



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

“DISEÑO DE UNA PCR MÚLTIPLE PARA DETECTAR
TRES MICROORGANISMOS ASOCIADOS A
NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD (*S.
pneumoniae*, *S. aureus* y *C. pneumoniae*)”

TRABAJO DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

CYNTHIA AVENDAÑO PORTUGAL

DIRECTORA:

D.C. FABIOLA AVELINO FLORES

CODIRECTORA:

D.C. ELSA IRACENA CASTAÑEDA ROLDÁN

AGOSTO, 2020



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a la directora de esta tesis, la Dra. Fabiola Avelino Flores, por la dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué al laboratorio. Asimismo, agradezco a la Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán, por su amabilidad para facilitarme su tiempo y sus ideas.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre metodología, y sobre todo por permitirte aprender en su laboratorio las técnicas de biología molecular, mi agradecimiento al Dr. Carlos Alberto Contreras Paredes.

Gracias a mi familia, a mis padres y a mi hermano, por su apoyo y comprensión. Por último, gracias a mis amigos, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano.

A todos, muchas gracias.

DEDICATORIA

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy; todos mis logros se los debo a ustedes, porque siempre me han motivado a alcanzar mis anhelos.

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | |
| RESUMEN | 1 |
| ANTECEDENTES GENERALES..... | 2 |
| Epidemiología de la NAC | 2 |
| Generalidades de la NAC | 3 |
| Etiología | 4 |
| ANTECEDENTES ESPECÍFICOS | 7 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 7 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 8 |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | 8 |
| Fundamento de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)..... | 10 |
| JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA | 15 |
| OBJETIVOS..... | 17 |
| Objetivo General | 17 |
| Objetivos Específicos..... | 17 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |
| 1. Análisis <i>in silico</i> para el diseño de los oligonucleótidos..... | 18 |
| 2. Identificación de cada uno de los microorganismos mediante PCR punto final usando los oligonucleótidos anteriormente diseñados | 24 |
| Extracción de ADN | 25 |
| PCR punto final..... | 25 |
| Secuenciación de ADN | 27 |
| 3. Estandarización de la PCR múltiple | 27 |
| Estandarización de la PCR punto final..... | 27 |
| PCR múltiple para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 28 |
| PCR múltiple para la detección de <i>S. aureus</i> , <i>S. pneumoniae</i> y <i>C. pneumoniae</i> | 29 |
| RESULTADOS..... | 31 |
| 1.- Análisis <i>in silico</i> de los oligonucleótidos..... | 31 |
| 2.- Extracción de ADN..... | 37 |
| 3.- Estandarización de PCR punto final | 38 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 38 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 42 |
| <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | 45 |
| 4.- PCR múltiple..... | 48 |

| | |
|--|-----------|
| DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 50 |
| 1.- Análisis <i>in silico</i> de oligonucleótidos | 50 |
| 2.- Extracción de ADN..... | 50 |
| 3.- Estandarización de las reacciones de PCR punto final..... | 51 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 52 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 52 |
| <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> | 53 |
| 4.- Resultados de secuenciación. | 54 |
| 5.- PCR múltiple para la detección de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> y <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> | 55 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| PERSPECTIVAS | 57 |
| REFERENCIAS | 58 |
| ANEXOS | 69 |
| ANEXO 1. | 69 |
| ANEXO 2. | 70 |
| ANEXO 3. | 76 |
| ANEXO 4 | 79 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Secuencia del gen <i>nucA</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| Figura 2. Gráfico del gen <i>nucA</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| Figura 3. Secuencia consenso utilizada para el proyecto Refseq del NCBI del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> | 20 |
| Figura 4. Secuencia del gen <i>lytA</i> de la cepa 7751 de <i>S. pneumoniae</i> | 20 |
| Figura 5. Secuencia del gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> | 21 |
| Figura 6. Gráfico del gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> | 21 |
| Figura 7. Alineamiento de secuencias del gen <i>lytA</i> | 22 |
| Figura 8. Alineamiento de secuencias del gen <i>ompA</i> de las diferentes cepas de <i>Chlamydia</i> | 22 |
| Figura 9. Oligonucleótidos encontrados para el gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> | 23 |
| Figura 10. Oligonucleótidos encontrados para el gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> | 23 |
| Figura 11. Análisis del oligonucleótido <i>nucA</i> Forward..... | 32 |

| | |
|--|----|
| Figura 12. Análisis del oligonucleótido <i>nucA</i> Reverse..... | 32 |
| Figura 13. Análisis del oligonucleótido <i>lytA</i> Forward..... | 33 |
| Figura 14. Análisis del oligonucleótido <i>lytA</i> Reverse..... | 33 |
| Figura 15. Análisis del oligonucleótido <i>ompA</i> Forward..... | 34 |
| Figura 16. Análisis del oligonucleótido <i>ompA</i> Reverse..... | 34 |
| Figura 17. Resultados del alineamiento del amplicón esperado (279 pb) para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> | 35 |
| Figura 18. Resultado del alineamiento del amplicón esperado (192 pb) para la identificación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 36 |
| Figura 19. Resultados del alineamiento del amplicón esperado (345 pb) para la identificación de <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | 36 |
| Figura 20. Gel de agarosa al 1%, muestra los resultados de la extracción de ADN de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 37 |
| Figura 21. Gel de agarosa al 1.5% muestra el resultado de la PCR punto final para la amplificación del gen <i>nucA</i> | 38 |
| Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% muestra la amplificación del gen <i>nucA</i> de la cepa ATCC [®] 25923 [™] a diferentes concentraciones de ADN..... | 39 |
| Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% teñido muestra la amplificación del gen <i>nucA</i> de la cepa ATCC [®] 25923 [™] a diferentes concentraciones de ADN..... | 40 |
| Figura 24. Gel de agarosa al 1.5% muestra la amplificación del gen <i>nucA</i> de la cepa ATCC [®] 25923 [™] usando como ADN diluciones bacterianas a diferentes concentraciones..... | 40 |
| Figura 25. Gel de agarosa al 1.5% muestra el resultado de la PCR de colonia para la amplificación del gen <i>nucA</i> de la cepa ATCC [®] 25923 [™] | 41 |
| Figura 26. Resultados de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR punto final para el gen <i>nucA</i> de <i>S. aureus</i> | 41 |
| Figura 27. Muestra los alineamientos de la secuenciación de <i>nucA</i> , junto con los valores de E-value y la identidad con <i>S. aureus</i> | 42 |
| Figura 28. Gel de agarosa al 1.5%, muestra el resultado de la PCR punto final para la amplificación del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> por triplicado..... | 43 |
| Figura 29. Gel de agarosa al 1.5%, muestra la amplificación del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> a diferentes concentraciones de ADN..... | 43 |
| Figura 30. Gel de agarosa al 1.5%, muestra la amplificación del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> usando diluciones bacterianas a diferentes concentraciones..... | 44 |
| Figura 31. Gel de agarosa al 1.5%, muestra la amplificación del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> usando diluciones bacterianas a diferentes concentraciones..... | 44 |

| | |
|---|----|
| Figura 32. Resultados de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR punto final para el gen <i>lytA</i> de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 45 |
| Figura 33. Alineamiento del resultado de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR para el gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> | 45 |
| Figura 34. Gel de agarosa al 1.5%, muestra el resultado de la PCR punto final para la amplificación del gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> por duplicado..... | 46 |
| Figura 35. Gel de agarosa al 1.5%, muestra la amplificación del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydophila pneumoniae</i> usando diferentes de volúmenes de la solución bacteriana madre como ADN..... | 46 |
| Figura 36. Resultados de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR punto final para el gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> | 47 |
| Figura 37. Alineamiento del resultado de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR para el gen <i>ompA</i> de <i>C. pneumoniae</i> | 47 |
| Figura 38. Gel de agarosa al 1% teñido, muestra los resultados de la extracción de ADN de sangre infectada..... | 48 |
| Figura 39. Gel de agarosa al 1.5%, muestra la amplificación del gen <i>nucA</i> de <i>S aureus</i> con ADN extraído de sangre infectada con la dosis mínima infectiva, amplificación de <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> desde una muestra de sangre infectada y amplificación de los genes <i>lytA</i> y <i>nucA</i> con ADN extraído desde sangre coinfectada con la dosis mínima infectiva de cada microorganismo..... | 49 |
| Figura 40. Gel de agarosa al 2%, muestra la amplificación por PCR multiplex de los genes <i>lytA</i> , <i>nucA</i> y <i>ompA</i> | 49 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Tamaño y número de acceso del NCBI de los genes blanco seleccionados para el diseño de la PCR múltiple..... | 19 |
| Tabla 2. Cepas utilizadas para el desarrollo de la PCR multiplex..... | 24 |
| Tabla 3. Condiciones de amplificación para la PCR multiplex..... | 25 |
| Tabla 4. Componentes de cada reacción de PCR realizada para la amplificación del gen <i>nucA</i> de <i>Staphylococcus pneumoniae</i> | 26 |
| Tabla 5. Componentes de cada reacción de PCR realizada para la amplificación del gen <i>lytA</i> de <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 26 |
| Tabla 6. Componentes de cada reacción de PCR realizada para la amplificación del gen <i>ompA</i> de <i>Chlamydophila pneumoniae</i> | 26 |
| Tabla 7. Componentes de cada reacción de PCR realizada utilizando ADN extraído de sangre infectada con <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 29 |
| Tabla 8. Componentes de cada reacción de PCR multiplex..... | 30 |

| | |
|---|----|
| Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes blanco y tamaño de los amplicones..... | 31 |
| Tabla 10. Concentración de los oligonucleótidos y del ADN extraído de las diferentes cepas utilizadas y los valores de las relaciones A260/A280 y A260/A230..... | 37 |

RESUMEN

A pesar de que se conocen las causas más frecuentes de la Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) y el tratamiento de la misma, esta afección sigue siendo importante como causa de enfermedad y mortalidad alrededor del mundo. La mayoría de las veces la muerte asociada a NAC se debe a la falta de un diagnóstico oportuno. Actualmente el estándar de oro para la identificación de los microorganismos causantes de la enfermedad es el cultivo *in vitro*, que puede llevar hasta 72 h; por eso es necesario implementar métodos que permitan la identificación oportuna de los agentes causales de la enfermedad, como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que puede ser confiable, específica y rápida. En el presente trabajo se realizó la estandarización de una PCR múltiple para el diagnóstico de tres de los agentes causales más importantes asociados a la NAC que son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*. Se extrajo el ADN de estas cepas tipo mediante el kit Zymo Research ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep, se procedió a estandarizar las reacciones de PCR de punto final para cada uno de los microorganismos, determinando su sensibilidad en unidades formadoras de colonias (UFC) y en concentración de ADN, los genes blanco utilizados fueron: *lyt A* para *S. pneumoniae*, *nuc* para *S. aureus* y *ompA* para *C. pneumoniae*. Posteriormente se estandarizó la PCR múltiple con las cepas tipo. Por último, se inoculó una muestra de sangre con cada uno de los microorganismos y se llevó a cabo la PCR múltiple directamente de sangre total utilizando el kit KAPA blood PCR. Los productos de amplificación fueron observados en geles de agarosa al 1.5% y se tiñeron con Bromuro de etidio a 0.5 µg/mL. Los amplicones se secuenciaron. El ADN extraído de cada una de las cepas cumplió con los estándares de calidad establecidos, la estandarización de la PCR de punto final para cada uno de los microorganismos originó los tamaños de amplicones esperados para *nuc* el amplicón fue de 279 pb, para *lytA* de 192 pb y para *ompA* fue de 345 pb, la secuenciación y el análisis de la secuenciación corroboró que si son específicos para el diagnóstico de los microorganismos en estudio y por último se procedió a estandarizar la PCR múltiple tanto con ADN puro de cada microorganismo como de sangre inoculada con los microorganismos, se obtuvieron los amplicones esperados en ambos casos.

ANTECEDENTES GENERALES

Epidemiología de la NAC

La neumonía es la principal causa individual de mortalidad infantil en todo el mundo. Se calcula que la neumonía provocó el deceso de unos 920 136 niños menores de 5 años en 2015, lo que supone el 15% de todas las defunciones de niños menores de 5 años en todo el mundo (OMS, 2016).

La incidencia de NAC en el mundo varía por país, sexo y edad, lo que afecta en los registros relacionados a la epidemiología, etiología, morbilidad, mortalidad, tasa de resistencia a antibióticos y costo económico de la enfermedad (Báez-Saldaña *et al.*, 2013). Estudios de la población basados en la incidencia de pacientes diagnosticados con NAC que requieren hospitalización, han reportado una incidencia de alrededor de 1.1 por cada 1000 adultos en la población de Canadá, 2.6 por cada 1000 en España, 2.7 por cada 1000 en Ohio y 4 por cada 1000 en Pennsylvania (Lim *et al.*, 2009). Aunque pareciera que la incidencia es baja la NAC es la sexta causa de mortalidad general y la primera causa de mortalidad por enfermedades infecciosas, la mortalidad atribuible a la neumonía adquirida en la comunidad es del 1 al 5% para los pacientes con tratamiento ambulatorio, de 5,7 a 25% para quienes requieren tratamiento hospitalario y asciende hasta el 50% para los pacientes que requieren cuidados intensivos (Asociación Colombiana de Neumología y Cirugía de Tórax (ACNCT) , Asociación Colombiana de Medicina Crítica y Cuidado Intensivo (AMCI) , Asociación Colombiana de Medicina Interna (ACMI), 2013).

La edad es un determinante importante de la frecuencia de NAC, como lo demuestra la frecuencia elevada en los menores de dos años y a partir de los 50 años, aunque varía dependiendo del país (Báez-Saldaña *et al.*, 2013). Estudios en el Reino Unido reportan que la proporción de adultos que requieren hospitalización está entre el 22 y 42%, con una mortalidad entre 5 y 12%, y en términos generales la mortalidad debida a neumonía no ha mostrado disminución significativa desde la utilización rutinaria de la penicilina (Woodhead, 2008). Y particularmente en los pacientes de 65 años o más la mortalidad tiende a incrementarse (Fry *et al.*, 2005). La tasa de mortalidad observada en Chile por

esta causa durante el año 2009 fue de 20,8 por 100.000 para la población general, y de 199,8 por 100.000 para los mayores de 65 años (Ministerio de salud Chileno, 2011).

Por otra parte, el porcentaje de adultos hospitalizados con NAC que requieren un manejo en la unidad de cuidados intensivos varía de 1.2% en un estudio en España a 5% en un estudio del multicentro BTS hasta 10% en otro estudio español. Alrededor del 8% y 10% de los ingresados a una unidad de cuidados intensivos se diagnosticó como NAC severa. Un análisis del ingreso de pacientes a la unidad de cuidados intensivos en Inglaterra, Gales e Irlanda del Norte entre 1995 y 2004, reporta que la NAC es la causa del 5.9% de todas las admisiones a las unidades de cuidados intensivos (Lim *et al.*, 2009). Aunque existen pocas condiciones médicas con niveles de letalidad tan altos, la NAC cumple con los criterios epidemiológicos para ser considerada un problema grave de salud pública. (Ministerio de salud Chileno, 2011).

En México la neumonía se encuentra entre las veinte causas principales de enfermedad Nacional; en el año 2015 se registró una incidencia de 129.36 casos por cada 100,000 habitantes y de estos casos los decesos reportados fueron un total de 156,530 personas, se estima que los grupos más afectados son aquellos de 1-4 años y 65 años y más. En el estado de Puebla la neumonía y bronconeumonía tienen una incidencia de 75.90 por cada 100,000 habitantes, siendo el grupo de mayor riesgo los niños menores de 1 año. (Secretaría de salud/DGE, 2005). La neumonía adquirida en la comunidad es una enfermedad común y potencialmente grave. Se asocia con una morbilidad y mortalidad considerables, especialmente en adultos mayores y en aquellos con comorbilidades significativas (IMSS, 2017).

