigación comprendió dos fases, una fase *in silico* y una fase húmeda:

- a. Tipo de estudio: Fase *in silico*, bioinformático; fase húmeda, experimental.
- b. Universo de estudio: Fase *in silico*, secuencias de blancos moleculares elegidos obtenidas de la base de datos del NCBI; fase húmeda, especímenes utilizados para la obtención de las secuencias blancos.
- c. Tamaño de la muestra: Fase *in silico*, 48 secuencias genéticas para gen OMP1, 14 secuencias para el gen de la ureasa y una única secuencia para el gen P100 y para el gen constitutivo SDHA; fase húmeda, una única muestra por blanco molecular de exudado endocervical que cumpla con los criterios de selección, dando un total de 4 muestras.
- d. Sede y lugar de estudio: Laboratorio de Infectología Molecular (LIM) ubicado en el edificio FCQ1 perteneciente al Depto. de Microbiología-FCQ, BUAP ubicado en Ciudad Universitaria, Puebla, Pue., México.
- e. Criterios de selección: Fase *in silico*, se incluyeron secuencias obtenidas de la base de datos del NCBI de los blancos moleculares para cada patógeno, se excluyeron todas las secuencias parciales y aquellas que no provenían del patógeno sino de plásmidos clonados o semejantes; fase húmeda, se incluyeron muestras de exudado endocervical previamente diagnosticadas como positivas para cada uno de los patógenos, recolectadas con citobrush, y transportadas en refrigeración, se excluyeron las muestras que no amplificaron para el control de técnica, muestras guardadas por más de 5 días sin refrigeración o algún otro método de conservación y muestras tomadas con hisopos de algodón o conservadas en medios que contengan rojo fenol.
- f. Recursos humanos: Titular de proyecto, e.Q.F.B. Martínez Hernández Ana Gabriela; directora de proyecto: D.C. Pazos Salazar Nidia Gary.
- g. Recursos financieros: Financiamiento propio del LIM y aquellos provistos mediante proyectos institucionales, proyecto VIEP 152.

4.1. Materiales y metodología

4.1.1. Esquema general de trabajo.



4.1.2. Descripción del esquema general de trabajo.

El esquema anterior ilustra las tres fases en las que se dividió el presente proyecto, a continuación, se describe la metodología de cada una de estas.

4.1.2.1. Fase in silico.

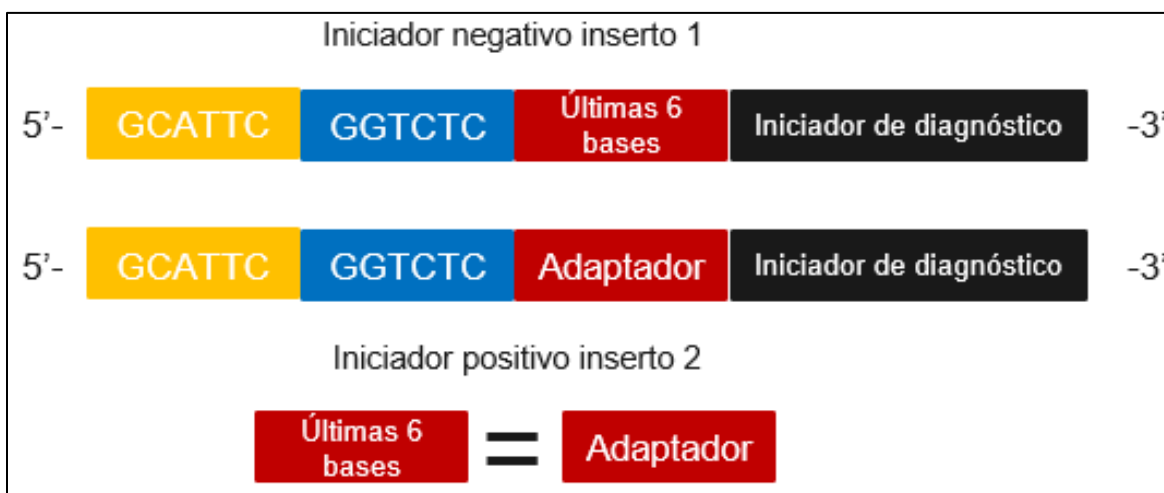
1. Revisión bibliográfica para la selección de blancos moleculares: Los blancos moleculares deben ser secuencias altamente conservadas para garantizar que la prueba detecte a todas o la mayoría de las variantes de cada uno de los patógenos,

además se buscó un gen constitutivo que esté presente en las muestras clínicas y sirva como control positivo de técnica.

2. Identificación de regiones conservadas por medio de alineamientos en *Clustal Omega*: Una vez definidos los blancos moleculares, se descargaron secuencias de la base de datos del NCBI tomando en cuenta los criterios de selección previamente mencionados y se realizaron alineamientos para cada patógeno con la herramienta *Clustal Omega*, esto con el objetivo de encontrar regiones conservadas de cada blanco molecular.
3. Diseño de iniciadores para identificar cada blanco molecular en *Oligo Explorer*: Sobre las regiones conservadas encontradas en el punto anterior, se realizó el diseño de iniciadores específicos para cada uno de los patógenos a los que va dirigida la PCR, así como un par de iniciadores específicos para el gen constitutivo, en este paso se cuidó que las características fisicoquímicas de los cuatro pares de iniciadores sean aptas para su uso en una PCR múltiple. Los iniciadores diseñados para este fin se denominaron como “iniciadores de diagnóstico”.
4. Evaluación de especificidad de iniciadores en plataforma BLAST: Se analizó la especificidad con ayuda de la herramienta *BLAST* del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). En todos los análisis se evaluó el porcentaje de identidad hacia los patógenos a los que van dirigidos los iniciadores, cumpliendo que este sea del 100%, en el caso de los iniciadores con bases degeneradas este baja dependiendo de la base que tenga en esa posición la secuencia. Otro factor que se evaluó fue el “E value”, el cual se cuidó que fuera lo más cercano a 0 posible. Después de verificar que estos factores sean aceptables se procedió a ver si los iniciadores hibridaban con alguna otra especie que pudiese causar un falso positivo, de ser así, se evaluó el alineamiento tomando en cuenta el “E value” y el número total de bases que hibridaban, así como si estas eran o no cercanas al extremo 3’, también se evaluó si tanto el iniciador positivo como el negativo hibridaban o no en la misma secuencia. De esta modo aseguramos de manera *in silico* que no haya posibles falsos positivos.
5. Diseño de plásmido control en programa *Snap Gene*: La construcción del plásmido control se hizo por medio del llamado *Golden Gate Cloning Method*, tomando como referencia la guía publicada por Bird y colaboradores en 2022. Este método se basa

en el uso de enzimas de restricción de tipo IIS para crear extremos cohesivos en las secuencias blanco de manera que cada unión es única, eliminando la posibilidad de ligar dos o más moléculas con la misma secuencia. La imagen 6 muestra, a manera de esquema, la base teórica de este método, para aplicarlo en este trabajo, también se diseñaron iniciadores con los adaptadores necesarios para llevarlo a cabo, a estos iniciadores se les nombró como “iniciadores de diseño”.

Imagen 6. Base teórica del *Golden Gate Cloning Method*



Las letras resaltadas en amarillo representan 6 bases nucleotídicas aleatorias que sirven para posicionamiento de la enzima. Las letras resaltadas en azul representan el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción de tipo IIS, BsaI.

6. Primera propuesta de protocolo de PCR múltiple para termociclador: Este paso comprendió definir las temperaturas y tiempos de cada paso del ciclo de amplificación y las especificaciones de la EGA, como porcentaje de agarosa y tiempo de corrimiento.

4.1.2.2. Fase húmeda.

1. Obtención de amplicones a partir de muestras clínicas diagnosticadas como positivas:
A partir de las muestras que cumplieron los criterios de selección se hizo una PCR con los iniciadores correspondientes a cada patógeno y la *Mezcla maestra para PCR DreamTaq (2X) Cat. No. K1071* de la casa comercial *Thermo Fisher Scientific*. En el caso de las muestras de *M. hominis* y *Ureaplasma spp.* se realizó previamente una extracción de ADN total con el kit *DNeasy Blood & Tissue Kit Cat. No. 69504* de la casa comercial *QIAGEN*.

2. Construcción *in vitro* del plásmido control utilizando el método *Golden Gate*: Una vez obtenidos los amplicones de cada una de las cuatro secuencias diana del proyecto, se repitieron las PCR con las mismas muestras, pero ahora con una polimerasa de alta fidelidad, la cual fue la *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Cat. No. F-530XL* de la casa comercial *Thermo Fisher Scientific*. Estas PCR se corrieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) para poder ser cortados los amplicones y posteriormente fundidos y clonados en el plásmido descrito anteriormente, esto se realizó mediante el *Kit de clonación de productos duplicados mediante PCR CloneJET Cat. No. K1231* de la misma casa comercial. Como resultado de estas clonaciones se obtuvieron los plásmidos; pJET1.2-SDHA, el cual contiene la secuencia del CPT; el pJET1.2-OMP1, que contiene la secuencia perteneciente a *C. trachomatis*; el pJET1.2-P100, el cual contiene la secuencia perteneciente a *M. hominis*; y el pJET1.2-Urea, el cual contiene la secuencia perteneciente a *Ureaplasma spp.* Todos los plásmidos se resguardaron mediante transformación bacteriana por choque térmico de *Escherichia coli* TOP10. Las colonias transformadas se caracterizaron por PCR con los iniciadores específicos para cada patógeno y los iniciadores que flanquean el sitio de clonación múltiple del plásmido de resguardo. Partiendo de los plásmidos individuales se amplificaron las secuencias diana de cada patógeno, los amplicones se extrajeron de un gel de ABPF para posteriormente someterse al protocolo de restricción/ligación del *Golden Gate Cloning Method*, con las enzimas ligasa T4 y la enzima de restricción de tipo IIs, BsaI. El inserto con los 4 blancos unidos se obtuvo por PCR con los iniciadores S CPT y AS Urea tomando como muestra la reacción de restricción/ligación y posteriormente se clonó en pJET1.2/blunt y se resguardó en *E. coli* TOP10, a este plásmido con las cuatro secuencias diana resguardadas, se le nombró “pJET1.2-SOPU”, por las iniciales de cada blanco molecular.

4.1.2.3. Estandarización.

Una vez clonado el plásmido control, caracterizado y resguardado, se procedió a realizar la estandarización de la PCR, esto incluye los controles negativos cruzados entre los patógenos que considera la prueba y la obtención del límite de detección para cada uno de los blancos moleculares.

1. Evaluación de especificidad de iniciadores *in vitro*: Los controles negativos y positivos de la especificidad cruzada de la prueba se realizaron a la par de la obtención de secuencias diana con las muestras clínicas. La imagen 7 muestra los controles cruzados necesarios y el resultado esperado de cada uno de estos.

Imagen 7. Controles de especificidad cruzada

Iniciadores	Muestra positiva a:	Resultado esperado
SDHA (CPT)	DNA células HeLa	Positivo
	<i>C. trachomatis</i>	Positivo
	<i>M. hominis</i>	Positivo
	<i>Ureaplasma spp.</i>	Positivo
OMP1 (<i>C. trachomatis</i>)	DNA células HeLa	Negativo
	<i>C. trachomatis</i>	Positivo
	<i>M. hominis</i>	Negativo
	<i>Ureaplasma spp.</i>	Negativo
P100 (<i>M. hominis</i>)	DNA células HeLa	Negativo
	<i>C. trachomatis</i>	Negativo
	<i>M. hominis</i>	Positivo
	<i>Ureaplasma spp.</i>	Negativo
Gen de la ureasa (<i>Ureaplasma spp.</i>)	DNA células HeLa	Negativo
	<i>C. trachomatis</i>	Negativo
	<i>M. hominis</i>	Negativo
	<i>Ureaplasma spp.</i>	Positivo

2. Determinación del límite de detección de la prueba en número de copias detectables: Se purificaron los cuatro amplicones por separado y se determinó su concentración por Nano Drop, posteriormente se preparó una solución de trabajo de 10 ng/μL de cada uno de los amplicones purificados y a partir de esta, se hicieron diluciones desde 10⁻¹ hasta 10⁻¹⁰ y se le realizó PCR a cada una. A la última dilución donde el amplicón fue detectable en la EGA se le calculó el número de copias contenidas con la calculadora en línea del *Integrated DNA Technologies, Inc.* (IDT), esta ocupa la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{X \text{ ng} * 6.0221 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{(N * 660 \text{ g/mol}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Donde la “X” es la cantidad de amplicón purificado contenido en la dilución y la “N” es la longitud del fragmento purificado en pares de bases.

Capítulo 5: Resultados y discusión

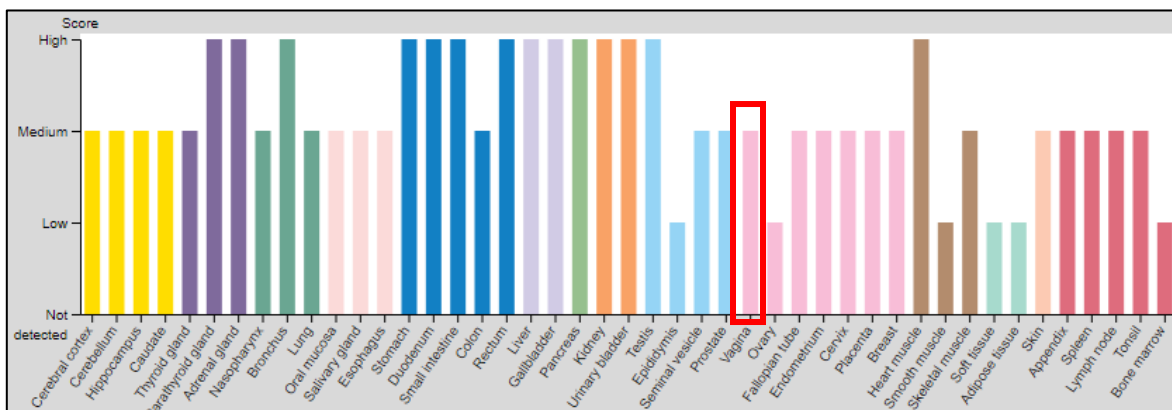
5.1. Fase in silico

Inicialmente se identificaron los blancos moleculares; gen SDHA, gen OMP1, gen P100 y gen de la ureasa para; el control positivo de técnica, los patógenos *C. trachomatis*, *M. hominis* y *Ureaplasma spp.*, respectivamente. Se evaluaron estos blancos moleculares para el posterior diseño de iniciadores.

5.1.1. Control positivo de técnica (CPT).

Para la prueba diagnóstica es necesario tener un control positivo que valide que la ejecución de la técnica se llevó a cabo de manera correcta, para ello se debe elegir un gen constitutivo que esté presente en todas las muestras que se evalúen. En este caso se eligió el gen SDHA, el cual codifica para la flavoproteína A del complejo succinato deshidrogenasa, debido a su alta expresión en los tejidos cuyas células estarán presentes en las muestras clínicas, debido a que es un gen constitutivo, no es necesario ningún tipo de alineamiento.

