



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS
CENTRO DE DETECCIÓN BIOMOLECULAR
POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA**



TESIS:

“Detección de micoplasmas y cocos piógenos en pacientes positivos a SARS-CoV-2”

para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA MÉDICA**

Presenta:

Q.F.B. AXEL PIÑA FLORES

Directora de tesis:

D.C. MARÍA LILIA CEDILLO RAMÍREZ

Codirector de tesis:

D. C. JORGE ANTONIO YÁÑEZ SANTOS

Puebla, Pue.

Enero 2024



BUAP

Puebla, Pue. a 16 de enero 2024.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
PRESENTE.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de tesis de maestría del alumno **Axel Piña Flores**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:


"Detección de micoplasmas y cocos piógenos en pacientes positivos a SARS-CoV-2"


A nuestro juicio, el alumno **Axel Piña Flores** puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente,
"Pensar Bien Para Vivir Mejor"


D.C. Patricia Lozano Zarain


D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia


D.C. Claudia F. Martinez de la Peña


D.C. Cristina Lara Ochoa



Posgrado en Ciencias Microbiológicas
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC11,
Ciudad Universitaria
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00 Ext. 2522
posgrado.microbiologia@correo.buap.mx

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco principalmente a mi prometida Gaby y a mi familia por apoyarme a lo largo de estos años en el posgrado.

A la Dra. María Lilia Cedillo Ramírez y el Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos por permitirme ser su alumno de maestría y por haberme confiado el presente trabajo de investigación.

A los integrantes del Centro de detección Biomolecular de la BUAP por el apoyo brindado en el desarrollo del presente trabajo de investigación, en especial a la Dra. Cristina Lara Ochoa por estar al pendiente de mi trabajo y por la amistad brindada a lo largo de estos años.

A el Dr. Abraham Medrano López por apoyarme de manera desinteresada en este proyecto y por su amistad.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Eje IV. Modelo de Investigación abierta y compartida. Objetivo 13. Formar recursos humanos que impacten positivamente el contexto social y científico como consecuencia de su accionar en una comunidad para lograr una educación desarrolladora de la transformación. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional (2021-2025) Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2013-2017.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	3
2.1 SARS-CoV- 2.....	3
2.2 Enfermedad COVID-19	4
2.3 Carga Vírica y duración de la infección	4
2.4 Manifestaciones clínicas	5
2.5 Factores de riesgo	6
2.6 Diagnóstico.....	7
2.6.1 RT-qPCR	7
2.7 Análisis de Curvas de disociación (Melting curves).....	9
2.8 Micoplasmas.....	12
2.8.1 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	13
2.9 Cocos piógenos	14
2.9.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	14
2.9.2 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	15
3. Antecedentes	16
4. Justificación.....	19
5. Objetivos	20
5.1 Objetivo general	20
5.2 Objetivos específicos.....	20
6.1 Muestras clínicas	21
6.1.1 Criterios de inclusión (grupo de estudio)	21
6.1.2 Criterios de inclusión (grupo control)	21
6.1.3 Criterios de exclusión (grupo de estudio y grupo control).....	21
6.2 Metodología.....	23
6.2.1 Diagrama general de trabajo	23
6.2.2 Cepas control para estandarización de PCR	24
6.2.3 Oligonucleótidos usados.....	26
6.4 Extracción de ADN	28
6.5 Evaluación de oligonucleótidos por PCR punto final.....	28
6.6 Estandarización de PCR Múltiplex y análisis Melting.....	29
7. Resultados	31
7.1 Evaluación de oligonucleótidos	31

7.1.1 Evaluación de oligonucleótidos para <i>S. aureus</i>	31
7.1.2 Evaluación de oligonucleótidos para <i>S. pneumoniae</i>	32
7.1.3 Evaluación de oligonucleótidos para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	33
7.1.4 Evaluación de oligonucleótidos para <i>GAPDH</i> (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	34
7.2 Estandarización de PCR múltiple en tiempo real	35
7.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	35
7.2.2 <i>S. pneumoniae</i>	36
7.2.3 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	37
7.2.4 <i>GAPDH</i>	37
7.3 Segunda fase de estandarización de PCR múltiple en tiempo real	38
7.4 Resultados de muestras clínicas	40
7.5 Síntomas clínicos de los pacientes	45
8. Discusión	48
9. Conclusiones	53
10. Perspectivas del trabajo.....	54
11. Bibliografía	55
12. Anexos.....	62
12.1 Anexo 1. Preparación de medio de cultivo Eaton con Glucosa	62
12.2 Anexo 2. Carta de consentimiento informado.....	63
12.3 Anexo 3. Cuestionario de síntomas clínicos.....	64

1. Introducción

A principios de diciembre de 2019, en Wuhan, China, se notificó la aparición de un nuevo coronavirus, genéticamente afín al SARS-CoV-1, designado como SARS-CoV-2. Este virus es el agente causal de la pandemia de COVID-19, la cual fue oficialmente declarada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en marzo de 2020. El periodo de incubación de la COVID-19 oscila entre 2 y 14 días en el hospedero, manifestándose con síntomas comunes que incluyen tos, fiebre, cefalea, diarrea y dificultad para respirar. En casos graves, la infección puede requerir hospitalización para ventilación mecánica y suplementación de oxígeno, llegando, en situaciones severas, a provocar la muerte.

Históricamente, pandemias anteriores causadas por virus respiratorios han revelado la asociación con otros microorganismos, como virus, bacterias y hongos, los cuales pueden generar complicaciones durante el curso de la infección. En particular, este estudio se enfoca en las micoplasmas, microorganismos autorreplicables de menor tamaño, responsables de neumonías atípicas, así como en los cocos piógenos *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, que causan diversas enfermedades respiratorias, incluyendo neumonía y bacteriemia. El objetivo principal de esta investigación consistió en la detección de estos microorganismos en pacientes tanto positivos como negativos para SARS-CoV-2, estandarizando y aplicando una herramienta rápida y sensible para evaluar la especificidad de los productos de PCR, que permita identificar las secuencias de ácidos nucleicos de diferentes microorganismos presentes en muestras de pacientes sospechosos a la infección por dicho virus, se trata de las curvas de disociación o curvas melting, dicha herramienta somete las muestras de ADN a un aumento gradual de temperatura, observando una transición en la curva de fluorescencia que indica el punto en el cual las hebras complementarias de ADN se separan. Esta información es útil para determinar la presencia y la especificidad de secuencias, lo que es esencial en aplicaciones como la identificación de microorganismos. Se buscó

comprender la correlación entre estos microorganismos y las infecciones virales, como el COVID-19, relacionando y comparando los resultados con la sintomatología que podría agravar la infección causada por este virus respiratorio. Los resultados obtenidos indican que los pacientes con infección positiva a COVID-19 y la presencia de *Streptococcus pneumoniae* presentaron una sintomatología más pronunciada en comparación con aquellos que solo fueron positivos para COVID-19. Los síntomas más comunes en esta cohorte incluyeron dolor de cabeza, tos, fatiga y dolor de garganta, además de la pérdida del olfato y gusto, especialmente notoria en los pacientes positivos a COVID-19 durante la segunda ola. Por otro lado, aquellos en los que se detectó *Mycoplasma pneumoniae* mostraron una sintomatología clínica común, destacando fiebre, tos, dolor de garganta y fatiga, con pérdida de olfato y gusto también observada en pacientes positivos a COVID-19 durante la segunda ola. Finalmente, en pacientes con la presencia de *Staphylococcus aureus*, se manifestaron síntomas como tos, dolor de garganta y fiebre, aunque es relevante señalar que estos pacientes tenían una muestra negativa para SARS-CoV-2. En general, se observó un mayor número de manifestaciones clínicas en aquellos pacientes con muestras positivas tanto para COVID-19 como para otros microorganismos, como *Mycoplasma pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae*.

Palabras clave: Coronavirus, SARS-CoV-2, COVID-19, Pandemia, Síntomas, Hospitalización, Complicaciones, Micoplasmas, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, Neumonías atípicas, herramienta rápida y sensible, Curvas de disociación, Correlación, Infecciones virales.

2. Marco Teórico

2.1 SARS-CoV- 2

El día 2 de diciembre del año 2019 en la ciudad de Wuhan, China se reportó la aparición de un coronavirus llamado SARS-CoV-2 (Síndrome respiratorio agudo severo coronavirus 2), el cual es genéticamente similar a SARS-CoV-1, pero con características que permite diferenciarlos (Cevik. *et al.*, 2020). Se trata de un β - coronavirus de RNA de cadena + con una secuencia similar a SARS-CoV-1(80%), este virus presenta una glicoproteína en su superficie con forma de “espiga” conocida como “spike”(S), una proteína que lo envuelve conocida como “envelope”(E), proteínas de membrana (M) y proteínas de nucleocápside (N)(Yan *et al.*, 2020)(figura 1).La enfermedad causada por este patógeno recibe el nombre de COVID-19, la rápida propagación de SARS-CoV-2 ha tenido un efecto negativo en el sistema de salud mundial, así como estragos en la economía.

Estructura de SARS-CoV-2

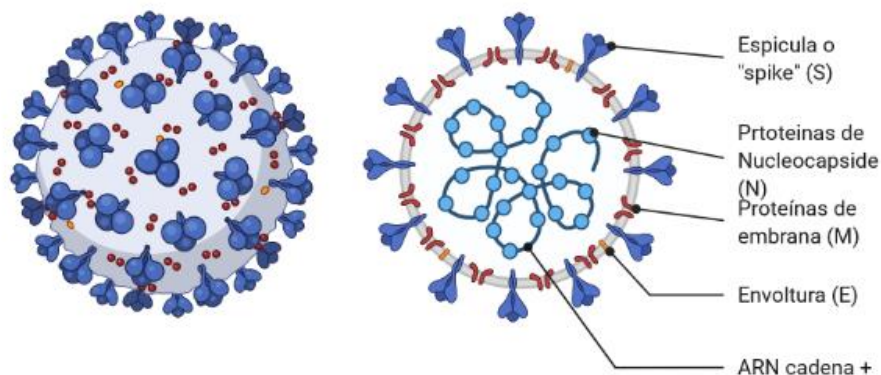


Figura 1. Estructura de SARS-CoV-2 adaptado de Human Coronavirus structure BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>.

2.2 Enfermedad COVID-19

Es una enfermedad causada por el coronavirus SARS-CoV-2, que afecta principalmente al sistema respiratorio; sin embargo, puede afectar a múltiples órganos, los síntomas más comunes son: fiebre, tos y dificultad para respirar (Mehta *et al.*, 2021). Después de la entrada del virus a la célula hospedera, este se replica en la mucosa epitelial del tracto respiratorio superior, para migrar después a el pulmón en donde se lleva a cabo mayormente la replicación del virus. El virus utiliza a la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) como su receptor para entrar a la célula, esta enzima se localiza principalmente en la mucosa del tracto respiratorio, células endoteliales, corazón, intestino y riñones, por lo que SARS-CoV-2 tiene la capacidad de replicarse en estos órganos (Tay *et al.*, 2020). La replicación del virus conduce a una respuesta inflamatoria exponencial, en la cual ocurre una producción de citocinas proinflamatorias y quimiocinas, que conduce a la activación y migración de neutrófilos ocasionando la característica tormenta de citocinas.

2.3 Carga Vírica y duración de la infección

En el tracto respiratorio, la carga máxima de SARS-CoV-2 se observa al momento del inicio de los primeros síntomas o en la primera semana de la enfermedad, posteriormente se observa una disminución de esta carga, lo que explica que el potencial de infecciosidad más alto se presente dentro de los primeros cinco días del inicio de los síntomas (figura 2)(Cevik *et al.*,2020) .La detección de ARN viral por RT-PCR no se traduce necesariamente a infecciosidad y raramente se ha detectado SARS-CoV-2 mediante esta técnica después de 14 días después de los primeros síntomas de enfermedad. (Buitrago-García *et al.*, 2020)

Los pacientes que presentan un cuadro clínico grave o inmunocomprometidos pueden tener altas cargas virales aún después de la primera semana de la enfermedad. En cuanto a las personas que no presentan síntomas, pero si una

muestra positiva puede transmitir la infección, aunque su grado relativo de infecciosidad parece ser limitado (Tay *et al.*, 2020).

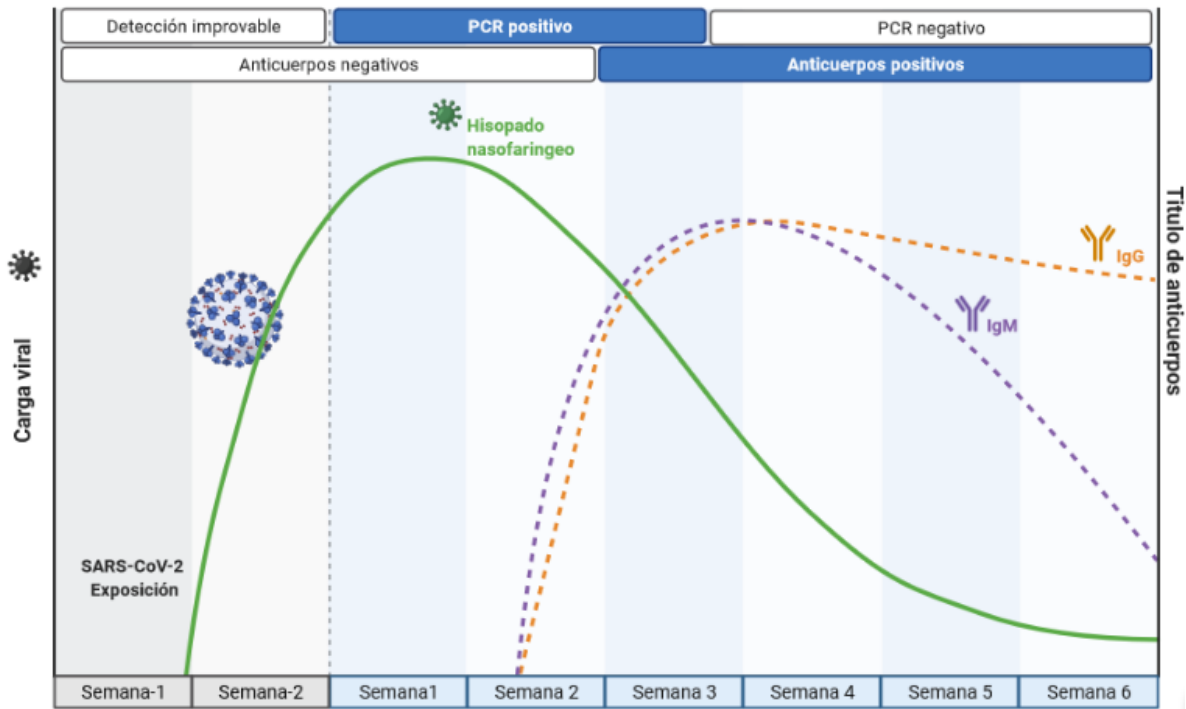


Figura 2. Carga vírica durante la infección de SARS-CoV-2. la carga máxima de SARS-CoV-2 se observa al momento del inicio de los primeros síntomas o en la primera semana de la enfermedad, posteriormente se observa una disminución de esta carga, lo que explica que el potencial de infecciosidad más alto se presente dentro de los primeros cinco días del inicio de los síntomas. Adaptado de Time Course of COVID-19 Infection and Test Positivity BioRender.com (2022). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

2.4 Manifestaciones clínicas

Según la OMS Los síntomas más habituales de la COVID-19 son: Fiebre, tos seca y cansancio. Otros síntomas que se presentan con menor presencia son: congestión nasal, dolor de cabeza, dolores musculares, conjuntivitis, pérdida del gusto o el olfato, dolor de garganta, náuseas o vómitos, diarrea, escalofríos o vértigo. Dentro de los síntomas de un cuadro grave de COVID-19 se incluyen los siguientes: Disnea, pérdida de apetito, confusión, dolor u opresión persistente en el pecho, temperatura por encima de los 38° (Couzin & Frankel 2020).

Existen síntomas que son menos frecuentes que los anteriormente mencionados como la irritabilidad, ansiedad, depresión, trastornos del sueño, accidentes cerebrovasculares y lesiones neurales. La sintomatología aparece entre los 2 y 14 días posteriores a la exposición viral, los síntomas y los signos de COVID-19 no son específicos y no puede diferenciarse clínicamente de otras infecciones respiratorias víricas, aunque el desarrollo de disnea tras varios días del inicio de los síntomas es sugestivo de COVID-19 (Mohemadian M. *et al.*, 2020).

Los síntomas asociados más frecuentes incluyen: tos (50%), fiebre subjetiva o mayor de 38 °C (43%), mialgias (36%), dolor de cabeza (34%), disnea (29%), dolor de garganta (20%), diarrea (19%), náuseas/vómitos (12%), anosmia, ageusia, disgeusia (Martínez -Chamorro *et al.*, 2021). Algunos pacientes pueden presentar una progresión rápida a una lesión pulmonar aguda. Y ARDS (Síndrome de dificultad respiratoria agudo) con shock séptico. Los pacientes con COVID-19 pueden desarrollar una saturación de oxígeno reducida en sangre ($\leq 93\%$) con saturación de oxígeno hasta 50 o 60% en casos graves (Couzin & Frankel 2020).

En casos severos los pacientes requieren de hospitalización, para ventilación mecánica, suplementación de oxígeno, terminando en la muerte del paciente. (Cyprian.F *et al.*, 2021).