Generalidades de la NAC

La NAC es un síndrome en el cual se desarrolla una infección aguda de los pulmones en personas que no han sido hospitalizadas recientemente y que no han tenido exposición regular al sistema de salud. (Musher & Thorner, 2014). Con una duración inferior a 14 días, o iniciada en los últimos 14 días (Andrés Martín *et al.*, 2012). En esta definición se excluye la neumonía que se presenta en personas residentes en hogares de cuidado crónico o en hogares geriátricos

(Asociación Colombiana de Neumología y Cirugía de Tórax (ACNCT), Asociación Colombiana de Medicina Crítica y Cuidado Intensivo (AMCI), Asociación Colombiana de Medicina Interna (ACMI), 2013). Su gravedad oscila desde cuadros leves en personas sanas, que pueden confundirse con resfriados, bronquitis o infecciones no respiratorias, hasta cuadros graves que requieren ingreso en unidades de tratamiento intensivo y ponen en peligro la vida de los pacientes (Miravittles, 2001). La NAC se clasifica clásicamente en tres grandes síndromes: NAC típica o bacteriana, atípica (producida por virus o bacterias atípicas) y no clasificable (casos que no cumplen criterios que permitan incluirlos en ninguno de los 2 primeros grupos) (Blanquer & Sanz, 2010).

La neumonía bacteriana típica (p. ej., *Streptococcus pneumoniae*) se caracteriza por fiebre elevada con escalofríos, dolor pleurítico y/o abdominal. Habitualmente, existe tos, aunque puede ser leve. La auscultación pulmonar que inicialmente puede ser normal posteriormente pondrá de manifiesto hipoventilación, crepitantes y/o un soplo tubárico.

La neumonía atípica (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Legionella spp.*) cursa generalmente de forma subaguda y sin afectación importante del estado general. La tos es el síntoma predominante y se suele acompañar de fiebre, rinitis, faringitis y/o meningitis. Puede existir dolor torácico generalizado en relación con los accesos repetidos de tos seca. Suele afectar más a niños mayores. Las neumonías virales son más frecuentes en niños pequeños y se suelen acompañar de un cortejo sintomático más amplio, con participación de otros niveles de las vías respiratorias. La fiebre, la tos y la afectación del estado general tienen una significación variable (Andrés Martín *et al.*, 2012).

Etiología

En la NAC, el *S. pneumoniae* es el agente causal más frecuente en la población general (21 a 39%), seguido por *Haemophilus influenzae* (1.5 al 14%) y *Staphylococcus aureus* (0.8 y 8.7%). Otros microorganismos encontrados como causantes de la NAC son la *C. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, especies de *Legionella*, bacterias aerobias gram negativas, virus de la influenza, adenovirus y virus sincitial respiratorio. (IMSS, 2009).

Este trabajo se centrará en 3 de los principales factores etiológicos que causan la Neumonía Adquirida en la Comunidad:

S. pneumoniae es una bacteria Gram positiva, capsulada, aunque se conocen 90 serotipos diferentes, sólo son 12 serotipos con mayor impacto clínico y es así como los serotipos: 1 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 14 - 18 - 19 y 23, son responsables del 80% o más de las infecciones neumocóccicas invasoras. La distribución geográfica y por grupo etario de estos serotipos también tiene variaciones; se ha observado que los serotipos 1 y 5 son más frecuentes en regiones del mundo de menor desarrollo socioeconómico. *S. pneumoniae* forma parte de la flora bacteriana normal de la mucosa nasal y faríngea, siendo su hábitat preferencial la nasofaringe posterior. La colonización por *S. pneumoniae* es más elevada en niños y adultos sobre los 60 años de edad, comparativamente a los adultos de edad mediana. *S. pneumoniae* se ubica dentro de las principales prioridades como problema de salud pública tanto en países industrializados como en aquellos menos desarrollados, es responsable de elevada morbilidad y letalidad ya que es uno de los principales agentes causales de una gran variedad de cuadros clínicos, infecciones benignas como otitis media y sinusitis agudas, e infecciones severas como septicemia, meningitis y neumonía (Preado, 2001).

S. aureus es una bacteria con forma de coco gram positiva capaz de provocar una amplia gama de enfermedades, ya sea por acción directa o mediante la acción de sus toxinas (Álvarez Lam & Ponce Bittar, 2012). El género *Staphylococcus* comprende 51 especies y se puede dividir en dos grupos principales: estafilococos coagulasa-positivos, cuyo miembro principal es *S. aureus*, y estafilococos coagulasa-negativos (CoNS) (Rochetti *et al.*, 2018). Debido a que aproximadamente el 20% de la población es portadora permanente de *S. aureus* en fosas nasales y un 30% intermitente, los pacientes con infecciones por *S. aureus* suelen infectarse por la misma cepa que coloniza sus fosas nasales. La colonización también permite la transmisión entre individuos tanto en el ambiente como en la comunidad (Pahissa, 2009).

Las clamidias son un grupo especial de bacterias, poseen ADN, ARN, ribosomas similares a los de las bacterias Gram negativas y pared celular. Una vez alcanzado el huésped adecuado, la bacteria se adhiere a la superficie de

determinados tejidos, generalmente epitelios columnares o transicionales, y penetra en las células de estos por medio de un fagosoma (Roca, 2007). Existen tres especies de clamidias patógenas para el hombre: *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* y *Chlamydoghila pneumoniae*. (Roca, 2007).

C. pneumoniae es una bacteria intracelular obligada, se multiplica dentro de las vacuolas unidas a la membrana en las células huésped eucariotas, pero no pueden generar ATP y, por lo tanto, dependen de los depósitos de ATP de la célula huésped para todos los requerimientos de energía, son incapaces de la biosíntesis de nucleótidos de novo y dependen de los grupos de nucleótidos del huésped (Blasi, Tarsia, & Aliberti, 2009).

C. pneumoniae, conocida también con el nombre de agente "*Taiwan Acute Respiratory*" (TWAR), es un microorganismo difícil de cultivar, que produce infecciones respiratorias altas y neumonías, especialmente en niños y adultos jóvenes, se transmite por vía respiratoria entre personas que están en estrecho contacto. Algunos estudios sugieren que este germen puede tener algún papel en la etiopatogenia de la arteriosclerosis (Liu y Waters, 2005; Muhlestein *et al.*, 2005). Para penetrar en el organismo humano la bacteria utiliza la célula epitelial columnar o de transición, infectando las vías respiratorias y los monocitos. Inicialmente lo hace en las células respiratorias de las vías altas y/o bajas y se disemina por la sangre gracias a los monocitos. Esto le permite la colonización a distancia de muchos lugares del organismo, tales como las arterias. Las personas infectadas por *C. pneumoniae* desarrollan una respuesta inmunológica celular la cual se caracteriza por ser poco intensa, pero persistente en el tiempo, y puede resolver la infección (Villegas, Sorlózano, Camacho y Gutiérrez, 2008). Se ha reportado que *C. pneumoniae* representa un número relativamente grande de casos (6–20%) de NAC, aunque los datos se basan principalmente en determinaciones serológicas (Blasi, Tarsia, & Aliberti, 2009). El curso clínico puede variar desde enfermedades leves y autolimitadas hasta formas graves de neumonía, particularmente en pacientes de edad avanzada y aquellos con enfermedades cardiopulmonares coexistentes. Este agente participa en la coinfección con otros agentes bacterianos en aproximadamente el 30% de los casos adultos de NAC (Blasi, Tarsia, & Aliberti, 2009).

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Streptococcus pneumoniae

Existen varios factores que contribuyen a la virulencia de *S. pneumoniae* (Preado, 2001), dentro de ellos destaca la autolisina (N-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (lytA)) que es una proteína que induce una respuesta autolítica característica que se presenta durante la fase de crecimiento estacionario y esto conlleva a la lisis excesiva de los cultivos *in vitro*. LytA provoca la lisis mediante la escisión del enlace de lactil-amida que une los péptidos del tallo y las cadenas de glicano del peptidoglicano, dando como resultado la hidrólisis de la pared celular (Mellroth *et al.*, 2012). Se estima que lytA es importante en la patogénesis de las infecciones pneumococcica, además de jugar un papel directo en la virulencia; ya que media la liberación de componentes de la pared celular y estos juegan un rol importante para provocar una alta inflamación en modelos animales. En adición a eso, estudios sugieren que la autolisina juega un papel indirecto en la patogénesis mediando la lisis celular y subsecuentemente la liberación de factores de virulencia como pneumolisina (Whatmore & Dowson, 1999). A pesar de la importancia clínica y el frecuente aislamiento de *S. pneumoniae*, no hay un estándar de oro establecido o método de referencia para su identificación. La identificación de este patógeno en el laboratorio ha sido realizada usando uno o más ensayos, incluyendo tinción de Gram, analizando la morfología de la colonia, probando su actividad hemolítica en agar sangre, su susceptibilidad a optoquina, utilización de carbohidratos, manual miniaturizado como el API 20 Strep system (bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.), y pruebas de ADN (Gen-Probe, San Diego, Calif.) (Kellogg *et al.*, 2001).

Un sistema de detección rápido basado en inmunocromatografía de orina ha resultado ser eficiente en pacientes adultos con neumonía, sin embargo, no es muy específico en niños. En los últimos años muchos investigadores han evaluado el uso de la PCR como herramienta para el diagnóstico de la neumonía causada por *S. pneumoniae*. En general la PCR es más sensible que el cultivo en agar y más rápido (Murdoch *et al.*, 2003).

Staphylococcus aureus

S. aureus es un microorganismo ampliamente distribuido en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia, *S. aureus* tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos. *S. aureus* es un microorganismo capaz de producir componentes superficiales llamados toxinas y producir enzimas extracelulares (Zendejas et al., 2014). Las cepas de *S. aureus* producen una termonucleasa extracelular (Nucleasa A o TNasa) con una frecuencia similar a las cepas que producen coagulasa. La TNasa es una proteína con una masa molecular de 17 KDa. Es una endonucleasa que degrada ADN y ARN y es termoestable porque su actividad enzimática puede resistir hasta 100°C en un tiempo aproximado de una hora. La proteína TNasa está bien caracterizada; el gen *nuc* que codifica para esta proteína ha sido secuenciado y clonado con anterioridad (Brakstad, Aasbakk, & Maeland, 1992). Y se sabe que es producido por la mayoría las cepas de *S. aureus*; es por eso que es usado como criterio de diagnóstico de esta especie (Hamdan-Partida et al., 2015). Una característica importante de *S. aureus* es que produce biopelículas y *nuc* favorece esta formación. Cuando *nuc* se encuentra mutado o no está presente; se afecta la habilidad de *S. aureus* para crecer y diseminarse (Kiedrowski, 2012).

Existe un test enzimático para la identificación de *S. aureus*, basado en la producción de TNasa, pero la actividad de la TNasa no es específica para *S. aureus*, lo que sí es específica es la secuencia del gen codificante para la TNasa (*nuc*) presente en las distintas cepas de *S. aureus*, hay estudios que respaldan este hecho como el realizado por Liebl *et al.* (Brakstad, Aasbakk, & Maeland, 1992). La identificación de *S. aureus* por amplificación del gen *nuc* por PCR es considerado un método estándar de oro, y es considerado de gran importancia para poder establecer un diagnóstico rápido de una infección por *S. aureus* (Ali et al., 2014).

Chlamydomophila pneumoniae

Durante su ciclo celular adopta dos morfologías distintas, una forma infecciosa extracelular, el cuerpo elemental, y una forma replicativa intracelular, el cuerpo reticular. Es característica del orden de las *Chlamydiales* su habilidad para inhibir la fusión lisosomal, por mecanismos no definidos, permite al cuerpo elemental habitar en una vesícula, rodeada de una membrana protectora, llamada cuerpo de inclusión, visible al microscopio óptico. Entonces, se modifica la membrana externa del cuerpo elemental, desaparecen los aminoácidos azufrados y se conforman, funcionalmente, las porinas (Villegas, Sorlózano, Camacho y Gutiérrez, 2008).

La evidencia actual indica que los productos de ciertos genes de *Chlamydia pneumoniae* (principalmente la proteína de choque térmico 60), a través de la activación de los factores de transcripción (especialmente el factor nuclear kappa-B), son responsables de la activación de la mayoría de los elementos celulares en el tejido bronquial (epitelio, endotelio, monocitos (macrófagos, células de músculo liso), que producen una cascada de liberación de citoquinas y una regulación positiva de la molécula de adhesión, lo que favorece la entrada de células en las vías respiratorias, la infección persistente y la remodelación de las vías respiratorias (Blasi, Tarsia, & Aliberti, 2009).

Las principales y más abundantes proteínas en la membrana son las denominadas *major outer membrane protein* (MOMP), que mantienen una elevada homología entre especies (Jaqueti, 2000). Estas MOMP son los antígenos mejor caracterizados en las especies de *Chlamydia*, ya que se halla en mayor proporción (60%) en los cuerpos elementales y reticulares. Son importantes porque tienen funciones de porina. Esta proteína es común a todos los miembros de la familia *Chlamydiaceae*, aunque presenta diferencias estructurales y de inmunogenicidad en cada una de las especies (Villegas *et al.*, 2008).

El cultivo de *C. pneumoniae* presenta varias dificultades. La bacteria no crece en los medios de cultivo habituales, sino que precisa líneas celulares; hay que tener en cuenta que la técnica es compleja, que las muestras pueden alterar el cultivo (el esputo puede ser citotóxico), y que se precisan técnicas de inmunofluorescencia directa para ver el crecimiento. Otros problemas derivan de la toma de las muestras y su manejo. Las muestras procedentes de nasofaringe

presentan mejores resultados que las obtenidas de la garganta. También se pueden utilizar esputos, líquido pleural y lavado broncoalveolar.

Desde el punto de vista clínico, la espera de 3 semanas para poder detectar la elevación del título retrasa el diagnóstico. La inmunofluorescencia directa presenta menos sensibilidad que los cultivos. La presencia de artefactos conlleva una menor especificidad en muestras con moco y la detección de antígenos mediante ELISA también es poco sensible.

Por otra parte, la PCR no solo permitiría la detección oportuna de *C. pneumoniae*, sino que a su vez la de varios patógenos respiratorios en la misma muestra, tanto en coinfecciones como en infecciones con etiología múltiple (Jaqueti, 2000).

El desarrollo de la tecnología de PCR ha traído grandes ventajas al diagnóstico de infección por *C. pneumoniae*. Se ha empleado con éxito con muestras respiratorias, muestras de biopsia pulmonar y vascular, y sangre. Varios estudios han encontrado que la PCR es una técnica más sensible que el cultivo bacteriano (Blasi, Tarsia, & Aliberti, 2009).

Los genes de la familia MOMP han sido utilizados para detectar a *C. pneumoniae* por métodos moleculares; utilizándolos como genes blanco.

Fundamento de la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN o ADNc), la enzima (ADN polimerasa), los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg⁺), una solución amortiguadora o buffer y H₂O.

Las tres etapas principales de las que se compone la PCR son: desnaturalización, hibridación y extensión y posteriormente al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los

productos de la PCR o también llamados amplicones son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa.

En la primera etapa (desnaturalización) la doble hélice de ADN se separa en dos hebras. Para ello se realiza una incubación de la muestra a altas temperaturas (93- 97°C) (Mas *et al.*, 2001). El tiempo depende de la secuencia del templado, es decir, si la cantidad de G-C es alta, será necesario más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T (Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013). La renaturalización se producirá cuando la temperatura disminuya (Mas *et al.*, 2001).

En el segundo paso (hibridación) los cebadores se unen a las zonas 3' complementarias que flanquean el fragmento que queremos amplificar. Se realiza gracias a la bajada de la temperatura (50-65°C) (Mas *et al.*, 2001). Es importante que la temperatura de hibridación o temperatura de fusión (T_m) sea la óptima; ésta generalmente oscila entre 50-60 °C. Si el diseño de los primers es el correcto y la temperatura es la adecuada, la estabilidad y especificidad del complejo será eficiente (Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013).

En la tercera etapa (elongación) se produce la síntesis de una cadena sencilla (produciéndose un fragmento de doble cadena por la complementariedad) en la dirección 5' -> 3' mediante la enzima ADN polimerasa, la cual incorpora los deoxinucleótidos fosfato presentes en el medio siguiendo la cadena molde (Mas *et al.*, 2001). La temperatura óptima para la reacción es de 72 °C, ya que a esa temperatura la enzima es funcional. Al final del ciclo, se habrán formado los amplicones con un tamaño dictado por el número total de pares de bases (pb).

Al final de la PCR, para saber si la reacción transcurrió eficientemente, los amplicones son visualizados a través de una electroforesis en geles de agarosa. La electroforesis consiste en la separación de grandes moléculas como los ácidos nucleicos a través de una matriz sólida que funciona como un filtro para separar las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. Esta separación se hace bajo un buffer o tampón que puede ser TAE o TBE. En el caso de los ácidos nucleicos, el grupo fosfato les proporciona la

carga negativa, por lo que durante la electroforesis migran hacia el polo positivo. Otro ingrediente que se agrega al gel es el bromuro de etidio, una molécula intercalante capaz de unirse al ADN de doble cadena. Cuando es excitado con luz UV emite una señal que permite la visualización de los amplicones en forma de bandas.