Imagen 8. Expresión del gen SDHA en diferentes órganos



Recuperado de: The Human Protein Atlas (2023)

5.1.2. Alineamientos de secuencias.

Dado que el diagnóstico de los patógenos *C. trachomatis* y *Ureaplasma spp.* incluye varias serovariantes, fue necesario realizar un alineamiento con la herramienta *Clustal Omega* para los blancos moleculares gen OMP1 y gen de la ureasa respectivamente, con esto se logró identificar las regiones más conservadas de cada blanco molecular para que los iniciadores diseñados para su detección incluyan todos los serotipos. No así en el caso de *M. hominis*,

dado que en la base de datos del NCBI existe una única secuencia correspondiente al gen P100.

En el anexo 1 se muestran los alineamientos hechos para los posibles blancos moleculares OMP1 y gen de la ureasa con los números de acceso correspondientes a las serovariantes de cada patógeno.

Para el análisis de *Chlamydia trachomatis* se alinearon 48 secuencias de OMP1 que incluyeron 3 secuencias por cada serovariante mencionada en el marco teórico excepto de las serovariantes A, Ba, y L₃, ya que, en la base de datos del NCBI, solo existen dos secuencias que cumplen con los criterios de inclusión mencionados en el capítulo 4, para amplificar todas las serovariantes fue necesario colocar 1 base degenerada en el iniciador sentido.

En el caso de *Ureaplasma spp.*, se alinearon 14 secuencias como resultado de tomar una secuencia por cada serovariante de las especies *Ureaplasma urealyticum* y *Ureaplasma parvum*, esto resultó en un par de iniciadores con 2 bases degeneradas cada uno.

5.1.3. Diseño de iniciadores.

Las características fisicoquímicas de los iniciadores diseñados para el diagnóstico de cada patógeno se muestran en la tabla 2 y en lo sucesivo se llamarán “iniciadores de diagnóstico”. En su diseño se cuidó que la diferencia entre las temperaturas de alineamiento no fuera mayor a 3 °C y que la formación de estructuras secundarias como los autoplegamientos fuera nula o, en caso de haber alguna, que la diferencia entre la ΔG de la estructura secundaria y la ΔG del alineamiento del iniciador al blanco fuera igual o mayor a 25 kcal/mol; de esta manera son aceptables para su uso en el mismo protocolo de amplificación por PCR. Por último, los tamaños de los amplicones producidos por cada par de iniciadores se mantuvieron por debajo de las 120 pb para el posterior ajuste de esta PCR a tiempo real.

Tabla 2. Blancos moleculares para cada patógeno y características fisicoquímicas de los iniciadores.

Patógeno	Blanco molecular	Iniciador	Longitud (pb)	Tm (° C)	CG%	ΔG (kcal/mol)	Tamaño de amplicón (pb)
CPT (control positivo de técnica)	Gen SDHA	S	18	53.9	55.6%	-31.6	108
		AS	18	54.1	50.0%	-32.4	
<i>C. trachomatis</i>	Gen OMP1	S	20	52.7	37.5%	-34.2	99
		AS	20	53.4	35.0%	-34.1	
<i>M. hominis</i>	Gen P100	S	18	53.5	55.6%	-31.4	113
		AS	18	54.8	50.0%	-32.5	
<i>Ureaplasma spp.</i>	Gen de la ureasa	S	18	53.7	44.4%	-32.9	110
		AS	18	55.5	47.2%	-32.8	

En los anexos del 2 al 5 se muestran las características fisicoquímicas de cada iniciador ampliamente descritas incluyendo la formación de estructuras secundarias.

Se evaluaron también las posibles estructuras secundarias entre los cuatro pares de iniciadores, tomando en cuenta las diferentes combinaciones causadas por las bases degeneradas. El análisis realizado con *Oligo Analyzer* que se presenta en el anexo 6, mostró la factibilidad de que los 8 iniciadores trabajen en una PCR múltiple puesto que la diferencia entre la ΔG de la estructura secundaria y la ΔG del alineamiento del iniciador al blanco fue ≥ 25 kcal/mol.

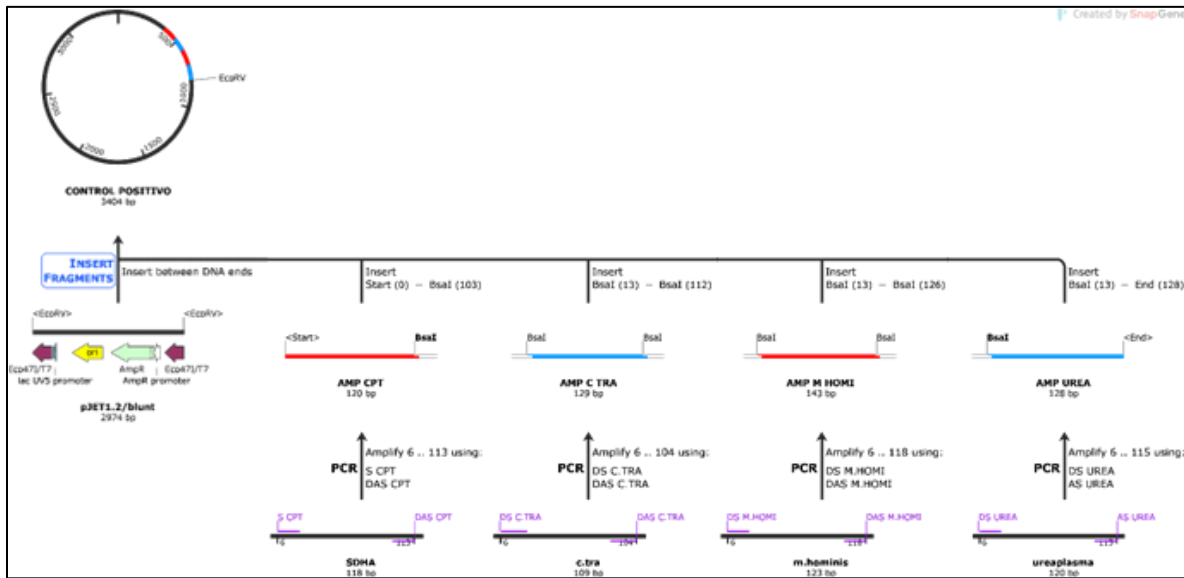
5.1.4. Análisis in silico de especificidad.

Cada uno de los iniciadores se analizó en la herramienta *BLAST* para el escrutinio de su especificidad y la posibilidad de falsos positivos en la prueba, los resultados confirmaron la especificidad de cada uno de los pares de iniciadores diseñados hacia los blancos moleculares (Anexo 7).

5.2. Diseño in silico de plásmido control positivo

La enzima elegida para el diseño del plásmido por el *Golden Gate Cloning Method* fue *BsaI*, la imagen 9 muestra de manera resumida el proceso del diseño *in silico* del plásmido control positivo.

Imagen 9. Esquema de diseño de plásmido control positivo



En la imagen 9 se muestra que los productos de PCR ya cuentan con los sitios de reconocimiento y corte de la enzima BsaI, para ello fue necesario diseñar los adaptadores para cada iniciador, en la tabla 3 se muestran los iniciadores ya con los adaptadores, a los cuales llamamos “iniciadores de diseño” que para diferenciarlos de los de diagnóstico se escriben con una letra D antes de S o AS, según sea iniciador sentido o antisentido. Las letras en color amarillo representan 6 bases aleatorias que no hibridan con la secuencia diana que servirán para el posicionamiento de la enzima, las letras resaltadas en morado corresponden al sitio de reconocimiento de la enzima BsaI y las letras resaltadas en azul corresponden a las últimas 6 bases del amplicón que se ligará en la posición anterior.

Tabla 3. Secuencias de iniciadores de diseño

Patógeno	Secuencia	Longitud (pb)	Longitud de amplicón (pb)
CPT	S: Iniciador de diagnóstico		120
	DAS: 5' - GCAGCAGGTCTC secuencia de iniciador de diagnóstico - 3'	30	
<i>C. trachomatis</i>	DS: 5' - GCAGCAGGTCTCTTCTGC secuencia de iniciador de diagnóstico -3'	38	129
	DAS: 5' - GCAGCAGGTCTC secuencia de iniciador de diagnóstico - 3'	32	
<i>M. hominis</i>	DS: 5' - GCAGCAGGTCTCTGGTCT secuencia de iniciador de diagnóstico - 3'	36	143
	DAS: 5' - GCAGCAGGTCTC secuencia de iniciador de diagnóstico - 3'	30	

<i>Ureaplasma spp.</i>	DS: 5' - GCAGCAGGTCTCCAACAG secuencia de iniciador de diagnóstico - 3'	36	128
	AS: Iniciador de diagnóstico		

En las imágenes de la 10 a la 12 se ilustran las restricciones y posteriores ligaciones de los amplicones producidos con los iniciadores de diseño; las bases escritas en letra azul corresponden a las 6 últimas bases de cada amplicón, las bases escritas en letra morada representan el sitio de reconocimiento de la enzima BsaI y las letras subrayadas en amarillo representan los fragmentos que se pierden tras el corte de la enzima de restricción.

Imagen 10. Representación de la restricción y ligación de fragmentos 1 y 2

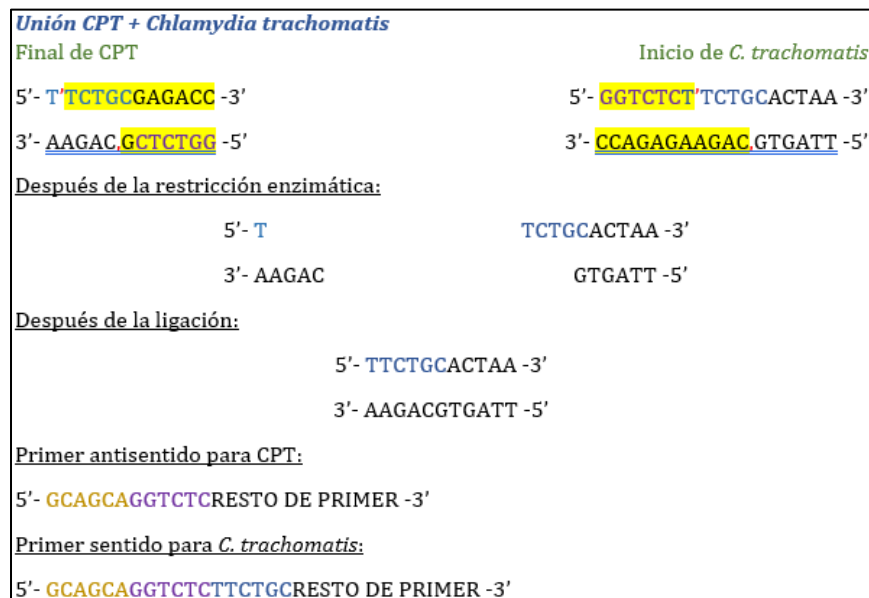


Imagen 11. Representación de la restricción y ligación de fragmentos 2 y 3

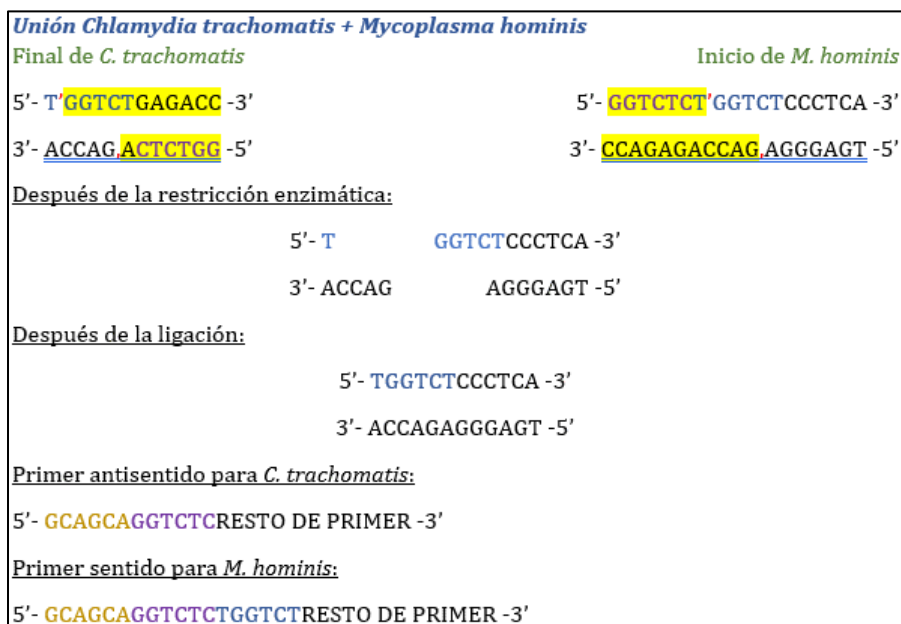
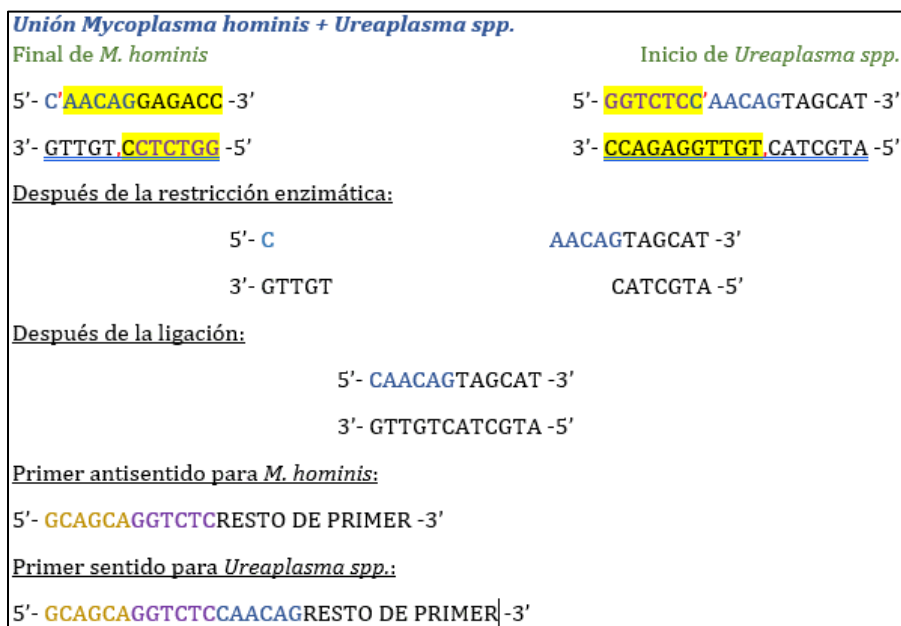


Imagen 12. Representación de la restricción y ligación de fragmentos 3 y 4



Como se puede observar en las imágenes de la 10 a la 12, los extremos cohesivos resultantes de las restricciones con BsaI son específicos de cada unión, ya que dependen de los adaptadores que se colocaron en los iniciadores de diseño, esto permite que la unión de las secuencias se pueda llevar a cabo con una única enzima de restricción, además de que impide que se unan dos o más moléculas de la misma secuencia, facilitando en la parte experimental,

la caracterización de colonias transformadas. De igual manera se muestra en las mismas imágenes que después de las restricciones se pierden los sitios de reconocimiento de la enzima, por lo que la secuencia final resultante no es sensible a la restricción por BsaI.