2.5 Factores de riesgo

A nivel mundial, el contar con una edad avanzada se ha asociado con una tasa de mortalidad alta. Se ha reportado una tasa de letalidad del 15 al 20% en adultos mayores de 80 años, del 15 al 20% en adultos con un rango de edad de 70 a 79 años (Martínez -Chamorro *et al.*, 2021). Enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades respiratorias crónicas, hipertensión, enfermedades autoinmunes, cáncer, así como también obesidad se han asociado con un alto riesgo de muerte. Es importante mencionar que en hombres la tasa de mortalidad es mayor que en mujeres (Jordan *et al.*, 2020).

2.6 Diagnóstico

Un diagnóstico temprano y el aislamiento de pacientes infectados juega un papel importante en el curso de la enfermedad y la transmisión de este virus. Existen diferentes métodos, el uso de estos depende de la población y los recursos que se tienen al alcance. Las técnicas de diagnóstico que se usan hasta el momento son; sintomatología clínica, tomografías computarizadas, técnicas moleculares (RT-PCR) y pruebas serológicas (Mohamadian, M. *et al.*, 2021).

2.6.1 RT-qPCR

En la técnica de PCR en tiempo real, se generan curvas de amplificación que representan la síntesis exponencial de las copias del gen diana marcado con fluorescencia o sondas. Estas curvas se visualizan mediante la representación gráfica donde el eje vertical (ordenadas) muestra la intensidad de fluorescencia, que está relacionada con la cantidad de ADN amplificado, y el eje horizontal (abscisas) indica el número de ciclos de la reacción de PCR, durante cada ciclo de la PCR, se produce una duplicación exponencial del ADN objetivo marcado con fluorescencia. A medida que avanzan los ciclos, la cantidad de ADN amplificado aumenta de manera exponencial, y esto se refleja en el aumento de la intensidad de fluorescencia registrada. El análisis de estas curvas permite determinar el punto en el que se inicia la amplificación exponencial, la eficiencia de la reacción y la cantidad inicial de ADN presente en la muestra original. Además, las sondas o marcadores fluorescentes específicos permiten la detección y cuantificación en tiempo real, proporcionando resultados precisos y cuantitativos. (Cubillos *et al.*, 2016).

2.6.2 RTq- PCR como método de detección de SARS-CoV-2

La secuenciación del genoma completo de SARS-CoV-2 permitió el diagnóstico temprano del virus mediante técnicas de biología molecular derivadas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las cuales siguen vigentes hoy en día. Usar la proteína S como objetivo de la amplificación para el diagnóstico demostró alta

especificidad, pero baja sensibilidad. Se ha hecho uso de oligonucleótidos que busquen amplificar genes virales específicos como lo son los encargados de codificar para la polimerasa (RdRp), nucleocápside (N) y Envoltura (E). (Chau *et Al.*, 2020)

La manera en la que se realiza la toma de muestra es mediante un hisopado nasofaríngeo y/o orofaríngeo, una vez colectada la muestra, estos hisopos se colocan en un medio de transporte viral universal bajo condiciones refrigerante. Posteriormente se realiza una extracción de ARN mediante kit, estos ácidos nucleicos se utilizan para realizar una RT-qPCR ocupando una retro transcriptasa para obtener cDNA a partir del ARN, el cual servirá como molde para que una polimerasa sintetice la cadena complementaria de DNA, (figura 3). La OMS recomienda buscar la amplificación de el gen E de envoltura y el gen RdRp que codifica para la RNA polimerasa de SARS-CoV-2 . En el 2020 el Centro para control y prevención de enfermedades (CDC) publicó un protocolo para realizar la detección de SARS-CoV-2. Dicho protocolo consiste en una RT-PCR múltiple en tiempo real para la detección cualitativa simultanea de SARS-CoV-2, virus de Influenza A y/o virus de influenza B en muestras de las vías respiratorias superiores o inferiores (CDC Influenza SARS-CoV-2 Multiplex Assay, 2021). Este ensayo también contiene oligonucleótidos para detectar el gen de la RNasa P humana (RP) en muestras clínicas o muestras de control para asegurar que la extracción de ARN se haya llevado a cabo de manera correcta, los oligonucleótidos para la detección de SARS-CoV-2. Cada sonda utilizada en el marcado de esta región posee una longitud de onda única, lo que permite distinguir y diferenciar entre los diferentes genes que se están amplificando. Durante el proceso de PCR en tiempo real, la señal fluorescente generada por estas sondas se monitorea en cada ciclo de amplificación. La detección se realiza al establecer un límite de amplificación, conocido como "Threshold" o umbral. Si la señal fluorescente supera este umbral en algún punto durante los ciclos de amplificación, se considera una prueba positiva. Este enfoque permite determinar de manera precisa si la secuencia específica del SARS-CoV-2 está presente en la muestra analizada. Cada sonda fluorescente única contribuye a

la identificación específica de la región amplificada, asegurando la especificidad y sensibilidad del método de detección (figura 3) (Chau *et al.*, 2020).

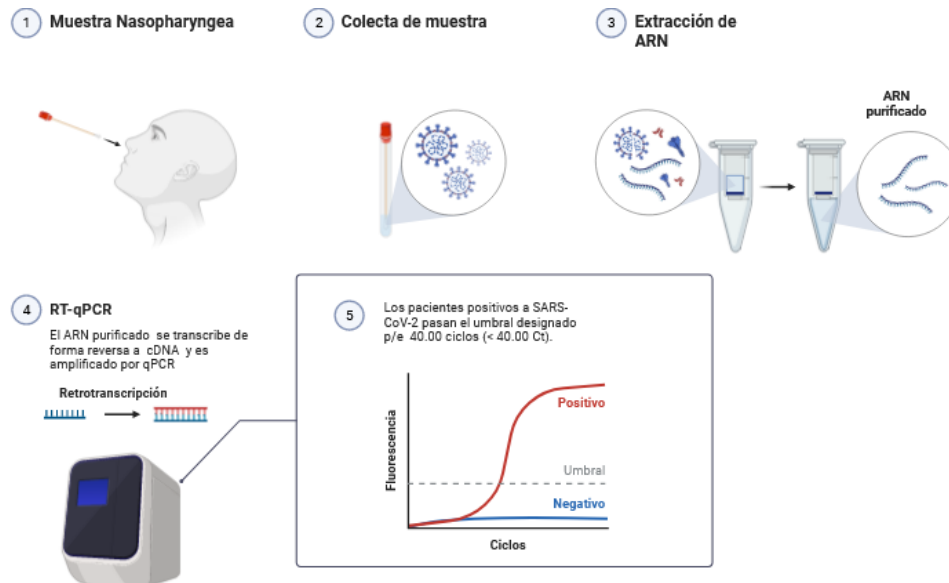


Figura 3. Prueba basada en (r)RT-PCR para el diagnóstico de SARS-CoV-2. Se muestra el proceso para realizar la RT-PCR múltiple en tiempo real según el protocolo publicado por el CDC en el 2020. Primero se hace una extracción de ARN, el cual mediante una retro transcriptasa se obtiene cDNA, este servirá como molde para continuar el proceso. Este protocolo es usado para la detección cualitativa simultanea de SARS-CoV-2(gen N), virus de Influenza A y/o virus de influenza B y el gen de la RNasa P humana (RP). Modificado de "COVID-19 Diagnostic Test through RT-PCR" Obtenido de <https://app.biorender.com/illustrations/65419df3aaf4b454fbb481f1>.

2.7 Análisis de Curvas de disociación (Melting curves)

La técnica de curvas de disociación, también conocida como curvas melting, constituye una etapa posterior a la amplificación en la PCR. Esta metodología implica la aplicación de diversas temperaturas a los amplicones generados durante la PCR, lo que permite obtener una cinética de disociación. El objetivo principal es determinar la Temperatura de Fusión (T_m) característica de la molécula de ADN bajo estudio. La T_m refleja las condiciones en las cuales la doble hélice de ADN se

desnaturaliza, siendo un valor distintivo para cada secuencia específica. Este análisis de curvas melting proporciona información valiosa sobre la composición y de los productos amplificados, contribuyendo a la identificación precisa de las secuencias de interés en la muestra. (Wittwer *et al.*, 2003).

La temperatura de melting (T_m) es la temperatura a la cual se expresa la cantidad de energía que se necesita para separar las hebras de doble cadena de ADN de una secuencia determinada en una proporción del 50%, es decir que, en la T_m , la mitad de la secuencia se encuentra de forma bicatenaria y la otra mitad de forma monocatenaria (figura 4). Esta temperatura (T_m) puede variar de acuerdo con el porcentaje de bases nucleotídicas que presenta una secuencia de ADN, una mayor presencia de G y C supone la unión bajo condiciones más estrictas en comparación a las bases A y T (Buckingham Lela & Flaws Maribeth L. 2007).

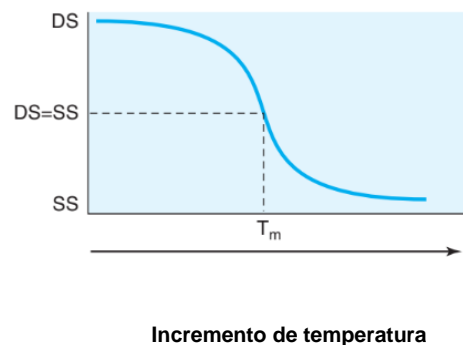


Figura 4. Temperatura de melting (T_m). La t_m es el punto en el cual exactamente la mitad de una secuencia de doble cadena de ADN pasa a dos cadenas sencillas. Esta temperatura está determinada en el punto de inflexión de la curva melting. DS: Cadena Doble, SS: Cadena sencilla. Tomado y modificado de (Buckingham Lela & Flaws Maribeth L. 2007)

Este método se presenta como una herramienta valiosa en la fase postamplificación de datos reales, haciendo uso de un agente intercalante de ADN de doble cadena fluorescente como el bromuro de etidio o SYBR Green. Durante este procedimiento, el equipo incrementa gradualmente la temperatura (aproximadamente $0,3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{seg.}$). Los colorantes específicos para el ADN de doble hebra generan inicialmente una señal alta, ya que, a bajas temperaturas, la mayoría del ADN se encuentra en forma

bicatenaria. A medida que la temperatura se eleva, los dúplex de ADN comienzan a separarse, desprendiéndose en hebras individuales. En consecuencia, se experimenta una disminución progresiva de la señal fluorescente. Este fenómeno se aprovecha para realizar un análisis de las curvas de disociación o curvas melting, permitiendo la identificación de la Temperatura de Fusión (T_m) característica de cada secuencia de ADN. La pérdida gradual de la señal fluorescente a medida que se incrementa la temperatura refleja la desnaturalización progresiva de los dúplex de ADN, lo que resulta crucial en la determinación precisa de la T_m y, por ende, en la identificación específica de las secuencias de interés. así como se observa en la figura 4 (Farrar *et al.*, 2010). La representación visual de este análisis se logra a través de picos, donde se grafica la derivada de la velocidad de disminución de la fluorescencia en función de la temperatura (que se incrementa). En esta representación, la temperatura correspondiente a la Temperatura de Fusión (T_m) de cada secuencia se interpreta como un pico con respecto al eje x (ver Figura 5). En el caso de muestras que contienen diversas secuencias, se generarán distintos picos o curvas de disociación, cada uno correspondiente a la T_m específico de las secuencias presentes en la muestra. Esta variabilidad en los picos es esencial para discernir y distinguir entre las diferentes secuencias de ácidos nucleicos presentes en la muestra analizada (Buckingham Lela & Flaws Maribeth L. 2007).

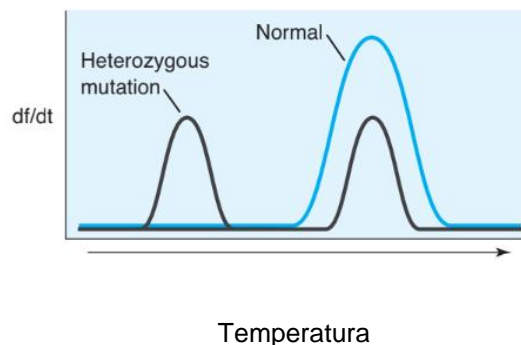


Figura 5. Curvas melting. Gráfica de la derivada de la fluorescencia (df/dt) contra la temperatura que muestran los puntos de inflexión de las curvas melting en forma de picos en la T_m de la secuencia correspondiente. En este caso una muestra Homozygota normal tiene una T_m que se puede distinguir de una T_m en una muestra mutante. Tomado y módificado de (Buckingham Lela & Flaws Maribeth L. 2007)

2.8 Micoplasmas

Se trata de los microorganismos autorreplicables más pequeños conocidos hasta ahora, pertenecen a la clase Mollicute (piel blanda), este grupo de bacterias han evolucionado de un ancestro en común Gram positivo con bajo contenido de G-C (C. Citti & A. Blanchard 2013). Estos microorganismos se han caracterizado por carecer de pared celular, debido al tamaño de su genoma (577-2200kb) debido a ello cuentan con requerimientos nutricionales exigentes en condiciones de laboratorio, el crecimiento de microcolonias en forma de "huevo frito" es característico de *Mycoplasma* (Rivera-Tapia *et al.*, 2001) (figura 6).

Existen dificultades en el momento de cultivar e identificar estos microorganismos a partir de muestras clínicas, que normalmente pueden contener otras bacterias u hongos, por lo que es complicado su diagnóstico y su asociación causal con las enfermedades, por lo que el avance en la secuenciación de genomas ha facilitado la identificación de una gama de especies (Barré, A *et al.*, 2004). Estos microorganismos usualmente son asociados con enfermedades crónicas como el caso de Asma (Baseman & Tully 1997).



Figura 6. Crecimiento colonial de *Mycoplasma* en agar Eaton. Las flechas indican las colonias en donde se observan los rasgos característicos de microcolonias en forma de "huevo frito" (escala de la barra = 0.5 mm). (Tomado de Rivera-Tapia *et al.*, 2001)

En el ser humano han sido identificados 6 diferentes especies de micoplasmas patógenos (*Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma penetrans* y *Mycoplasma fermentans*) que establecen vínculos con enfermedades caracterizadas por una alta morbilidad y una baja morbilidad, estas infecciones pueden ser sistémicas en pacientes inmunocomprometidos. (Rivera-Tapia *et al.*,2006).

Las micoplasmas tienen la capacidad de estimular y suprimir los linfocitos, se ha demostrado que estos microorganismos y sus componentes celulares derivados modulan la actividad de monocitos, macrófagos y las células NK, debido a esta razón inducen en su hospedero una producción de citocinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral, interleucina 1 (IL 1) e IL6, quimiocinas como IL8, proteína 1 quimioatrayente de monocitos y de macrófagos (Muñoz-Zurita *et al.*, 2014).

2.8.1 *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno que comúnmente se asocia con una gama amplia de manifestaciones clínicas que incluyen infecciones de las vías respiratorias, neumonías y también síntomas clínicos extrapulmonares (P. K, Kutty *et al.*, 2019).

Diversos estudios han demostrado que las infecciones por *M. pneumoniae* son influenciadas por el género, edad, antecedentes genéticos, estrés ambiental e infecciones virales, dichos factores pueden contribuir a la amplia gama de manifestaciones clínicas que presentan los pacientes (Chu, H. W *et al.*, 2006) *M. pneumoniae* tiene la capacidad de adherirse a la superficie de la célula epitelial, en donde utiliza moléculas tóxicas para dañar la célula del huésped, induciendo ciliostasis y descamación epitelial, en un esfuerzo por adquirir los nutrientes necesarios para su desarrollo (Atkinson. & Waites, 2014).

Las células de *M. pneumoniae* atraviesan la capa de moco en el tracto respiratorio, los cilios son un sitio de unión inicial, seguido por translocación a la superficie de la célula huésped, a través de la motilidad deslizante que presenta esta bacteria (Prince *et al.*,2014) Las células responden estimulando la producción de mucina,

por lo que exacerba los síntomas de la enfermedad (Hao *et al.*,2014). Las células de *M. pneumoniae* tienen la capacidad de organizarse en superficies como biopelículas lo que sugiere un papel adicional para la adherencia en el proceso de la enfermedad promoviendo la resistencia a las defensas del huésped y antibióticos (Waites *et al.*, 2017).

2.9 Cocos piógenos

Existen microorganismos con la capacidad de afectar diversas partes del organismo al acceder a través de distintas vías. Un ejemplo de estos son los cocos piógenos, que pueden clasificarse tanto como Gram positivos (+) como Gram negativos (-), desencadenando diversos procesos patológicos, tales como supuraciones, formación de abscesos y septicemias potencialmente mortales. Dentro de esta categoría se incluyen especies relevantes como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Neisseria meningitidis* (Microbiología y salud, 2019).

2.9.1 *Staphylococcus aureus*

Se trata de una bacteria Gram (+) con forma de coco, tienden a organizarse en racimos que se describen “en forma de uva”. (Taylor TA & Unakal CG., 2022). No presenta movilidad, algunas cepas producen una cápsula mucoide, es anaerobia facultativa, productora de las enzimas coagulasa y catalasa, en el medio salado de Chapman son capaces de fermentar el manitol (Kuroda *et al.*, 2001). La mayoría de las cepas de *S. aureus* pueden sintetizar enzimas como nucleasas, lipasas y proteasas, las cuales pueden destruir los tejidos del hospedero. También son productoras de β -lactamasas. *Staphylococcus aureus* es un patógeno humano y al mismo tiempo una bacteria comensal, se estima que aproximadamente el 30% de la población humana está colonizada con *S. aureus* (Wertheim HF *et al.*, 2005). Simultáneamente, es uno de las principales agentes causantes de neumonía y otras infecciones del tracto respiratorio, bacteriemia y endocarditis infecciosa, además de

estar relacionada con infecciones ocasionadas por dispositivos médicos. (Tong, S. Y., *et al.*, 2015).