La PCR ha sufrido modificaciones para ofrecer una tecnología más innovadora apegada a los retos inherentes que implica el estudio del ADN (Tamay de Dios, Ibarra & Velasquillo, 2013).

Para superar la desventaja inherente del coste y mejorar la capacidad de diagnóstico de la prueba, se desarrolló una PCR múltiple, una variante de la prueba en la que se amplifica más de una secuencia diana utilizando más de un par de cebadores. Se han descrito PCR múltiples para detectar agentes virales, bacterianos y/o infecciosos en un tubo de reacción (Elnifro *et al.*, 2000). Se puede ahorrar tiempo mediante la amplificación simultánea de múltiples secuencias en una sola reacción. La PCR múltiple requiere que los cebadores conduzcan a la amplificación de regiones únicas de ADN, tanto en pares individuales como en combinaciones de muchos cebadores, bajo un solo conjunto de condiciones de reacción. Además, los métodos deben estar disponibles para el análisis de cada producto de amplificación individual de la mezcla de todos los productos (Markoulatos, Siafakas, & Moncany, 2002).

La mPCR (PCR múltiple) ha sido aplicada en muchas áreas para el análisis simultáneo de marcadores múltiples incluyendo delecciones, mutaciones, polimorfismo, análisis cuantitativos por transcriptasa reversa y por RT-PCR. Con óptimos resultados ha sido empleada en análisis microsatelital, detección de organismos genéticamente modificados, detección de patógenos y tipificación de diferentes cepas. En el campo epidemiológico, su importancia crece por la factibilidad de aumentar en una sola reacción la detección simultánea de varios microorganismos aprovechando entre otros parámetros la similitud de cuadros clínicos (Bolívar, Rojas & Garcia-Lugo, 2014). El desarrollo de una PCR múltiple eficaz requiere, generalmente, una planificación estratégica y múltiples intentos de optimizar las condiciones de reacción. Para un ensayo de PCR múltiple exitoso, son importantes la concentración relativa de los cebadores, la concentración del buffer de PCR, el equilibrio entre las concentraciones de

cloruro de magnesio y desoxinucleótido, las temperaturas de ciclación y la cantidad de ADN molde y ADN Taq polimerasa. Una combinación óptima de temperatura de fusión y concentración de tampón es esencial en la PCR múltiple para obtener productos de amplificación altamente específicos (Markoulatos, Siafakas, & Moncany, 2002).

Existen estudios similares en los que se propone a la PCR como herramienta de diagnóstico; un ejemplo es el realizado por Murdoch *et al.* en el 2003, en dónde se evalúa un ensayo de PCR para detectar a *S. pneumoniae* en muestras de NAC; en el estudio se utiliza la PCR de punto final para detectar el gen de la autolisina de *S. pneumoniae*, ellos evalúan qué tipo de muestra es la que les proporciona una mayor sensibilidad y concluyen que las muestras de sangre dan mejores resultados que las muestras respiratorias, ya que cuando se extraen las muestras respiratorias no se puede hacer la distinción entre aquellos pacientes que tienen la enfermedad y los que sólo han sido colonizados con *S. pneumoniae* (Murdoch *et al.*, 2003).

Otros estudios reportan el uso del gen *mecA* para la detección de *S. aureus* (Pérez-Roth *et al.*, 2001) así como el uso de la PCR múltiple para detectar a qué antibiótico es resistente la cepa con la que están trabajando, así como se ha publicado un ensayo que permite la detección simultánea de genes de resistencia clínicamente relevantes en *S. aureus* (Strommenger *et al.*, 2003).

En el año 2001, Corless *et al.* desarrollaron un protocolo de detección múltiple que permite la identificación simultánea de *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae* a partir de distintos tipos de muestras clínicas, concretamente, líquido cefalorraquídeo (LCR), plasma, suero y sangre.

En un estudio realizado por Welti *et. al* en el 2003, se hizo la detección y cuantificación exitosa de *C. pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *M. pneumoniae* desde muestras respiratorias usando la técnica de RT-PCR. La comparación de la prueba de PCR múltiple en tiempo real y convencional en 73 muestras respiratorias mostró una concordancia general del 98,3%, correspondiente al 95,8%, 100% y concordancia del 100% para *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* y *M. pneumoniae*, respectivamente.

En una revisión realizada por Jaqueti en el 2000 se menciona que la PCR utiliza cebadores específicos de *C. pneumoniae* y puede detectar el ADN equivalente a un cuerpo elemental. La especificidad es muy elevada con respecto al cultivo, mientras que la sensibilidad oscila en torno al 75%.

JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Los métodos de diagnóstico para NAC que existen actualmente no son los mejores para hacer un diagnóstico temprano, ya que, en la mayoría de los hospitales aún se utiliza como diagnóstico el cultivo de los microorganismos a partir de las muestras obtenidas del paciente para posteriormente estudiar la morfología y hacer las pruebas bioquímicas necesarias para hacer un confirmativo del diagnóstico (Báez-Saldaña *et al.*, 2013; Grupo de Salubridad General, 2009). Estos métodos conllevan mucho tiempo (alrededor de 48 y 72 horas) y muchas veces pueden dar falsos positivos o en su defecto falsos negativos, debido a que las muestras normalmente son esputo o fluidos de la vía respiratoria inferior, sin embargo, hay que tomar en cuenta que estas muestras podrían contaminarse con los microorganismos que están formando parte de la flora normal de las vías respiratorias superiores, que sólo causan la enfermedad cuando colonizan tejido sanguíneo o vías respiratorias inferiores (Grupo de Estudio de la Neumonía Adquirida en la Comunidad Área de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias (TIR)-SEPAR, 2005). Debido a la demora de estas pruebas, el agente etiológico de la neumonía no se demuestra en 20-70% de los casos (Báez-Saldaña *et al.*, 2013). Hoy en día la NAC sigue siendo un problema de salud pública, ya que ocupa el tercer lugar como causa de mortalidad a nivel global. En México la neumonía se encuentra entre las 10 principales causas de enfermedad Nacional, incluso en los estudios epidemiológicos en algunos hospitales mexicanos se reporta que el diagnóstico de NAC representa la segunda causa de hospitalización de etiología infecciosa por detrás de las infecciones gastrointestinales (Montaño *et al.*, 2016).

Las técnicas de diagnóstico molecular ya han sido probadas anteriormente y se ha comprobado que ahorran hasta 48 horas de tiempo que en comparación con las técnicas de diagnóstico microbiológicas (Wessels *et al.*, 2012; Bartlett, 2004; Nolte, 2008); algo que tiene mucho peso a la hora de querer diagnosticar microorganismos tal como *C. pneumoniae*, que es agente etiológico causante de NAC en un 6 a 20% de los casos, pero que es difícil de diagnosticar ya que es a base de cultivo celular que al final precisa técnicas de inmunofluorescencia directa para ver el crecimiento, la otra opción que es un diagnóstico serológico

precisa de 3 semanas para poder detectar la elevación del título lo que retrasa el diagnóstico (Jaqueti, 2000; Miyashita *et al.*, 2008), todo esto conlleva a necesitar metodologías diagnósticas más rápidas, sensibles y específicas que apoyen al diagnóstico de la NAC.

Un problema que se había atribuido a las técnicas de diagnóstico molecular es el costo de estas, sin embargo, con el paso de los años los costos se han ido abaratando, además que al poder establecer un diagnóstico rápido se podría evitar la hospitalización de larga duración y la muerte de los pacientes.

El uso de la PCR múltiple puede resolver el problema principal que es obtener un diagnóstico rápido y certero, con el fin de hacerlo llegar al médico lo más rápido posible y que éste pueda tratar la enfermedad correctamente (Bolívar *et al.*, 2014). Así como también se puede utilizar para futuros estudios epidemiológicos, sobre todo para dar a conocer el verdadero impacto de *C. pneumoniae* como colonizador de las vías respiratorias bajas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Estandarizar la técnica de PCR múltiple para la identificación de 3 de los principales microorganismos que causan NAC en México.

Objetivos Específicos

- Validar que los oligonucleótidos diseñados amplifiquen los genes blanco de los microorganismos a identificar por medio de la técnica de PCR.
- Confeccionar *in silico* de una PCR múltiple que permita identificar el microorganismo causante de la NAC
- Establecer el ensayo de PCR múltiple en sangre como una prueba diagnóstica nueva de NAC

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Análisis *in silico* para el diseño de los oligonucleótidos.

El gen blanco elegido de cada patógeno para la realización de este trabajo fue seleccionado de acuerdo con la investigación previa de cada uno de los organismos usados, eligiendo los que se consideran determinantes para causar la enfermedad, así como para la diferenciación entre un organismo y otro (Otero *et al.*, 1990; Gholamhosseini-Moghaddam *et al.*, 2015; Villegas *et al.*, 2008; Boman *et al.*, 1999) (Tabla 1).

Tabla 1. Tamaño y número de acceso del NCBI de los genes blanco seleccionados para el diseño de la PCR múltiple.

| Organismo | Gen blanco | Tamaño del gen en nucleótidos | Número de acceso de NCBI |
|-----------------------------------|-------------|-------------------------------|--------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>nucA</i> | ~594 nt | LC484036.1 |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>lytA</i> | ~906 nt | AJ243414 |
| <i>Chlamydomophila pneumoniae</i> | <i>ompA</i> | ~1200 nt | NC_000922.1 |

Para *S. pneumoniae* se eligió el gen *lytA* y para *C. pneumoniae* el gen *ompA*. En el caso de *S. aureus* se utilizó un par de oligonucleótidos que fueron diseñados previamente en el laboratorio de Patogenicidad Microbiana del CICM-ICUAP.

Para poder hacer el diseño de los oligonucleótidos a usar en la PCR múltiple se buscaron las secuencias de los genes blanco elegidos para la detección de los tres diferentes microorganismos, *nucA* para *S. aureus* (Figuras 1 y 2), *lytA* para *S. pneumoniae* (Figuras 3 y 4) y *ompA* para *C. pneumoniae* (Figuras 5 y 6) en la base de datos de nucleótidos del NCBI.

Staphylococcus aureus 4-1 nucA gene for thermonuclease, partial cds
 GenBank: LC484036.1
 >LC484036.1 Staphylococcus aureus 4-1 nucA gene for thermonuclease, partial cds

```

GGCATATGATGGCAATCGTTTCAATATTACTTATAGGGATGGCTATCAGTAATGTTTCGAAAGGGCAATACGCAAAGAGGTTTTCTATT
TCGCTACTAGTTGTTTAGTGTTAACTTTAGTTGAGTTTCAAGTCTAAGTAGCTCAGCAAATGCATCACAACAGATAATGGCGTAAATAG
AAGTGGTTCTGAAGATCCAACAGTATATAGTGCAACTTCAACTAAAAAATTACATAAAGAACCTGCGACATTAATTAAGCGATTGATGGT
GATACGTTTAAATTAATGTACAAAGGTCAACCAATGACATTCAGACTATTATTGGTTGATACACCTGAAACAAAGCATCCTAAAAAAGGTG
TAGAGAAATATGGTCCTGAAGCAAGTGCATTTACGAAAAAATGGTAGAAAAATGCAAAGAAAATTGAAGTCGAGTTTGACAAAGGTCAAA
GAACTGATAAATATGGACGTGGCTTAGCGTATATTTATGCTGATGGAAAAATGGTAAACGAAGCTTTAGTTCGACAAGGCTTGGCTAAAG
TTGCTTATGTTTATAA
  
```

Figura 1. Secuencia del gen *nucA* de *Staphylococcus aureus*. Fuente: NCBI con número de acceso y referencia: LC484036.1 >LC484036.1 *S. aureus* 4-1 *nucA* gene for thermonuclease, partial cds.

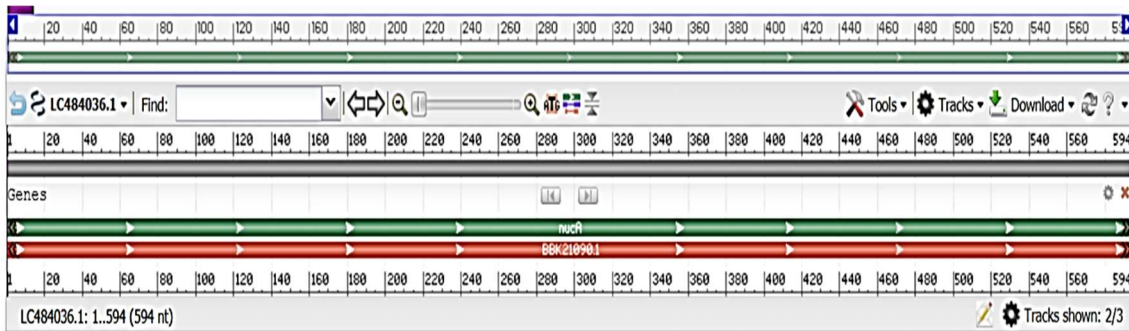


Figura 2. Gráfico del gen *nuca* de *Staphylococcus aureus* (594 pb). Ubicado en la cadena sentido.

Streptococcus pneumoniae R6 chromosome, complete genome
 NCBI Reference Sequence: NC_003098.1
 >NC_003098.1:c1723025-1722069 Streptococcus pneumoniae R6 chromosome, complete genome

```

ATGGAAATTAATGTGAGTAAATTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAACCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAA
TCCGCATTCAACCGTACAGAATGAAGCGGATTACTACTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTCTCGCACATTGTTGGGAACGGTT
GCATCATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACGTTGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGAT
TGAAAGCCATTCAACCAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTATATCGAACTCTTACGCAATCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGC
CGAAAACGCTTGATACAGGGAGTTAGCTGGAATTAACGCACGAGTATTGCACGAATAACCAACCAACAACCACTCAGACCAGCTT
GACCCCTTATCCATATCTTGCTAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTAAGCATGATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTG
GCAGAAGAATGACACTGGCTACTGGTACGTACATTAGCAGCGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACT
ACTTTGACAGTTTCAAGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTGACAACTCAGGCGAAAT
GGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGAC
ACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCCCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAA
ACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGCCAGAATTCACAGTAGACCCAGATGGCTTGATTACAGTAAATAA
  
```

Figura 3. Secuencia consenso utilizada para el proyecto Refseq del NCBI del gen *lytA* de *S. pneumoniae*. Fuente: NCBI con número de acceso y referencia: NC_003098.1 >NC_003098.1:c1723025-1722069 *S. pneumoniae* R6 chromosome, complete genome.