Una vez unidas las secuencias diana, estas se insertaron en el plásmido de resguardo pJET1.2/blunt cuya descripción se muestra en la imagen 13. En el apartado 5.2 se describe la estrategia experimental para obtener el amplicón con las cuatro secuencias juntas.

De esta manera, se cumple el segundo objetivo específico mencionado en capítulos anteriores, la imagen 14 muestra el mapa final del plásmido con un total de 3404 pares de bases que servirá como control positivo de la prueba.

Imagen 13. Mapa del plásmido pJET1.2/blunt

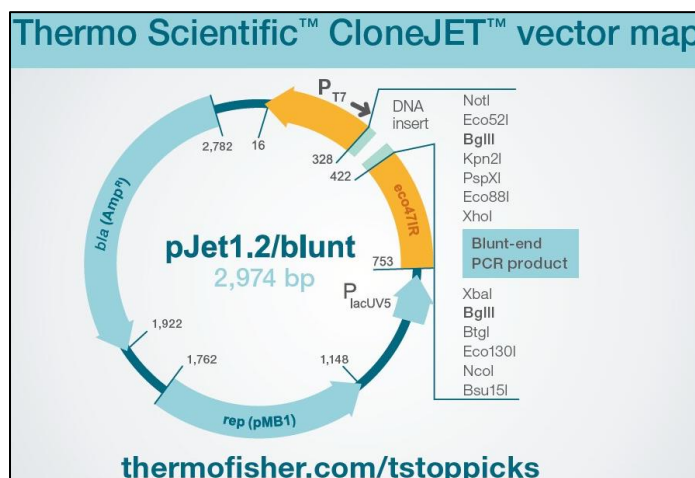
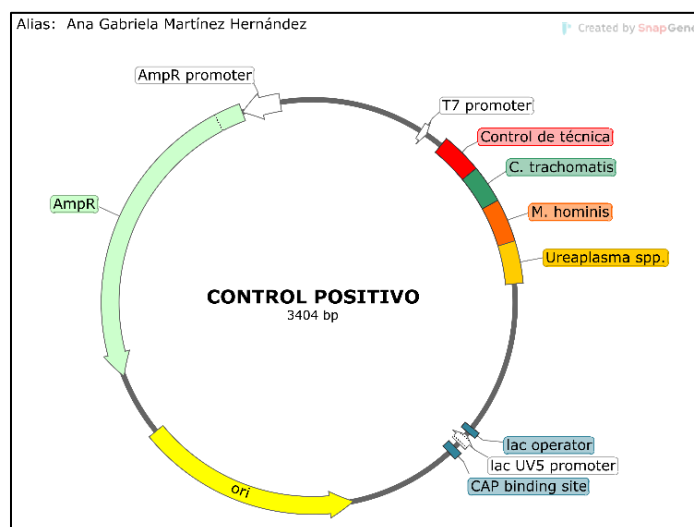


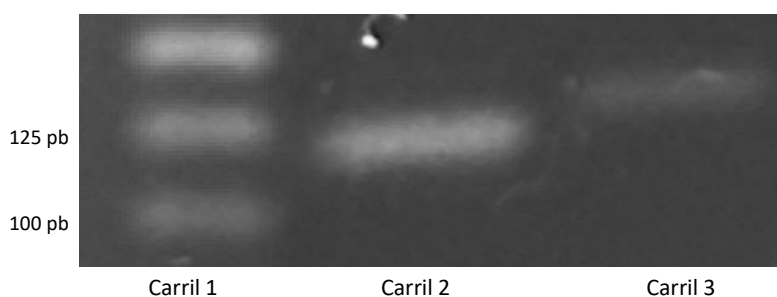
Imagen 14. Mapa del vector pJET1.2-SOPU



5.3. Obtención de secuencias diana

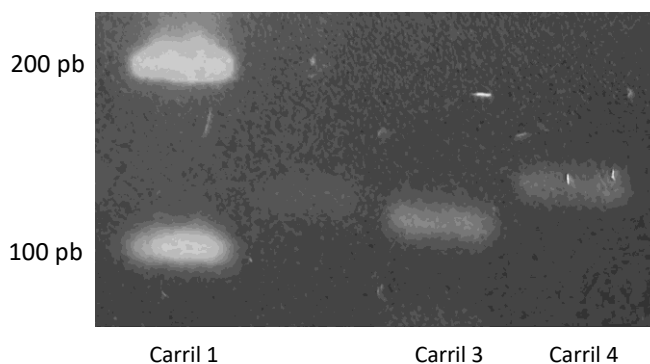
Los amplicones para cada patógeno se obtuvieron por PCR empleando los iniciadores de diseño, en las imágenes 15 a la 17 se muestran las amplificaciones de *Ureaplasma*, *M. hominis* y *C. trachomatis* respectivamente, en todos los casos se usaron muestras positivas y en cada una se amplificó la secuencia de SDHA como CPT, que también se amplificó de ADN de células HeLa como muestra ajena a los patógenos.

Imagen 15. Obtención de amplicón de *Ureaplasma*



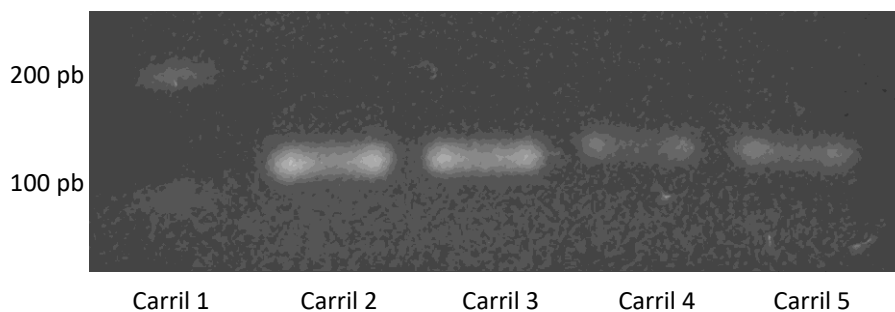
PCR de muestra positiva a *Ureaplasma spp.* con iniciadores de diseño. Carriles: 1; MP 25 pb, 2; blanco ureasa (128 pb), 3; blanco *sdha* (120 pb). EGA al 2%.

Imagen 16. Obtención de amplicón de *M. hominis*



PCR de muestra positiva a *M. hominis* con iniciadores de diseño. Carriles: 1; MP 100 pb, 3; blanco *sdha* (120 pb), 4; blanco *p100* (143 pb). EGA al 2%.

Imagen 17. Obtención de amplicones de CPT y *C. trachomatis*



PCR de ADN de células HeLa y muestra positiva a *C. trachomatis* con iniciadores de diseño. Carriles: 1; MP 100 pb, 2 y 3; blanco *sdha* (120 pb), 4 y 5; blanco *omp1* (129 pb). EGA al 2%.

La elección de estos blancos moleculares como posibles biomarcadores para la PCR múltiple representan varias ventajas en comparación a pruebas de PCR ya reportadas para los mismos patógenos, por ejemplo; los kits de diagnóstico por PCR para la detección de *C. trachomatis* están, en su mayoría, dirigidos a la detección del plásmido críptico, el cual, si bien, de acuerdo con López *et al.* (2018), está presente en un alto número de copias (10 copias/genoma aprox.), se ha reportado por los mismos autores que el 1% de las cepas carecen de este plásmido, aunado a que también se han reportado cepas que presentan deleciones en el plásmido, afectando así el diagnóstico por PCR, mientras que la secuencia codificante de la proteína MOMP es continuamente expresada durante todo el ciclo de vida del patógeno, por lo que está siempre biodisponible para ser detectada, aunado a que los dominios constantes de dicha secuencia son altamente conservados y no se han reportado mutaciones en estos; en el caso del diagnóstico de *M. hominis*, las pruebas PCR, como la desarrollada por Rodríguez *et al.* (2007), que se han reportado ocupan como blanco molecular diferentes secuencias pertenecientes al ARN ribosomal 16S, el cual es altamente conservado en los micoplasmas, sin embargo no tiene un número de copias alto y su similitud entre diferentes especies del género *Mycoplasma* es alta, por su lado, el gen P100 es exclusivo de la especie *M. hominis*, además, debido a que la proteína codificada en este gen participa en la adherencia del patógeno al tejido, está presente desde etapas tempranas de la infección, aunado a que es una secuencia altamente conservada; en el diagnóstico por PCR del género *Ureaplasma*, como la reportada nuevamente por Rodríguez y colaboradores en el 2007, se ocupan diferentes blancos moleculares como el ARN ribosomal 16S y fragmentos adyacentes al gen de la ureasa, estas son secuencias específicas de especie, es decir, que diferencian entre la especie

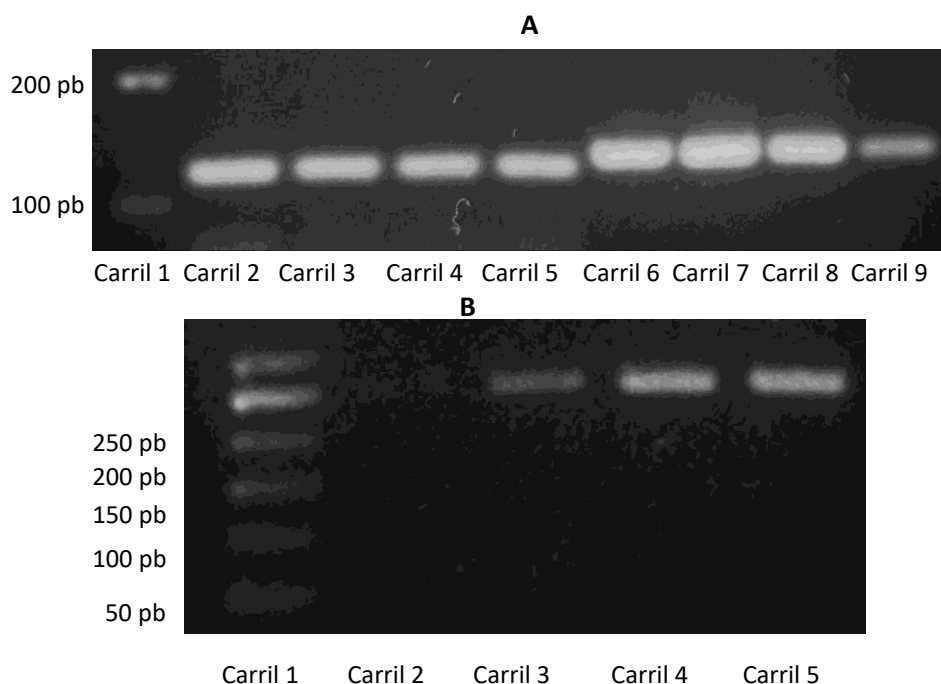
U. parvum y *U. urealyticum*, para objetivos de esta prueba diagnóstica, no es necesario diferenciar entre especies, debido a que clínicamente tienen las mismas complicaciones y se tratan con el mismo medicamento, razones por las cuales se eligió un blanco molecular común altamente conservado y expresado, el gen de la ureasa.

Para la obtención de las secuencias diana se utilizaron los iniciadores de diseño, esto debido a que los amplicones producidos con estos iniciadores fueron posteriormente utilizados para la construcción del plásmido control.

5.4. Construcción *in vitro* del plásmido control positivo y su caracterización

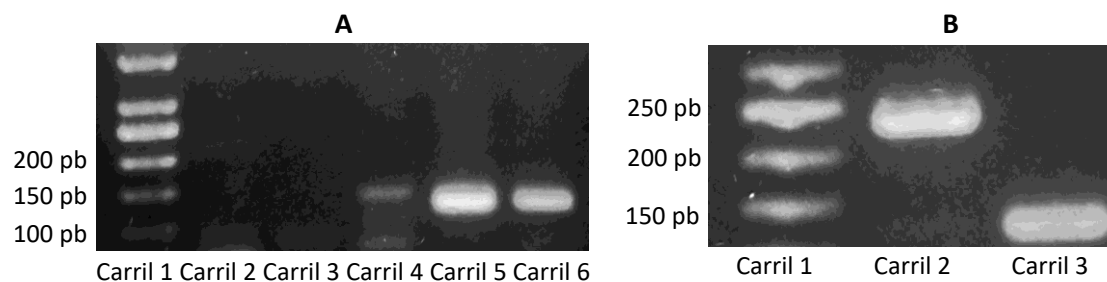
Las imágenes 17 a la 19 muestran la caracterización por PCR de las colonias transformadas con los plásmidos pJET1.2-SDHA, pJET1.2-OMP1, pJET1.2-P100 y pJET1.2-Urea.

Imagen 18. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-SDHA y pJET1.2-OMP1



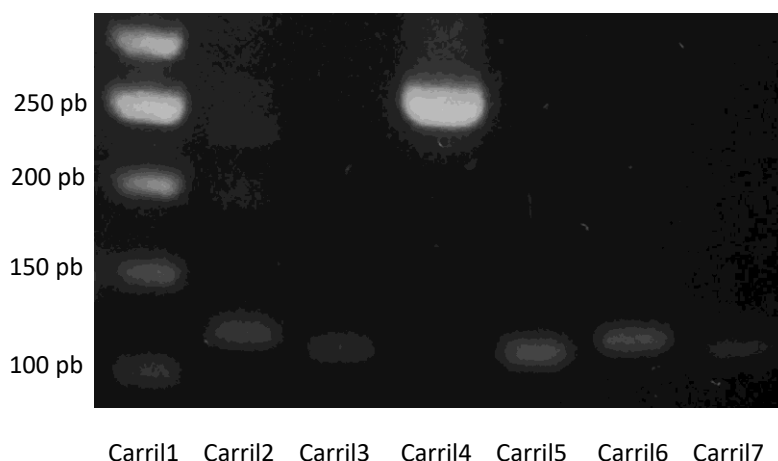
PCR de colonias candidato con iniciadores de diseño para cada blanco y del plásmido pJET1.2/blunt.
A. Amplificaciones con iniciadores de diseño. Carriles: 1; MP 100 pb, 2-5; candidatos 1-4 transformadas con pJET1.2-SDHA (120 pb), 6-9; candidatos 1-4 transformadas con pJET1.2-OMP1 (129 pb). EGA al 2%.
B. Amplificaciones con iniciadores del plásmido pJET1.2/blunt. Carriles: 1; MP 50 pb, 2 y 3; candidatos de carriles 2 y 3 de imagen A (240 pb), 4 y 5; candidatos de carriles 6 y 7 de imagen A (249 pb). EGA al 2%.