La bacteriemia causada por *S. aureus* tiene una tasa de incidencia de 20 a 50 casos por cada 100, 000 habitantes en el mundo por año, aproximadamente del 10 al 30 % de estos pacientes mueren debido a la infección. (van Hal *et al.*, 2012). Las infecciones causadas por *S. aureus* se catalogan como problemáticas debido a la frecuencia de cepas resistentes a diferentes antibióticos, siendo la cepa resistente a meticilina (MRSA) la más importante clínicamente. (Turner, 2019).

2.9.2 *Streptococcus pneumoniae*

También conocido como *pneumococcus* se trata de una bacteria Gram (+), anaerobia facultativa, catalasa negativa, inmóvil y presenta cápsula, a la observación en microscopio se pueden presentar en cadenas de 2 (diplococos), en cultivo crece en agar sangre formando colonias mucosas rodeadas de un halo de α -hemólisis (TC. Barnett *et al* 2015). En el 2017 la Organización mundial de la salud (OMS) incluyó a este patógeno como uno de los 12 patógenos prioritarios, para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos ya que las tasas en constante aumento de resistencia a la penicilina y otros antibióticos han suscitado un creciente interés en el ámbito de la prevención. (Weiser, J. N. 2018) Se considera como un patógeno que puede colonizar las superficies mucosas del tracto respiratorio alto del humano, también mantienen una relación de comensalismo con el hospedero, aproximadamente *S. pneumoniae* coloniza cerca del 10% de la población (Yahiaoui *et al.*, 2016). *S pneumoniae* es una bacteria causante de una gama amplia de infecciones que incluyen neumonía adquirida en la comunidad, meningitis, otitis media y sepsis. (Whitney *et al.*, 2003)

Las infecciones causadas por *S. pneumoniae* son más frecuentes en adultos mayores de 60 años, en niños menores de 2 años y en pacientes que padecen enfermedad renal, cardíaca o pulmonar crónica, así como en diabéticos, inmunodeprimidos y pacientes sin bazo (TC. Barnett *et al.*, 2015).

3. Antecedentes

Cuando en un paciente se hace la detección simultánea de dos o más microorganismos patógenos en una misma muestra, podría existir una correlación entre estos microorganismos. Estas correlaciones se han detectado a lo largo de múltiples pandemias (Soltani *et al.*, 2021). En marzo del 2020 la OMS declaró la pandemia de COVID-19 originada por el virus SARS-CoV-2, desde entonces a partir de diferentes muestras clínicas como hisopados nasofaríngeos, aspirados endotraqueales y sangre periférica provenientes de pacientes positivos a SARS-CoV-2, se ha tratado de detectar la presencia de bacterias destacando a los micoplasmas y cocos piógenos en el tracto respiratorio dado que los síntomas de estas infecciones pueden superponerse con los de la infección ocasionada por SARS-CoV-2, especialmente en las etapas iniciales (Fattorini *et al.*, 2020). En el siguiente apartado se describen algunos de los trabajos más relevantes.

En el año 2020, Easom y colaboradores, en el Reino Unido, llevaron a cabo un estudio utilizando muestras nasofaríngeas de pacientes confirmados positivos al SARS-CoV-2. La investigación se centró en la búsqueda de tres microorganismos específicos: *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae*. De las 49 muestras analizadas, se logró identificar la presencia de *M. pneumoniae* en un paciente, *S. aureus* en otro paciente y *H. influenzae* en un tercer individuo (Tabla 2).

En paralelo, Richardson y colaboradores también realizaron un estudio en el mismo año con el objetivo de detectar dos microorganismos vinculados a neumonías atípicas: *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*. Dicha elección se basó en la similitud sintomática entre las infecciones causadas por estas bacterias y el SARS-CoV-2. Sorprendentemente, solo se logró identificar la presencia de *M. pneumoniae* en un paciente y *C. pneumoniae* en dos pacientes (Tabla 2).

Otra investigación relevante, liderada por Crotty MP. *et al.*, 2020, se propuso la detección de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli* en un conjunto más extenso de muestras de pacientes positivos al SARS-CoV-2

(289 muestras). Los resultados indicaron un mayor número de muestras positivas para *S. aureus* (7/289). Es pertinente señalar que las muestras utilizadas abarcaban tanto el tracto respiratorio alto como el bajo.

En el contexto de los cocos piógenos, focalizando la atención en otro estudio llevado a cabo en China en 2020, se identificó una mayor prevalencia de *Streptococcus pneumoniae* (13/289) seguido de *Staphylococcus aureus* (3/289) entre los pacientes positivos a SARS-CoV-2 (Tabla 2).

Contrariamente, en dos estudios realizados en Estados Unidos, donde se investigó la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*, no se observó ningún paciente positivo para estos microorganismos. No obstante, en un estudio en pacientes pediátricos en China, se detectó la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* en 10 de 74 pacientes positivos a SARS-CoV-2. Esta discrepancia podría deberse a la mayor frecuencia de *M. pneumoniae* en la población infantil, además de la posible influencia de ciclos epidemiológicos que presenta esta micoplasma con una periodicidad de 3-7 años (Tabla 2).

Es esencial destacar que ninguno de los estudios de referencia hizo mención al empleo de grupos control, es decir, muestras de pacientes negativos al virus respiratorio SARS-CoV-2. Este aspecto constituye una consideración importante al evaluar los resultados y la interpretación de las investigaciones mencionadas.

Tabla 1. Antecedentes de Microorganismos detectados en pacientes con SARS-CoV-2.

Número de m.o. detectados/Número de pacientes + a COVID-19	Muestra clinica	Método diagnóstico	País	Referencia
<i>M. pneumoniae</i> (1/67) <i>S. aureus</i> (1/49) <i>H.influenzae</i> (3/49)	Muestras nasofaríngeas	Respiratory panel plus (Biomeriux)	Reino Unido	Easom N. <i>et al.</i> , 2020.
<i>M.pneumoniae</i> (1/42) <i>Chlamydia pneumoniae</i> (2/42)	Muestras nasofaríngeas	RT-PCR (Respiratory panel)	Estados Unidos	Richardson S. <i>et al.</i> , 2020.
<i>S.aureus</i> (7/289) <i>S. pneumoniae</i> (4/289) <i>E.Coli</i> (1/289)	tracto respiratorio alto y bajo.	PCR	Estados Unidos	Crotty MP. <i>et al.</i> , 2020.
<i>S.aureus</i> (3/289) <i>S. pneumoniae</i> (13/289) <i>H.influenzae</i> (23/289)	Muestra nasofaríngea	PCR	China	He F. <i>et al.</i> , 2020
<i>M. pneumoniae</i> (10/74)	Muestras nasofaríngeas de pacientes 18ediátricos	PCR	China	Wu, Q <i>et al.</i> , 2020.
<i>M. pneumoniae</i> (0/459) <i>C.pneumoniae</i> (0/459) <i>B. pertusis</i> (0/459)	Muestras nasofaringeas	Panel respiratorio BioFire Film Array 2	Estados Unidos	Hazra A. <i>et al.</i> , 2020.
<i>M. pneumoniae</i> (0/116) <i>C. pneumoniae</i> (0/116)	Muestras de tracto respiratorio alto y bajo.	Panel de patógenos respiratorios	Estados Unidos	Kim, D <i>et al.</i> , 2020.

4. Justificación

En diciembre del 2019 en Wuhan, China se reportó la aparición de un coronavirus parecido en un 80% a SARS-CoV-1 llamado SARS-CoV-2 meses después la OMS declaró la pandemia de COVID. Se han realizado investigaciones en países como Estados Unidos y China con el objetivo de detectar otros microorganismos patógenos que puedan estar presentes en el tracto respiratorio de pacientes positivos a SARS-Cov-2, lo que podría causar complicaciones en los pacientes infectados por dicho virus. En Latinoamérica es notoria la falta de estudios relacionados a este tema, es por ello por lo que en esta investigación se busca realizar la detección de micoplasmas y cocos piógenos en pacientes positivos a SARS-CoV-2 optimizando una técnica de diagnóstico molecular que fuera rápida y específica para diferentes microorganismos en habitantes de la ciudad de Puebla y de un grupo control, compuesto por pacientes con síntomas de COVID-19 pero negativos al virus causante de la infección, SARS-CoV-2. Además de relacionar los datos clínicos de los pacientes con los resultados obtenidos, se compararán los resultados del grupo de estudio y el grupo control para conocer si la presencia de estos microorganismos es común en pacientes positivos a SARS-CoV-2 .Continuar con este tipo de estudios es con el afán de proporcionar información documentada que ayuden a entender el papel de la presencia de ciertos microorganismos en enfermedades causadas por virus respiratorios como en el caso del SARS-CoV-2 y el de la implementación de tratamientos antibacterianos que puedan apoyar a la recuperación del paciente.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

1.- Detectar infecciones por micoplasmas y/o cocos piógenos en pacientes positivos a SARS-COV-2, utilizando una herramienta rápida y sensible.

5.2Objetivos específicos

1.Implementación de una PCR múltiple en tiempo real y análisis de curvas “melting” para la identificación de *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.

2.Detectar la presencia de micoplasmas y cocos piógenos por PCR en tiempo real en muestras de pacientes (+ y -) a SARS-CoV-2 de la segunda y la quinta ola en la ciudad de Puebla.

3. Correlación de sintomatología clínica con los datos experimentales obtenidos.

6. Materiales y métodos

6.1 Muestras clínicas

El personal del Centro de detección Biomolecular se encargó de realizar exudados nasofaríngeos de pacientes sospechosos a SARS-CoV-2 y realizar la búsqueda de SARS-CoV-2, al mismo tiempo que se les realizó una encuesta clínica para poder relacionar la información con los datos experimentales. (Anexo 3). Las muestras utilizadas en esta investigación consistieron en extracciones de ARN que fueron preservadas mediante ultracongelación. Estos materiales biológicos forman parte del banco de muestras del Centro de Detección Biomolecular de la BUAP. La recolección de las muestras abarcó dos periodos distintos, correspondientes a la segunda "Ola" de la pandemia de COVID-19, que transcurrió del 16 de febrero al 26 de septiembre de 2020, y a la quinta "Ola", que tuvo lugar desde el 19 de diciembre de 2021 hasta el 05 de marzo de 2022. Es importante destacar que las muestras fueron adquiridas de manera voluntaria por individuos que accedieron a participar en el proyecto de investigación (Anexo 2).

6.1.1 Criterios de inclusión (grupo de estudio)

Muestras de pacientes ambulatorios SARS-CoV-2 (+) que acudieron a realizarse la prueba (RT-PCR) al Centro de Detección Biomolecular BUAP durante la segunda y quinta ola.

6.1.2 Criterios de inclusión (grupo control)

Muestras de pacientes ambulatorios SARS-CoV-2 (-) que acudieron a realizarse la prueba (RT-PCR) al Centro de Detección Biomolecular BUAP durante la segunda y quinta ola.

6.1.3 Criterios de exclusión (grupo de estudio y grupo control)

Muestras que no cumplan los requisitos mencionados en los apartados anteriores.

En total se utilizaron 114 muestras de pacientes con sospecha de SARS-CoV-2, del total de muestras el 64% (73 muestras) correspondieron al sexo femenino mientras que el 36% (41 muestras) correspondieron al sexo masculino. (Ver figura 7).

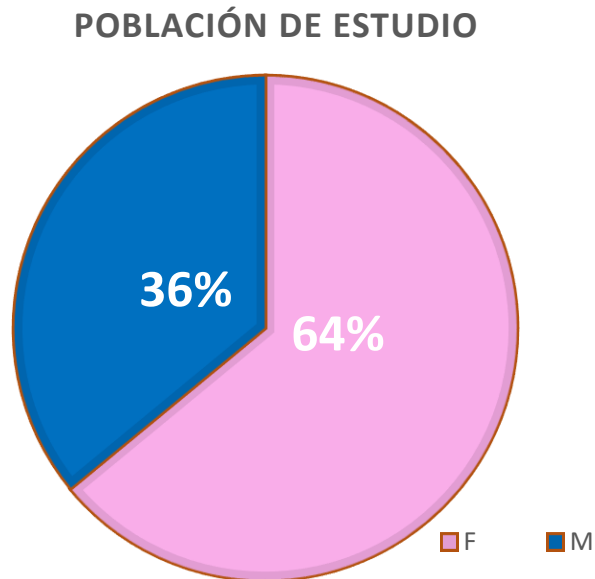


Figura 7. Población de estudio. Se muestra el porcentaje de pacientes femeninos y masculinos en la presente investigación.

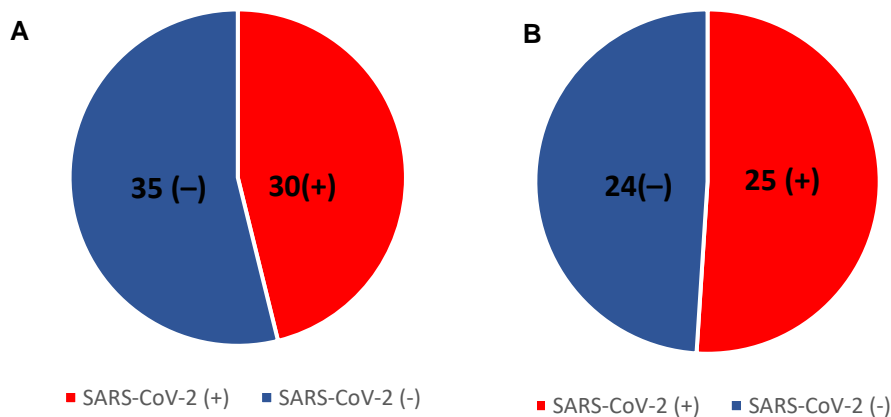
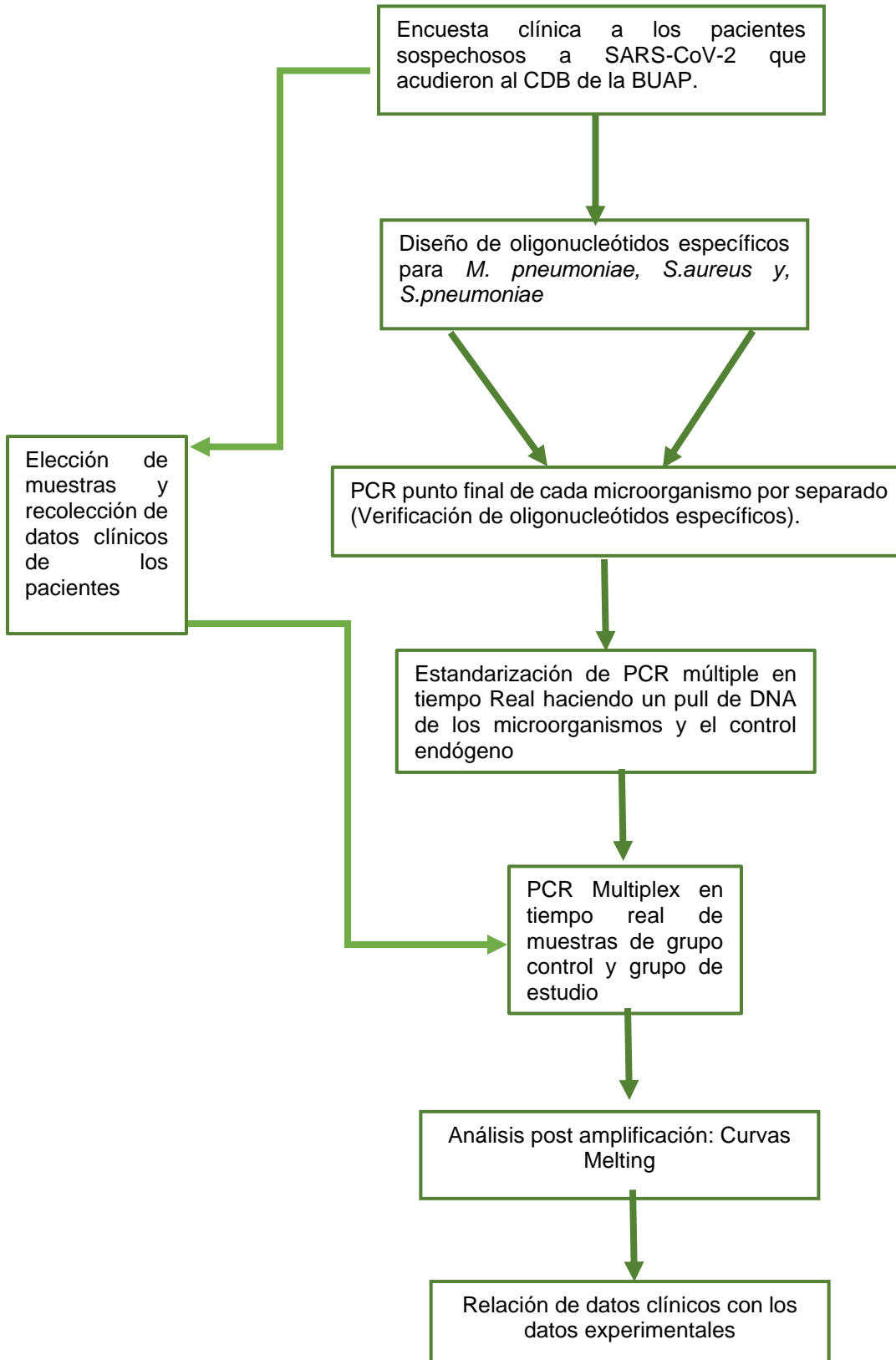


Figura 8. Número de muestras positivas (+) y negativas (-) a SARS-CoV-2. A. Se observa el número de muestras utilizadas correspondientes a la segunda ola de COVID-19. B. Número de muestras utilizadas en el periodo correspondiente a la quinta ola de COVID-19.