Streptococcus pneumoniae partial lytA gene for autolysin, strain 7751
 GenBank: AJ243414.
 >AJ243414.1 Streptococcus pneumoniae partial lytA gene for autolysin, strain 7751

```

TTAAGAACAGATTTGCCTCAAGTCGGCGTGCAACCATATAGGCAAGTACACGCACACTCAACTGGGAATCCGCATTCAACCGTACA
GAATGAAGCGGATTACTACTGGCGGAAAGACCCAGAATTAGGTTTTTCTCGCACATTGTTGGGAACGGTTGCATCATGCAGGTAG
GACCTGTTGATAATGGTGCCTGGGACGTTGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGATTGAAAGCCATTTC
AACTAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTATATCGAACTCTTACGCAATCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGCCGAAAACGC
TTGATACAGGGAGTTAGCTGGAATTAACGCACGAGTATTGCACGAATAACCAACCAACAACCACTCAGACCATGTGGATCCA
TACCCTTACTTGGCAAAATGGGGCATTAGCCGTGAGCAGTTAAGTATGATATTGAGAACGGCTTGACGATTGAAACAGGCTGGCA
GAAGAATGACACTGGCTACTGGTACGTACATTAGCAGCGCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACT
ACTTTGACAGTTTCAAGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTGACAACTCAGGCGA
AATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTAC
AAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCCCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGT
ACTACCTCAAACAGACGGAACACTGGCAGACAAGCCAGAATTCACAGTA
  
```

Figura 4. Secuencia del gen *lytA* de la cepa 7751 de *S. pneumoniae*. Fuente: NCBI con número de acceso y referencia: GenBank AJ243414 >AJ243414.1 *S. pneumoniae* partial *lytA* gene for autolysin, strain 7751

Chlamydomophila pneumoniae CWL029 chromosome

>NC_000922.1:780216-781385 Chlamydomophila pneumoniae CWL029 chromosome, complete genome

```
ATGAAAAAAGCTTTAAAGTCGGCGTTATTATCCGCCGCAATTTGCTGGTTCTGTTGGCTCCTTACAAGCCTTGCTGTAGGGAACCCCTTCT
GATCCAAGCTTATTAATTGATGGTACAATATGGGAAGGTGCTGCAGGAGATCCTTGCATCCTTGCCTACTTGGTGCAGCGCTATTAG
CTTACGTGCTGGATTTTACGGAGACTATGTTTTCGACCGTATCTTAAAAGTAGATGCACCTAAAACATTTTCTATGGGAGCCAAGCCTAC
TGGATCCGCTGCTGCAAACATACTACTGCCGTAGATAGACCTAACCCGGCCTACAATAAGCATTACACGATGCAGAGTGGTTCACTA
ATGCAGGCTTCAATGCTTAAACATTTGGGATCGCTTTGATGTTTTCTGACTTTAGGAGCTTCTAATGGTTACATTAGAGGAACTCTAC
AGCGTTCAATCTCGTTGGTTTATTCGGAGTTAAAGGTAAGTACTGTAATGCAAAAGAACTACCAAACGTTTCTTAAAGTAACGGAGTTGTT
GAACTTTACACAGACACCTTTTCTCTGGAGCGTAGGCGCTCGTGGAGCCTTATGGGAATGCGGTTGTGCAACTGGGAGCTGAATTCC
AATATGCACAGTCCAACCTAAAGTTGAAGAACTTAAATGTATCTGTAACGTATCGCAATCTCTGTAACAAACCCAAAGGGCTATAAAG
GCGTTGCTTTCCCTTGCCAAACAGACGCTGGCGTAGCAACAGCTACTGGAACAAAGTCTGCGACCATCAATTATCATGAATGGCAAGTA
GGAGCCTCTCTATCTACAGACTAAACTCTTAAAGTCCATACATTGGAGTACAATGGTCTCGAGCAACTTTTATGCTGATAACATCCGC
ATTGCTCAGCCAAAACCTACCTACAGCTGTTTTAACTTAACTGCATGGAACCCCTTCTTACTAGGAAATGCCACAGCATTGTCTACTACT
GATTGCTCAGACTTCAATGCAAAATGTTTCTGTCAGATCAACAAGTTAAATCTAGAAAAGCTTGTGGAGTACTGTAGGAGCTACTT
TAGTTGATGCTGATAAATGGTCACTTACTGCAGAAGCTCGTTAATTAACGAGAGAGCTGCTCACGTATCTGGTCAGTTCAGATTCTAA
```

Figura 5. Secuencia del gen *ompA* de *C. pneumoniae*. Fuente: NCBI con número de acceso y referencia: NC_000922.1>NC_000922.1:780216-781385 *C. pneumoniae* CWL029 chromosome, complete genome



Figura 6. Gráfico del gen *ompA* de *C. pneumoniae* (1200 pb) en la cadena sentido.

Debido a que en la base de datos del NCBI se encontraron 2 entradas para el gen *lytA* de *S. pneumoniae*; se realizó una comparación entre el gen *lytA* de diferentes cepas de *S. pneumoniae* (Figura 7) y la secuencia utilizada para el proyecto Refseq del NCBI. Posteriormente se usó la parte conservada para el diseño de los oligonucleótidos.



Figura 7. Alineamiento de secuencias del gen *lytA*. En donde la secuencia 1 corresponde a la Secuencia consenso utilizada para el proyecto Refseq (NCBI Reference Sequence: NC_003098.1) y la secuencia 2 corresponde a Secuencia de *lytA* de la cepa 7751 de *Streptococcus pneumoniae* (GenBank: AJ243414).

Por otra parte, en la bibliografía se menciona que un problema que se puede tener al tratar de identificar a *C. pneumoniae*, es la posibilidad de identificar otras especies de *Chlamydia* debido la similitud que tienen entre ellas (Rodríguez-Domínguez *et al.*, 2014). Para evitar falsos positivos, se realizó un alineamiento de la secuencia del gen *ompA* de *C. pneumoniae* (NCBI Reference Sequence: NC_000922.1) contra las otras especies de *Chlamydia* que poseen una gran similitud con la misma (*Chlamydia trachomatis* (NCBI Reference Sequence: EU105065.1) y *Chlamydia psittaci* (NCBI Reference Sequence: LN810483.1)). Una vez determinada la región variable entre estas 3 especies, esa región se utilizó para crear los oligonucleótidos (región a partir de los 260 pb) (Figura 8).

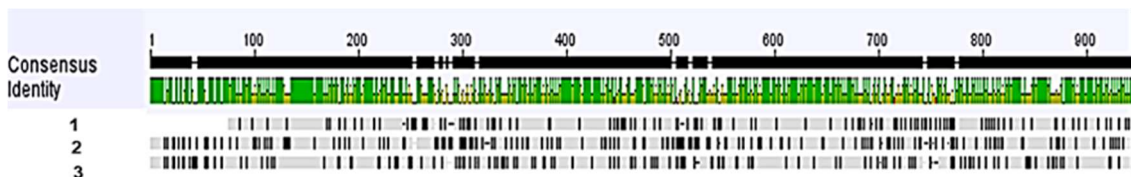


Figura 8. Alineamiento de secuencias del gen *ompA* de las diferentes cepas de *Chlamydia*. En donde la secuencia 1 corresponde al gen *ompA* de *Chlamydia psittaci* (NCBI Reference Sequence: LN810483.1), la secuencia 2 corresponde al gen *ompA* de *Chlamydia trachomatis* (NCBI Reference Sequence: EU105065.1) y la secuencia 3 corresponde al gen *ompA* de *Chlamydophila pneumoniae* (NCBI Reference Sequence: NC_000922.1).

Los criterios de selección usados para el diseño de los oligonucleótidos fueron: contenido de guanina-citocina (45-60%), Tm promedio (~55°C), tamaño del oligonucleótido (19-24 pb).

Posteriormente se procedió a hacer el diseño utilizando el programa Geneious (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) y añadiendo al software los criterios de inclusión y exclusión (Figuras 9 y 10).

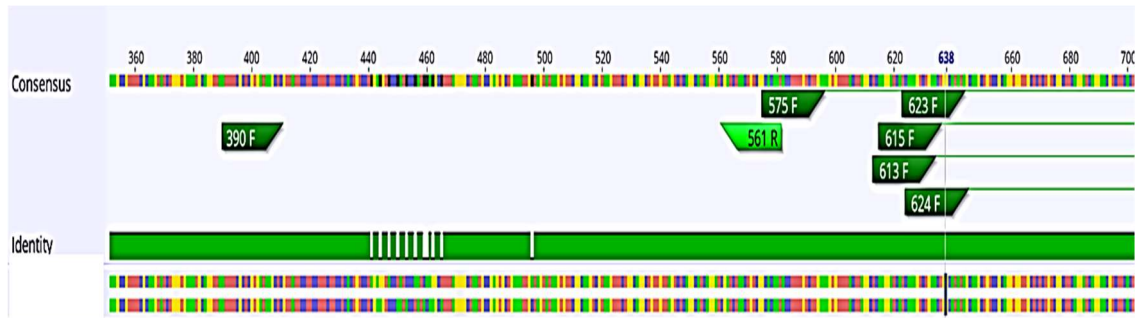


Figura 9. Oligonucleótidos encontrados para el gen *lyt A* de *S. pneumoniae*.

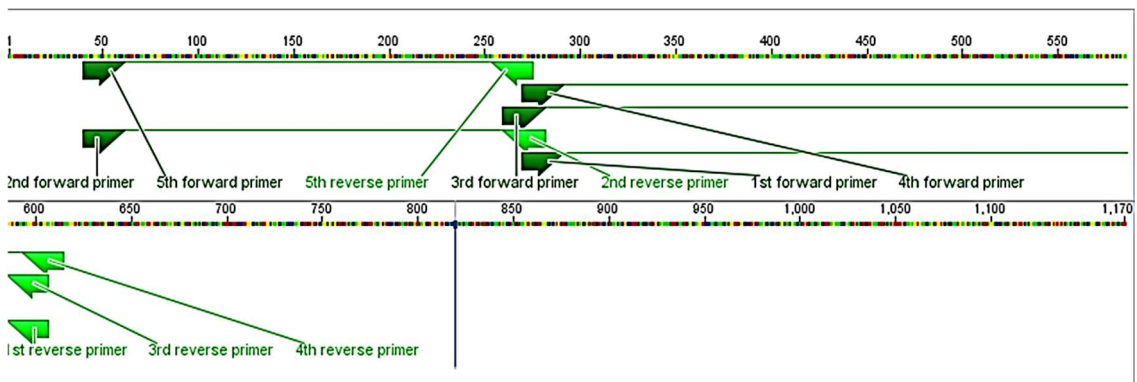


Figura 10. Oligonucleótidos encontrados para el gen *ompA* de *C. pneumoniae*.

De los resultados obtenido utilizando el software geneious, se eligieron los oligonucleótidos que tuvieran las características que se acoplaran adecuadamente para el diseño de la PCR múltiple, se tomó en cuenta el tamaño del amplicón, la temperatura de fusión (Tm) promedio y la probabilidad de formar estructuras secundarias, todas estas características se obtuvieron utilizando la herramienta OligoAnalyzer y UNAFoldTool (PrimerQuest® program, IDT, Coralville, Iowa, USA. 2018. <https://www.idtdna.com/SciTools>.) que provee IDT.

Seguido de los análisis realizados usando las herramientas de SciTools, se procedió a hacer un alineamiento de secuencias utilizando la herramienta “Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)” (Madden, T. (2013)., se hizo el alineamiento de cada uno de los oligonucleótidos por separado y del amplicón, esto con la finalidad de comprobar que los primers fueran específicos para el organismo a identificar.

Por último, utilizando la herramienta OligoAnalyzer, Heterodimer (PrimerQuest® program, IDT, Coralville, Iowa, USA. 2018. <https://www.idtdna.com/SciTools>.) se analizaron los oligonucleótidos para evaluar la probabilidad de formar heterodímeros.

2. Identificación de cada uno de los microorganismos mediante PCR punto final usando los oligonucleótidos anteriormente diseñados

Para comprobar la funcionalidad de los oligonucleótidos diseñados, se probaron por separado mediante PCR punto final, utilizando como referencia las condiciones antes predichas por el análisis *in silico*.

Las cepas utilizadas para probar y estandarizar los oligonucleótidos diseñados se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Cepas utilizadas para el desarrollo de la PCR multiplex.

| Organismo | <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> |
|------------------|--|---|--|
| Cepas utilizadas | <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach (ATCC® 25923™) | <i>Streptococcus pneumoniae</i> hospitalaria (Catalasa-, α- hemolítico) | Inactivated <i>Chlamydia pneumoniae</i> Strain CWL-029 Ref: HE0034N Helix Elite molecular Standards. |
| | Cepa 1 (CoA+, nuc+, coagulasa+) | | |
| | Cepa 4 (CoA -, nuc-, coagulasa-) | | |
| | Cepa 7 (CoA+, nuc+, cosagulasa+) | | |

Extracción de ADN

Después de realizar las pruebas bioquímicas, para comprobar la identidad de los microorganismos; se hizo la extracción y purificación del ADN bacteriano de las cepas a usar; utilizando el kit de Zymo Research ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit; para comprobar que la extracción de ADN fue exitosa, se procedió a realizar una electroforésis en gel de agarosa al 1% en Buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial (NaOAc), 2,0 mM EDTA pH 8,3) que se dejaron correr por 60 minutos a 90 volts, posteriormente el gel fue teñido en un baño de Bromuro de Etidio (BrEt) lo que permitió la visualización de las bandas correspondientes al ADN extraído mediante un transiluminador. La medición de la concentración de ADN se realizó con un nanofotómetro Implen “Nanophotometer Pearl®” UV/VIS (Implen. Múnich, Alemania).

PCR punto final

Las reacciones de PCR se realizaron a un volumen final de 25 µL para cada cepa utilizando los oligonucleótidos que fueron sintetizados en los laboratorios de Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT), Iowa, USA. y el GoTaq® Green Master Mix, 2X (Promega corp. Madison, USA), cuya composición es Buffer de reacción (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP y 3mM MgCl₂; las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador marca miniPCR™ mini8 thermal (miniPCR bio™. Massachussets, USA). Las condiciones de amplificación se encuentran especificadas en la tabla 3 y las cantidades de los componentes en las tablas 4, 5 y 6.

Tabla 3. Condiciones de amplificación para la PCR multiplex.

| Fase de la PCR | Temperatura en grados Celsius | Tiempo en segundos | Número de ciclos |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------|------------------|
| Desnaturalización inicial | 94 °C | 300 | 37 |
| Desnaturalización | 94 °C | 60 | |
| Alineamiento | 55 °C | 30 | |
| Extensión | 72 °C | 60 | |
| Extensión final | 72 °C | 420 | |

Tabla 4. Componentes de cada reacción de PCR realizada para la amplificación del gen *nucA* de *Staphylococcus pneumoniae*.

| Componente | Volumen en microlitros (μL) |
|---|------------------------------------|
| GoTaq® Green Master Mix, 2X o GoTaq® Colorless Master Mix, 2X | 12.5 |
| Oligonucleótido Forward 10 μM | .5 |
| Oligonucleótido Reverse 10 μM | .5 |
| H ₂ O | 7.5 |
| ADN | 4 |

Tabla 5. Componentes de cada reacción de PCR realizada para la amplificación del gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae*.

| Componente | Volumen en microlitros (μL) |
|---|------------------------------------|
| GoTaq® Green Master Mix o GoTaq® Colorless Master Mix | 12.5 |
| Oligonucleótido Forward 10 μM | .5 |
| Oligonucleótido Reverse 10 μM | .5 |
| H ₂ O | 5.5 |
| ADN | 6 |

Tabla 6. Componentes de cada reacción de PCR realizada para la amplificación del gen *ompA* de *Chlamydophila pneumoniae*.

| Componente | Volumen en microlitros (μL) |
|---|------------------------------------|
| GoTaq® Green Master Mix 2X o GoTaq® Colorless Master Mix 2X | 12.5 |
| Oligonucleótido Forward 10 μM | .5 |
| Oligonucleótido Reverse 10 μM | .5 |
| H ₂ O | 8.5 |
| Solución bacteriana | 3 |

En seguida se realizaron electroforésis en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial (NaOAc), 2,0 mM EDTA pH 8,3) que se dejaron correr por 70 minutos a 90 volts. Inmediatamente se tiñó el gel de agarosa utilizando una solución de bromuro de etidio (BrEt) 0.5 µg/mL para posteriormente visualizar el resultado de la PCR punto final utilizando un transiluminador.

Secuenciación de ADN

Las muestras resultantes (3 reacciones de 25 µL, para cada uno de los organismos) de una PCR utilizando GoTaq® Colorless Master Mix, 2X (Promega corp. Madison, USA) que contiene GoTaq® DNA Polymerase 2X, Colorless GoTaq® Reaction Buffer (pH 8.5), 400µM dATP, 400µM dGTP, 400µM dCTP, 400µM dTTP y 3mM MgCl₂, oligonucleótidos, agua y ADN se corrieron en un gel de electroforésis al 1% (ANEXO 4) al que se le extrajo el ADN a la banda que contenía el amplicón resultante utilizando el kit de Zymo Research Zymoclean Gel DNA Recovery Kit . Las condiciones de las PCR y las cantidades de los componentes de las reacciones son las especificadas anteriormente. El ADN resultante se envió a secuenciar por el método de Sanger en el centro de detección de diagnóstico molecular de la BUAP (CDB) y en la unidad de síntesis y secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

3. Estandarización de la PCR múltiple

Estandarización de la PCR punto final

Una vez que se comprobó por medio de la secuenciación que los amplicones obtenidos para cada cepa eran los esperados, se procedió a estandarizar las PCR punto final para cada uno de los organismos; variando las concentraciones de ADN; haciendo diluciones de ADN utilizando agua libre de nucleasas.