Imagen 19. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-Urea



PCR de colonias candidato. **A.** *Iniciadores para ureasa.* Carriles: 1; MP 50 pb, 4-6; candidatos 1-3 (128 pb). EGA al 2%. **B.** *Iniciadores de plásmido pJET1.2/blunt.* Carriles: 1; MP 50 pb, 2; candidato de carril 6 de imagen A (248 pb), 3; candidato de carril 5 de imagen A (248 pb). EGA al 2%.

Imagen 20. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-P100

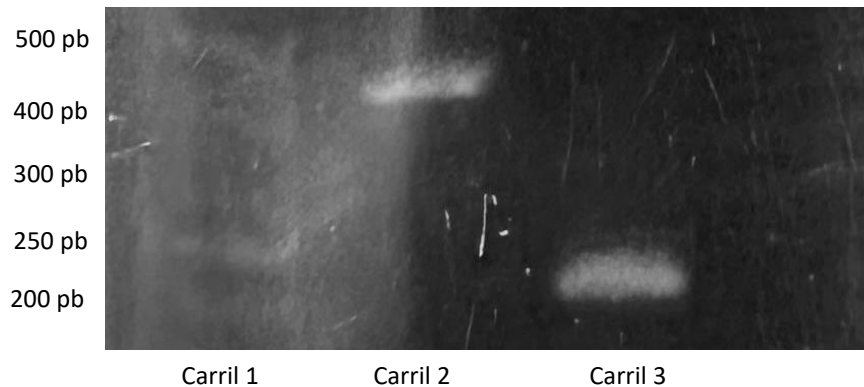


PCR de colonias candidato. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; candidato 1 con iniciadores de pJET1.2/blunt (263 pb), 3; candidato 1 con iniciadores de P100 (113 pb), 4; candidato 2 con iniciadores de pJET1.2/blunt, 5; candidato 2 con iniciadores de P100, 6; candidato 3 con iniciadores del pJET1.2/blunt, 7; candidato 3 con iniciadores de P100. EGA al 2%.

Todas las colonias que fueron exitosamente caracterizadas fueron congeladas en medio con glicerol para su posterior uso en la construcción del plásmido control. Tener las secuencias resguardadas en plásmidos por separado permitió trabajar las muestras en diferentes tiempos y poder replicar las PCR cuando fuera necesario, tomando estos plásmidos como muestras.

La imagen 21 muestra la EGA en ABPF de la PCR que tiene como muestra la reacción de restricción/ligación que se describe en la metodología, esta se realizó utilizando los iniciadores S CPT y AS Urea.

Imagen 21. Obtención de amplicón control generado por método *Golden Gate*

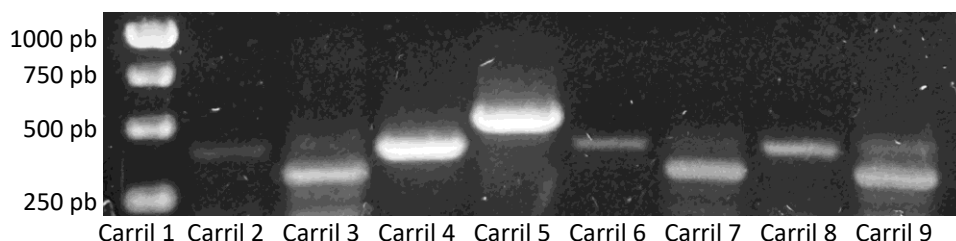


Evidencia de la unión de múltiples fragmentos a partir de reacción restricción/ligación (*BsaI* y ligasa T4).
Carriles: 1; MP 50 pb, 2; PCR con iniciadores S CPT y AS Urea demostrando la unión *sdha-omp1-p100-ureasa* (430 pb), 3; PCR con iniciadores S CPT y AS *C. trachomatis* para evaluación de orden de unión en el amplicón del carril 2 (207 pb). EGA en ABPF al 1%.

En el protocolo de restricción/ligación, la enzima deja extremos cohesivos compatibles únicamente como se explicó en el diseño *in silico* del plásmido control y en el mismo protocolo se ligan en un orden específico, por lo que la PCR con los iniciadores S CPT y AS Urea, si el diseño se llevó a cabo exitosamente, debe dar como resultado un único amplicón de 430 pb, como se puede observar en la imagen 21, este diseño se llevó a cabo de manera exitosa. Esta reacción de PCR es una modificación propia que se hizo al procedimiento descrito por Bird y colaboradores en el 2022, esta fue necesaria debido a que el plásmido utilizado, pJET 1.2/blunt, tiene un sitio de reconocimiento de la enzima *BsaI* en el gen de resistencia a ampicilina, por lo que, de ser sometido al protocolo de restricción ligación, se hubiera restringido.

La imagen 22 muestra la caracterización por PCR de colonias transformadas con el plásmido control pJET1.2-SOPU.

Imagen 22. Caracterización de colonias transformadas con pJET1.2-SOPU

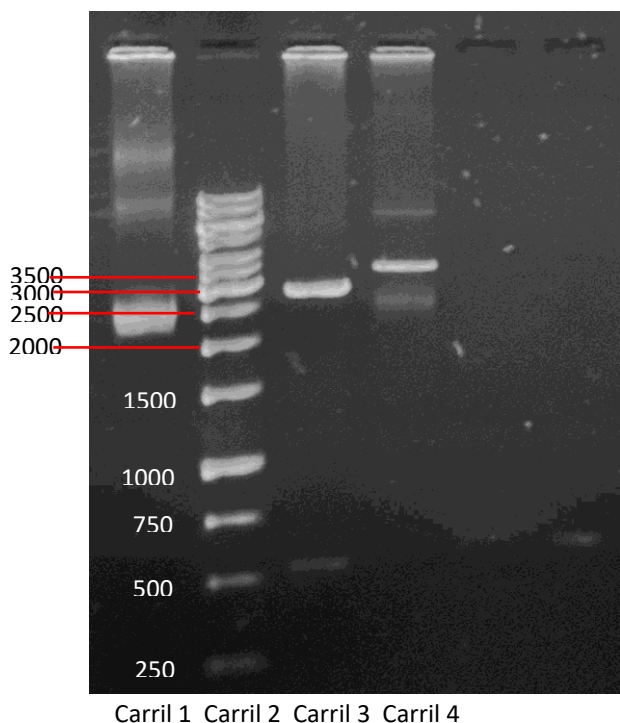


PCR de colonias candidato transformadas con pJET1.2-SOPU. Carriles: 1; MP 1kb, 2; candidato 1 con iniciadores S CPT y AS Urea (430 pb), 3; candidato 1 con iniciadores de plásmido pJET1.2/blunt (550 pb), 4; candidato 2 con iniciadores S CPT y AS Urea, 5; candidato 2 con iniciadores de plásmido pJET1.2/blunt, 6; candidato 3 con iniciadores S CPT y AS Urea, 7; candidato 3 con iniciadores de plásmido pJET1.2/blunt, 8; candidato 4 con iniciadores S CPT y AS Urea, 9; candidato 4 con iniciadores de plásmido pJET1.2/blunt. EGA en gel al 1%.

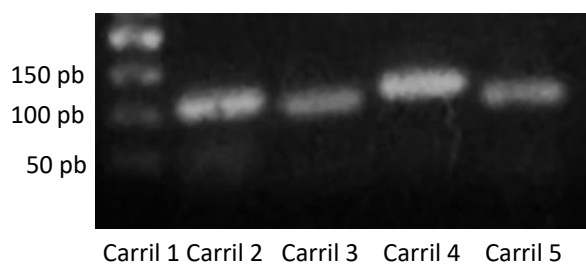
Para la caracterización de las colonias por PCR del plásmido pJET1.2-SOPU se realizaron PCR de colonia con los iniciadores S CPT y AS Urea, mismos que se utilizaron para amplificar el fragmento que contiene las 4 secuencias diana de la prueba, así como los iniciadores que flanquean el sitio de clonación múltiple del plásmido. La colonia exitosamente caracterizada fue congelada en caldo con glicerol para resguardar el plásmido control, a su vez está misma colonia se reprodujo en medio con ampicilina para caracterizar el plásmido por restricción enzimática y por PCR de cada uno de los blancos moleculares.

Imagen 23. Caracterización de plásmido pJET1.2-SOPU

A



B



Carril 1 Carril 2 Carril 3 Carril 4

A. Restricción de plásmido pJET1.2-SOPU. Carriles: 1; plásmido sin restringir, 2; MP 1kb, 3; liberación de fragmento de interés con *BglIII* (fragmento liberado de 481 pb y plásmido vacío de 2923 pb), 4; plásmido linealizado con *BsaI* (3404 pb). EGA en gel al 1.5%. **B. PCR de plásmido pJET1.2-SOPU con iniciadores de diagnóstico.** Carriles 1; MP 50 pb, 2; iniciadores de *sdha* (108 pb), 3; iniciadores de *omp1* (99 pb), 4; iniciadores de *p100*, 5; iniciadores de ureasa (110 pb). EGA en gel al 2%.

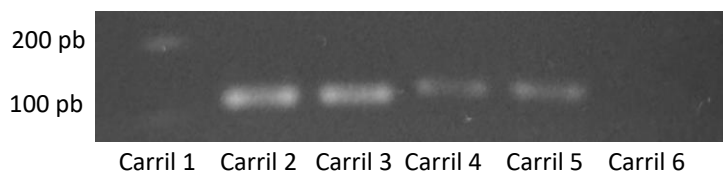
En la caracterización del plásmido por restricción enzimática se eligieron dos enzimas; una para liberar el fragmento, la cual fue *BglIII*, debido a que su sitio de reconocimiento y corte está a ambos lados del sitio de clonación múltiple del plásmido pJET 1.2/blunt, esperando dos fragmentos, uno de 481 pb el cual corresponde al fragmento de interés liberado, y otro de 2923 pb, el cual corresponde al restante del plásmido; la segunda enzima utilizada fue para linealizar el plásmido, esta fue *BsaI*, la cual nos da un único fragmento de 3404 pb, a su vez, con esta última restricción se comprobó que los sitios de reconocimiento de la enzima *BsaI* agregados como adaptadores a los iniciadores de diseño, son desechados en el protocolo de restricción/ligación.

5.5. Estandarización de prueba PCR

5.5.1. Pruebas de especificidad.

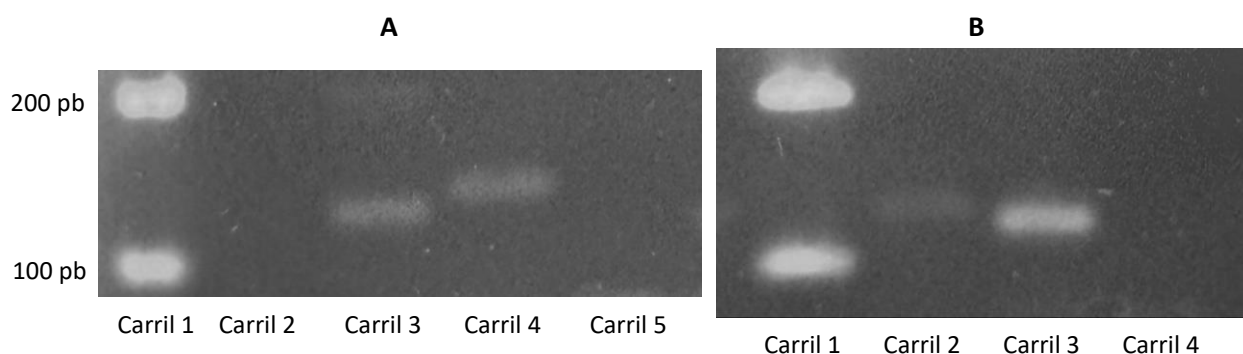
Las pruebas de especificidad se fueron realizando a la par de la obtención de los amplicones para la construcción del plásmido control, las imágenes de la 24 a la 26 muestran los resultados de dichos controles.

Imagen 24. Evaluación de especificidad de iniciadores de *omp1*



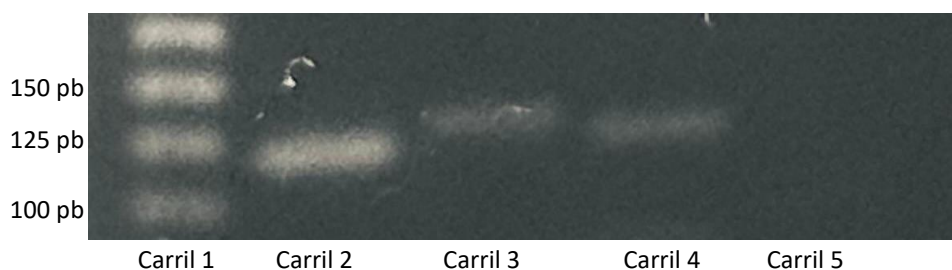
PCR con iniciadores de diseño. Carriles: 1; MP 100 pb, 2 y 3; ADN de células HeLa con iniciadores de *sdha* (120 pb), 4 y 5; muestra de *C. trachomatis* (129 pb), 6; ADN de células HeLa (negativo). EGA en gel al 2%.

Imagen 25. Evaluación de especificidad de iniciadores de *p100*



PCR con iniciadores de diseño. A. Carriles: 1; MP 100 pb, 2; muestra de agua (negativo), 3; muestra de *Ureaplasma spp.* con iniciadores de ureasa (128 pb), 4; muestra de *M. hominis* (143 pb), 5; ADN de células HeLa (negativo). EGA en gel al 2%. **B.** Muestra de *Ureaplasma spp.* Carriles: 1; MP 100 pb, 2; con iniciadores de ureasa (128 pb), 3; iniciadores de *sdha* (120 pb), 4; (negativo). EGA en gel al 2%.

Imagen 26. Evaluación de especificidad de iniciadores para el gen de la ureasa

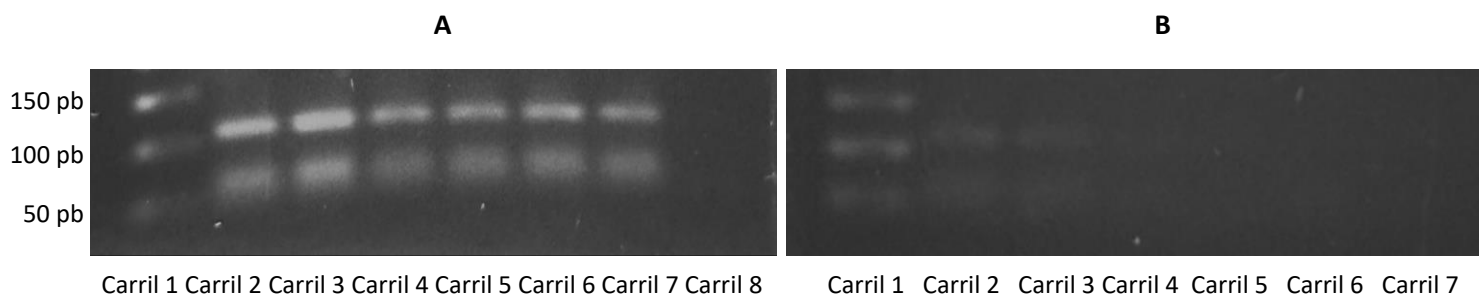


PCR con iniciadores de diseño. Carriles: 1; MP 25 pb, 2; ADN de células HeLa con iniciadores de *sdha* (120 pb), 3; muestra de *Ureaplasma spp.* (128 pb), 4; muestra de *Ureaplasma spp.* con iniciadores de *sdha* (120 pb), 5; ADN de células HeLa (negativo). EGA en gel al 2%.