6.2 Metodología

6.2.1 Diagrama general de trabajo



6.2.2 Cepas control para estandarización de PCR

En el presente estudio, se emplearon cepas de tipo ATCC para *M. pneumoniae* y *S. pneumoniae*. Respecto a *S. aureus*, se utilizaron la cepa ATCC 25923 y una cepa proveniente de un aislado clínico donada generosamente por la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP. Además, se incluyeron muestras de extracción de ARN de un paciente positivo y otro negativo a SARS-CoV-2 para llevar a cabo el control endógeno de la reacción. Estos elementos fueron fundamentales en la ejecución del estudio y se detallan en la Tabla correspondiente.

Tabla 2. Cepas de referencia.

Microorganismo y GEN de referencia	Cepa o muestra utilizada
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none">• ATCC cepa tipo EATON
<i>S. pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none">• ATCC 49619
<i>S. aureus</i>	<ul style="list-style-type: none">• ATCC 25923• Cepa de aislado clínico
<i>GAPDH</i> (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)	<ul style="list-style-type: none">• Extracción de RNA de paciente positivo y negativo a SARS-CoV-2

Para realizar la estandarización de PCR, las condiciones de trabajo para cada cepa fueron las siguientes:

La cepa ATCC de *M. pneumoniae* se cultivó en medio Eaton con Dextrosa monohidratada al 0.5% para el aislamiento e identificación del microorganismo. El medio de cultivo se preparó a partir del medio *Mycoplasma* Broth Base y se enriquecieron con dializado de levadura al 15% y con suero de caballo al 25% como fuente de colesterol (anexo 1). Se tomaron 200 µl de la cepa ATCC en medio líquido y se inocularon en 3ml del medio de cultivo; posteriormente se dejaron incubar a 37°C por un período de 7 a 15 días o hasta que el indicador del medio viré de color de Rojo a Amarillo (medio con Glucosa) indicando el crecimiento de estos microorganismos.

Finalmente se tomaron 400 ul del medio de cultivo Eaton inoculado con *M. pneumoniae* para proceder a realizar la extracción de ácidos nucleicos (Ver figura 10).



Figura 09. Esquema general para el empleo de la cepa ATCC de *Mycoplasma pneumoniae*.

Para las cepas de *Streptococcus pneumoniae*, se realizó el cultivo microbiológico en agar sangre de carnero al 2%, utilizando 10 - µl de las cepas ATCC en medio de cultivo TSB y distribuyéndola sobre la placa por estría cruzada, Así mismo utilizando de 10 µl de la de la cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* se realizó un cultivo microbiológico en agar sal y manitol aplicando estría cruzada Posteriormente, se

llevó a incubación a 37°C por un periodo de 2 a 3 días. Finalmente se realizó la extracción de ADN de las 2 cepas de cocos piógenos, y se procedió a realizar PCR punto final con los oligonucleótidos *lyt A* y *nucA* según la cepa.

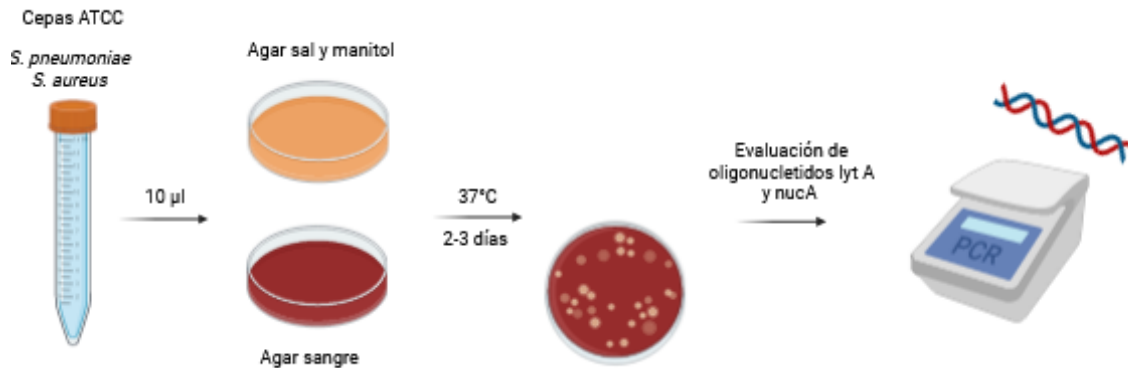


Figura 10. Esquema general para el empleo de las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

6.2.3 oligonucleótidos usados

Los oligonucleótidos empleados en el marco de este proyecto fueron derivados de literatura científica preexistente, siendo sometidos a modificaciones específicas en la región 5'. Esta adaptación se llevó a cabo con el propósito de generar amplicones con diferentes Temperaturas de Melting (T_m) (Tabla 3).

6.3 Verificación de la eficacia y funcionalidad de los oligonucleótidos.

En el presente estudio, se llevaron a cabo ajustes en los oligonucleótidos utilizados por Hamdan-Partida *et al.*, 2015 para la detección de *Staphylococcus aureus* se optó por amplificar una región específica del gen *nucA*, conocido por codificar una termonucleasa extracelular, ampliamente utilizado como criterio diagnóstico para esta especie bacteriana.

En relación con *Streptococcus pneumoniae*, se realizaron ajustes a los oligonucleótidos originalmente propuestos por Kuszniarz *et al.*, 2016. El enfoque fue amplificar una región específica del gen *lytA* (N-acetilmuramoil-l-alanina amidasa), responsable de codificar una autolisina fundamental en la patogénesis de la

infección neumocócica. En el caso de *Mycoplasma pneumoniae*, se realizaron modificaciones a los oligonucleótidos propuestos por Kumar *et al.*, 2020. La estrategia consistió en amplificar una región conservada del gen *P1*, responsable de codificar una proteína adhesina densamente agrupada en el sitio de unión del orgánulo de este microorganismo. Para el control endógeno, se realizaron ajustes a los oligonucleótidos propuestos por N. J. Gadsby *et al.*, 2015, buscando amplificar una región específica del gen *GAPDH*, correspondiente a la Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, una enzima clave en la glucólisis en humanos (Tabla 3).

Tabla 3. Oligonucleotidos modificados, utilizados para la detección de micoplasmas, cocos piógenos y control endógeno de reacción.

Organismo	Gen	Oligonucleótidos	Tamaño	TM serial cloner	TM Teórica	Tamaño amplicón	TM Real °C	Referencia
<i>S. pneumoniae</i>	<i>lyt A</i>	Fw 5'CGGACTACC GCCTTTATATCG 3'	21 nt	61.3 °C	82.6 °C	548 pb	82 °C	(Kusznierz, <i>et al.</i> , 2016)
		Rv 5'GGCATTGAT ACCATGGCGC 3'	20 nt	60.5 °C				
<i>M. pneumoniae</i>	<i>P1</i>	Fw 5'ACTCGGAGGAC AATGGTCAG 3'	20 nt	60.5 °C	87.1 °C	483 pb	87 °C	(Kumar S. <i>et al.</i> , 2020)
		Rv 5'CAAACCCGGT CTTTCGTTA 3'	20 nt	56.4 °C				
<i>S. aureus</i>	<i>nucA</i>	Fw 5'GCGATTGAT GGTGATACGGTT 3'	21 nt	59.4 °C	77.4 °C	276 pb	77.4 °C	(Hamdan-Partida <i>et al.</i> , 2015)
		Rv 5'CAAGCCTTGAC GAACTAAAGC 3'	21 nt	59.4 °C				
control endógeno	<i>GAPDH</i>	Fw 5'GATGAGTCCAG TGAGGAAGG 3'	20 nt	60.5 °C	85 °C	239 pb	85 °C	(N. J. Gadsby <i>et al.</i> , 2015)
		Rv 5'GCTGAGTCACA AAGATGGTG 3'	20 nt	58.4 °C				

Con el propósito de garantizar la especificidad de los oligonucleótidos modificados, se llevaron a cabo alineamientos en la base de datos del NCBI previo a la PCR punto final, este proceso se implementó como parte de la verificación de la eficacia y funcionalidad de los oligonucleótidos.

6.4 Extracción de ADN

200 a 300 μ l de cultivos microbiológicos de las cepas de referencia se centrifugaron a 14000 rpm por 25 min, para obtener la pastilla bacteriana.

Para la extracción de ADN se empleó el kit comercial *High Pure PCR Template Preparation Kit* de Roche®, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Finalmente, se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría con el nanofotómetro Pearl de IMPLEN (NanoPhotometer® Pearl) y se conservaron las muestras de ADN en congelación a -20°C hasta su uso.

6.5 Evaluación de oligonucleótidos por PCR punto final

Previo a la ejecución de los análisis moleculares en las muestras clínicas, se llevó a cabo un proceso de estandarización de la técnica. Esta fase se implementó con el propósito de evaluar la funcionalidad de la técnica en la detección precisa de los microorganismos de interés en el contexto de esta investigación. Se realizó PCR punto final con los oligonucleótidos específicos para *Mycoplasma pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* y *GAPDH* para evaluar la funcionalidad de los oligonucleótidos (tabla 4).

Cada reacción de PCR punto final a emplear en este trabajo se llevó a cabo a un volumen final de 25 μ l el cual contenía: 1.00 μ l 0.3 μ M de cada oligonucleótido (sentido y anti-sentido) al 10 mM, 5 μ l de ADN templado, 12.5 μ l de mezcla maestra (2X) para DreamTaq Green (Thermo Scientific) y 5.5 μ l de agua grado biología molecular.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador marca Labnet con las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 95°C por 1 min, alineamiento de

oligonucleótidos por 1 min a 60°C, extensión a 72°C por 1 min; y por último una extensión final de 72°C por 5 min. Una vez finalizado el programa, los productos amplificados se corrieron en gel de agarosa al 1% y fueron teñidos con bromuro de etidio.

6.6 Estandarización de PCR Múltiplex y análisis Melting

Una vez que se evaluó la funcionalidad de los oligonucleótidos utilizados para la detección de los microorganismos y el control endógeno abordados en este proyecto, se procedió a realizar la estandarización de qPCR múltiplex y su posterior análisis mediante curvas melting.

En la primera etapa se realizaron reacciones para la detección por separado de los microorganismos, para ello se preparó una máster mix en un volumen final de 15 µl con los siguientes componentes: 0.3 µM de todos los oligonucleótidos (tabla 3), 4 µl de ADN templado, 2.5 µl de agua grado biología molecular y 7.5 µl de la mezcla maestra Applied Biosystems™ SYBR Green.

En la segunda etapa se realizó la qPCR múltiple para la detección simultánea de los microorganismos, por lo que se añadieron en la misma reacción los templados de ADN de *M. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae*, en una mezcla con los siguientes componentes:

1.2 µl al 0.3 µM del mix de oligonucleótidos, 2 µl de ADN templado de cada microorganismo y el control endógeno, 0.8 µl de agua grado biología molecular y 10 µl de la mezcla maestra Applied Biosystems™ SYBR Green obteniendo así una reacción de 20 µl.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche), en las siguientes condiciones de reacción: un ciclo de pre-incubación a 95°C por 10 min; 40 ciclos de 1 min a 60°C, un ciclo de curvas melting a 97°C y una etapa final de enfriamiento por 30 segundos a 40°C. Una vez concluido el ciclo de reacción, el equipo llevó a cabo una etapa post amplificación mediante la generación de curvas de disociación. En esta fase, la temperatura se incrementa

mientras se grafica la derivada de la fluorescencia (df/dt) frente a la temperatura. Este proceso revela los puntos de inflexión en las curvas de disociación, manifestados como picos en la temperatura de fusión (T_m) correspondiente a la secuencia específica.

7. Resultados

7.1 Evaluación de oligonucleótidos

7.1.1 Evaluación de oligonucleótidos para *S. aureus*

El producto de la amplificación, conocido como amplicón, exhibe una longitud específica de 276 pares de bases (pb). La visualización en la Figura 11 demuestra la concordancia del tamaño del amplicón obtenido con el tamaño esperado, tanto en la muestra de *S. aureus* de la cepa ATCC 25923 (carril 3) como en la muestra de *S. aureus* proveniente de aislado clínico (carril 4). La observación de este patrón confirmó la eficacia y especificidad de la reacción de amplificación para el gen *nucA*, proporcionando evidencia concluyente de la presencia del microorganismo objetivo en las muestras evaluadas.

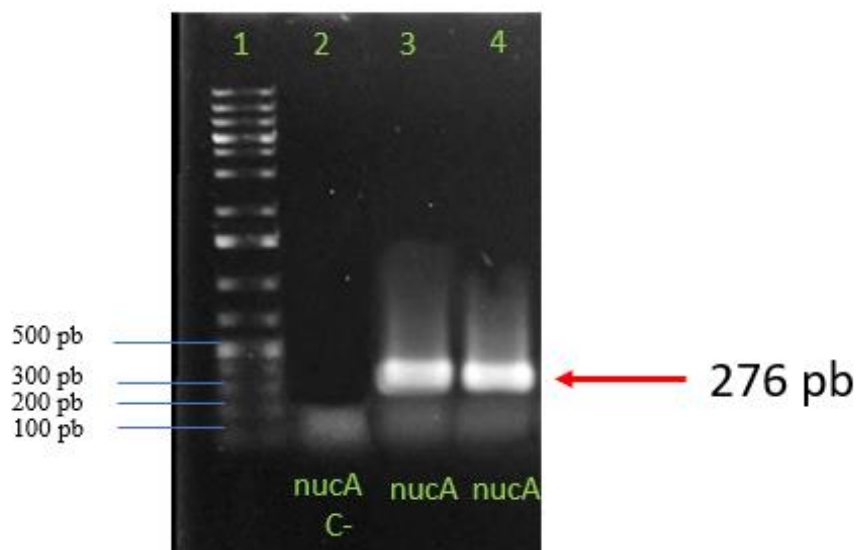


Figura 11. Evaluación de oligonucleótidos para *S. aureus* (*nucA*). **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Control templado de la reacción. **Carril 3.** *S. aureus* cepa ATCC 25923. **Carril 4.** Cepa de *S. aureus* de aislado clínico.

7.1.2 Evaluación de oligonucleótidos para *S. pneumoniae*

La secuencia amplificada correspondiente al gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae* exhibe una longitud específica de 548 pares de bases (pb). La visualización en la figura 12 ilustra claramente la obtención del tamaño de amplicón esperado en ambas reacciones utilizando la cepa ATCC (carriles 2 y 3). Este resultado respalda la consistencia y adecuación de la reacción de amplificación para el gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae*, validando así la detección específica de dicho microorganismo en las muestras analizadas.

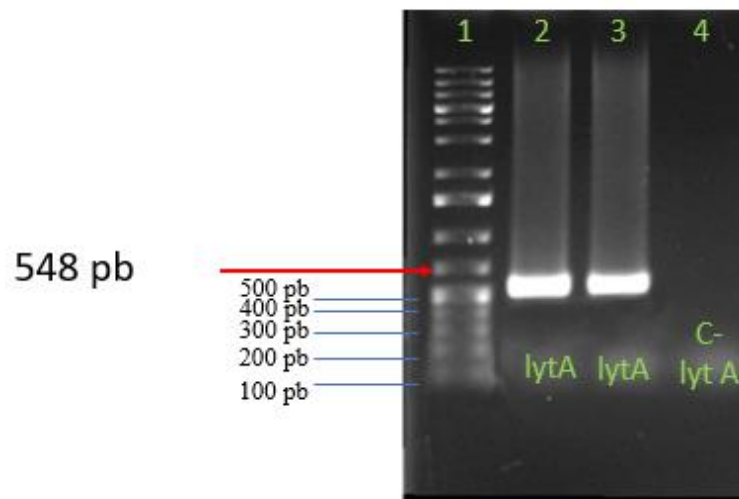


Figura 12. Evaluación de oligonucleótidos para *S. pneumoniae* (*lytA*). **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2 .** *S. pneumoniae* cepa ATCC 49619 obtenida de un cultivo con agar sangre. **Carril 3.** *S.pneumoniae* cepa ATCC 49619 obtenida de un cultivo en TSB . **Carril 4.** Control templado de la reacción.

7.1.3 Evaluación de oligonucleótidos para *Mycoplasma pneumoniae*

La secuencia amplificada, esperada para el gen específico *P1* de *Mycoplasma pneumoniae*, presenta una longitud precisa de 483 pares de bases (pb), tal como se ilustra en la figura 13. Es pertinente señalar que en ambas reacciones realizadas con la cepa ATCC, identificadas en los carriles 5 y 6, se lograron obtener los tamaños de amplicones conforme a las expectativas predefinidas.