Así como también se hicieron reacciones de PCR a partir de soluciones bacterianas a diferentes concentraciones para poder determinar la cantidad mínima de UFC que la PCR puede detectar. Las diluciones bacterianas se

prepararon basándose en la escala de Mac Farland; en el caso de *S. aureus* ATCC®25923™, se inició con una concentración 1.5×10^8 UFC (OD: 0.15 a 600 nm) para llegar a 1×10^6 UFC y para *S. pneumoniae* se partió de una concentración inicial de 1.5×10^8 UFC (OD: 0.15 a 600 nm) para llegar a 1.5×10^6 . Posteriormente se realizó PCR de colonia (Colony-PCR) y por último PCR usando ADN proveniente de sangre humana infectada con la cantidad de bacterias necesarias para causar una infección productiva (para *S. aureus* 1×10^6 y para *S. pneumoniae* 1×10^8).

Las PCR fueron llevadas a cabo utilizando un termociclador miniPCR™ mini8 thermal cycler (miniPCR bio™. Massachusetts, USA), las condiciones de amplificación para las PCR se encuentran especificadas en la tabla 3, y las cantidades de los componentes se encuentran en las tablas 4, 5 y 6. Todos los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial (NaOAc), 2,0 mM EDTA pH 8,3) que se dejaron correr por 70 minutos a 90 volts, posteriormente el gel fue teñido en un baño de Bromuro de Etidio (BrEt) para finalmente ser visualizado usando un transiluminador.

PCR múltiple para la detección de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*

Después de haber estandarizado las PCR para la identificación de los genes blanco para cada microorganismo, se procedió a hacer la PCR múltiple de 2 organismos partiendo de sangre humana infectada con la dosis infectiva mínima (1×10^7 a 1×10^8 para *S. pneumoniae* y 1×10^6 para *S. aureus*) para causar una infección productiva de cada microorganismo. Una vez infectada, la sangre se dejó incubar en agitación a 37 °C por 5 horas. Posteriormente se procedió a hacer la extracción de ADN utilizando el kit de Zymo Research Quick-gDNA™ MiniPrep. Una vez obtenido el ADN se prepararon las reacciones de PCR utilizando un mix de los oligonucleótidos utilizados para identificar cada uno de los microorganismos, las cantidades de los componentes de la PCR se especifican en la tabla 7 y las condiciones de amplificación en la tabla 3. Al terminar la reacción de PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial (NaOAc), 2,0 mM EDTA pH 8,3) y se dejó correr por 70 minutos a 90 volts posteriormente

el gel fue teñido en un baño de BrEt para ser visualizado usando un transiluminador.

Tabla 7. Componentes de cada reacción de PCR realizada utilizando ADN extraído de sangre infectada con *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*.

| Componente | Volumen en microlitros (µL) |
|------------------------------------|-----------------------------|
| GoTaq® Green Master Mix, 2X | 12.5 |
| Mix Oligonucleótidos Forward 10µM | .7 |
| Mix Oligonucleótidos Reverse 10 µM | .7 |
| H ₂ O | 6.1 |
| ADN | 5 |

PCR múltiple para la detección de *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *C. pneumoniae*.

Debido a que a la cepa de *C. pneumoniae* no se le pudo extraer el ADN con los métodos convencionales, ni usando los kits empleados; se diseñó un experimento utilizando el KAPA blood PCR kit (Hoffmann-La Roche. Basilea, Suiza) que permite hacer una reacción de PCR directamente de sangre sin pasar por el proceso de extracción de ADN. Se utilizó sangre humana infectada con la cantidad de bacterias necesarias para causar una infección productiva, se dejó incubando en agitación y a 37°C por 5 horas, posterior a las 5 horas se procedió a usar el KAPA blood PCR kit; las condiciones de amplificación se especifican en la tabla 3 y las cantidades de los componentes de la reacción se especifican en la tabla 8. La PCR se realizó al igual que todas las anteriores utilizando un miniPCR™ mini8 thermal cycler (miniPCR bio™. Massachussets, USA). Posteriormente se hizo una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en Buffer TAE 1X (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético glacial (NaOAc), 2,0 mM EDTA pH 8,3) que se dejó correr por 80 minutos a 90 volts, posterior a los 80 minutos, el gel se tiñó usando una solución de BrEt a 0.5 µg/mL para después observar las bandas en un transiluminador.

Tabla 8. Componentes de cada reacción de PCR multiplex.

| Componente | Volumen en microlitros (μL) |
|---|--|
| KAPA Blood PCR Mix B (2x) | 12.5 |
| Oligonucleótidos Forward 10 μM | 1 |
| Oligonucleótidos Reverse 10 μM | 1 |
| H ₂ O | 6.5 |
| Sangre EDTA | 4 |

RESULTADOS

1.- Análisis *in silico* de los oligonucleótidos

Los genes blanco elegidos fueron los más representativos de la virulencia en la NAC, *nuc*, *lytA* y *ompA* para *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, respectivamente; las secuencias de los oligonucleótidos y los tamaños del amplicón esperado se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes de interés y tamaño de los amplicones.

| Organismo | Gen blanco | Secuencia de los oligonucleótidos | Tamaño del amplicón | Frecuencia en la causa de NAC |
|---|---|--|---------------------|-------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>nuc</i> Codificante para una termonucleasa. | Forward: GCGATTGATGGTGATACTGTTA Reverse: AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC | 279 pb | 8.7% |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | <i>lytA</i> Codificante para autolisina A. | Forward: TAAAACGCACGAGTATTGCAC Reverse: TAAGAGCCGTCTGAATGTACG | 192 pb | 39% |
| <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> (<i>Chlamydia pneumoniae</i>) | <i>ompA</i> Codificante para una proteína de membrana. | Forward: CAAGCCTACTGGATCCGCTG Reverse: CCGCATTCCCATAAGGCTCC | 345 pb | 6-20% |

Fuente: (IMSS,2009; Blasi, Tarsia, & Aliberti, 2009).

Algunas de las características más importantes de los oligonucleótidos, tanto del oligonucleótido sentido (Forward) como el del oligonucleótido antisentido (Reverse), tales como la temperatura de fusión, el contenido de GC y el tamaño de los oligonucleótidos se obtuvieron usando la herramienta OligoAnalyzer, los resultados de este análisis para identificar a *S. aureus* (gen *nucA*), *S. pneumoniae* (gen *lytA*) y a *C. pneumoniae* (gen *ompA*) se muestran en las figuras del 11 al 15.

Los análisis *in silico* realizados en los que se calcula de Delta G, muestran que los oligonucleótidos elegidos tienen una baja probabilidad de formar estructuras secundarias como horquillas (ANEXO 1) y/o Heterodímeros (ANEXO 2).

nucA Forward

| | |
|---------------------------|---------------------------------------|
| SEQUENCE | 5'- GCG ATT GAT GGT GAT ACT GTT A -3' |
| COMPLEMENT | 5'- TAA CAG TAT CAC CAT CAA TCG C -3' |
| LENGTH | 22 |
| GC CONTENT | 40.9 % |
| MELT TEMP | 52.6 °C |
| MOLECULAR WEIGHT | 6820.5 g/mole |
| EXTINCTION COEFFICIENT | 219000 L/(mole-cm) |
| nmole/OD ₂₆₀ : | 4.57 |
| µg/OD ₂₆₀ : | 31.14 |

Figura 11. Resultados al analizar el oligonucleótido *nucA* Forward con la herramienta OligoAnalyzer.

nucA Reverse

| | |
|---------------------------|---|
| SEQUENCE | 5'- AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC -3' |
| COMPLEMENT | 5'- GCT TTA GTT CGT CAA GGC TTG GCT -3' |
| LENGTH | 24 |
| GC CONTENT | 50 % |
| MELT TEMP | 59.8 °C |
| MOLECULAR WEIGHT | 7339.8 g/mole |
| EXTINCTION COEFFICIENT | 237000 L/(mole-cm) |
| nmole/OD ₂₆₀ : | 4.22 |
| µg/OD ₂₆₀ : | 30.97 |

Figura 12. Resultados al analizar el oligonucleótido *nucA* Reverse con la herramienta OligoAnalyzer.

lytA Forward

| | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| SEQUENCE | 5'- AGG ACC TGT TGA TAA TGG TGC -3' |
| COMPLEMENT | 5'- GCA CCA TTA TCA ACA GGT CCT -3' |
| LENGTH | 21 |
| GC CONTENT | 47.6% |
| MELT TEMP | 54.9 °C |
| MOLECULAR WEIGHT | 6501.3 g/mole |
| EXTINCTION COEFFICIENT | 207300 L/(mole-cm) |
| nmole/OD ₂₆₀ : | 4.82 |
| µg/OD ₂₆₀ : | 31.36 |

Figura 13. Resultados al analizar el oligonucleótido *lytA* Forward con la herramienta OligoAnalyzer.

lytA Reverse

| | |
|---------------------------|-------------------------------------|
| SEQUENCE | 5'- TAA GAG CCG TCT GAA TGT ACG -3' |
| COMPLEMENT | 5'- CGT ACA TTC AGA CGG CTC TTA -3' |
| LENGTH | 21 |
| GC CONTENT | 47.6% |
| MELT TEMP | 54.2 °C |
| MOLECULAR WEIGHT | 6470.3 g/mole |
| EXTINCTION COEFFICIENT | 209300 L/(mole-cm) |
| nmole/OD ₂₆₀ : | 4.78 |
| µg/OD ₂₆₀ : | 30.91 |

Figura 14. Resultados al analizar el oligonucleótido *lytA* Reverse con la herramienta OligoAnalyzer.

ompA Forward

| | |
|---------------------------|------------------------------------|
| SEQUENCE | 5'- CAA GCC TAC TGG ATC CGC TG -3' |
| COMPLEMENT | 5'- CAG CCG ATC CAG TAG GCT TG -3' |
| LENGTH | 20 |
| GC CONTENT | 60 % |
| MELT TEMP | 57.9 °C |
| MOLECULAR WEIGHT | 6078 g/mole |
| EXTINCTION COEFFICIENT | 183200 L/(mole-cm) |
| nmole/OD ₂₆₀ : | 5.46 |
| µg/OD ₂₆₀ : | 33.18 |

Figura 15. Resultados al analizar el oligonucleótido *ompA* Forward con la herramienta OligoAnalyzer.

ompA Reverse

| | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| SEQUENCE | 5'- CCG CAT TCC CAT AAG GCT C -3' |
| COMPLEMENT | 5'- GAG CCT TAT GGG AAT GCG G -3' |
| LENGTH | 19 |
| GC CONTENT | 57.9 % |
| MELT TEMP | 56.1 °C |
| MOLECULAR WEIGHT | 5708.8 g/mole |
| EXTINCTION COEFFICIENT | 171500 L/(mole-cm) |
| nmole/OD ₂₆₀ : | 5.83 |
| µg/OD ₂₆₀ : | 33.29 |

Figura 16. Resultados al analizar el oligonucleótido *ompA* Reverse con la herramienta OligoAnalyzer.

En el caso de los oligonucleótidos diseñados para identificar a *S. aureus* (gen *nucA*), los resultados del alineamiento son favorables ya que tienen una identidad del 100% con el organismo de interés (ANEXO 3A y 3B) y el amplicón esperado una identidad del 99.28% (Figura 17); y los alineamientos tanto de los oligonucleótidos y el amplicón contra la base de datos del NCBI poseen un E-value cercano a 0.

En el caso de los alineamientos de los oligonucleótidos tanto forward como reverse para la identificación de *S. pneumoniae* (gen *lytA*) (ANEXO 3C y 3D) y el amplicón esperado (Figura 18) los resultados indican que poseen una identidad del 100% con el organismo de interés y un E-value cercano a 0.

Los alineamientos de los oligonucleótidos Forward y Reverse (ANEXO 3E y 3F), así como el amplicón esperado (Figura 19) para la detección de *C. pneumoniae* tienen una identidad del 100% con *Chlamydomphila pneumoniae* (gen *ompA*) y un E-value cercano a 0.

| Amplicón | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|----------|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| | Staphylococcus aureus strain ZY05 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP045472.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER02826.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030661.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER01533.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030675.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03710.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030646.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER01803.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030693.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER00573.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030681.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER01570.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030653.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03493.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030708.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03755.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030634.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03489.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030664.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER01746.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030654.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER02069.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030668.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER04448.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030656.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER02969.3 chromosome, complete genome | 505 | 505 | 100% | 5e-139 | 99.28% | CP030658.1 |

Figura 17. Resultados del alineamiento del amplicón esperado (279 pb) para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

| Amplicón | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|--|-------------|-----------|-------------|-------------|---------|-------|--|
| Streptococcus pneumoniae strain 180-15 genome assembly, chromosome: 1 | | 347 | 562 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1539176525 LR129844.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain 180-2 genome assembly, chromosome: 1 | | 347 | 562 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1539176524 LR129843.1 |
| Streptococcus pneumoniae ASP0581 DNA, complete genome | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1528007818 AP019192.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain M23734 chromosome, complete genome | | 347 | 577 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1438629803 CP031247.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain 4041STDY6836169 genome assembly, chromosome: 1 | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1403730152 LS483523.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO3011 autolysin gene, partial cds | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1383707315 MH029594.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain Ex3319 autolysin gene, partial cds | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1383707265 MH029569.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO6224 autolysin gene, partial cds | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1383707261 MH029567.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain p_10877 autolysin gene, partial cds | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1383707245 MH029559.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO2687 autolysin gene, partial cds | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1383707239 MH029556.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain CP2215 chromosome | | 347 | 571 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1375520646 CP028436.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain 335 chromosome, complete genome | | 347 | 567 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1343871268 CP026670.1 |
| Streptococcus pneumoniae MDRSPN001 DNA, complete genome | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1252002187 AP018391.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain 436 autolysin (lytA) gene, partial cds | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1152729623 KY581554.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain SWU02, complete genome | | 347 | 347 | 100% | 7e-92 | 100% | gij1114629522 CP018347.1 |

Figura 18. Resultado del alineamiento del amplicón esperado (192 pb) para la identificación de *Streptococcus pneumoniae*.

| Amplicón | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|-------------|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Chlamydia pneumoniae genome assembly YK41, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN849043.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien3, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847257.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien2, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847254.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly UZG1, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847246.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly U1271, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847244.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly PB2, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847241.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly PB1, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847240.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Panola, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847236.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly MUL2216, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847227.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly K7, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847221.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly H12, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847194.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly GiD, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847008.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL029c, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847005.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL011, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN847000.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CV15, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN846999.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CV14, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN846996.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CM1, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN846995.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien1, chromosome : 1 | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | LN846980.1 |
| Chlamydia pneumoniae strain AR-39 major out membrane protein gene, complete cds | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | KC512913.1 |
| Uncultured Chlamydia sp. isolate TOR1 major outer membrane protein (MOMP) gene, partial cds | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | GQ918217.1 |
| Chlamydia pneumoniae isolate WA97001 major outer membrane protein (MOMP) gene, partial cds | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | GQ918216.1 |
| Chlamydia pneumoniae TW-183, complete genome | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | AE009440.1 |
| Chlamydia pneumoniae LKK-1 outer membrane protein A (ompA) gene, partial cds | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | AY555078.1 |
| Chlamydia pneumoniae AR39, complete genome | | 638 | 638 | 100% | 6e-179 | 100.00% | AE002161.1 |

Figura 19. Resultados del alineamiento del amplicón esperado (345 pb) para la identificación de *Chlamydia pneumoniae*.

2.- Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN de las cepas de *S. aureus*, incluyendo la cepa ATCC®25923™ y de la cepa clínica de *S. pneumoniae* (Figura 20); se obtuvieron concentraciones de 74.2 - 155 ng/μL para las cepas de *S. aureus* y de 49.4 ng/μL para la cepa *S. pneumoniae*. La pureza del ADN extraído se determinó mediante la medición de la muestra de ácido nucleico a diferentes longitudes de onda (260, 280 y 230), tomando como valores de referencia las relaciones A260/A280 que idealmente debe estar de 1.8 – 2 y la relación A260/A230 que debe estar cerca de 2.0 a 2.2 (ThermoFisher Scientific, 2015) (Tabla 10).