5.5.2. Obtención de los límites de detección.

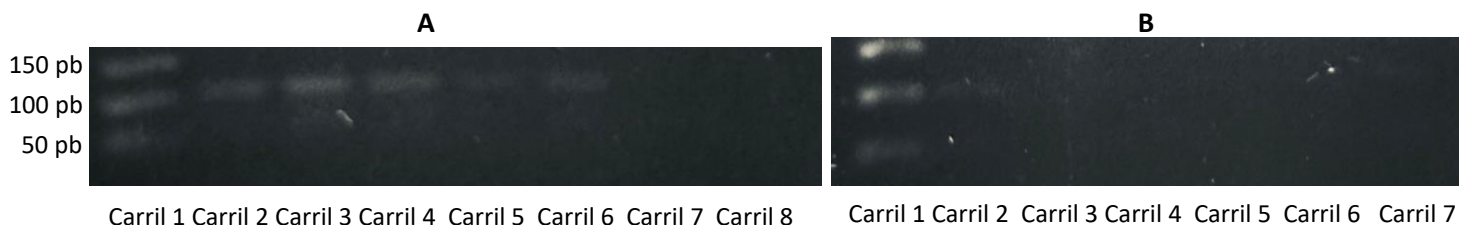
Los límites de detección se obtuvieron por cada amplicón por separado en unidades de “número de copias detectables”, las imágenes 27 a la 29 presentan las EGA de las PCR aplicadas a las diluciones como lo explica la metodología.

Imagen 27. Determinación de límite de detección para *sdha*



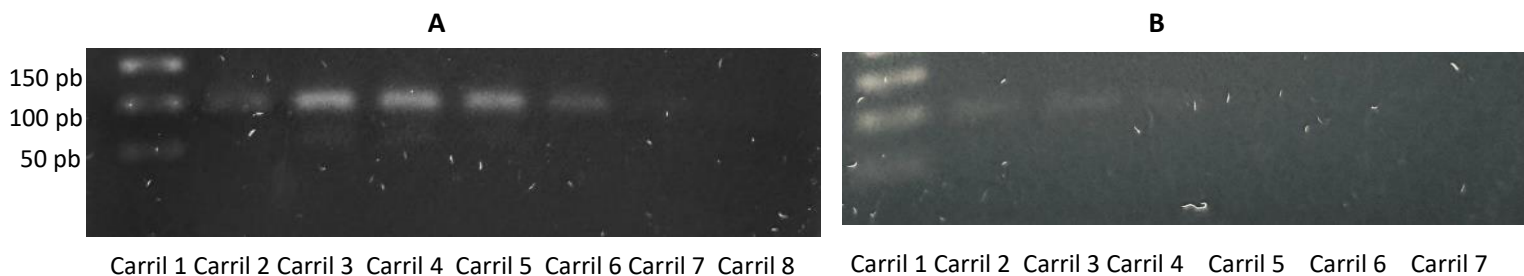
PCR de diluciones de amplicón con iniciadores de diagnóstico de *sdha* (108 pb). A. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; 10 ng/ μ L, 3; 10^{-1} , 4; 10^{-2} , 5; 10^{-3} , 6; 10^{-4} , 7; 10^{-5} , 8; muestra de agua (control negativo). EGA en gel al 2%. B. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; 10^{-6} , 3; 10^{-7} , 4; 10^{-8} , 5; 10^{-9} , 6; 10^{-10} , 7; muestra de agua (control negativo). EGA en gel al 2%.

Imagen 28. Determinación de límite de detección para *omp1*



PCR de diluciones de amplicón con iniciadores de diagnóstico de *omp1* (99 pb). A. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; 10 ng/ μ L, 3; 10^{-1} , 4; 10^{-2} , 5; 10^{-3} , 6; 10^{-4} , 7; 10^{-5} , 8; muestra de agua (control negativo). EGA en gel al 2%. B. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; 10^{-6} , 3; 10^{-7} , 4; 10^{-8} , 5; 10^{-9} , 6; 10^{-10} , 7; muestra de agua (control negativo). EGA en gel al 2%.

Imagen 29. Determinación de límite de detección para gen de la ureasa



PCR de diluciones de amplicón con iniciadores de diagnóstico de ureasa (110 pb). A. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; 10 ng/ μ L, 3; 10^{-1} , 4; 10^{-2} , 5; 10^{-3} , 6; 10^{-4} , 7; 10^{-5} , 8; muestra de agua (control negativo). EGA en gel al 2%. B. Carriles: 1; MP 50 pb, 2; 10^{-6} , 3; 10^{-7} , 4; 10^{-8} , 5; 10^{-9} , 6; 10^{-10} , 7; muestra de agua (control negativo). EGA en gel al 2%.

Como se observa en las imágenes, en todas las EGA se corrió también un control negativo, la cual fue una PCR con los mismos iniciadores, pero como muestra se agregó agua grado biología molecular, de esta manera nos aseguramos de que no haya ninguna contaminación que pueda alterar los resultados.

En el caso del gen SDHA, nuestro control positivo de técnica, la última dilución a la que fue visible el amplicón fue la dilución 10^{-8} , para el gen OMP1, perteneciente a *C. trachomatis*, fue la dilución 10^{-7} y para el gen de la ureasa, perteneciente a *Ureaplasma spp.*, fue la dilución 10^{-8} . La tabla 4 muestra los resultados de los límites de detección de los blancos moleculares en “número de copias detectables”.

Tabla 4. Límites de detección de cada blanco molecular

Patógeno	Blanco molecular	Límite de detección (número de copias detectables)
CPT	SDHA	8.448×10^2
<i>C. trachomatis</i>	OMP1	9.216×10^3
<i>Ureaplasma spp.</i>	Gen de la ureasa	8.295×10^2

En el caso del CPT, su límite de detección fue de 844.8 copias, por lo que sería efectivo incluso si la expresión del gen en el tejido no es muy alta, lo que da paso a probar la aplicación de esta prueba PCR en otras muestras clínicas; por su lado, el límite de detección para *C. trachomatis* fue de 9216 copias, el cual fue el más alto de la prueba, sin embargo, como se explica en el marco teórico, la dosis infectiva de este patógeno es de 100 000 IFU, por lo que el límite de detección es lo suficientemente eficiente para detectar al patógeno desde el inicio de la infección, lo cual permite también que la aplicación de esta prueba diagnóstica sea preventiva, es decir, que se aplique incluso sin presentar síntomas para una acción temprana; en el caso de *Ureaplasma spp.*, su límite de detección fue de 829.5 copias, el cual, si lo comparamos con su dosis infectiva de 10 000 CCU, notaremos que también es adecuado para el diagnóstico del patógeno desde el inicio de la infección.

Es importante mencionar que los datos de límite de detección en número de copias pueden no ser equivalentes a los datos de sensibilidad, ya que esta última toma en cuenta los interferentes que puede haber en las muestras clínicas, por lo que estos datos pueden ser mayores, sin embargo, se debe tomar en cuenta que esta prueba está diseñada para su posterior ajuste a PCR múltiple en tiempo real, lo cual le brindaría aún mejor sensibilidad y límite de detección.

Conclusiones

1. La identificación del gen SDHA en todas las muestras empleadas valida su uso como control positivo de técnica en muestras de exudado endocervical.
2. Se demostró congruencia entre los resultados de las muestras clínicas previamente diagnosticadas con los resultados positivos de la aplicación de la PCR, con ello también se comprobó la utilidad de los iniciadores para la detección de los blancos moleculares elegidos.
3. Se demostró de manera *in silico* y experimental, la especificidad de los iniciadores diseñados.
4. La estrategia del *Golden Gate Cloning Method* fue eficiente para la unión de los 4 blancos moleculares.
5. Los resultados de la caracterización del pJET1.2.-SOPU son congruentes con lo diseñado *in silico*.
6. El número de copias detectado para cada uno de los blancos moleculares es diez veces menos que la dosis infectiva requerida de cada patógeno.

Perspectivas

1. Secuenciación del plásmido PJET1.2-SOPU para validar su uso como control positivo de la prueba.
2. Evaluación de los controles faltantes de especificidad cruzada entre los patógenos de la prueba, además de controles negativos con patógenos que pudiesen estar presentes en las muestras clínicas.
3. Límite de detección de gen P100 y determinación de sensibilidad de la prueba haciendo uso de muestras clínicas y corriendo cada resultado por triplicado.
4. Ajuste a PCR múltiple en tiempo real, para lo cual es necesario el diseño de sondas específicas para cada blanco molecular.
5. Proceso de validación de la prueba para poder aplicarla en el diagnóstico de estos patógenos.

ANEXOS

Anexo 1. Alineamientos con herramienta Clustal Omega

Alineamiento del gen *omp1* en *C. trachomatis* para iniciador positivo

DQ231370.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
X55700.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
JX548318.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
JN795442.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AY380118.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AY380117.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AY380116.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
HM230063.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AF063207.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AF063204.2	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AF063203.2	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
JX564247.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AF063200.2	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
GU903929.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
HM230060.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
GU903930.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
FJ261937.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
FJ261951.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
FJ261945.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
FJ943542.1	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
AF063201.2	GGG	CTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCCCTTTCTTAC
FJ261950.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261936.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261947.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261938.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261954.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261939.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261953.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261949.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261948.1	GGG	TTACCATGAGTGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261925.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261930.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
M33636.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
JN795441.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
JX559521.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
L35606.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
GU903934.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
JN795427.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
DQ231369.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
JN795453.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
JN795428.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
M14738.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
DQ231368.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
AB915592.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
DQ064294.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261943.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
FJ261952.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
X62921.1	GGG	TTACCATGAATGGCAAGCAAGTTTAGCTCTCTCTTAC
** ***** ** ***** ** *****		

Alineamiento del gen omp1 en C. trachomatis para iniciador negativo

DQ231370.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
X55700.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
JX548318.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
JN795442.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AY380119.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AY380117.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AY380116.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
HM230063.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AF063207.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AF063204.2	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AF063203.2	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
JX564247.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AF063200.2	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
GU903929.1	AGACTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
HM230060.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
GU903930.1	AGACTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
FJ261937.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
FJ261951.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
FJ261945.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
FJ943542.1	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
AF063201.2	AGATTAAATATGTTCACTCCCT	AGAGTAAGTTTTGATGCC
FJ261950.1	AGACTCAATATGTTCACTCCCT	CGTGCAAGCTTTGATTCC
FJ261936.1	AGACTCAATATGTTCACTCCCT	CGTGCAAGCTTTGATTCC
FJ261947.1	AGACTCAATATGTTCACTCCCT	CGTGCAAGCTTTGATTCT
FJ261938.1	AGACTCAATATGTTCACTCCCT	CGTGCAAGCTTTGATTCT
FJ261954.1	AGACTCAATATGTTCACTCCCT	CGTGCAAGCTTTGATTCT
FJ261939.1	AGACTCAATATGTTCACTCCCT	CGTGCAAGCTTTGATTCT
FJ261953.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGTTTTGATGCC
FJ261949.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGTTTTGATGCC
FJ261948.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGTTTTGATGCC
FJ261925.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
FJ261930.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
M33636.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
JN795441.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
JX559521.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
L35606.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
GU903934.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
JN795427.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
DQ231369.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
JN795453.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
JN795428.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
M14738.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCA
DQ231368.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCG
AB915592.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCG
DQ064294.1	AGATTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCG
FJ261943.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCC
FJ261952.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCC
X62921.1	AGACTGAATATGTTCACTCCCT	CGAGCAAGCTTTGATGCC
	*** * ***** * ***** * * ** *****	

Alineamiento del gen de la ureasa en *Ureaplasma spp.*

AF085720.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085721.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085722.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085723.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085724.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085725.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085726.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085727.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085728.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085729.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATCTACACTAAAG
AF085731.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATTTACACTAAAG
AF085730.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATTTACTACTAAAG
AF085733.2	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATTTACACTAAAG
AP018561.1	GATACCTTCAACAAAAGGGTA	TAATGATATTTACTACTAAAG
	*****	*****
AF085720.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085721.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085722.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085723.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085724.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085725.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085726.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085727.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085728.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085729.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085731.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085730.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AF085733.2	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
AP018561.1	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG	AAGATGCTAGAATTTTATTAATACTTCTGTTTACCAGCTGATCGTATTGCTG
	*****	*****
AF085720.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085721.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085722.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085723.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085724.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085725.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085726.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085727.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085728.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085729.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085731.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085730.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AF085733.2	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
AP018561.1	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA	GTCCACATACAGCGATTTCGTGAAGATGCTTCAATGAACTTTGCTGCAA
	*****	*****

Anexo 2. Características y propiedades físicoquímicas de iniciadores para CPT

Oligo Explorer - 1.1.2
30/03/2024

CAGAGTAGTCATCCTCGC-5'

Sequence

Tm (basic) : 56.0 °C
Tm (salt) : 56.1 °C
Tm (NN) : 53.9 °C

Filename : CPT SDHA.oep
Length : 749 bp
Unresolved : 0 bp
GC % : 43.1 %

GC % : 55.6 %
3'-tail GC % : 42.9 %
dG : -31.6 kcal/mol
3'-tail dG : -9.5 kcal/mol

Upper primer

5'-position : 76
Length : 18
Sequence : 5'-
CGTCTACTGATGAGAC-3'
3'-

Lower primer

5'-position : 183
Length : 18
Sequence : 5'-
GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'

3'-
CAGAAGTATGCGAAGACG-5'

Tm (basic) : 54.0 °C
Tm (salt) : 53.8 °C
Tm (NN) : 54.1 °C

GC % : 50.0 %
3'-tail GC % : 42.9 %
dG : -32.4 kcal/mol
3'-tail dG : -10.0 kcal/mol

Primer pair properties

Length difference : 0
Tm (basic) difference: 2.0 °C
Tm (salt) difference : 2.3 °C
Tm (NN) difference : 0.2 °C
GC % difference : 5.6 %

PCR product

Position : 76 - 183
Length : 108 bp
GC% : 40.7 %

Tm (product) : 70.4 °C
Tm (annealing) : 50.6 °C

Upper primer self annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||| : : ::
3'-CAGAGTAGTCATCCTCGC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

Upper primer loops:

5'-CGCTCCTAC
||| :)
3'-CAGAGTAGT
dG: 0.16 kcal/mol

Lower primer self annealing:

None!