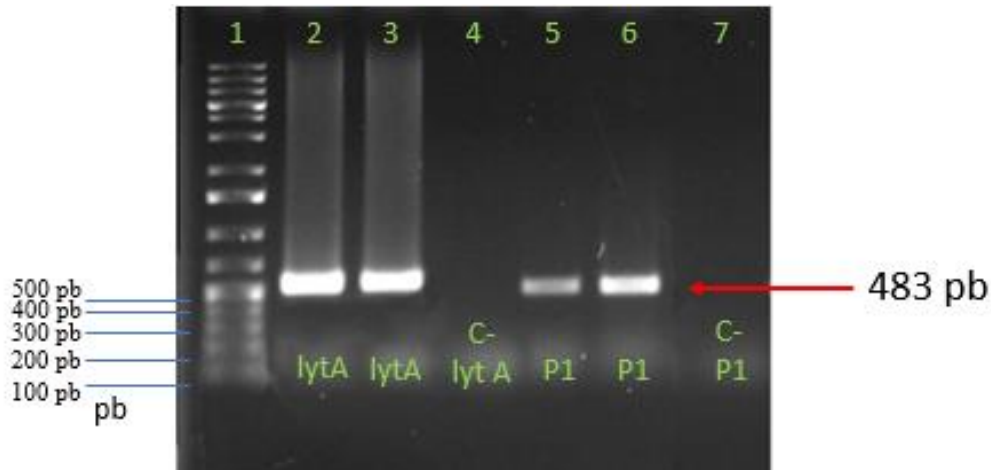


Figura 13. Evaluación de oligonucleótidos para *M. pneumoniae* (P1). **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 5.** *M. pneumoniae* cepa ATCC eaton obtenida de un cultivo en medio eaton. **Carril 6.** *M. pneumoniae* cepa ATCC eaton obtenida de un cultivo en medio eaton. **Carril 7.** Control templado de la reacción.

7.1.4 Evaluación de oligonucleótidos para *GAPDH* (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa)

El amplicón correspondiente es de 239 pb, se puede observar en la figura 14 que en las 3 recciones con las diferentes muestras de pacientes (carril 2,3 y 4) se obtuvieron los tamaños específicos para este control endógeno.

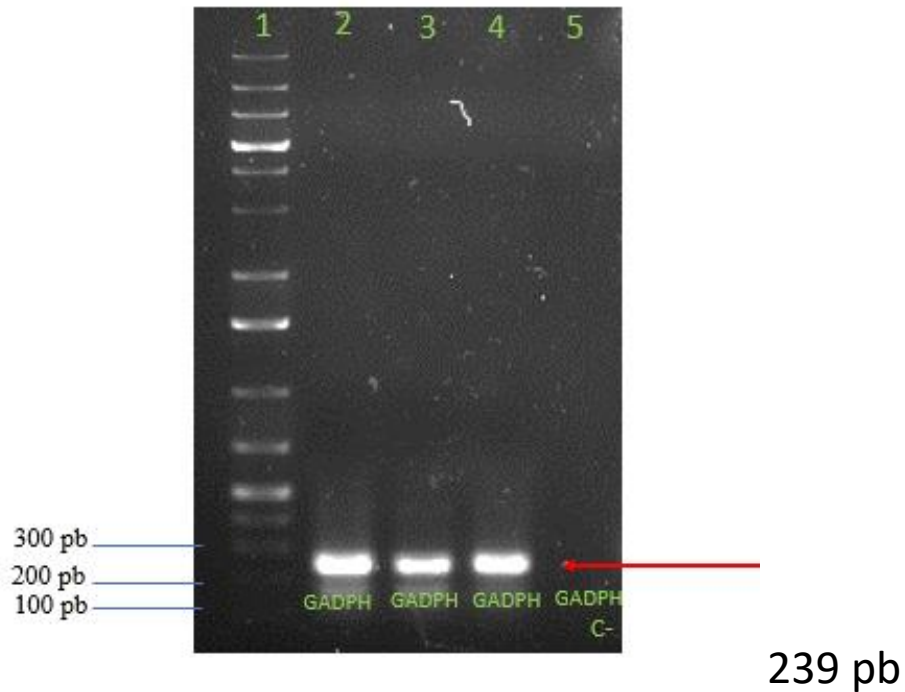


Figura 14. Evaluación de oligonucleótidos para el Control endógeno (*GAPDH*). **Carril 1.** Marcador de peso molecular. **Carril 2.** Extracciones de RNA mediante *kit RNA Virus de Núcleo spin*® de muestras de pacientes SARS-CoV-2 (+). **Carril 3.** Extracciones de RNA mediante *kit RNA Virus de Núcleo spin*® de muestras de pacientes SARS-CoV-2 (-). **Carril 4.** extracción de DNA de *kit High Pure PCR Template Preparation Kit* de Roche® de una muestra de un paciente sin sospecha de COVID-19. **Carril 5.** Control templado de la reacción.

7.2 Estandarización de PCR múltiple en tiempo real

Una vez realizada la evaluación de los oligonucleótidos mediante PCR punto final, se procedió a realizar la estandarización de la PCR múltiple en tiempo real, para ello en una primer fase de experimentos se hicieron reacciones de manera separada por duplicado para cada par de oligos y sus respectivos moldes de DNA (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* y control endógeno) con su respectivo control templado por cada reacción.

7.2.1 *Staphylococcus aureus*

Para *Staphylococcus aureus*, se determinó que la Temperatura de Melting (T_m) del amplicón generado fue de 77.4°C. Posteriormente, al concluir la PCR en tiempo real, se procedió al análisis de curvas de disociación. En este análisis, se confirmó de manera efectiva que el pico de la T_m coincidió con la temperatura previamente establecida de 77.4°C. Este resultado se evidencia en la figura 15, específicamente en el inciso B, donde se destacan los picos de disociación en color rojo y azul marino, correspondientes a la T_m específico para este microorganismo. Este hallazgo confirma la funcionalidad de los oligonucleótidos *nucA* para la detección precisa de *Staphylococcus aureus*. Además, se incluye en la figura la curva de disociación del control templado en color verde, lo cual indica que esta curva es inespecífica para este microorganismo, reforzando la especificidad del método de detección para *S. aureus*.

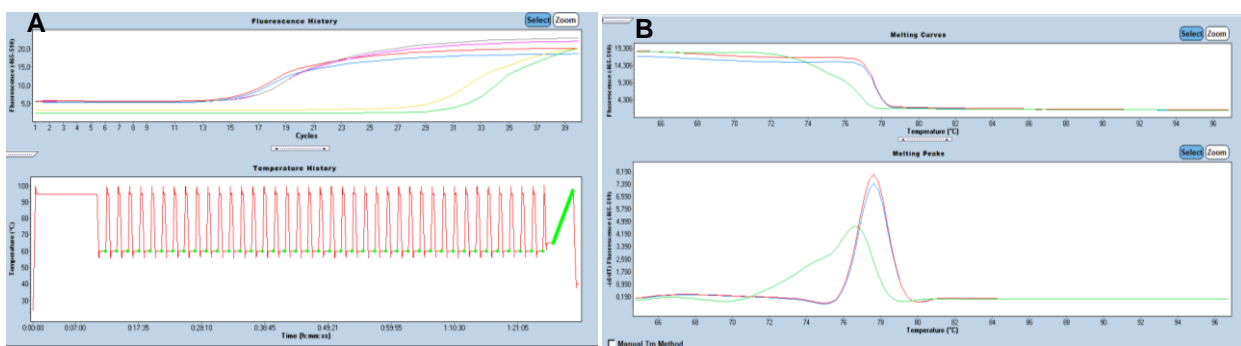


Figura 15. Estandarización de PCR múltiple para *S. aureus*. **A.** curvas de amplificación de PCR en tiempo real. **B.** Paso post amplificación "Curvas melting".

7.2.2 *S. pneumoniae*

Utilizando los oligonucleótidos modificados para el gen *lytA*, se calculó una Temperatura de Melting (T_m) teórica correspondiente al amplicón de 82.6 °C. No obstante, los datos experimentales obtenidos en el análisis post amplificación revelaron que la T_m real es de 82°C. En la figura 16, se presenta en el apartado B, en colores rojo y azul marino, la curva de disociación con la T_m real de 82°C. Adicionalmente, se observa un pico adicional en color amarillo, que representa el control templado de la reacción. Este hallazgo confirma de manera concluyente la funcionalidad y especificidad de los oligonucleótidos *lytA*, destacando la capacidad de estos para la detección precisa de *Streptococcus pneumoniae* en el contexto de esta investigación.

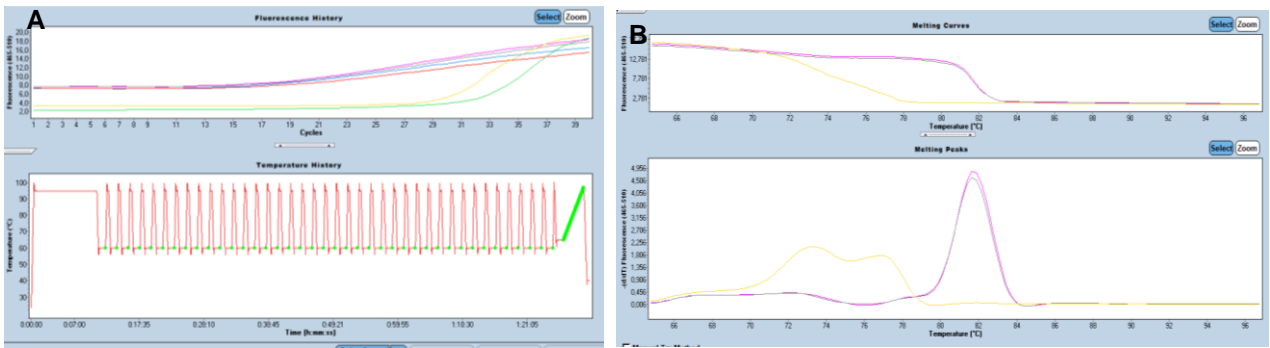


Figura 16. Estandarización de PCR múltiple para *S. pneumoniae*. **A.** curvas de amplificación de PCR en tiempo real. **B.** Paso postamplificación "Curvas melting".

7.2.3 *Mycoplasma pneumoniae*

La T_m teórica correspondiente a la secuencia de amplificación del gen *P1* de *Mycoplasma pneumoniae* es de 87.1 °C , los datos experimentales del análisis postamplificación indican que la T_m real es de 87°C , se pueden apreciar en color rojo los picos melting en la figura 17 por lo que se comprobó que los oligos *P1* y la T_m real para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* son funcionales en esta investigación y si se obtiene el “pico melting” específico para detectar a este microorganismo.

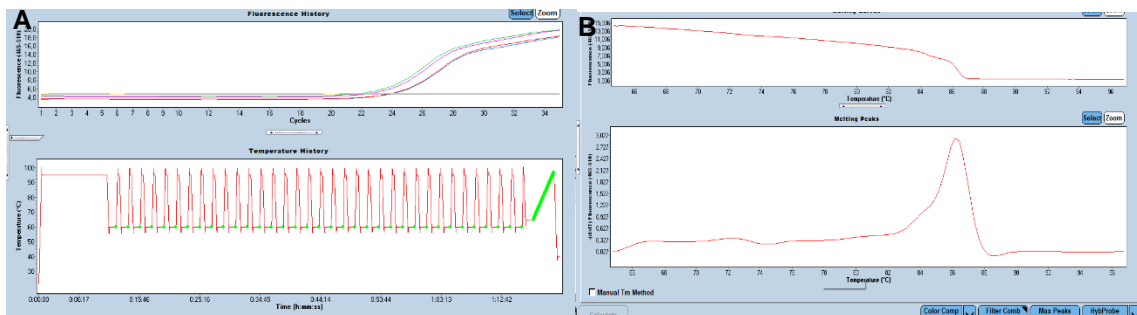


Figura 17. Estandarización de PCR múltiple para *M. pneumoniae* **A.** curvas de amplificación de PCR en tiempo real. **B.** Paso postamplificación “Curvas melting”.

7.2.4 *GAPDH*

Para nuestro control endógeno (*GAPDH*) la T_m teórica correspondiente a la secuencia de amplificación del gen *GADPH* es de 85 °C, en este caso los resultados del análisis postamplificación indican que la T_m real es la misma, es decir 85°C, se pueden apreciar en color rojo y azul los picos melting en la figura por lo que se comprobó que los oligos *GAPDH* y la T_m real para la detección del control endógeno son funcionales y específicos para los fines de esta investigación .

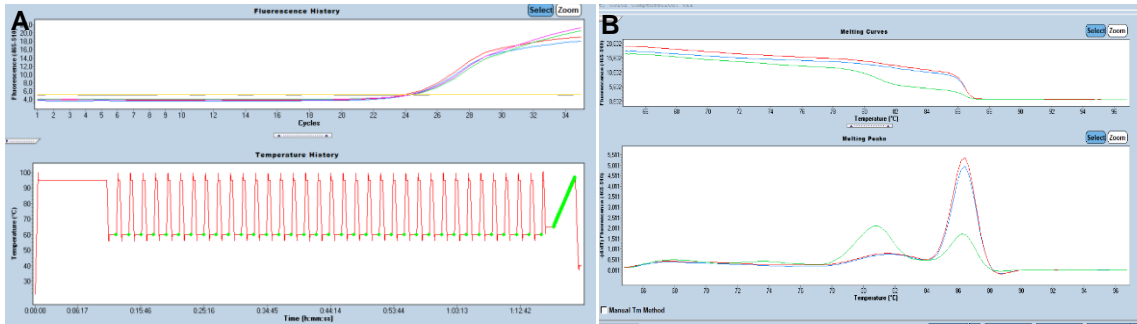


Figura 18. Estandarización de PCR múltiple para el control endógeno GAPDH. **A.** curvas de amplificación de PCR en tiempo real. **B.** Paso postamplificación “Curvas melting”.

7.3 Segunda fase de estandarización de PCR múltiple en tiempo real

La segunda fase del experimento consistió en llevar a cabo la estandarización de la PCR múltiple en tiempo real después de finalizar la primera fase de reacciones. En este paso, se creó un pool de oligonucleótidos con cada par correspondiente a los microorganismos de interés (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* y *GAPDH*). La reacción se realizó con un mix de ADN de los moldes, que contenía ADN de cada microorganismo.

Durante el experimento, la primera reacción produjo picos de melting específicos para *S. aureus* a 77°C y para *S. pneumoniae* a 82°C (ver figura 19). Sin embargo, el pico correspondiente a *Mycoplasma pneumoniae* (87°C) no se observó. Esta falta de detección podría deberse a la dificultad para cultivar el organismo en medio de cultivo, así como al tamaño extremadamente pequeño del genoma de *Mycoplasma pneumoniae*. Al cuantificar el ADN mediante espectrofotometría en el equipo nanodrop, aparentemente no se detectó una concentración significativa. Es crucial destacar que la ausencia de una concentración detectable no implica necesariamente la ausencia de ADN de *Mycoplasma pneumoniae* en la muestra.

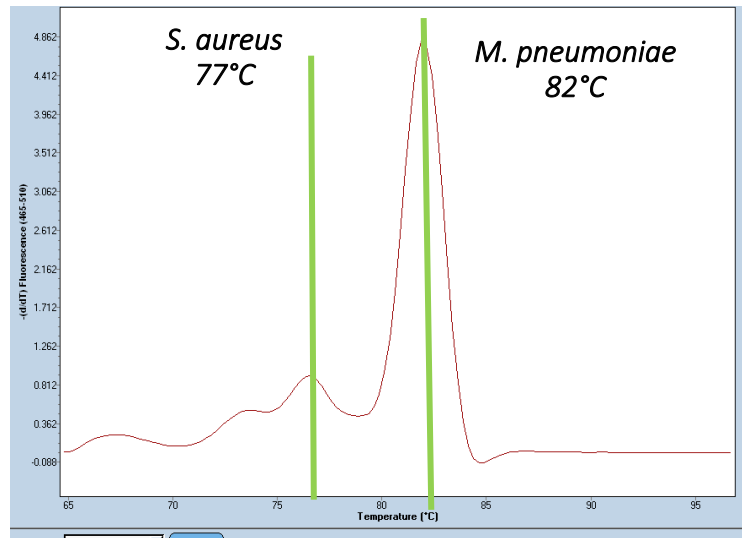


Figura 19. Estandarización de PCR múltiple para *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Se observan los “picos melting” en 77 °C Y 82° respectivamente.

Derivado de los resultados de la primera reacción, se prosiguió con una nueva reacción utilizando únicamente el par de oligos de *M. pneumoniae* y utilizando como molde la amplificación de la primera reacción, obteniendo de esta forma el pico melting específico para *Mycoplasma pneumoniae* de 87°C (ver figura 20)

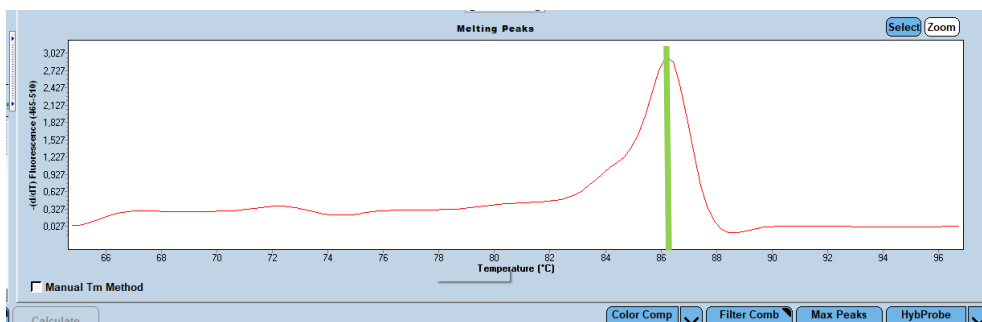


Figura 20. Segunda reacción en estandarización de PCR múltiple para *Mycoplasma pneumoniae* Se observa el “pico melting ” específico para *M. pneumoniae* en 87°C.

Tras completar la estandarización de la técnica, se implementó este modelo de trabajo para el procesamiento de las muestras clínicas. En otras palabras, para cada muestra se llevó a cabo una primera reacción con el propósito de detectar los microorganismos *S. aureus* y *S. pneumoniae*. Posteriormente, se utilizó la muestra resultante de esta primera reacción como molde para la detección de *Mycoplasma*

pneumoniae, replicando así la estrategia empleada durante la estandarización de la técnica.