Tabla 10. Concentración de oligonucleótidos y ADN extraído de las diferentes cepas utilizadas y los valores de las relaciones A260/A280 y A260/A230.

| Muestra | Concentración | A260/A280 | A260/A230 |
|---|---------------|-----------|-----------|
| ADN <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. aureus Rosenbach (ATCC® 25923™) | 128 ng/μL | 1.766 | 1.984 |
| ADN <i>Staphylococcus aureus</i> cepa 1 | 88.8 ng/μL | 1.798 | 1.935 |
| ADN <i>Staphylococcus aureus</i> cepa 4 | 155 ng/μL | 1.789 | 2.099 |
| ADN <i>Staphylococcus aureus</i> cepa 7 | 74.2 ng/μL | 1.819 | 1.603 |
| ADN <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 49.4 ng/μL | 1.678 | 0.990 |
| Oligonucleótidos | 10 μM | - | - |

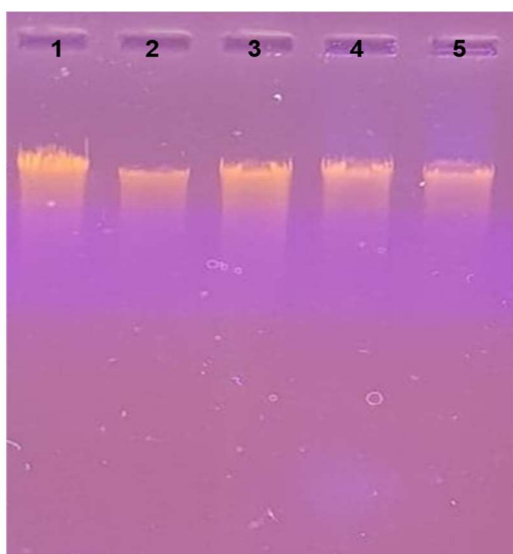


Figura 20. Gel de agarosa al 1%, muestra los resultados de la extracción de ADN de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. 1) cepa 7, 2.) cepa 4, 3) cepa 1, 4) cepa ATCC® 25923™, 5) *Streptococcus pneumoniae*.

3.- Estandarización de PCR punto final

Staphylococcus aureus

Los resultados de la PCR punto final para la identificación de *Staphylococcus aureus* se observan en la figura 21, la banda de 279 pb es la que se esperaba ya que es el amplicón de *nuc*, la línea 2 corresponde a una cepa de *S. aureus* coagulasa y termonucleasa negativas y que fue usada como control negativo.

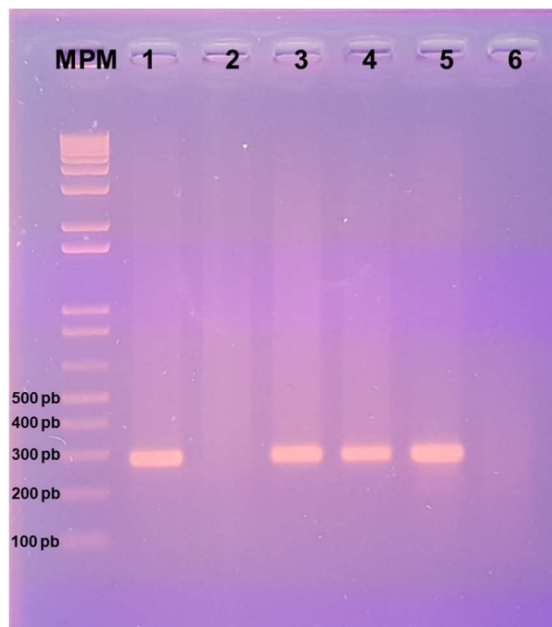


Figura 21. Electroforésis en gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt, se muestra el resultado de la PCR punto final para la amplificación del gen *nucA* de las diferentes cepas de *S. aureus*. **MPM** 100 pb plus DNA Ladder, **1)** cepa 1, **2)** cepa 4 *nuc* negativo, **3)** cepa 7, **4)** ATCC[®] 25923[™], **5)** ATCC[®] 25923[™] **6)** Control negativo.

A partir de la concentración inicial que se tenía del ADN de la cepa de *S. aureus* ATCC[®] 25923[™] que era de 128 ng/mL se realizaron diversas diluciones para conocer la sensibilidad de la PCR para la amplificación del gen *nuc*, las diluciones que se probaron fueron seriadas 1:10 y algunas intermedias, obteniéndose amplificaciones aún en la dilución 1:80,000 (Figura 22) y con ello se determinó que la concentración mínima de ADN para que se pueda lograr la amplificación del gen *nucA* utilizando los oligonucleótidos diseñados es de 0.0016 ng/ μ L o 1.6 pg/mL (Figura 23).

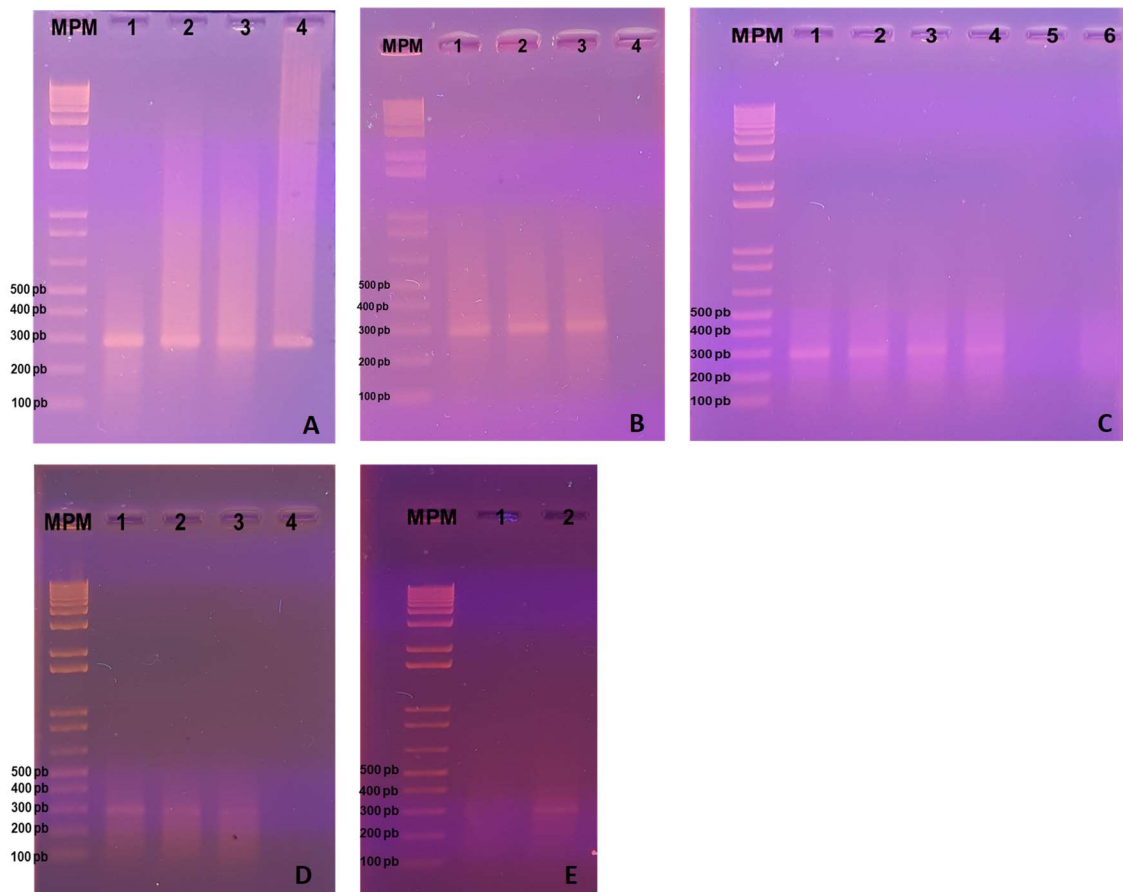


Figura 22. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 mg/mL, muestra la amplificación del gen *nucA* de la cepa ATCC[®] 25923[™] a diferentes concentraciones de ADN. **A)** MPM 100 bp plus DNA Ladder, **1.** Sin diluir, **2.** dilución 1:10, **3.** dilución 1:100, **4.** 1:1000. **B)** MPM 100 bp plus DNA Ladder, **1.** dilución 1:5000, **2.** dilución 1:7000, **3.** dilución 1:9000, **4.** control negativo. **C)** MPM 100 bp plus DNA Ladder, **1.** dilución 1:10000, **2.** dilución 1:15000, **3.** dilución 1:20000, **4.** dilución 1:25000 **6.** control negativo. **D)** MPM 100 bp plus DNA Ladder, **1.** dilución 1:30000, **2.** dilución 1:35000, **3.** dilución 1:40000, **4.** control negativo. **E)** MPM 100 bp plus DNA Ladder, **1.** control negativo, **2.** dilución 1:50000.

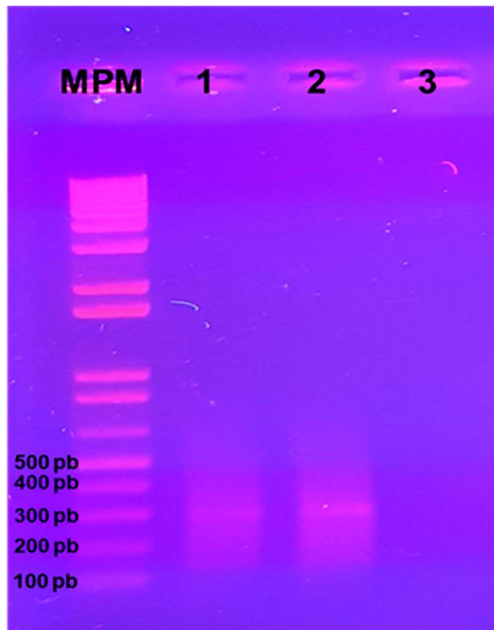


Figura 23. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 mg/mL muestra la amplificación del gen *nucA* de la cepa ATCC® 25923™ a diferentes concentraciones de ADN. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** dilución 1:60000, **2.-** dilución 1:80000, **3.-** dilución 1:100000

Para el caso en que se utilizaron diluciones de UFC a partir de un tubo de concentración de 1.5×10^8 UFC (en la escala de Mac Farland), se pudo observar que para *S. aureus* se pudo detectar hasta 1×10^6 UFC (Figura 24).

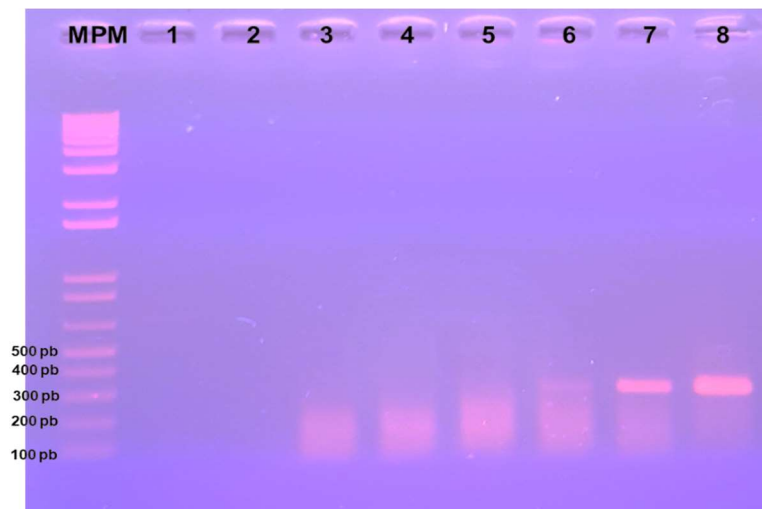


Figura 24. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 $\mu\text{g/mL}$, muestra la amplificación del gen *nucA* de la cepa ATCC® 25923™ usando como ADN diluciones bacterianas a diferentes concentraciones. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** control negativo, **3.** dilución 1 UFC, **4.** dilución 100 UFC, **5.** 1×10^4 UFC, **6.** 1×10^6 UFC, **7.** 1.26×10^7 UFC, **8.** 1.5×10^8 UFC.

También se llevó a cabo una PCR de colonia (Colony-PCR) para *S. aureus* y si se obtuvo el amplicón del gen *nuc* (Figura 25), por lo que se puede decir que la amplificación de *nuc* con el par de oligonucleótidos diseñados es una prueba robusta, específica y sensible.

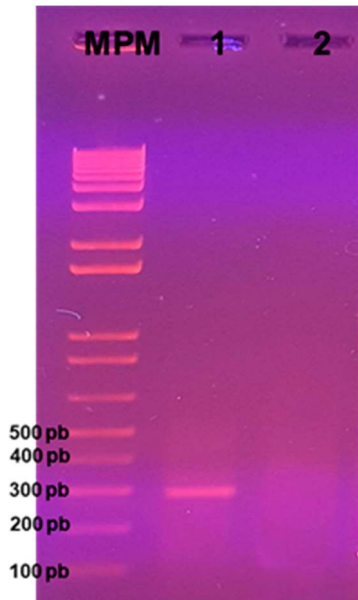


Figura 25. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 $\mu\text{g/mL}$, muestra el resultado de la PCR de colonia para la amplificación del gen *nucA* de la cepa ATCC[®] 25923[™]. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** ATCC[®] 25923[™], **2.** control negativo.

Después de las pruebas realizadas se procedió a hacer un gel preparativo, con el fin de visualizar la integridad del amplicón, posteriormente se hizo la extracción de la banda resultante con el kit de Zymo Research Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, obteniendo una concentración de ADN de 30.9 ng/ μL y se envió el material genético para su secuenciación.

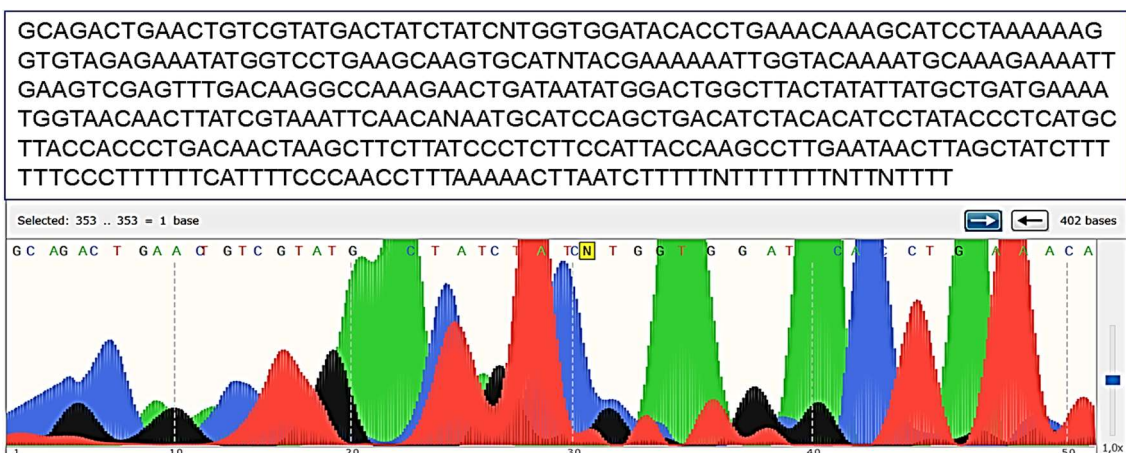


Figura 26. Resultados de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR punto final para el gen *nucA* de *S. aureus*. En la parte de arriba se especifica la secuencia resultante, en la parte de abajo se muestra un gráfico generado con el programa SnapGene software (from GSL Biotech; available at snapgene.com).

En cuanto a los resultados de la secuenciación de ADN del amplicón del gen *nucA* (Figura 26), mediante un alineamiento contra la base de datos del NCBI se pudo observar que el amplicón tiene una identidad del 92.93% con las diferentes cepas de *S. aureus* con un E- value cercano a 0 (Figura 27).

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Staphylococcus aureus strain GHA4 chromosome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP043920.1 |
| Staphylococcus aureus strain 13 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP031265.1 |
| Staphylococcus aureus JRA307 DNA, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | AP019751.1 |
| Staphylococcus aureus strain 2288 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP026646.1 |
| Staphylococcus aureus strain PMB 81-4 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP034441.1 |
| Staphylococcus aureus JMUB3031 DNA, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | AP018923.1 |
| Staphylococcus aureus strain BPH2760 genome assembly, chromosome: 1 | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | LR130509.1 |
| Staphylococcus aureus strain FDAARGOS_2 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP026964.1 |
| Staphylococcus aureus strain FDAARGOS_43 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP026957.1 |
| Staphylococcus aureus strain Mw2 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP026073.1 |
| Staphylococcus aureus strain USA400-0051 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP019574.1 |
| Staphylococcus aureus strain CFSAN007851 chromosome, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP017680.1 |
| Staphylococcus aureus strain FORC_045, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP017115.1 |
| Staphylococcus aureus DNA, almost complete genome, strain: No.10 | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | AP015012.1 |
| Staphylococcus aureus strain FORC_026, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | CP013132.1 |
| Staphylococcus aureus strain R1 thermostable nuclease (nuc) gene, partial cds | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | DQ507378.1 |
| Staphylococcus aureus strain MSSA476, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | BX571857.1 |
| Staphylococcus aureus subsp. aureus MW2 DNA, complete genome | 279 | 279 | 47% | 5e-71 | 92.93% | BA000033.2 |
| Staphylococcus aureus strain R50 chromosome, complete genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP039167.1 |
| Staphylococcus aureus strain Lr6 chromosome, complete genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP039160.1 |
| Staphylococcus aureus strain Lr3 chromosome, complete genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP039992.1 |
| Staphylococcus aureus subsp. aureus strain VB9352 chromosome, complete genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP035670.1 |
| Staphylococcus aureus strain 79_S10 genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP010944.1 |
| Staphylococcus aureus strain 144_S7 genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP010943.1 |
| Staphylococcus aureus subsp. aureus ST772-MRSA-V strain DAR4145, complete genome | 274 | 274 | 47% | 2e-69 | 92.42% | CP010526.1 |

Figura 27. Muestra los alineamientos de la secuenciación de *nucA*, junto con los valores de E-value y la identidad con *S. aureus*.