Lower primer loops:

None!

Upper primer - Lower primer annealing:

5'-
CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||| :: :
3'-CAGAAGTATGCGAAGACG-5'
dG: -5.14 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
:: |||
3'-CAGAAGTATGCGAAGACG-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
:: ||| : :
3'-CAGAAGTATGCGAAGACG-5'
dG: 0.91 kcal/mol

Anexo 3. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para *C. trachomatis*

Oligo Explorer - 1.1.2
26/01/2023

Sequence

Filename : Untitled
Length : 1325 bp
Unresolved : 0 bp
GC % : 42.7 %

Upper primer

5'-position : 897
Length : 20
Sequence : 5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
3'-
AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'

Tm (basic) : 56.0 °C
Tm (salt) : 54.3 °C
Tm (NN) : 53.9 °C

GC % : 40.0 %
3'-tail GC % : 28.6 %
dG : -34.5 kcal/mol
3'-tail dG : -9.5 kcal/mol

Lower primer

5'-position : 995
Length : 20
Sequence : 5'-
AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
3'-
TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'

Tm (basic) : 54.0 °C
Tm (salt) : 52.3 °C
Tm (NN) : 53.4 °C

GC % : 35.0 %
3'-tail GC % : 42.9 %
dG : -34.1 kcal/mol

3'-tail dG : -11.8 kcal/mol

dG: -1.64 kcal/mol

Primer pair properties

Length difference : 0
Tm (basic) difference: 2.0 °C
Tm (salt) difference : 2.0 °C
Tm (NN) difference : 0.4 °C
GC % difference : 5.0 %

PCR product

Position : 897 - 995
Length : 99 bp
GC% : 39.4 %

Tm (product) : 69.2 °C
Tm (annealing) : 49.7 °C

Upper primer self annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: ||| ::: :
3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
dG: -1.46 kcal/mol

Upper primer loops:

5'-ACTAAGGA
: ||| T
3'-AGTTATCTCCG
dG: -1.34 kcal/mol

Lower primer self annealing:

5'-AGACCATTAACTCCAATGT-3'
|||| : : :::
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-AGACCATTAACTCCAATGT-3'
: : |||| : :
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'

Lower primer loops:

5'-AGACCATTAA
||| C
3'-TGTAACCT
dG: -2.04 kcal/mol

Upper primer - Lower primer annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-
TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
:: ||| : :
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -1.43 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'

|||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'

: |||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: 0.04 kcal/mol

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| :
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: 0.31 kcal/mol

Anexo 4. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para M. hominis

Oligo Explorer - 1.1.2
13/02/2023

Sequence

Filename : Untitled
Length : 10414 bp
Unresolved : 0 bp
GC % : 28.0 %

Upper primer

5'-position : 6539
Length : 18
Sequence : 5'-
CCCTCACACTCTATCAGG-3'

3'-
GGACTATCTCACACTCCC-5'

Tm (basic) : 56.0 °C
Tm (salt) : 56.1 °C
Tm (NN) : 53.5 °C

GC % : 55.6 %
3'-tail GC % : 42.9 %
dG : -31.4 kcal/mol
3'-tail dG : -10.6 kcal/mol

Lower primer

5'-position : 6651
Length : 18

Sequence : 5'-
 CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 3'-
 GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'

Tm (basic) : 54.0 °C
 Tm (salt) : 53.8 °C
 Tm (NN) : 54.8 °C

GC % : 50.0 %
 3'-tail GC % : 42.9 %
 dG : -32.5 kcal/mol
 3'-tail dG : -12.1 kcal/mol

Primer pair properties

Length difference : 0
 Tm (basic) difference: 2.0 °C
 Tm (salt) difference : 2.3 °C
 Tm (NN) difference : 1.3 °C
 GC % difference : 5.6 %

PCR product

Position : 6539 -
 6651
 Length : 113 bp
 GC% : 39.8 %

Tm(product) : 70.3 °C
 Tm(annealing) : 50.5 °C

Upper primer self annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 ||| : : : : :
 3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
 dG: -1.46 kcal/mol

Upper primer loops:

5'-CCCTCACAC
 ||| : : T
 3'-GGACTATC
 dG: -1.34 kcal/mol

Lower primer self annealing:

None!

Lower primer loops:

None!

Upper primer - Lower primer annealing:

5'-
 CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
 3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
 dG: -2.93 kcal/mol

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : : |||
 3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
 dG: -0.34 kcal/mol

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
 3'-
 GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
 dG: -0.34 kcal/mol

5'-
 CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : |||
 3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
 dG: -0.08 kcal/mol

Anexo 5. Características y propiedades fisicoquímicas de iniciadores para Ureaplasma spp.

Oligo Explorer - 1.1.2
 14/02/2023

Sequence

Filename : Untitled
 Length : 5696 bp
 Unresolved : 0 bp
 GC % : 32.7 %

Upper primer

5'-position : 4089
 Length : 18
 Sequence : 5'-
 TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
 3'-

CATTAGCGACGGTACGAT-5'

Tm (basic) : 54.0 °C
 Tm (salt) : 53.8 °C
 Tm (NN) : 58.3 °C

GC % : 50.0 %
 3'-tail GC % : 42.9 %
 dG : -34.9 kcal/mol
 3'-tail dG : -10.9 kcal/mol

Lower primer

5'-position : 4198
 Length : 18
 Sequence : 5'-
 ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'

3'-
 CACAACCTTTGACCCCTA-5'

Tm (basic) : 54.0 °C
 Tm (salt) : 53.8 °C
 Tm (NN) : 58.1 °C

GC % : 50.0 %
 3'-tail GC % : 42.9 %
 dG : -34.3 kcal/mol
 3'-tail dG : -10.1 kcal/mol

Primer pair properties

Length difference : 0
 Tm (basic) difference: 0.0 °C
 Tm (salt) difference : 0.0 °C
 Tm (NN) difference : 0.2 °C
 GC % difference : 0.0 %

PCR product

Position : 4089 -
 4198
 Length : 110 bp
 GC% : 36.4 %

Tm (product) : 68.7 °C
 Tm (annealing) : 50.6 °C

Upper primer self annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-
 3'

: |||| :

3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
 dG: -2.17 kcal/mol

Upper primer loops:

None!

Lower primer self annealing:

5'-ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'
 ||| :::
 3'-CACAACCTTTGACCCCTA-5'
 dG: -0.07 kcal/mol

Lower primer loops:

None!

Upper primer - Lower primer annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
 : ||| :
 3'-CACAACCTTTGACCCCTA-5'
 dG: -1.81 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
 : : : |||
 3'-CACAACCTTTGACCCCTA-5'
 dG: 0.16 kcal/mol

Anexo 6. Análisis fisicoquímico de estructuras secundarias formadas entre iniciadores

Oligo Analyzer - 1.0.2
 16/02/2023

S CPT - AS CPT annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-
 3'

|||| :: :

3'-CAGAAGTATGCGAAGACG-5'
 dG: -5.14 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 :: |||

3'-CAGAAGTATGCGAAGACG-5'
 dG: -0.34 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 :: ||| : :

3'-CAGAAGTATGCGAAGACG-5'
 dG: 0.91 kcal/mol

S CPT - S1 C. tra annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : ||| :
 3'-AGTTATCTCCGTAGAAATCA-
 5'
 dG: 0.04 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : : |||

3'-
 AGTTATCTCCGTAGAAATCA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

S CPT - S2 C. tra annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-
 3'

||||

3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
 dG: -3.03 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : ||| :
 3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-

5'
dG: 0.04 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||
3'-

AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
dG: 0.04 kcal/mol

S CPT - AS C. tra annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-
5'
dG: 0.04 kcal/mol

S CPT - S M. hominis annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -3.39 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -1.92 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||| : : :
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -1.46 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||| :
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||| :
3'-GGACTATCTCACACTCCC-
5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: |||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

S CPT - AS M. hominis annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -1.30 kcal/mol

S CPT - S1 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||| : :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -1.53 kcal/mol

5'-
CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -1.53 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : ||| :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : ||| :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-
3'
: : |||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S CPT - S2 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||||| : :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -5.14 kcal/mol

5'-
CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -1.53 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: ||| :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
:: ||| :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-
3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S CPT - S3 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
||| : :
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -1.53 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : ||||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-
3'
: : |||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S CPT - S4 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
|||| : :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -5.14 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : ||||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-
3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S CPT - AS1 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||| :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -1.68 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: |||
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : ||| : :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: |||
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S CPT - AS2 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: |||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : ||| : :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: |||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S CPT - AS3 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
: : |||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.68 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'

: |||
 3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
 dG: -0.31 kcal/mol
 5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 :: ||| ::
 3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
 dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : : |||
 3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : |||
 3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
 dG: 0.16 kcal/mol

S CPT - AS4 Urea annealing:

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : |||
 3'-CACAACCTTTGTCCTCCTA-5'
 dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 :: ||| ::
 3'-CACAACCTTTGTCCTCCTA-5'
 dG: -0.31 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : : : |||
 3'-CACAACCTTTGTCCTCCTA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

5'-CGCTCCTACTGATGAGAC-3'
 : |||
 3'-CACAACCTTTGTCCTCCTA-5'
 dG: 0.16 kcal/mol

AS CPT - S1 C. tra annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-
 3'
 |||
 3'-AGTTATCTCCGTAGAAATCA-5'
 dG: -1.88 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 ||| :: : : ::
 3'-AGTTATCTCCGTAGAAATCA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'

: |||
 3'-
 AGTTATCTCCGTAGAAATCA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

AS CPT - S2 C. tra annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-
 3'
 |||
 3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
 dG: -1.88 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 ||| :: : ::
 3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 : |||
 3'-
 AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

AS CPT - AS C. tra annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 :: |||
 3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
 dG: -0.22 kcal/mol

AS CPT - S M. hominis annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 :: :: ||| :
 3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
 dG: -0.31 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 |||
 3'-GGACTATCTCACACTCCC-
 5'
 dG: -0.31 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 ||| : :
 3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
 |||
 3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
 dG: 0.04 kcal/mol

**AS CPT - AS M. hominis
annealing:**

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||| :: ::
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||| : ::
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -1.53 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
: ||||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -1.30 kcal/mol

5'-
GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||| : : :
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||| : :
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

AS CPT - S1 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

AS CPT - S2 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'

|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

AS CPT - S3 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

AS CPT - S4 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

AS CPT - AS1 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||||
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
: ||| : : :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

AS CPT - AS2 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||| : :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
: ||| : : :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

AS CPT - AS3 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'

dG: -2.26 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
: ||| : : :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

AS CPT - AS4 Urea annealing:

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
|||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
||| :: :
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-GCAGAAGCGTATGAAGAC-3'
: ||| : : :
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.31 kcal/mol

S1 C. tra - S2 C. tra annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : : ||| :
3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
dG: -1.46 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : ||| :: : : :
3'-AGTTATCTCCGTAGGAATCA-5'
dG: 0.04 kcal/mol

S1 C. tra - AS C. tra annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
3'
||| :
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -1.64 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: 0.04 kcal/mol

S1 C. tra - S M. hominis annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -1.46 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| :
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S1 C. tra - AS M. hominis annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.21 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||| : :
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

S1 C. tra - S1 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : ||| : :

3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -3.36 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||||
3'-
CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||| : ::
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S1 C. tra - S2 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||| :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -3.36 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'

dG: 0.65 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S1 C. tra - S3 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||| :
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||||
3'-
CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||| : ::
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||||
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : :: :
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S1 C. tra - S4 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||| :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'

||| : :: :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S1 C. tra - AS1 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||||
3'-
CACAACCTTTGACCCCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : :
3'-CACAACCTTTGACCCCCTA-5'
dG: -0.68 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CACAACCTTTGACCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-
3'
||| :
3'-CACAACCTTTGACCCCCTA-5'
dG: 0.27 kcal/mol

S1 C. tra - AS2 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||||
3'-
CACAACCTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CACAACCTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.68 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CACAACCTTTGTCCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S1 C. tra - AS3 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||||
3'-
CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : :
3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
dG: -0.68 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-
3'
||| ::
3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
dG: 0.27 kcal/mol

S1 C. tra - AS4 Urea annealing:

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: ||||
3'-
CACAACCTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CACAACCTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: -0.68 kcal/mol

5'-
ACTAAAGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-CACAACCTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S2 C. tra - AS C. tra annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-
TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
:: ||| : :
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -1.43 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: 0.04 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
3'
||| :
3'-TGTAACCTCAATTTACCAGA-5'
dG: 0.31 kcal/mol

**S2 C. tra - S M. hominis
annealing:**

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
5'
dG: -1.46 kcal/mol

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -1.46 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-
GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -0.31 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| :
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: 0.16 kcal/mol

**S2 C. tra - AS M. hominis
annealing:**

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-
GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'

dG: -0.21 kcal/mol

S2 C. tra - S1 Urea annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||| :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -3.36 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-
CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S2 C. tra - S2 Urea annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||| :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -3.36 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :

3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S2 C. tra - S3 Urea annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : ||| :
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-
CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : :
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S2 C. tra - S4 Urea annealing:

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : ||| :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -4.95 kcal/mol

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : : :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.31 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S2 C. tra - AS1 Urea annealing:

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'
dG: -2.91 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-
CACAACTTTGACCCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
||| : :
3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'
dG: 0.27 kcal/mol

S2 C. tra - AS2 Urea annealing:

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
|||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -2.91 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: |||
3'-
CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -1.46 kcal/mol

S2 C. tra - AS3 Urea annealing:

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
 |||||
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -4.51 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
 : |||||
 3'-
CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
 : ||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.43 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-
3'
 ||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: 0.27 kcal/mol

S2 C. tra - AS4 Urea annealing:

5'-
ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
 |||||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -4.51 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
 : ||||| :
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -3.03 kcal/mol

5'-ACTAAGGATGCCTCTATTGA-3'
 : |||||
 3'-
CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -2.26 kcal/mol

**AS C. tra - S M. hominis
annealing:**

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : : |||
3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: -0.08 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| :

3'-GGACTATCTCACACTCCC-5'
dG: 0.04 kcal/mol

**AS C. tra - AS M. hominis
annealing:**

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-
3'
 ||||| :
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -4.38 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ::: |||||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -3.76 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : ||||| :: : : :
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -2.16 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-
3'
 |||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -1.81 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : : |||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.07 kcal/mol

AS C. tra - S1 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-
3'
 ||||| :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -3.29 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : :: ||| :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -1.81 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : :: : |||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
CATTAACGACGGTACGAT-5'

dG: -0.21 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| :
 3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
 dG: -0.21 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| : :
 3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
 dG: 0.31 kcal/mol