7.4 Resultados de muestras clínicas

En el conjunto total de 114 muestras provenientes de pacientes con sospecha de infección por SARS-CoV-2, 65 corresponden a la segunda "ola" de la pandemia de COVID-19, con 30 muestras clasificadas como positivas y 35 como negativas para SARS-CoV-2. Por otro lado, en el marco de la quinta "ola" de la pandemia, se emplearon 49 muestras, de las cuales 25 resultaron positivas y 24 negativas para SARS-CoV-2.

Durante el análisis de las muestras de la segunda ola de COVID-19, se identificaron *Mycoplasma pneumoniae* en 3 pacientes y *Streptococcus pneumoniae* en 1 paciente, todos ellos positivos para SARS-CoV-2. En contraste, en pacientes negativos para SARS-CoV-2 en la misma ola, se detectaron *Mycoplasma pneumoniae* en 1 caso, *Staphylococcus aureus* en 1 caso y *Streptococcus pneumoniae* en 1 caso.

En relación con la quinta ola de COVID-19, se encontró la presencia de *Streptococcus pneumoniae* en 3 pacientes positivos para SARS-CoV-2, mientras que en los pacientes negativos para el virus en la misma ola se detectaron 2 casos de *Streptococcus pneumoniae* (Tabla 4).

Tabla 4. Microorganismos detectados en muestras de pacientes con sospecha de COVID-19.

Edad	Sexo	Microorganismo detectado	Número de ola /Tipo de muestra	Sintomatología
16	Femenino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	dolor de cabeza, tos, fatiga y dolor de garganta, anosmia, disgeusia, disnea.
30	Femenino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	dolor de cabeza, fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga, anosmia, disgeusia.
22	Femenino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	dolor de cabeza, fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga, anosmia y disgeusia.
32	Femenino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	dolor de cabeza, fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga, anosmia y disgeusia.
34	Masculino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (-)	fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga.
52	Femenino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (-)	dolor de cabeza, tos, fatiga y dolor de garganta.
35	Masculino	<i>S. aureus</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (-)	Fiebre, dolor de garganta y dolor de cabeza.
60	Masculino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CoV-2 (+)	dolor de cabeza, fatiga y dolor de garganta, fiebre.
68	Femenino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CV-2 (+)	dolor de cabeza, tos, fatiga y dolor de garganta.
35	Masculino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CoV-2 (+)	tos, fatiga, temperatura y disnea.
28	Masculino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CoV-2 (-)	tos, fatiga y dolor de garganta
55	Masculino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CoV-2 (-)	tos, y dolor de garganta.

Esta investigación se centró en la detección de 3 bacterias: *Mycoplasma pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. En las muestras de la ola 2 se detectaron 3 cocos piógenos; 2 *Streptococcus pneumoniae* y 1 *Staphylococcus aureus*, en un paciente positivo a SARS-CoV-2 y en un paciente negativo a SARS-CoV-2 se identificó a *S.pneumoniae* (figura 21), en otro paciente negativo al virus se detectó a *S. aureus* (tabla 4).

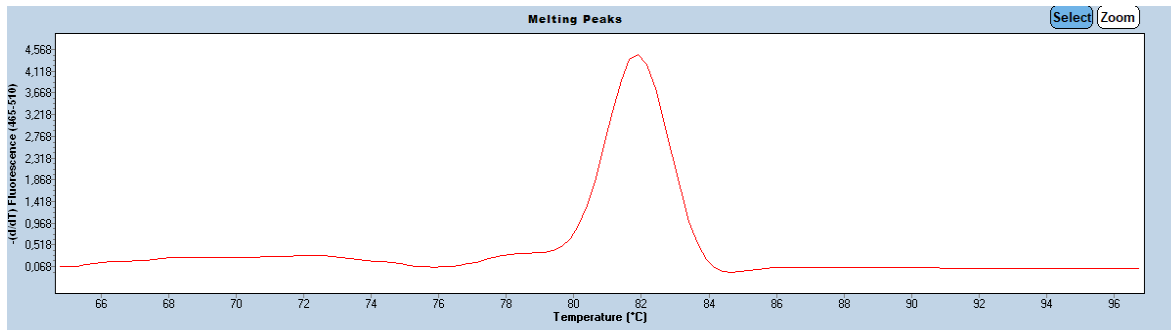


Figura 21. Detección de *S. pneumoniae* en un paciente positivo a SARS-CoV-2. Se observa el pico melting específico para dicho coco piógeno en 82°C.

en otro paciente negativo al virus en la misma ola de COVID-19 se detectó a *S. aureus* (ver tabla 4), cabe mencionar que de las 114 muestras analizadas entre pacientes negativos y positivos a SARS-CoV-2 es la única muestra en la que se detectó a este microorganismo (figura 22).

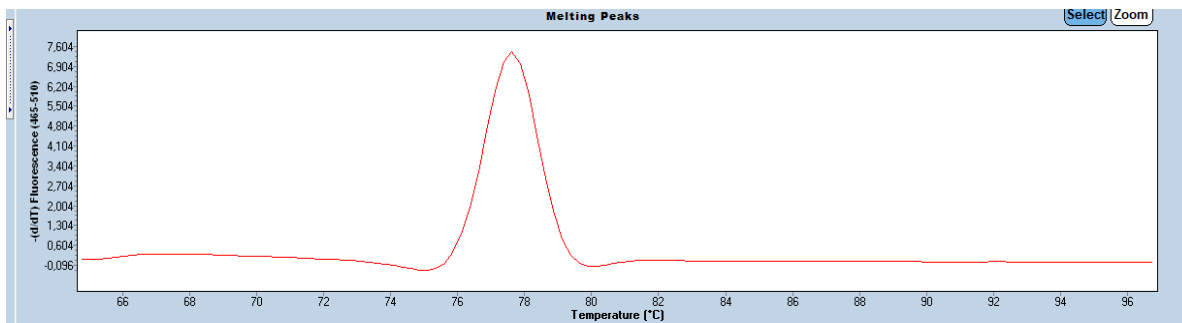


Figura 22. Detección de *S. aureus* en un paciente negativo a SARS-CoV-2. Se observa el pico melting específico para dicho coco piógeno en 77 °C.

Para el caso de *Mycoplasma pneumoniae*, en muestras analizadas de la segunda ola de COVID-19, esta bacteria se detectó en 3 pacientes positivos a SARS-CoV-2 en cambio en los pacientes negativos de la misma ola se detectó en 1 paciente a este microorganismo (figura 23).

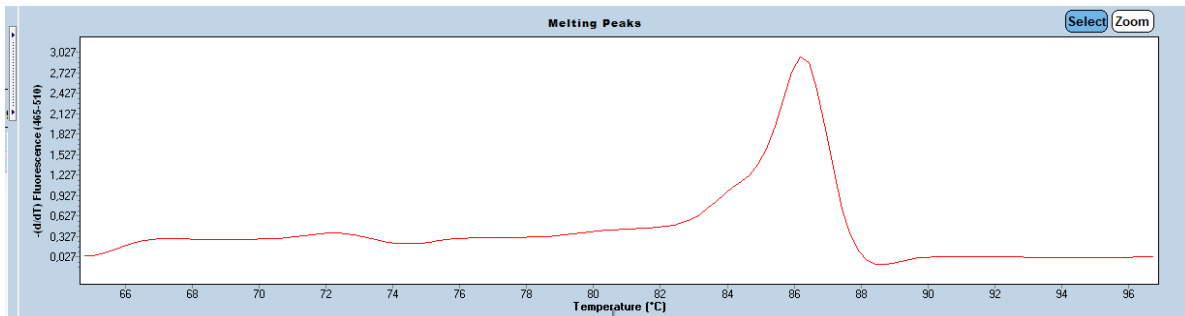
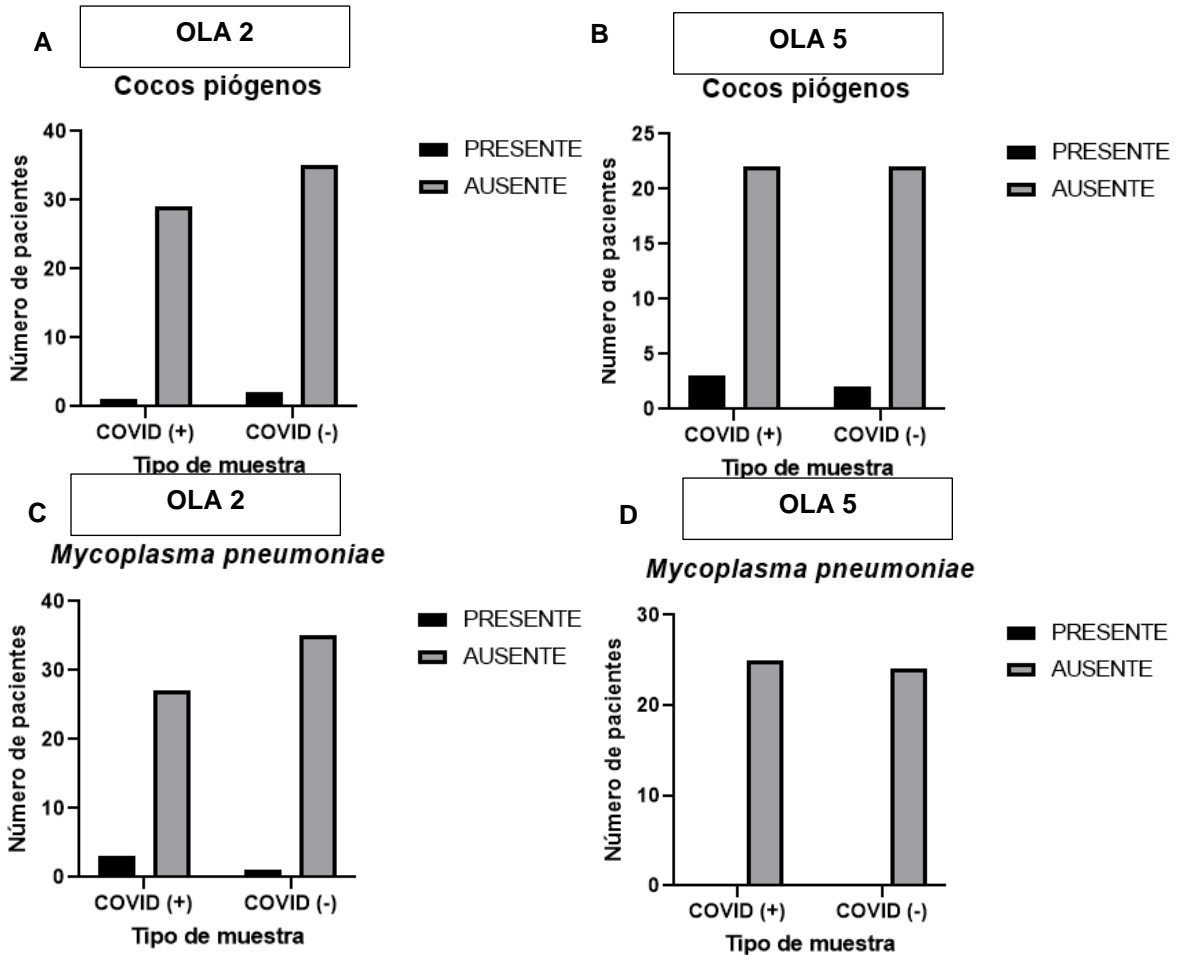


Figura 23. Detección de *Mycoplasma pneumoniae* en un paciente negativo a SARS-CoV-2. Se observa el pico melting específico para dicho coco piógeno en 87 °C.

En la ola 5 no se detectó ningún *Mycoplasma pneumoniae* ni en pacientes positivos ni en pacientes negativos a SARS-CoV-2, sin embargo, en la ola 2, se detectó a *M. pneumoniae* en 3 pacientes positivos a el virus respiratorio y 1 en un paciente negativo. No obstante, en esta misma ola se detectaron en total en 5 muestras a *Streptococcus pneumoniae*, en 3 de ellos positivos a SARS-CoV-2 y 2 de ellos negativos a este virus. (grafica 1).

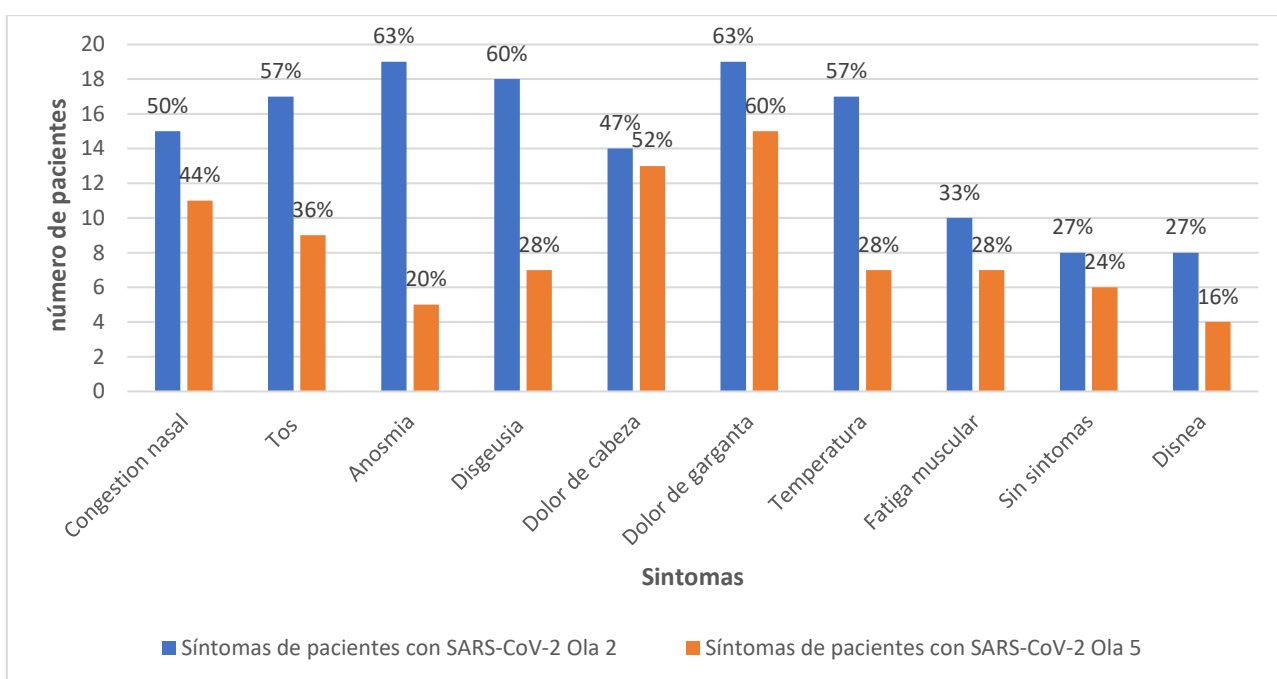


Grafica 1. Gráficas de microorganismos detectados por ola en los pacientes. **A.** Se muestra la cantidad de pacientes positivos a cocos piógenos en la ola 2 **B.** Cantidad de pacientes positivos a cocos piógenos en la ola 5. **C.** Muestras positivas a Mycoplasmas en la ola 2. **D.** pacientes positivos a mycoplasmas en la ola 5.

El microorganismo que tuvo mayor prevalencia en las 114 muestras fue *S. pneumoniae*, el cual corresponde al 58.33% de los microorganismos detectados (7/12), seguido de *Mycoplasma pneumoniae* que fue detectado en 4 pacientes correspondiendo al 33.33 % de los microorganismos detectados (4/12) y por último el microorganismo con menos presencia en los pacientes que formaron parte de esta investigación fue *Staphylococcus aureus* que corresponde al 8.33% de los microorganismos detectados.

7.5 Síntomas clínicos de los pacientes

Las manifestaciones clínicas que refirieron los pacientes positivos únicamente a SARS-CoV-2 varían (Anexo 3), sin embargo, la presencia de anosmia y disgeusia se presentó con mayor frecuencia en pacientes de la segunda ola de COVID-19 en comparación con los pacientes de la quinta ola (grafica 2), siendo el caso también de la tos y la presencia de temperatura que se presentó con mayor frecuencia en la segunda ola.



Grafica 2. Sintomatología de pacientes con COVID-19.

En el caso de los pacientes que presentaron una muestra positiva a SARS-CoV-2 y a otros microorganismos como *Mycoplasma pneumoniae* y *Streptococcus pneumoniae* el número de síntomas que presentaban los pacientes era mayor en comparación con los pacientes (grafica 3) que únicamente eran positivos a SARS-CoV-2. Los pacientes que presentaban una muestra positiva al virus respiratorio y a *S. pneumoniae* presentaban con mayor frecuencia: dolor de cabeza, tos, fatiga muscular, anosmia, disgeusia y disnea.