Streptococcus pneumoniae

Los resultados de la PCR punto final para la identificación de *S. pneumoniae* (Figura 28), fueron favorables ya que se pueden observar las bandas en los carriles 1, 2 y 3, en un peso molecular de 192 pb, lo que concuerda con el tamaño del amplicón esperado.

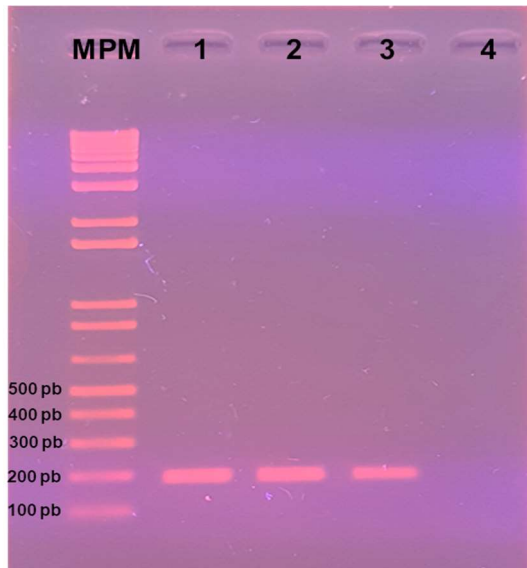


Figura 28. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se muestra el resultado de la PCR punto final para la amplificación del gen *lytA* de *S. pneumoniae* por triplicado. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1-3.** *lytA S pneumoniae*, **4.** control negativo.

Al hacer las diluciones de ADN a partir de la concentración de 49.4 ng/mL, se pudo determinar que la concentración mínima de ADN necesaria para detectar a *S. pneumoniae* es de 0.494 ng/ μL (dilución 1:100) (Figura 29).

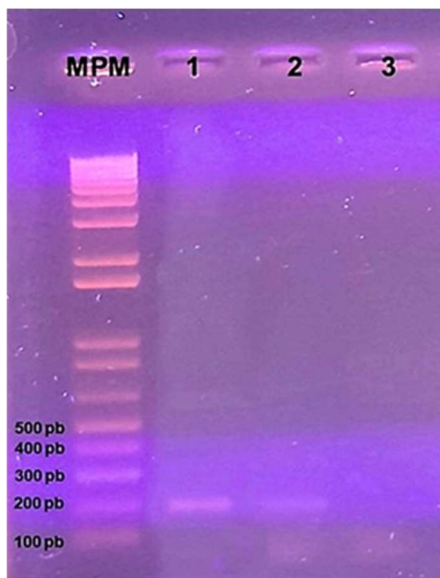


Figura 29. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt 0.5 mg/mL, muestra la amplificación del gen *lytA* de *S. pneumoniae* a diferentes concentraciones de ADN. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** dilución 1:10, **2.** dilución 1:100, **3.** control negativo

Para determinar el mínimo de UFC detectadas mediante PCR empleando el gen *lytA* de *S. pneumoniae*, se llevaron a cabo diluciones bacterianas a diferentes concentraciones partiendo de una concentración de 1.5×10^8 UFC (en la escala de Mac Farland), se pudo identificar a *S. pneumoniae* hasta en la dilución que contiene 15 UFC UFC (Figuras 30 y 31).

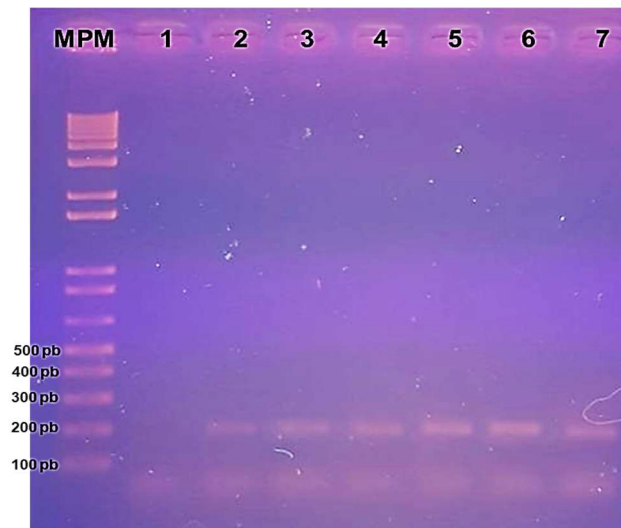


Figura 30. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt 0.5 mg/mL, muestra la amplificación del gen *lytA* de *S. pneumoniae* usando diluciones bacterianas a diferentes concentraciones. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** Control negativo, **2.** dilución 1.5×10^3 UFC **3.** dilución 1.5×10^4 UFC, **4.** dilución 1.5×10^5 UFC, **5.** 1.5×10^6 UFC, **6.** dilución 1.5×10^7 UFC, **7.-** dilución 1.5×10^8 UFC.

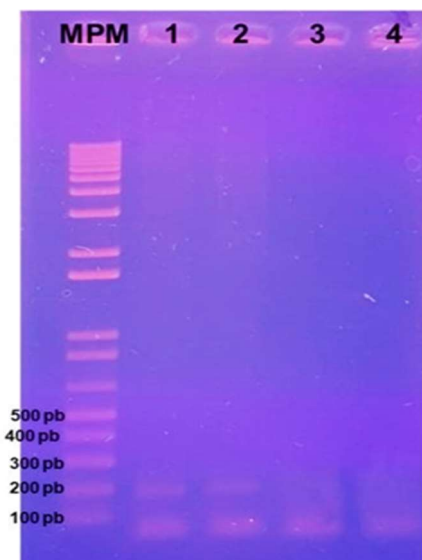


Figura 31. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 mg/mL, muestra la amplificación del gen *lytA* de *S. pneumoniae* usando diluciones bacterianas a diferentes concentraciones. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** Dilución con 150 UFC, **2.** dilución con 15 UFC **3.** dilución 1.5 UFC, **4.** Control negativo.

Para *S. pneumoniae* no se pudo amplificar al gen *lytA* mediante Colony-PCR, esto se debe principalmente a que su cápsula es muy resistente al calor y no es posible romperla con las temperaturas alcanzadas en los programas de amplificación de la PCR, a diferencia de *S. aureus* que si se logró.

Al igual que para *S. aureus* se hizo un gel preparativo, con el fin de visualizar la integridad del amplicón, posteriormente se hizo la extracción de la banda resultante con el kit de Zymo Research Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, obteniendo una concentración de ADN de 37.9 ng/μL. En cuanto a la secuenciación de ADN (Figura 32), los resultados muestran una identidad del

97.35% con el gen *lytA* para diferentes cepas de *S. pneumoniae* y con un E-value menor a 0 (Figura 33).

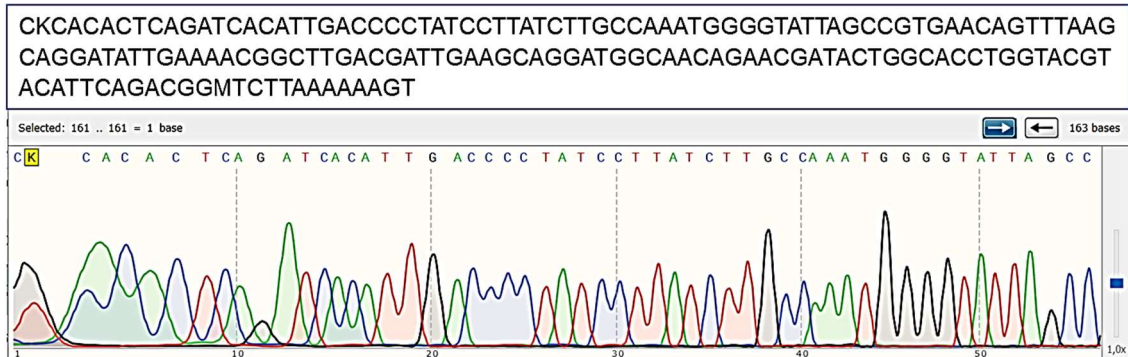


Figura 32. Resultados de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR punto final para el gen *lytA* de *Streptococcus pneumoniae*. En la parte de arriba se especifica la secuencia resultante, en la parte de abajo se muestra un gráfico generado con el programa SnapGene software (from GSL Biotech; available at snappgene.com).

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|------------|
| Streptococcus pneumoniae lytA gene for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, strain 1078/1997 | 257 | 257 | 92% | 8e-65 | 97.35% | AJ419981.1 |
| Streptococcus sp. 3072 lytA gene for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, strain 3072 | 257 | 257 | 92% | 8e-65 | 97.35% | AM113504.1 |
| Streptococcus sp. 578 lytA gene for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, strain 578 | 257 | 257 | 92% | 8e-65 | 97.35% | AM113497.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain Gra_218B N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (lytA) gene, complete cds | 254 | 254 | 92% | 1e-63 | 96.69% | KT253594.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO5084 autolysin gene, partial cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | MH029582.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO6242 autolysin gene, partial cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | MH029581.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO7485 autolysin gene, partial cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | MH029561.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO6408 autolysin gene, partial cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | MH029557.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain 201 autolysin (lytA) gene, partial cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | KY581558.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain 359 autolysin (lytA) gene, partial cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | KY581557.1 |
| Streptococcus mitis strain PT9018 N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (lytA) gene, complete cds | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | KT253599.1 |
| Streptococcus pneumoniae lytA gene for N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase, strain 1230/1996 | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | AJ419978.1 |
| Streptococcus sp. partial lytA gene for autolysin, strain COL20 | 252 | 252 | 92% | 4e-63 | 96.69% | AJ252194.1 |
| Streptococcus sp. partial lytA gene for autolysin, strain COL27 | 248 | 248 | 91% | 5e-62 | 96.64% | AJ252196.1 |
| Streptococcus sp. strain REO5340 autolysin gene, partial cds | 246 | 246 | 92% | 2e-61 | 96.03% | MH029591.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO2901 autolysin gene, partial cds | 246 | 246 | 92% | 2e-61 | 96.03% | MH029589.1 |
| Streptococcus mitis strain REO6424 autolysin gene, partial cds | 246 | 246 | 92% | 2e-61 | 96.03% | MH029586.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO29 autolysin gene, partial cds | 246 | 246 | 92% | 2e-61 | 96.03% | MH029574.1 |
| Streptococcus pneumoniae strain REO25 autolysin gene, partial cds | 246 | 246 | 92% | 2e-61 | 96.03% | MH029573.1 |

Figura 33. Alineamiento del resultado de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR para el gen *lytA* de *S. pneumoniae*.

Chlamydomphila pneumoniae

La PCR punto final para la identificación de *C. pneumoniae* tuvo resultados positivos, ya que se logró amplificar la región seleccionada del gen blanco, obteniendo un amplicón de ~345 pb (Figura 34).

Para *C. pneumoniae* se tomaron diferentes volúmenes en μL de la solución bacteriana Inactivated *Chlamydia pneumoniae* Strain CWL-029 Ref: HE0034N Helix Elite molecular Standards, y se pudo obtener una detección incluso con 1 μL de la solución bacteriana (Figura 35).

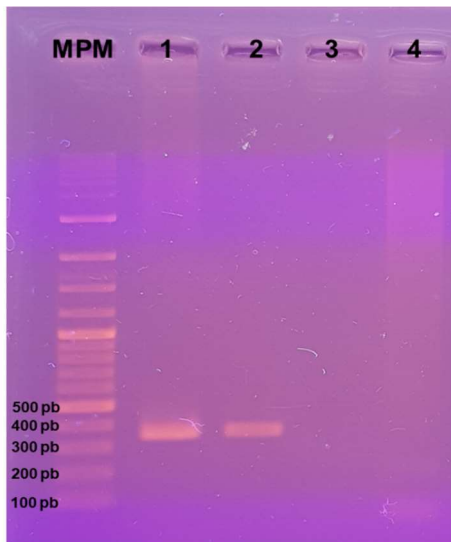


Figura 34. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, se muestra el resultado de la PCR punto final para la amplificación del gen *ompA* de *C. pneumoniae* por duplicado. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1 – 2.** *ompA* de *C. pneumoniae*, **24.** control negativo.

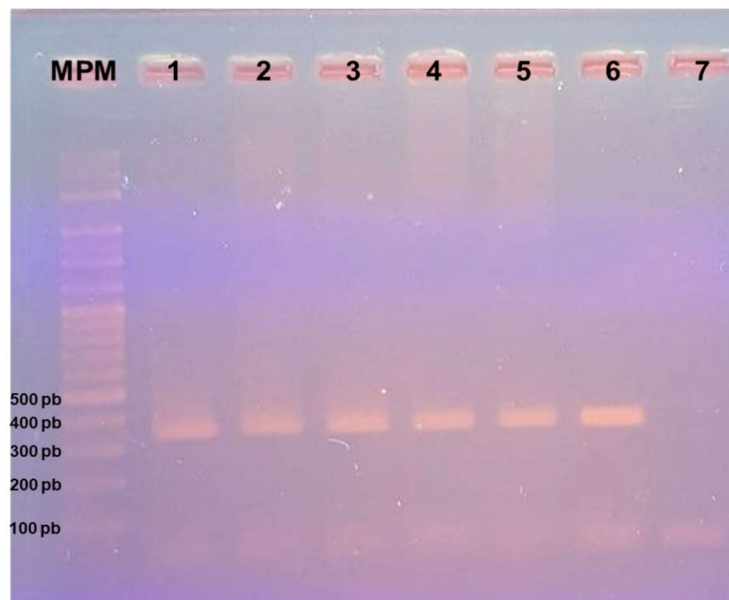


Figura 35. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt, muestra la amplificación del gen *ompA* de *Chlamydomphila pneumoniae* usando diferentes de volúmenes solución bacteriana como ADN.

MPM (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder), **1.-** 1 μL de solución, **2.-** 1.5 μL de solución, **3.-** 2 μL de solución, **4.-** 2.5 μL de solución, **5.-** 3 μL de solución, **6.-** 3.5 μL de solución, **7.-** control negativo.

También se purificó al amplicón del gen *ompA* de un gel preparativo para posteriormente hacer la extracción de la banda resultante con el kit de Zymo Research Zymoclean Gel DNA Recovery Kit, obteniendo una concentración de ADN de 37.9 ng/μL. Los resultados de la secuenciación de ADN (Figura 36) se obtuvo una identidad con el gen blanco de 99.02% con un E-value cercano a 0 (Figura 37).