AS C. tra - S2 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 3' |||| :
 3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
 dG: -3.29 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : : ||| :
 3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
 dG: -1.81 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : : : |||
 3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
 dG: -0.22 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
 CATTAGCGACGGTACGAT-5'
 dG: -0.21 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| :
 3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
 dG: 0.31 kcal/mol

AS C. tra - S3 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 3' |||| :
 3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
 dG: -3.29 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : : ||| :
 3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
 dG: -1.81 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'

3'-
 CATTAAACGACGGTATGAT-5'
 dG: -0.21 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| : :
 3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
 dG: -0.21 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : |||
 3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
 dG: 0.27 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| : :
 3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
 dG: 0.31 kcal/mol

AS C. tra - S4 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 3' |||| :
 3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
 dG: -3.29 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : : ||| :
 3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
 dG: -1.81 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
 CATTAGCGACGGTATGAT-5'
 dG: -0.21 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : |||
 3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
 dG: 0.27 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 ||| :
 3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
 dG: 0.31 kcal/mol

AS C. tra - AS1 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : |||| :
 3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'
 dG: -1.68 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
CACAACCTTTGACCCCCTA-5'
dG: -0.08 kcal/mol

AS C. tra - AS2 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
CACAACCTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.08 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : ||| :
 3'-CACAACCTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.07 kcal/mol

AS C. tra - AS3 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : |||| :
 3'-CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.68 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
CACAACCTTTGACCTCCTA-5'
dG: -0.08 kcal/mol

AS C. tra - AS4 Urea annealing:

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 |||
 3'-
CACAACCTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.08 kcal/mol

5'-AGACCATTTAACTCCAATGT-3'
 : ||| :
 3'-CACAACCTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.07 kcal/mol

S M. hominis - AS M. hominis annealing:

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-
3'
 |||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'

dG: -2.93 kcal/mol
5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : : |||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
 3'-
GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.34 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-
3'
 :: |||
3'-GTCGTAATCTGGGTTGTC-5'
dG: -0.08 kcal/mol

S M. hominis - S1 Urea annealing:

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 :: : |||
3'-CATTAAACGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S M. hominis - S2 Urea annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
 3'-CATTAGCGACGGTACGAT-
5'
dG: 0.16 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : : |||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S M. hominis - S3 Urea annealing:

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : |||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.27 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : |||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S M. hominis - S4 Urea
annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
 3'-CATTAGCGACGGTATGAT-
5'
dG: 0.16 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : :: |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.27 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : :: :: |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

S M. hominis - AS1 Urea
annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : ||| :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: 0.27 kcal/mol

S M. hominis - AS2 Urea
annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : ||||
 3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -3.41 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.08 kcal/mol

S M. hominis - AS3 Urea
annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : |||
 3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.46 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : ||| : :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: 0.27 kcal/mol

S M. hominis - AS4 Urea
annealing:

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : ||||
 3'-CACAACTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: -3.41 kcal/mol

5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 : : |||
 3'-CACAACTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: -1.46 kcal/mol

 5'-CCCTCACACTCTATCAGG-3'
 |||
3'-CACAACTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: -0.08 kcal/mol

AS M. hominis - S1 Urea
annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 : |||||
 3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -5.44 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 : : : : |||||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -4.96 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 : : |||
 3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 |||
 3'-CATTAACGACGGTACGAT-
5'
dG: -1.17 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 ||| : :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

 5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 ||| :
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

 5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
 |||
3'-CATTAACGACGGTACGAT-5'

dG: 0.65 kcal/mol

AS M. hominis - S2 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: : : : |||||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -4.96 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -3.48 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -1.17 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
||| :
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

AS M. hominis - S3 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -5.44 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: : |||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -1.17 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
||| : :
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -0.69 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
|||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
|||
3'-CATTAAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

AS M. hominis - S4 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -3.48 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -1.88 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -1.17 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
|||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.65 kcal/mol

AS M. hominis - AS1 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: |||||
3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'
dG: -4.88 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'
: ||||| : :
3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'

dG: -3.99 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

|||

3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'

dG: -2.93 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

: ||| :

3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'

dG: -2.93 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

||| :: :

3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'

dG: -0.34 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

: : : |||

3'-CACAACTTTGACCCCTA-5'

dG: -0.34 kcal/mol

AS M. hominis - AS2 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

||||| : :

3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'

dG: -3.99 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

|||

3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'

dG: -2.93 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

||| :

3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'

dG: -2.93 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

|||

3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'

dG: -2.93 kcal/mol

AS M. hominis - AS3 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

||||| :: :

3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'

dG: -3.99 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

|||

3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'

dG: -1.81 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

||| :: :

3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'

dG: -0.34 kcal/mol

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

: : : |||

3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'

dG: -0.34 kcal/mol

AS M. hominis - AS4 Urea annealing:

5'-CTGTTGGGTCTAATGCTG-3'

||||| : :

3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'

dG: -3.99 kcal/mol

S1 Urea - S2 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'

: ||||| :

3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'

dG: -2.17 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'

: ||| :

3'-CATTAGCGACGGTACGAT-5'

dG: -0.21 kcal/mol

S1 Urea - S3 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'

: ||||| :

3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'

dG: -2.16 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'

: ||| :

3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'

dG: -0.22 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'

: : |||

3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'

dG: 0.91 kcal/mol

S1 Urea - S4 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
5'
dG: -0.21 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

S1 Urea - AS1 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

S1 Urea - AS2 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

S1 Urea - AS3 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

S1 Urea - AS4 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

S2 Urea - S3 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'

dG: -0.22 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
5'
dG: -0.21 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: : |||
3'-CATTAACGACGGTATGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

S2 Urea - S4 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.22 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: : |||
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

S2 Urea - AS1 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: : : : |||
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S2 Urea - AS2 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: : : : |||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S2 Urea - AS3 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :

3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: : : |||
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S2 Urea - AS4 Urea annealing:

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: |||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-TAGCATGGCAGCGATTAC-3'
: : : |||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S3 Urea - S4 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: -0.21 kcal/mol

5'-TAGTATGGCAGCAATTAC-3'
||| :::
3'-CATTAGCGACGGTATGAT-5'
dG: 0.91 kcal/mol

S3 Urea - AS1 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

S3 Urea - AS2 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCAATTAC-3'
: : |||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

S3 Urea - AS3 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCAATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'

dG: -1.81 kcal/mol

S3 Urea - AS4 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCAATTAC-3'
: : ||| :
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

S4 Urea - AS1 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: : : : |||
3'-CACAACTTTGACCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S4 Urea - AS2 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: : ||| :
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: : : : |||
3'-CACAACTTTGTCCCCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S4 Urea - AS3 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -1.81 kcal/mol

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: : : |||
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

S4 Urea - AS4 Urea annealing:

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: : |||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-TAGTATGGCAGCGATTAC-3'
: : : |||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: 0.16 kcal/mol

3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -2.03 kcal/mol

AS3 Urea - AS4 Urea annealing:

AS1 Urea - AS2 Urea annealing:

5'-ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'
: : : ||||
3'-CACAACTTTGTCCCCTA-5'
dG: -2.03 kcal/mol

5'-ATCCTCCAGTTTCAACAC-3'
: : : ||||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -2.03 kcal/mol

5'-ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

5'-ATCCTCCAGTTTCAACAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

AS1 Urea - AS3 Urea annealing:

5'-ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'
||| : :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -0.07 kcal/mol

AS1 Urea - AS4 Urea annealing:

5'-ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'
: : : ||||
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -2.03 kcal/mol

5'-ATCCCCCAGTTTCAACAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGTCCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

AS2 Urea - AS3 Urea annealing:

5'-ATCCCCCTGTTTCAACAC-3'
||| : :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -2.03 kcal/mol

5'-ATCCCCCTGTTTCAACAC-3'
: ||| :
3'-CACAACTTTGACCTCCTA-5'
dG: -0.34 kcal/mol

AS2 Urea - AS4 Urea annealing:

5'-ATCCCCCTGTTTCAACAC-3'
: : : ||||

Anexo 7. Análisis in silico de la especificidad de los iniciadores

Resultados de análisis in silico de especificidad de iniciador S CPT

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2693	NM_004168.4
✓	Homo sapiens chromosome 5 succinate dehydrogenase flavoprotein subunit gene, complete cds	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	9442	AH008093.2
✓	Homo sapiens BAC clone CH17-336L6 from chromosome 3, complete sequence	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	203050	AC245464.3
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2549	NM_001294332.2
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 3, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2450	NM_001330758.2
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	45460	NG_012339.1
✓	Homo sapiens SDHA pseudogene 3 (SDHAP3), non-coding RNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	1153	NR_003263.2
✓	Homo sapiens cDNA FLJ55072 complete cds, highly similar to Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2148	AK295937.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ76840 complete cds, highly similar to Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2286	AK291311.1
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), mRNA (cDNA clone IMAG)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	1961	BC004328.1
✓	Homo sapiens mRNA for Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit, mitochondrial precursor	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2305	AK225027.1
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), mRNA (cDNA clone MGC)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2301	BC001380.2
✓	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2245E15, complete sequence	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	131371	AC091849.2
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), mRNA (cDNA clone MGC)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	1912	BC041016.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ16646 fis, clone TEST14032090	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	4477	AK131478.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ16373 fis, clone THYMU3000269, highly similar to Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	3001	AK131350.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ41509 fis, clone BRTHA2009886	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2044	AK123503.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ37560 complete cds, highly similar to Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2208	AK094879.1
✓	Homo sapiens mRNA for succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein precursor variant protein	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2273	AB208991.1
✓	Homo sapiens mRNA for Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit of complex II, complete cds	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2260	D30648.1
✓	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2083E4, complete sequence	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	156677	AC021087.5

Resultados de análisis in silico de especificidad de iniciador AS CPT

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 1, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2693	NM_004168.4
✓	Homo sapiens	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	6385	AH008466.2
✓	Homo sapiens chromosome 5 succinate dehydrogenase flavoprotein subunit gene, complete cds	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	9442	AH008093.2
✓	Homo sapiens BAC clone CH17-336L6 from chromosome 3, complete sequence	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	203050	AC245464.3
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 2, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2549	NM_001294332.2
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), transcript variant 3, mRNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2450	NM_001330758.2
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	45460	NG_012339.1
✓	Homo sapiens SDHA pseudogene 3 (SDHAP3), non-coding RNA	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	1153	NR_003263.2
✓	Homo sapiens cDNA FLJ55072 complete cds, highly similar to Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2148	AK295937.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ76840 complete cds, highly similar to Homo sapiens succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2286	AK291311.1
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), mRNA (cDNA clone IMAG)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	1961	BC004328.1
✓	Homo sapiens mRNA for Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit, mitochondrial precursor	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2305	AK225027.1
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), mRNA (cDNA clone MGC)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2301	BC001380.2
✓	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2245E15, complete sequence	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	131371	AC091849.2
✓	Homo sapiens succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp), mRNA (cDNA clone MGC)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	1912	BC041016.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ16646 fis, clone TEST14032090	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	4477	AK131478.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ16373 fis, clone THYMU3000269, highly similar to Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	3001	AK131350.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ41509 fis, clone BRTHA2009886	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2044	AK123503.1
✓	Homo sapiens cDNA FLJ37560 fis, clone BRROC2000333, highly similar to Succinate dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein subunit A (SDHA), RefSeqGene (LRG_315)	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2208	AK094879.1
✓	Homo sapiens mRNA for succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein precursor variant protein	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2273	AB208991.1
✓	Homo sapiens mRNA for flavoprotein subunit of complex II, complete cds	Homo sapiens	36.2	36.2	100%	0.28	100.00%	2260	D30648.1

Resultados de análisis in silico de especificidad de iniciador S M. HOMI

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SP3615 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	1153	100%	0.001	100.00%	715990	CP055150.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SP10291 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	997	100%	0.001	100.00%	750518	CP055149.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SS10 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	1012	100%	0.001	100.00%	700135	CP055146.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SP2565 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	1427	100%	0.001	100.00%	712781	CP055144.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain A136 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	1063	100%	0.001	100.00%	696338	CP055143.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 8958 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	1008	100%	0.001	100.00%	680851	CP055142.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain FBG chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	973	100%	0.001	100.00%	780024	CP055151.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 4235 chromosome	Metamycoplasm...	36.2	1124	100%	0.001	100.00%	824840	CP038014.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis ATCC 23114 chromosome complete genome	Metamycoplasm...	36.2	1034	100%	0.001	100.00%	665445	FP236530.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis P100_oppB_oppC_oppD_oppF genes	Metamycoplasm...	36.2	36.2	100%	0.001	100.00%	10414	X99740.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SS25 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	30.2	898	100%	0.062	100.00%	672843	CP055147.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 4788 chromosome	Metamycoplasm...	30.2	887	100%	0.062	100.00%	712385	CP035542.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain TO0613 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	30.2	1135	100%	0.062	100.00%	766228	CP033021.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis strain AF1_complete genome	Metamycoplasm...	22.3	953	100%	15	100.00%	700851	CP009677.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain VO31120 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	20.3	912	100%	59	88.89%	681374	CP055148.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 475 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	20.3	1061	100%	59	88.89%	717777	CP055145.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 35 chromosome	Metamycoplasm...	20.3	945	100%	59	88.89%	811096	CP035543.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain PX1114 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	20.3	1045	100%	59	88.89%	688435	CP032849.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis isolate 2539 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	20.3	927	100%	59	100.00%	751310	CP026341.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis strain Sprott_complete genome	Metamycoplasm...	20.3	1006	100%	59	88.89%	695214	CP011538.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis ATCC 27545_complete genome	Metamycoplasm...	20.3	961	100%	59	88.89%	715165	CP009652.1

Resultados de análisis in silico de especificidad de iniciador AS M. HOMI

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SP10291 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	4524	100%	0.001	100.00%	750518	CP055149.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain VO31120 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3527	100%	0.001	100.00%	681374	CP055148.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SS25 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3531	100%	0.001	100.00%	672843	CP055147.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SS10 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3909	100%	0.001	100.00%	700135	CP055146.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 475 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3612	100%	0.001	100.00%	717777	CP055145.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SP2565 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	4002	100%	0.001	100.00%	712781	CP055144.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain A136 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3567	100%	0.001	100.00%	696338	CP055143.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 8958 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3482	100%	0.001	100.00%	680851	CP055142.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain FBG chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3936	100%	0.001	100.00%	780024	CP055151.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 35 chromosome	Metamycoplasm...	36.2	4031	100%	0.001	100.00%	811096	CP035543.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain TO0613 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3945	100%	0.001	100.00%	766228	CP033021.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain PX1114 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3468	100%	0.001	100.00%	688435	CP032849.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis isolate 2539 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3766	100%	0.001	100.00%	751310	CP026341.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis strain Sprott_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3292	100%	0.001	100.00%	695214	CP011538.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis strain AF1_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3224	100%	0.001	100.00%	700851	CP009677.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis ATCC 27545_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3668	100%	0.001	100.00%	715165	CP009652.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain MIN-132 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3799	100%	0.001	100.00%	708710	CP086131.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis ATCC 23114 chromosome complete genome	Metamycoplasm...	36.2	3078	100%	0.001	100.00%	665445	FP236530.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Mycoplasma hominis P100_oppB_oppC_oppD_oppF genes	Metamycoplasm...	36.2	89.2	100%	0.001	100.00%	10414	X99740.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain SP3615 chromosome_complete genome	Metamycoplasm...	32.2	3704	100%	0.016	100.00%	715990	CP055150.1
<input checked="" type="checkbox"/>	Metamycoplasma hominis strain 4788 chromosome	Metamycoplasm...	32.2	3966	100%	0.016	100.00%	712385	CP035542.1