Los pacientes que presentaron una muestra positiva a SARS-CoV-2 y a *M. pneumoniae* refirieron con mayor frecuencia tener dolor de cabeza, fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga, anosmia, disgeusia, disnea. (tabla 5)

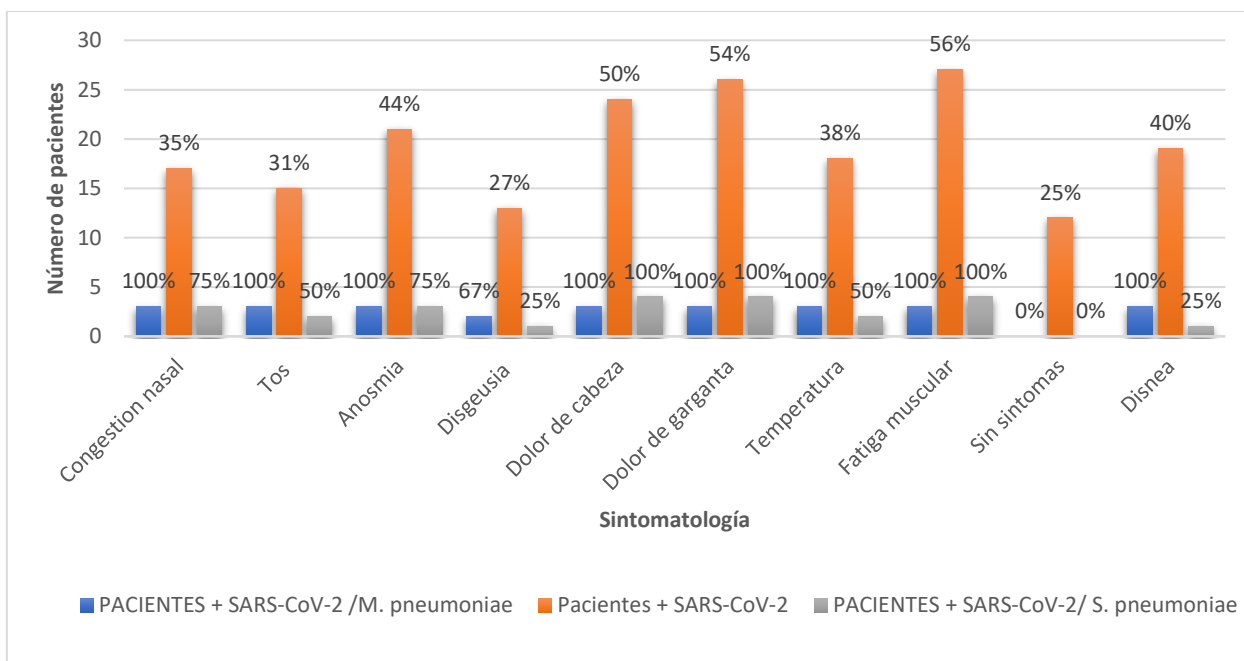
Tabla 5. Sintomatología de pacientes con SARS-CoV-2 y *M. pneumoniae* / *S. pneumoniae*

Edad	Sexo	Microorganismo detectado	Número de ola /Tipo de muestra	Sintomatología
16	Femenino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	Dolor de cabeza, dolor de garganta, temperatura, tos, fatiga muscular, congestión nasal, anosmia, disgeusia y disnea.
30	Femenino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	Congestión nasal, tos, anosmia, disgeusia, dolor de cabeza, dolor de garganta, temperatura, fatiga muscular y disnea
22	Femenino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	Congestión nasal, tos, anosmia, disgeusia, dolor de cabeza, dolor de garganta, temperatura, fatiga muscular y disnea
32	Femenino	<i>M. pneumoniae</i>	Ola 2, SARS-CoV-2 (+)	Congestión nasal, tos, anosmia, dolor de cabeza, dolor de garganta, temperatura, fatiga muscular y disnea
60	Masculino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CoV-2 (+)	Dolor de cabeza, congestión nasal, tos, temperatura, anosmia, dolor de garganta, fatiga muscular.
68	Femenino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CV-2 (+)	Dolor de cabeza, dolor de garganta, fatiga muscular, congestión nasal, anosmia.
35	Masculino	<i>S. pneumoniae</i>	Ola 5, SARS-CoV-2 (+)	Dolor de cabeza, dolor de garganta, fatiga muscular.

No se detectó la presencia de *S. aureus* en pacientes con SARS-CoV-2, sin embargo en los pacientes con dicho virus respiratorio en los que se logró detectar a *M. pneumoniae* y *S.pneumoniae* se puede notar claramente que hay una mayor

presencia de síntomas en los que predominan la fatiga muscular, temperatura, disnea, dolor de cabeza, dolor de garganta y tos.

Se observó una asociación entre la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes positivos a SARS-CoV-2 y la sintomatología disnea. Sin embargo, se enfatiza que estos síntomas no necesariamente son causados por la bacteria, sino que podrían ser atribuibles al virus. Además, se proporciona información sobre la prevalencia de la disnea en pacientes con una muestra positiva a SARS-CoV-2 y *Mycoplasma pneumoniae*, en comparación con aquellos con *Streptococcus pneumoniae*. (gráfica 3).



Gráfica 3. Sintomatología de pacientes con COVID-19, *M.pneumoniae* y *S. pneumoniae*

8. Discusión

Las vías respiratorias son vulnerables a infecciones originadas por una gama amplia de microorganismos, esto se debe a que es uno de los sistemas que se comunica directamente con el ambiente externo al organismo. Dependiendo de las condiciones del huésped, el ambiente y el microorganismo en cuestión, cualquier microorganismo, si se presentan las circunstancias adecuadas, puede ocasionar una infección de las vías respiratorias altas que podría propagarse a las vías respiratorias inferiores (Olivia J, et al., 2021). Gran parte de los microorganismos que producen infecciones de las vías respiratorias inferiores primero colonizan el epitelio nasal y faríngeo. Los microorganismos que residen en estas vías alcanzan el tracto respiratorio inferior en el momento en el que los mecanismos que utiliza el sistema inmune para proteger al organismo de infecciones se alteran, por lo general a causa de una infección viral. Como se mencionó al inicio, el propósito primordial de esta investigación fue la identificación de microorganismos en pacientes, portadores del virus SARS-CoV-2. Se llevó a cabo una estandarización rigurosa y la aplicación de una herramienta ágil y precisa con el fin de evaluar la pureza y especificidad de los productos generados mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta herramienta, conocida como curvas de disociación o curvas melting empleando SYBR Green han evidenciado ser una herramienta altamente eficaz en la identificación y discriminación de diversos patógenos (Laiyen, *et al.*, 2019). La técnica fue empleada con el propósito de discernir las secuencias de ácidos nucleicos correspondientes a distintos microorganismos presentes en las muestras de pacientes bajo sospecha de infección por el SARS-CoV-2. La metodología aplicada consistió en exponer las muestras a un aumento gradual de temperatura, mientras se monitoreaba la curva de fluorescencia. La curva indicó el punto en el cual las hebras complementarias de ADN se separaron, conocido como temperatura de disociación (T_m). Esta información se reveló como esencial para determinar la existencia y especificidad de las secuencias elegidas, aspecto crucial en aplicaciones destinadas a la identificación precisa de los microorganismos estudiados en el presente proyecto.

No solo facilitó la identificación de la presencia de diferentes microorganismos en las muestras, sino que también aseguró la especificidad de las secuencias detectadas. La implementación de esta técnica robusteció la capacidad de discernir entre diversos agentes infecciosos, proporcionando así un enfoque preciso y sensible en el diagnóstico microbiológico de las muestras clínicas, cabe destacar que aunque no se encontró información del uso de esta técnica para la detección de microorganismos en pacientes positivos a SARS-CoV-2, el trabajo de Landolt *et al.*, 2019 destaca por su aplicación en la identificación de *Mycobacterium tuberculosis*, un microorganismo de gran relevancia médica. En su estudio, emplearon curvas de disociación para evaluar la presencia y especificidad de secuencias de ácidos nucleicos en muestras de aislados clínicos. Esta técnica demostró ser una herramienta eficaz en la identificación precisa de microorganismos patógenos, brindando resultados significativos para la detección de *Mycobacterium tuberculosis*. La capacidad de las curvas de disociación para diferenciar secuencias específicas de ácidos nucleicos en muestras clínicas resalta su utilidad en la investigación y diagnóstico de enfermedades infecciosas, especialmente aquellas causadas por patógenos de importancia médica.

Cabe resaltar que para realizar la presente investigación, el equipo del Centro de Detección Biomolecular de la BUAP realizó la prueba de detección de SARS-CoV-2 en 114 pacientes ambulatorios de la comunidad poblana con diferente sintomatología, algunos de ellos no presentaban síntomas, pero habían estado en contacto con pacientes positivos a COVID-19, dichas muestras se encontraban en congelación a -20°C . Para determinar el papel de estos microorganismos en el grupo de estudio, se empleó la prueba de chi cuadrada (χ^2) entre los microorganismos presentes en el grupo de estudio (con presencia de SARS-CoV-2). No obstante, el valor obtenido para los cocos piógenos fue de $p= 0.6717$, y para *Mycoplasma pneumoniae* fue de $p= 0.6834$ el cual carece de significancia estadística debido a que es mayor al esperado ($p= <0.05$). De la misma forma, se realizó la misma prueba estadística adicionando los datos obtenidos del grupo control negativo, observándose el mismo fenómeno. Por tal motivo, se infiere que la presencia de los diferentes microorganismos objeto de este estudio (*Streptococcus pneumoniae*,

Staphylococcus aureus y *Mycoplasma pneumoniae*) presentes en los pacientes con SARS-CoV-2 no están relacionadas con la adquisición de este virus respiratorio como se hubiera esperado, sin embargo Se observo una asociación entre la presencia de *Mycoplasma pneumoniae* en pacientes positivos a SARS-CoV-2 y la sintomatología de anosmia y disgeusia. Cabe destacar que en otro proyecto de investigación realizado por Wu Q. y colaboradores en 2020 se detectó por PCR de muestras nasofaríngeas en 10 de 74 pacientes pediátricos a *Mycoplasma pneumoniae*, es el único estudio que vincula a este microorganismo con la presencia de SARS-CoV-2. Debido a lo anteriormente mencionado, este estudio pretendía vincular las infecciones de micoplasmas y cocos piógenos con la infección causada por SARS-CoV-2 ya que este conjunto de microorganismos afecta principalmente al tracto respiratorio y la sintomatología clínica que ocasionan es similar entre sí.

A pesar de que no se haya observado una evidencia estadística significativa entre los cocos piógenos y *M. pneumoniae* en los pacientes positivos a SARS-CoV-2 , se puede apreciar que en la segunda ola (27 de septiembre del 2020 al 17 de abril del 2021) se observó un mayor número de pacientes positivos a *Mycoplasma pneumoniae*, en tres pacientes positivos a SARS-CoV-2 y en un paciente negativo a dicho virus, mientras que en comparación con los pacientes de la quinta ola no se detectó a micoplasma ni en pacientes positivos ni negativos a el virus respiratorio, esto puede deberse a que durante la segunda ola de covid-19 la población aún no se encontraba vacunada contra COVID-19, y al ser un virus emergente, tomó por sorpresa a la población y a los sistemas de salud, por lo que la población en dichos momentos se encontraba susceptible, aunado a ésto la muestra de los pacientes en los que se detectó a *Mycoplasma pneumoniae* fueron tomadas en fechas decembrinas del 2020, y las infecciones por este microorganismo tienen mayor incidencia durante el invierno y presenta ciclos epidémicos de 4-7 años. En la 5ta ola (27 de septiembre del 2020 al 17 de abril del 2021) una gran parte de la población ya contaba con un esquema completo de vacunación contra SARS-CoV-2 , y la sana distancia en esos momentos ya era un práctica común de la población, cabe mencionar que diversos estudios han demostrado una relación entre enfermedades respiratorias y *M. pneumoniae* en pacientes pediátricos, tal y como

lo reportó W. Q *et al.*, 2020, en el cual lograron detectar 10 pacientes infectados con *M. pneumoniae* en 74 pacientes pediátricos con SARS-CoV-2, mientras que en la presente investigación el promedio de edad fue de 40 años, todos estos factores entre otros pudieron jugar un papel clave en la detección de este microorganismo. En el caso de los cocos piógenos en la segunda ola únicamente se detectó a *S. pneumoniae* en pacientes positivos a SARS-CoV-2 mientras que en las muestras de pacientes negativos al virus se detectó a un *S. pneumoniae* y un *S. aureus*. En estos pacientes en donde se detectaron a dichos microorganismos coinciden los siguientes síntomas: dolor de cabeza, tos, y gripa por lo cual acudieron a tomarse muestra por sospecha a infección por SARS-CoV-2. En el análisis de las muestras correspondientes a la quinta "ola" de la pandemia, se identificaron 5 cocos piógenos, todos ellos atribuibles a *Streptococcus pneumoniae*. Estos hallazgos se distribuyeron en tres pacientes positivos a SARS-CoV-2 y dos pacientes negativos para este virus. En los meses más fríos del año, que en Puebla suceden de noviembre a diciembre, es considerada como la "temporada respiratoria", ya que un número mayor de individuos son portadores asintomáticos de *S. pneumoniae* en la faringe. De este modo los seres humanos constituyen el reservorio más importante para este microorganismo (Mitsi *et al.*, 2022) y de acuerdo con los resultados el 58.8 % de los microorganismos detectados en los pacientes ya sean positivos o negativos a SARS-Cov-2 corresponden a *S. pneumoniae*. Aunado a esto se ha demostrado que infecciones preexistentes de las vías respiratorias superiores, por lo general de origen viral, interfieren con los mecanismos normales de defensa de estas vías permitiendo la entrada de microorganismos como *S. pneumoniae* hacia las vías respiratorias inferiores, y por consiguiente el desarrollo de infecciones por este agente (Olivia J, et al., 2021). Los principales mecanismos que favorecen la sobreinfección bacteriana son múltiples, sin embargo el principal es que la replicación de un virus, produce daño en la barrera epitelial pulmonar, con exposición de receptores de la membrana basal, lo que favorece la adherencia bacteriana y el hecho de que haya una disminución del aclaramiento mucociliar, lo que hace que aumente el sustrato disponible para las bacterias además, las infecciones virales respiratorias inducen un aumento de la inflamación, a través de

la respuesta inmune innata y de la producción de citocinas en el epitelio respiratorio, lo que podría crear un entorno adecuado para la proliferación de algunas bacterias comensales, como *S. pneumoniae* (Mitsi, et. al., 2022). Por otro lado, la infección viral respiratoria puede alterar el microbioma respiratorio, induciendo la aparición de otros microorganismos que podrían ocasionar daño a la población, como los estudiados en este proyecto, continuar con la comprensión de estas relaciones entre microorganismos puede resultar clave para comprender la gravedad clínica que estas conllevan, ya que pueden agravar el curso de la enfermedad, como se puede observar en este proyecto, los pacientes positivos a COVID-19 y que presentaron a *S. pneumoniae* indicaron tener más síntomas que los pacientes que únicamente fueron positivos a COVID-19, entre los más comunes que presentaron fueron : dolor de cabeza, tos, fatiga y dolor de garganta , aunado a la pérdida del olfato y gusto entre los pacientes positivo a COVID-19 de la segunda ola. Mientras que para los pacientes en los que se detectó a *M.pneumoniae* la sintomatología clínica común fue: fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga y de igual manera en los tres pacientes durante la segunda ola que también presentaron una muestra positiva a COVID-19 , indicaron tener perdida de olfato y gusto , finalmente la sintomatología presentada por *S. aureus* fue tos, dolor de garganta y fiebre sin embargo este paciente presentaba una muestra negativa a SARS-CoV-2. Se logró observar un mayor número de manifestaciones clínicas en los pacientes con una muestra positiva a COVID-19 y a otro microorganismo como *M. pneumoniae* y *S. pneumoniae* por lo que continuar con este tipo de investigaciones ayuda a sustentar y aumentar la prevención (vacunación), diagnóstico y por consiguiente terapias más efectivas frente a estas infecciones que pueden agravarse.

9. Conclusiones

1. Se establecieron las condiciones para una PCR múltiple en tiempo real y mediante el paso post amplificación de curvas melting, fue posible detectar a *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*.
2. En la segunda ola se detectó tanto en pacientes positivos como negativos a SARS-CoV-2a *Mycoplasma pneumoniae*.
3. *Streptococcus pneumoniae* fue el coco que se detectó con mayor frecuencia en las dos olas, además este microorganismo se detectó tanto en pacientes positivos como negativos a SARS-CoV-2.
4. Se detectó en una muestra a *S. aureus* (1/114), correspondiente un paciente negativo a SARS-CoV-2 de la ola 2.
5. Las diferentes especies de microorganismos abordados en este estudio; *M. pneumoniae*, *S. aureus* y *S. pneumoniae* no tienen relación significativa con la enfermedad COVID-19 , en la población estudiada.
6. La sintomatología más común en los pacientes en los que se detectó a *S. pneumoniae* fue dolor de cabeza, tos, fatiga y dolor de garganta, y algunos presentaron pérdida del olfato y gusto. Mientras que para los pacientes en los que se detectó a *M.pneumoniae* la sintomatología común fue: fiebre, tos, dolor de garganta, fatiga y perdida de olfato y gusto. La *sintomatología* presentada en pacientes con *S. aureus* fue tos, dolor de garganta y fiebre.

10. Perspectivas del trabajo

El presente estudio propone diversas direcciones para futuras investigaciones con el objetivo de fortalecer la validez y amplitud de los hallazgos obtenidos:

1. Incrementar el volumen de muestras clínicas procedentes de pacientes tanto positivos como negativos a SARS-CoV-2, con el fin de robustecer la significancia estadística de los resultados presentados en el estudio actual.
2. Ampliar la diversidad de especies bacterianas consideradas en el estudio, incorporando nuevas especies víricas en el análisis y, de manera complementaria, analizar muestras de sangre periférica de los pacientes para identificar estos microorganismos.
3. Evaluar alternativas técnicas para la detección de microorganismos, además de los métodos convencionales de biología molecular, como, por ejemplo, la aplicación de técnicas de cultivo de microorganismos y pruebas bioquímicas.
4. Realizar un análisis comparativo entre muestras de pacientes con COVID-19 que se encuentren hospitalizados y aquellos que reciben tratamiento de forma ambulatoria, con el propósito de identificar posibles diferencias en la carga microbiana y su relación con la severidad de la infección.

Estas propuestas de investigación adicional contribuirán a una comprensión más profunda de las interacciones microbianas asociadas con el virus SARS-CoV-2, permitiendo refinar las estrategias diagnósticas, terapéuticas y preventivas en el manejo de esta enfermedad.

11. BIBLIOGRAFÍA

- A.Rivera-Tapia JA, Cedillo RL, Giono CS. Comparación genómica en micoplasmas de interés médico. *A Med Asoc Med Hosp ABC*. 2006;51(2):74-79.
- A.Rivera-Tapia, J., Lilia Cedillo-Ramírez, M., & Vega-Benítez, M. (2001). Micoplasmas y su importancia médica. *REVISTA BIOMÉDICA*, 12(4), 262–271.
- Atkinson, T. P., & Waites, K. B. (2014). *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Childhood. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 33(1), 92–94.
- Barré, A., de Daruvar, A., & Blanchard, A. (2004). MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), D307–D310.
- Baseman, J. B., & Tully, J. G. (1997). Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerging infectious diseases*, 3(1), 21–32.
- Buckingham Lela, Flaws Maribeth L. (2007). *Molecular diagnostics, Fundamentals Methods & Clinical Applications* F. A. Davis company.
- Buitrago-Garcia, D., Egli-Gany, D., Counotte, M. J., Hossmann, S., Imeri, H., Ipekci, A. M., . & Low, N. (2020). Occurrence and transmission potential of asymptomatic and presymptomatic SARS-CoV-2 infections: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, 17(9), e1003346.
- Cevik, M., Kuppalli, K., Kindrachuk, J., & Peiris, M. (2020). Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2. *BMJ*, m3862.
- Cevik, M., Tate, M., Lloyd, O., Maraolo, A. E., Schafers, J., & Ho, A. (2021). SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *The lancet microbe*, 2(1), e13-e22.
- Chau, C. H., Strobe, J. D., & Figg, W. D. (2020). COVID-19 Clinical Diagnostics and Testing Technology. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 40(8), 857–868.

- Chu, H. W., Breed, R., Rino, J. G., Harbeck, R. J., Sills, M. R., & Martin, R. J. (2006). Repeated respiratory *Mycoplasma pneumoniae* infections in mice: effect of host genetic background. *Microbes and Infection*, 8(7), 1764–1772.
- Citti, C., & Blanchard, A. (2013). Mycoplasmas and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*, 21(4), 196–203.
- Couzin-Frankel J. The mystery of the pandemic's 'happy hypoxia'. *Science*. 2020 May 1;368(6490):455-456.
- Cubillos, G. P. B., Murcia, J., Pérez, J. L. C., Otálora, P. E. C., Santofimio, C. A. G., & Villamizar, L. (2016). PCR en tiempo real: una metodología útil para la detección y cuantificación de granulovirus. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(2), 24.
- Cyprian, F., Sohail, M. U., Abdelhafez, I., Salman, S., Attique, Z., Kamareddine, L., & Al-Asmakh, M. (2021). SARS-CoV-2 and immune-microbiome interactions: Lessons from respiratory viral infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 105, 540–550.
- Easom, N., Moss, P., Barlow, G., Samson, A., Taynton, T., Adams, K., Ivan, M., Burns, P., Gajee, K., Eastick, K., & Lillie, P. J. (2020). Sixty-eight consecutive patients assessed for COVID-19 infection: Experience from a UK Regional infectious diseases Unit. *Influenza and other respiratory viruses*, 14(4), 374–379.
- Farrar, J. S., Reed, G. H., & Wittwer, C. T. (2010). High-Resolution melting Curve analysis for molecular diagnostics. En *Elsevier eBooks* (pp. 229-245).
- Fattorini L, Creti R, Palma C, Pantosti A; Unit of Antibiotic Resistance and Special Pathogens; Unit of Antibiotic Resistance and Special Pathogens of the Department of Infectious Diseases, Istituto Superiore di Sanità, Rome. Bacterial coinfections in COVID-19: an underestimated adversary. *Ann Ist Super Sanita*. 2020 Jul-Sep;56(3):359-364.
- Gayam, V., Konala, V. M., Naramala, S., Garlapati, P. R., Merghani, M. A., Regmi, N., Balla, M., & Adapa, S. (2020). Presenting characteristics, comorbidities, and outcomes of patients coinfecting with COVID-19 and *Mycoplasma pneumoniae* in the USA. *Journal of Medical Virology*, 92(10), 2181–2187.

- Ghaffari, A., Meurant, R., & Ardakani, A. (2020). COVID-19 Serological Tests: How Well Do They Actually Perform? *Diagnostics*, 10(7), 453.
- Guillermo, M. Z., David, P. M., Antonio, Y. S. J., Constantino, G. J., & Lilia, C. R. M. (2014b). Presence of *Mycoplasma* Spp. in Patients with Asthma or Allergic Rhinitis. *Advances in Microbiology*, 04(11), 720–725.
- Hao, Y., Kuang, Z., Jing, J., Miao, J., Mei, L. Y., Lee, R. J., Kim, S., Choe, S., Krause, D. C., & Lau, G. W. (2014). *Mycoplasma pneumoniae* Modulates STAT3-STAT6/EGFR-FOXA2 Signaling To Induce Overexpression of Airway Mucins. *Infection and Immunity*, 82(12), 5246–5255.
- Hurtado, M. P., de la Parte, M. A., & Brito, A.. (2002). Staphylococcus aureus: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112-118.
- Jordan, R. E., Adab, P., & Cheng, K. K. (2020). Covid-19: risk factors for severe disease and death. *BMJ*, m1198.
- Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K. I., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., . . . Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of meticillin-resistant Staphylococcus aureus. *The Lancet*, 357(9264), 1225–1240.
- Kutty, P. K., Jain, S., Taylor, T. H., Bramley, A. M., Diaz, M. H., Ampofo, K., Arnold, S. R., Williams, D. J., Edwards, K. M., McCullers, J. A., Pavia, A. T., Winchell, J. M., Schrag, S. J., & Hicks, L. A. (2018). Mycoplasma pneumoniae Among Children Hospitalized With Community-acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*.
- Landolt, P., Stephan, R., & Scherrer, S. (2019). Development of a new High Resolution Melting (HRM) assay for identification and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex samples. *Scientific Reports*, 9(1).

- Li, H., Liu, S. M., Yu, X. H., Tang, S. L., & Tang, C. K. (2020). Coronavirus disease 2019 (COVID-19): status and future perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(5), 105951.
- Machado, B., Hodel, K., Barbosa-Júnior, V., Soares, M., & Badaró, R. (2020). The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: An Overview Based on the Literature. *Viruses*, 13(1), 40.
- Martínez Chamorro, E., Díez Tascón, A., Ibáñez Sanz, L., Ossaba Vélez, S., & Borruel Nacenta, S. (2021). Diagnóstico radiológico del paciente con COVID-19. *Radiología*, 63(1), 56–73.
- Mehta, O. P., Bhandari, P., Raut, A., Kacimi, S. E. O., & Huy, N. T. (2021). Coronavirus Disease (COVID-19): Comprehensive Review of Clinical Presentation. *Frontiers in Public Health*, 8.
- Microbiología y salud*. (2019, marzo). 3Ciencias. Recuperado 13 de abril de 2022, de <https://www.3ciencias.com/libros/libro/microbiologia-y-salud/>
- Mitsi, E., Reiné, J., Urban, B. C., Solórzano, C., Nikolaou, E., Hyder-Wright, A., Pojar, S., Howard, A., Hitchins, L., Glynn, S. A., Farrar, M., Liatsikos, K., Collins, A., Walker, N. F., Hill, H., German, E. L., Cheliotis, K. S., Byrne, R. L., Williams, C. T., . . . Ferreira, D. M. (2022). Streptococcus pneumoniae colonization associates with impaired adaptive immune responses against SARS-COV-2. *Journal of Clinical Investigation*, 132(7).
- Mohamadian, M., Chiti, H., Shoghli, A., Biglari, S., Parsamanesh, N., & Esmaeilzadeh, A. (2021). COVID-19: Virology, biology and novel laboratory diagnosis. *The Journal of Gene Medicine*, 23(2).
- Morris, D. E., Cleary, D. W., & Clarke, S. C. (2017). Secondary Bacterial Infections Associated with Influenza Pandemics. *Frontiers in Microbiology*, 8.
- Padilla Benítez, T., Rojas, A. L., Munive Báez, L., Monsiváis Orozco, A. C., Dionicio Avendaño, A. R., Corona Villalobos, C. A., Guzmán Valderrábano, C. R., Gochicoa Rangel, L. G., Lechuga Trejo, I., Avilés Ramírez, B. A., Velázquez Serratos, J. R., García Colín, E. R., Del Razo Rodríguez, R., Olmedo Jiménez, A., Madrid Mejía, W., Ochoa García, E., Uc Rosaldo, J. E., Mercado Rodríguez, J. Y., Hinojosa Maya, S. Romo Domínguez, K. J. (2020).

- Manifestaciones clínicas de la COVID-19. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 33(s1), 10–32.
- Prince, O. A., Krunkosky, T. M., & Krause, D. C. (2014). *In Vitro* Spatial and Temporal Analysis of *Mycoplasma pneumoniae* Colonization of Human Airway Epithelium. *Infection and Immunity*, 82(2), 579–586.
- Senok, A., Alfaresi, M., Khansaheb, H., Nassar, R., Hachim, M., Al Suwaidi, H., Almansoori, M., Alqaydi, F., Afaneh, Z., Mohamed, A., Qureshi, S., Ali, A., Alkhajeh, A., & Alsheikh-Ali, A. (2021). Coinfections in Patients Hospitalized with COVID-19: A Descriptive Study from the United Arab Emirates. *Infection and drug resistance*, 14, 2289–2296.
- Soltani, S., Faramarzi, S., Zandi, M., Shahbahrami, R., Jafarpour, A., Rezayat, S. A., Pakzad, I., Abdi, F., Malekifar, P., & Pakzad, R. (2021). Bacterial Coinfection among Coronavirus Disease 2019 Patient groups: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. *New Microbes and New Infections*, 43, 100910.
- Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H., & Stratton, C. W. (2020). Laboratory Diagnosis of COVID-19: Current Issues and Challenges. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6).
- Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):363-374.
- Taylor TA, Unakal CG. Staphylococcus Aureus. [Updated 2022 Feb 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- TC. Barnett, JN. Cole, T. Rivera-Hernández, A. Henningham, JC. Paton, V. Nizet, MJ. Walker. Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease *Cellular Microbiology*. 2015;17(12): 1721-1741.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). Staphylococcus aureus Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661.

- Tost, J., & Gut, I. (2017). Molecular techniques for DNA methylation studies. En *Elsevier eBooks* (pp. 103-139).
- Tsang, H. F., Chan, L. W. C., Cho, W. C. S., Yu, A. C. S., Yim, A. K. Y., Chan, A. K. C., Ng, L. P. W., Wong, Y. K. E., Pei, X. M., Li, M. J. W., & Wong, S. C. C. (2020). An update on COVID-19 pandemic: the epidemiology, pathogenesis, prevention and treatment strategies. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 19(7), 877–888.
- Turner, N., Sharma-Kuinkel, B. K., Maskarinec, S. A., Eichenberger, E. M., Shah, P., Carugati, M., Holland, D., & Fowler, V. G. (2019). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: An Overview of Basic and Clinical research. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 203-218.
- van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., & Gosbell, I. B. (2012b). Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 362–386.
- Waites KB, Xiao L, Liu Y, Balish MF, Atkinson TP. 2017. *Mycoplasma pneumoniae* from the respiratory tract and beyond. *Clin Microbiol Rev* 30:747– 809.
- Weiser, J. N. (2018, 29 marzo). *Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization, and invasion*. Nature.
- Wertheim, H. F., Melles, D. C., Vos, M. C., van Leeuwen, W., van Belkum, A., Verbrugh, H. A., & Nouwen, J. L. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(12), 751–762.
- Whitney, C. G., Farley, M. M., Hadler, J., Harrison, L. H., Bennett, N. M., Lynfield, R., Reingold, A., Cieslak, P. R., Pilishvili, T., Jackson, D., Facklam, R. R., Jorgensen, J. H., & Schuchat, A. (2003). Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein–Polysaccharide Conjugate Vaccine. *New England Journal of Medicine*, 348(18), 1737–1746.
- Winter, A. K., & Hegde, S. T. (2020). The important role of serology for COVID-19 control. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(7), 758–759.

- Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-Resolution genotyping by Amplicon melting analysis using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6), 853-860.
- Wölfel, R., Corman, V. M., Guggemos, W., Seilmaier, M., Zange, S., Müller, M. A., ... & Wendtner, C. (2020). Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*, 581(7809), 465-469.
- World Health Organization. Clinical management of COVID-19. [citado el 17 de octubre de 2021].: <https://covid19.who.int/>
- Yahiaoui, R. Y., den Heijer, C. D., van Bijnen, E. M., Paget, W. J., Pringle, M., Goossens, H., Bruggeman, C. A., Schellevis, F. G., & Stobberingh, E. E. (2016). Prevalence and antibiotic resistance of commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *Future Microbiology*, 11(6), 737–744.
- Yan, R., Zhang, Y., Li, Y., Xia, L., Guo, Y., & Zhou, Q. (2020). Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 367(6485), 1444-1448.

12.Anexos

12.1 Anexo 1. Preparación de medio de cultivo Eaton con Glucosa

Reactivos

- 2.0 g de medio de cultivo “Mycoplasma broth base”
- 0.5 g de dextrosa monohidratada
- 2000 UI de penicilina G
- 1 ml rojo de fenol (solución)
- 65 ml de agua Tridestilada
- 10 ml dializado de levadura
- 25 ml suero de caballo

Procedimiento

En una balanza granataria pesar el medio “Mycoplasma broth base” y la dextrosa Posteriormente añadir el agua Tridestilada y homogenizar perfectamente. De ser necesario calentar la solución 1 min para que se disuelvan mejor los sólidos. Con ayuda de una pipeta analítica o una micropipeta, medir 1 ml de la solución de rojo de fenol y añadir a la solución dentro del matraz. Esterilizar la solución en autoclave a 15 lb por 15 minutos. Una vez pasado el tiempo dejar enfriar a temperatura ambiente. Agregar suero de caballo (20%) y dializado de levadura (10%)

Pesar la penicilina G dentro de un tubo Eppendorf con ayuda de la balanza analítica y posteriormente añadir al medio de cultivo en condiciones de esterilidad. Verter el dializado de levadura y el suero de caballo (estériles) en el medio de cultivo, homogenizar perfectamente y verter el medio en Tubos de 6 ml para su conservación a - 4°C hasta su posterior uso.

12.2 Anexo 2. Carta de consentimiento informado.

Mediante la firma de este documento, doy mi consentimiento para participar en el proyecto de investigación "Detección de micoplasmas y cocos piógenos en pacientes positivos a SARS-CoV-2", el cual está realizando el estudiante de maestría en microbiología y del instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP-ICUAP) Axel Piña Flores, en colaboración con el Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos del Centro de Detección Biomolecular de la BUAP Este estudio pretende aportar resultados que documenten posibles coinfecciones de micoplasmas y cocos piógenos en pacientes positivos a SARS-COV-2 mismos que servirán para un manejo adecuado de los pacientes con esta enfermedad.

Entiendo que mi participación será permitiendo que los investigadores me tomen una muestra que consiste en hisopado nasofaríngeo, esto no repercute en mi integridad física o daño a la salud, ni en lo económico ya que los estudios que se realizaran serán costeados por la BUAP. Es también de mi consentimiento que los investigadores pueden ponerse en contacto conmigo en el futuro para saber de los resultados obtenidos y a fin de obtener más información acerca de la enfermedad, para que estos ayuden a entender el posible papel de coinfecciones por micoplasmas y cocos piógenos en la enfermedad COVID-19. Fui elegido(a) para participar en este estudio porque padezco síntomas de COVID-19 o estuve en contacto con pacientes positivos a dicha enfermedad.

He concedido libremente mi participación en el estudio. Se me ha informado que es totalmente voluntaria y que aun después de iniciado el estudio, puedo rehusarme a participar o contestar preguntas en el momento que yo decida. Se me ha notificado también que los resultados obtenidos en el estudio son confidenciales y que mi nombre no será publicado en ningún informe y que además si rehusó a participar, no me será afectado de ninguna manera.

También he sido informado que mi participación es voluntaria y que no recibiré ninguna compensación económica.

Folio: _____ Ciudad de Puebla, Pue. A ____ de ____ del 20____.

Nombre y firma del paciente

12.3 Anexo 3. Cuestionario de síntomas clínicos.

Nombre:	
Edad:	
Sexo:	
Dosis de Vacunación:	
¿Ha presentado alguno de los siguientes síntomas clínicos en los últimos días?:	<p>Dolor muscular___ Tos seca___ Tos con expectoraciones___ Temperatura___</p> <p>Fatiga___ Dolor de cabeza___ Dificultad al respirar___ escurrimiento o congestión nasal___ conjuntivitis___ anosmia___ disgeusia___ nauseas___</p> <p>Dolor abdominal___ cuadro diarreico___</p>
Algún otro síntoma que no se haya mencionado:	
Presenta alguna de las siguientes Comorbilidades:	<p>Hipertensión___ Asma___ Diabetes___</p> <p>Cáncer___ Cardiopatías___ EPOC___</p> <p>Enfermedad autoinmune___</p> <p>Inmunodeficiencia___ Obesidad___</p>
Alguna otra comorbilidad que no se haya mencionado:	