Resultados de análisis in silico de especificidad de iniciador S UREA

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Ureaplasma urealyticum strain 315 chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	28.2	7529	100%	0.22	94.44%	853955	CP039963.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain 132 chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	28.2	7508	100%	0.22	94.44%	825366	CP041200.1
✓	Ureaplasma parvum strain 106 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6307	100%	0.22	100.00%	741809	CP041199.1
✓	Ureaplasma parvum serovar 3 OMC-P162 DNA, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6062	100%	0.22	100.00%	732031	AP018561.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu uu3 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6044	100%	0.22	100.00%	727176	CP021991.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu1229 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6070	100%	0.22	100.00%	737737	CP021990.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu3h07 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6025	100%	0.22	100.00%	723292	CP021989.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu3h05 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6011	100%	0.22	100.00%	722452	CP021988.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu3h04 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6060	100%	0.22	100.00%	732889	CP021987.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU WJSL chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	28.2	7435	100%	0.22	94.44%	827615	CP062067.1
✓	Ureaplasma parvum strain MIN-198 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	28.2	6199	100%	0.22	100.00%	726862	CP086127.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain MIN-201 chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	28.2	7447	100%	0.22	94.44%	816741	CP086123.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-10 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	28.2	100%	0.22	94.44%	482	KM086686.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-9 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	44.6	77%	0.22	100.00%	482	KM086685.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-8 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	28.2	77%	0.22	100.00%	482	KM086684.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-7 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	44.6	77%	0.22	100.00%	482	KM086683.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-6 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	44.6	77%	0.22	100.00%	482	KM086682.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-5 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	28.2	100%	0.22	94.44%	482	KM086681.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-4 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	28.2	100%	0.22	94.44%	482	KM086680.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-3 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	44.6	77%	0.22	100.00%	482	KM086679.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-2 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	28.2	44.6	77%	0.22	100.00%	482	KM086678.1

Resultados de análisis in silico de especificidad de iniciador AS UREA

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Ureaplasma urealyticum strain 315 chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	36.2	6865	100%	0.001	100.00%	853955	CP039963.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain 132 chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	36.2	6657	100%	0.001	100.00%	825366	CP041200.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU WJSL chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	36.2	6410	100%	0.001	100.00%	827615	CP062067.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain MIN-201 chromosome, complete genome	Ureaplasma ure...	36.2	6573	100%	0.001	100.00%	816741	CP086123.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-10 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	36.2	52.5	100%	0.001	100.00%	482	KM086686.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-5 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	36.2	52.5	100%	0.001	100.00%	482	KM086681.1
✓	Ureaplasma urealyticum strain UU429-4 urease complex component (ureG) gene, partial cds	Ureaplasma ure...	36.2	52.5	100%	0.001	100.00%	482	KM086680.1
✓	Ureaplasma urealyticum serovar 10 str. ATCC 33699, complete genome	Ureaplasma ure...	36.2	7153	100%	0.001	100.00%	874478	CP001184.1
✓	Ureaplasma urealyticum serovar 4 urease complex component UreA (ureA), urease complex component UreB...	Ureaplasma ure...	36.2	85.2	100%	0.001	100.00%	5696	AF085721.2
✓	Ureaplasma urealyticum serovar 2 urease complex component UreA (ureA), urease complex component UreB...	Ureaplasma ure...	36.2	85.2	100%	0.001	100.00%	5696	AF085720.2
✓	Ureaplasma diversum strain ATCC 49782 genome	Ureaplasma dive...	28.2	7941	100%	0.22	94.44%	973501	CP009770.1
✓	Ureaplasma parvum strain 106 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5522	100%	0.87	100.00%	741809	CP041199.1
✓	Ureaplasma parvum serovar 3 OMC-P162 DNA, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5555	100%	0.87	100.00%	732031	AP018561.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu uu3 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5535	100%	0.87	100.00%	727176	CP021991.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu1229 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5572	100%	0.87	100.00%	737737	CP021990.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu3h07 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5486	100%	0.87	100.00%	723292	CP021989.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu3h05 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5486	100%	0.87	100.00%	722452	CP021988.1
✓	Ureaplasma parvum strain hebnu3h04 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5555	100%	0.87	100.00%	732889	CP021987.1
✓	Ureaplasma parvum strain MIN-198 chromosome, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5396	100%	0.87	100.00%	726862	CP086127.1
✓	Ureaplasma parvum serovar 3 DNA, complete genome, strain: SV3F4	Ureaplasma par...	26.3	5558	100%	0.87	100.00%	727289	AP014584.1
✓	Ureaplasma parvum serovar 3 str. ATCC 700970, complete genome	Ureaplasma par...	26.3	5672	100%	0.87	100.00%	751719	AF222894.1

REFERENCIAS

- Acosta, B., Codina, M., Matas, A. y Meseguer, M. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Mycoplasma* spp. y *Ureaplasma* spp. En E. Cercenado y R. Cantón. (1ra Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica*. SEIMC. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia40.pdf>
- Alonso; Galán; Fernández; Rodríguez, Domínguez; Salinas y Sanbonmatsu (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. *Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia44.pdf>
- Álvarez, Colín (2012). Incidencia de *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* en mujeres que acuden al Hospital de Ginecología y Obstetricia del IMIEM. *Archivos de Investigación Materno Infantil*, IV(3). <https://www.medigraphic.com/pdfs/imi/imi-2012/imi123d.pdf>
- Anal. Methods (2014). PCR – the polymerase chain reaction. *The Royal Society of Chemistry* 6(59). doi:10.1039/c3ay90101g
- Bolivar, Ana; Rojas, Agustina y García, Pablo (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, (3)1. <https://www.redalyc.org/pdf/3313/331330398005.pdf>
- Cardona, Arias; Valencia, Arredondo; Suárez, Henao y Herrera, Posada (2015). Prevalencia de vaginosis bacteriana en usuarios de una institución prestadora de servicios de salud de Medellín Colombia. *Investigaciones Andina*, 17(30). <https://www.redalyc.org/pdf/2390/239035878002.pdf>
- De Dios; Ibarra y Velasquillo (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad* 2(2). <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/publicaciones.cgi?IDREVISTA=279>

Escobedo, Guerra; López, Hurtado; Gutiérrez, Trujillo y Guerra; Infante (2021). Prevalencia de Chlamydia trachomatis en mujeres del Hospital General de Zona No. 29. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 59(4).
<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2022/02/1358424/3972-26926-1-pb.pdf>

Gaydos y Quinn (2022). Infecciones por chlamydia. En Harrison. *Principios de Medicina Interna*, (21e). McGraw Hill.
<https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3118§ionid=267824127>

Hardy R (2022). Infecciones por micoplasmas. En Harrison. (21e). *Principios de Medicina Interna*. McGraw Hill.
<https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3118§ionid=267816700>

Henrich, Birgit; Hopfe, Miriam; Kitzerow, Annette y Hadding, Ulrich (1999). The Adherence-Associated Lipoprotein P100, Encoded by an opp Operon Structure, Functions as the Oligopeptide-Binding Domain OppA of a Putative Oligopeptide Transport System in Mycoplasma hominis. *Journal of Bacteriology*, (181)16.
<https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/JB.181.16.4873-4878.1999>

<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X16302142>

Instituto Mexicano del Seguro Social (2009). Diagnóstico y Tratamiento de la Vaginitis Infecciosa en Mujeres en Edad Reproductiva en Primer Nivel de Atención, México.
http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/guiasclinicas/081GER_1.pdf

Jameson J, Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., y Loscalzo (2020). Infecciones de transmisión sexual y del aparato reproductor. En Harrison. (20e). *Manual de Medicina*. McGraw Hill.
<https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2943§ionid=25078210>

Jaweed, Ahmed; Jyoti, Rawre; Neha, Dhawan; Neena, Khanna y Benu, Dhawan (2021). Mycoplasma hominis: An under recognized pathogen. *Indian Journal of Medical*

Microbiology, 39(1).

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0255085720300232?via%3>

Dihub

Jiménez, Flores; Flores, Tlalpa; Ruiz, Tagle y Villagrán, Padilla (2020). Evaluación de los métodos utilizados para el diagnóstico de vaginosis bacteriana en el Hospital Regional ISSSTE Puebla. *Ciencia UAT* 14(2).

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-

[78582020000100062](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582020000100062)

Kokkayil y Dhawan (2015). Ureaplasma: Current perspectives. *Indian Journal of Medical Microbiology* 33(2).

<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0255085721002449?token=CABE8297C>

[DFAE7B8CAE2DCD6A4437B6278A36D1A47A40F30D7BFD61BE9C6D44F1A](https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0255085721002449?token=CABE8297C)

[9663485504610130A6CB26314EF00C&originRegion=us-east-](https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0255085721002449?token=CABE8297C)

[1&originCreation=20230115194449](https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0255085721002449?token=CABE8297C)

Kong y Gilbert (2004). Postgenomic taxonomy of human ureaplasmas – a case study based on multiple gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (54)1.

<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/54/5/1815.pdf?expires=1674498192&id=id&accname=guest&checksum=E8E9949B0A8185FA050B7>

[D70E607B1B0](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/54/5/1815.pdf?expires=1674498192&id=id&accname=guest&checksum=E8E9949B0A8185FA050B7)

Kong, James, Zhenfang, Gordon, Wang y Gilbert (2000). Phylogenetic analysis of *Ureaplasma urealyticum* - support for the establishment of a new species, *Ureaplasma parvum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, (49)1.

<https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/49/4/ijsem-49-4->

[1879.pdf?expires=1674497866&id=id&accname=guest&checksum=E7068D604F8](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/49/4/ijsem-49-4-)

[58CF191FD36513A8FA5B1](https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/49/4/ijsem-49-4-)

Kong; James; Gordon y Gilbert (2000). Species Identification and Subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* Using PCR-Based Assays. *Journal of Clinical Microbiology* 38(3).

<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.38.3.1175->

[1179.2000](https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JCM.38.3.1175-1179.2000)

- Kraus, S., Jacobs, N., Chandler, F. y Arum, E. (1977). Experimental Animal Infections with Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum. *Infection and Immunity* (16)1. Doi: 10.1128/iai.16.1.302-309.1977
- Laszlo K., Southern, T., Downey, C., Watkins, H., Randall, L., Taylor, L., Sturdevant, G., Whitmire, W. y Caldwell, H. (2014). Chlamydia trachomatis Polymorphic Membrane Protein D Is a Virulence Factor Involved in Early Host-Cell Interactions. *Infection and Immunity* (82)7. Doi: 10.1128/IAI.01686-14.
- Lifeder (2022). Ureaplasma. <https://www.lifeder.com/ureaplasma/>
- López, Hurtado; García, Romero; Escobedo, Guerra; Bustos, López y Guerra, Infante (2018). Prevalencia de la infección genital por Chlamydia trachomatis en mujeres que asisten al Instituto Nacional de Perinatología de la Ciudad de México. *Rev. Chilena Infectol.* 35(4). <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v35n4/0716-1018-rci-35-04-0371.pdf>
- Méndez, Sebastián y Pérez, Eduardo (2004). La PCR múltiple en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, (22)3. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73059-1](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73059-1)
- Meseguer, Peinado; Acosta, Boga; Matas, Andreu y Codina, Grau (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por Mycoplasma. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8). doi: 10.1016/j.eimc.2011.10.020
- NIH (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR) Fact Sheet. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>
- Ostos, Ortiz y Mélida, Sánchez (2003). Chlamydia trachomatis: avances y perspectivas. *NOVA- PUBLICACIÓN CIENTÍFICA*, 1(1). <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/14/26>
- Perera, Carmen y Acevedo, Ana (2018). Nuevas tendencias en el diagnóstico de enfermedades virales en los animales. *Revista de Salud Animal*, (40)3. <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v40n3/2224-4700-rsa-40-03-e02.pdf>
- Riedel; Hobden; Miller; Morse; Mietzner; Detrick; Mitchell; Sakanari; Hotez y Mejia (2020). Micoplasmas y bacterias con pared defectuosa. En Jawetz; Melnick y

- Adelberg. *Microbiología Médica*, (28e). McGraw Hill. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2955§ionid=249740982>
- Riedel; Hobden; Miller; Morse; Mietzner; Detrick; Mitchell; Sakanari; Hotez y Mejia R (2020). Chlamydia spp. En Jawetz, Melnick & Adelberg. *Microbiología Médica*, (28e). McGraw Hill. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=2955§ionid=249741170>
- Rivera, Tapia; Centeno, Torres; Santellan, Olea y Rodríguez, Preval (2004). Prevalencia de Ureaplasma urealyticum en mujeres. *Revista Mexicana de Patología Clínica*, 51(1). <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2004/pt041g.pdf>
- Rodríguez, Preval; Fernández, Molina; Rodríguez; Berdasquera y Rivera, Tapia (2007). PCR-Múltiple para el diagnóstico de Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum y Ureaplasma urealyticum. *Rev. Perú Med. exp. salud pública*, 24(2). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342007000200009
- Ryan (2022). Mycoplasma. En Sherris y Ryan. (8e)., *Microbiología Médica*. McGraw Hill. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3217§ionid=272419845>
- Ryan (2022). Chlamydia. En Sherris & Ryan. *Microbiología Médica*, (8e). McGraw Hill. <https://accessmedicina.bibliotecabuap.elogim.com/content.aspx?bookid=3217§ionid=272419898>
- Sayada, Chalom; Denamur, Erick y Elion, Jacques (1992). Complete sequence of the major outer membrane protein-encoding gene of Chlamydia trachomatis serovar Da. *Gene*, (120)1. doi:10.1016/0378-1119(92)90022-h
- Valencia, Arredondo y Yepes, López (2018). Prevalencia y factores asociados con vaginosis bacterianas, candidiasis y tricomoniasis en dos hospitales de los municipios de Apartadó y Rionegro -Antioquia, 2014. *IATREIA* 31(2). <http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v31n2/0121-0793-iat-31-02-00133.pdf>

Van, Der Pol y Unemo (2014). Infecciones por clamidias. En OMS. *Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana*.
https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/38597/9789243505848_spa.pdf

Villegas, Victoria; Sánchez, Magda y Chuaire, Lilian (2009). Reacción en cadena de la polimerasa y diagnóstico molecular. *Colombia Médica*, (40)3.
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95342009000300011