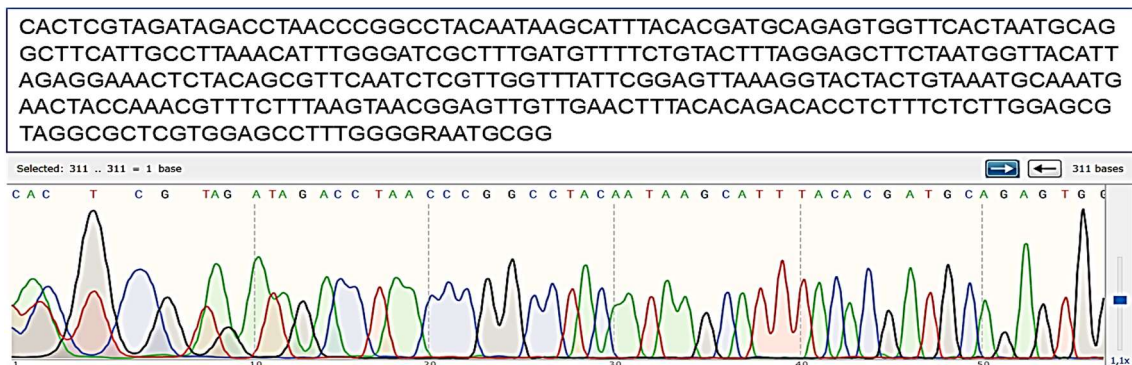


Figura 36. Resultados de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR punto final para el gen *ompA* de *C. pneumoniae*. En la parte de arriba se especifica la secuencia resultante, en la parte de abajo se muestra un gráfico generado con el programa SnapGene software (from GSL Biotech; available at snapgene.com).

| Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| Chlamydia pneumoniae genome assembly YK41, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN849043.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien3, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847257.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien2, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847254.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly UZG1, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847246.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly U1271, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847244.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly PB2, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847241.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly PB1, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847240.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Panola, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847236.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly MUL2216, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847227.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly K7, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847221.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly H12, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847194.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly GiD, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847008.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL029c, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847005.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL011, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN847000.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CV15, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN846999.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CV14, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN846996.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly CM1, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN846995.1 |
| Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien1, chromosome : 1 | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | LN846980.1 |
| Chlamydia pneumoniae strain AR-39 major out membrane protein gene, complete cds | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | KC512913.1 |
| Uncultured Chlamydomphila sp. isolate TOR1 major outer membrane protein (MOMP) gene, partial cds | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | GQ918217.1 |
| Chlamydomphila pneumoniae isolate WA97001 major outer membrane protein (MOMP) gene, partial cds | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | GQ918216.1 |
| Chlamydomphila pneumoniae TW-183, complete genome | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | AF009440.1 |
| Chlamydomphila pneumoniae LKK-1 outer membrane protein A (ompA) gene, partial cds | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | AY555078.1 |
| Chlamydomphila pneumoniae AR39, complete genome | 549 | 549 | 98% | 3e-152 | 99.02% | AF002161.1 |

Figura 37. Alineamiento del resultado de la secuenciación del amplicón resultante de la PCR para el gen *ompA* de *C. pneumoniae*.

4.- PCR múltiple

Después de inocular sangre con las cantidades productivas de dos de los diferentes microorganismos en estudio (1×10^7 UFC a 1×10^8 UFC para *S. pneumoniae* y 1×10^6 para *S. aureus*) primero de forma individual y otra muestra simulando una coinfección, se extrajo ADN de la sangre infectada con *S. aureus* y *S. pneumoniae* por separado, así como combinados semejando una coinfección, esta extracción se puede observar en la Figura 38, para este caso el gel de agarosa fue al 1 %.

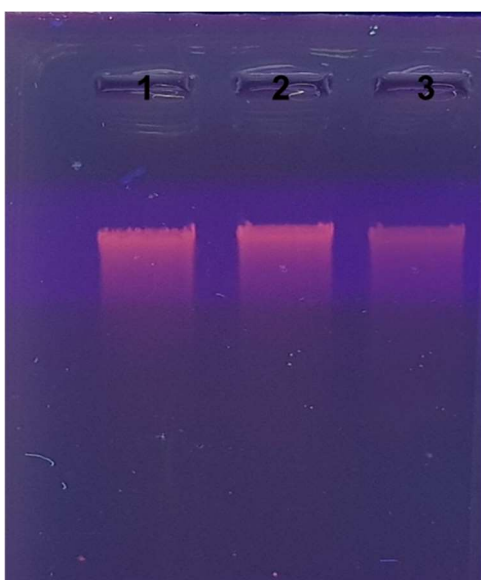


Figura 38. Gel de agarosa al 1% teñido con BrEt a 0.5 µg/mL, muestra los resultados de la extracción de ADN de sangre infectada. 1. ADN de sangre infectada con *S. pneumonie*, 2. ADN de sangre coinfectada con *S. pneumonie* y *S. aureus*, 3. ADN de sangre infectada con *S. aureus*.

Las reacciones de PCR para *S. aureus* y *S. pneumoniae* partiendo desde ADN extraído de sangre infectada se presenta en la figura 38, donde se observan los amplicones esperados de 279 pb y 192 pb respectivamente por separado (Figura 39 A y B). En la reacción de PCR que se hizo con el ADN extraído de la sangre coinfectada con los dos microorganismos se obtuvieron dos bandas (carril 1) cada una correspondiente a los pesos moleculares esperados (279 pb para *S. aureus* y 192 pb para *S. pneumoniae*) (Figura 39 C).

La última parte fue la aplicación de la PCR multiplex en una muestra inoculada con los tres agentes causantes de NAC con las dosis infectivas de cada uno de los microorganismos, en este caso no se llevó a cabo extracción de ADN, sino que se hizo la amplificación directamente en sangre empleando el kit

KAPA Blood PCR Kit, los resultados pueden observarse claramente en la (Figura 40), en la cual se aprecian los amplicones para *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *C. pneumoniae* de 279 pb, 192 pb y 345 pb, respectivamente.

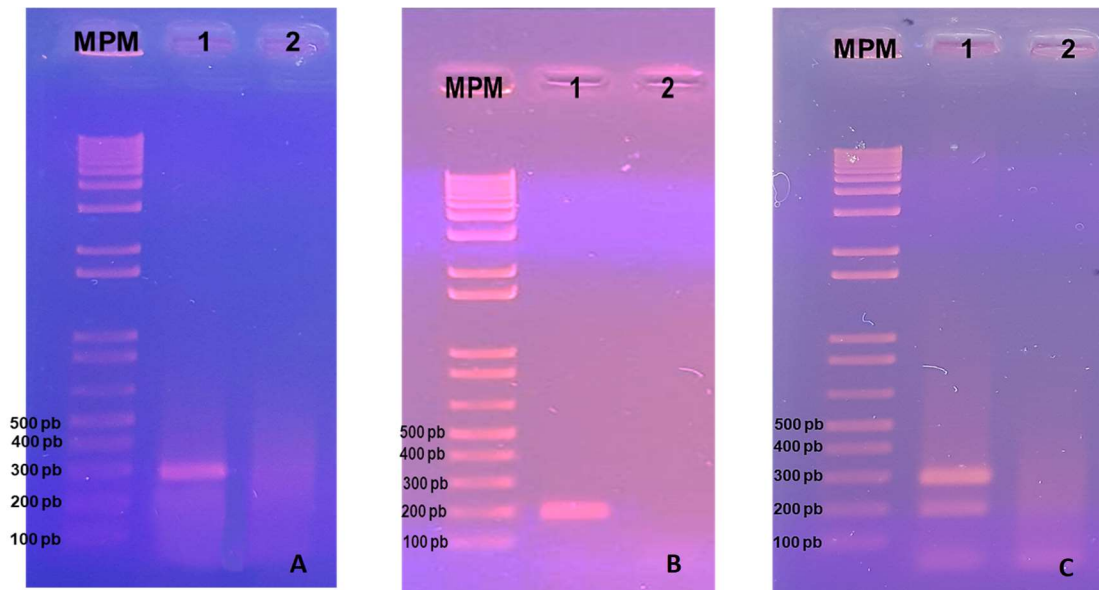


Figura 39. Gel de agarosa al 1.5% teñido con BrEt a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, **A)** muestra la amplificación del gen *nucA* de *S. aureus* con ADN extraído de sangre infectada con la dosis mínima infectiva. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.** muestra con ADN de *S. aureus*, **2.** control negativo. **B)** amplificación de *lytA* de *S. pneumoniae* amplificado en una muestra de sangre infectada. **MPM** 100 bp plus DNA Ladder, **1.-** amplificación de *lytA* de *S. pneumoniae* a partir de sangre inoculada, y **2.-** control negativo. **C)** Amplificación de los genes *lytA* y *nucA* con ADN extraído desde sangre coinfectada con la dosis mínima infectiva de cada microorganismo, donde se muestran los dos amplicones.

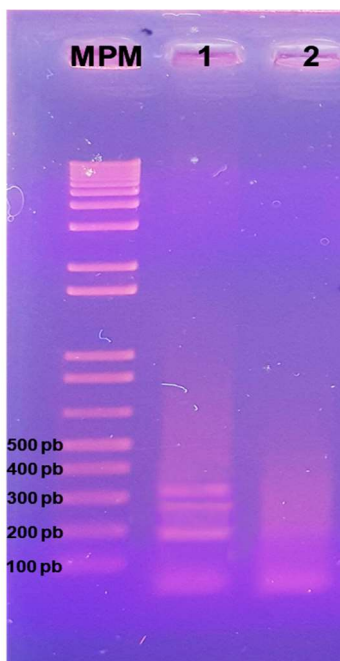


Figura 40. Gel de agarosa al 2% teñido con BrEt a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, muestra la amplificación por PCR multiplex de los genes *lytA*, *nucA* y *ompA* usando el KAPA Blood PCR Kit desde sangre infectada con la dosis mínima infectiva de cada microorganismo. Se observan los amplicones de 345 pb, 279 pb y 192 pb **MPM** (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder), **1.-** amplicones resultantes de la PCR múltiple **2.-** control negativo.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

1.- Análisis *in silico* de oligonucleótidos

Para la identificación de *S. aureus* se eligió el gen *nucA* que codifica para una nucleasa termoestable, este gen está presente con cepas patógenas, ya que su presencia se relaciona directamente con la producción de enterotoxinas (Otero *et al.*, 1990).

Para *S. pneumoniae* se eligió el gen *lytA* que codifica para la enzima autolítica principal del Estreptococo llamada Autolisina A (N-acetilmuramoil-L-alanina-amidasa). La autolisina principal codificada por *lytA* de *S. pneumoniae* es miembro de un grupo ampliamente distribuido de enzimas de degradación de la pared celular ubicadas en la envoltura celular; la autolisina es responsable de la lisis celular inducida por desoxicolato y penicilina en la fase estacionaria, que tiene una gran importancia clínica (Gholamhosseini-Moghaddam *et al.*, 2015).

El gen blanco elegido para la identificación de *C. pneumoniae* es el gen *ompA* que codifica para una proteína de membrana (major outer membrane protein) que es de las proteínas más estudiadas de *Chlamydomphila* (Villegas *et al.*, 2008). Y por esta razón hay trabajos anteriores reportando que, aunque se podría usar el gen 16s rRNA o *PstI* se han tenido mejores resultados con *ompA* (Boman *et al.*, 1999).

Tomando en cuenta las recomendaciones que Hyndman y Mitsuhashi mencionan en su manual para el diseño de oligonucleótidos; que los análisis para la determinación de estructuras secundarias fueron determinantes para la selección de los oligonucleótidos, así como la identidad que tiene cada uno con el gen blanco dentro del organismo a identificar.

2.- Extracción de ADN

La diferencia de las concentraciones de ADN obtenidas para las cepas de *S. aureus* y de *S. pneumoniae* es notable. En trabajos anteriores, que involucran la extracción de ADN de *S. pneumoniae*, los autores mencionan que utilizan el kit QIAamp DNA minikit (QIAGEN; Hilden, Germany)(Murdoch *et al.*, 2003) o

QIAamp DNA blood kit (QIAGEN; Hilden, Germany) (Falguera *et al.*, 2002), pero no mencionan el rendimiento obtenido con el kit, por lo que no podemos atribuirle directamente a la utilización de kit de extracción ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep Kit el bajo rendimiento de extracción del ADN de *S. pneumoniae*.

Por otra parte, la diferencia en el rendimiento de la extracción de ADN entre los dos organismos se le puede atribuir a la diferencia de las características microbiológicas de los mismos. La posible razón por la que el rendimiento de la extracción de ADN de *S. pneumoniae* sea más baja es principalmente porque el tipo de cultivo y las características de *S. pneumoniae*, específicamente el tamaño de las colonias (1 a 3 mm de diámetro) y su crecimiento de aspecto umbilicado, con una depresión central producida por una autólisis celular progresiva, hacen difícil la recolección de las colonias que serán usadas para crear la solución bacteriana de la que se parte para hacer la extracción de ADN, además que la depresión central que presenta en el agar hace que la probabilidad de recolectar la colonia con agar sea más alta (Preado, 2001).

En el caso de *C. pneumoniae*, no se pudo realizar una extracción de ADN. Debido a que la cepa de *Chlamydomphila pneumoniae* usada es un producto de Helix Elite (Productos de los Helix Elite™ Molecular Standards gránulo inactivado) que contienen uno o más células patógenas estabilizadas en una matriz de excipientes patentada, se desconoce la naturaleza de esta matriz, pero, es probable que tenga algún agente inhibidor que hace que la extracción de ADN sea mucho más difícil de lo habitual, algo que Helix elite remarca en la ficha técnica refiriéndose a ello como una limitación del producto.

3.- Estandarización de las reacciones de PCR punto final

La amplificación de ácidos nucleicos por PCR tiene aplicaciones en muchos campos de la biología y la medicina, incluida la detección de virus, bacterias y otros agentes infecciosos (Brakstad *et al.*, 1992).

Staphylococcus aureus

La PCR diseñada para el gen *nucA* detectó hasta 1 UFC de *S. aureus* y cantidades bajas (1.6 pg) de ADN extraído. Lo que coincide con la sensibilidad descrita para PCR con otras bacterias, entre 1 y 20 UFC o entre 1 y 100 pg del ADN extraído de *S. aureus* (Johnson *et al.*, 1991) y (Wilson *et al.*, 1991).

Otros trabajos importantes en donde se detecta a *S. aureus* utilizando el gen *nucA* reportan una detección de hasta 2 UFC utilizando una técnica de PCR de fluorescencia en tiempo real (Palomares *et al.*, 2003), a pesar de que esta técnica es bastante sensible y rápida, no es una técnica que se recomiende utilizar en países en desarrollo como es el caso de México, debido al costo de la técnica, ya que no muchos hospitales y/o incluso centros de investigación cuentan con el equipo y reactivos necesarios.

Existen otros ensayos de amplificación por PCR dirigidos a varios genes, incluida la amplificación de *mecA* para la resistencia a la meticilina (López-Vázquez *et al.*, 2015; Galarce *et al.*, 2016; Al-Ruaily & Khalil, 2011; Wilson *et al.*, 1991), así como genes que codifican toxinas que son producidas por muchos aislamientos de *S. aureus* como la toxina exfoliativa (Sakurai *et al.*, 1995; Mehrotra *et al.*, 2000), y las enterotoxinas (Wilson *et al.*, 1991; Mehrotra *et al.*, 2000; Mclauchlin *et al.*, 2000). Sin embargo, todos estos objetivos no se encuentran ubicuamente en la especie *S. aureus* y, en consecuencia, estos ensayos de PCR no son adecuados para la detección e identificación de *S. aureus* (Palomares *et al.*, 2003). En 2014, Sahebnaasagh, *et al.*, reportaron que tanto *mecA* como *nuc* son dos genes que se pueden utilizar en el diagnóstico rápido de *S. aureus* en pacientes con infecciones hospitalarias (Sahebnaasagh, *et al.*, 2014).

Streptococcus pneumoniae

La PCR diseñada para la identificación de *S. pneumoniae* utilizando el gen *lytA*, pudo detectar hasta 15 UFC de *S. pneumoniae* y hasta 0.494 ng/ μ L, en cuanto a las UFC, los resultados obtenidos en este proyecto son similares a los obtenidos por Hassan-King y colaboradores quienes reportaron que lograron detectar 3 UFC (Hassan-King *et al.*, 1994), y son más bajos que los reportados por Gillespie y colaboradores quienes reportan 104 UFC como límite mínimo de

detección (Gillespie *et al.*, 1994). Esta alta sensibilidad en comparación con la detección de *S. pneumoniae* utilizando genes blanco, se le atribuye a la utilización de oligonucleótidos dirigidos a una secuencia presente en múltiples copias (Gillespie *et al.*, 1994). Otra razón para utilizar el gen de la autolisina es que hay otros trabajos que han demostrado que el gen que codifica para la autolisina se conserva entre todos los serotipos de neumococo probados (Cherian *et al.*, 1998). Adicional a esto, en otros trabajos se menciona que utilizando el gen *lytA* para la detección de diferentes cepas; *S. oralis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. aureus* y *S. epidermidis* fueron negativas para el gen *lytA*; mientras que solo *S. pneumoniae* fue positivo para *lytA* (Nagai, 2001).

Estudios que evaluaron la PCR para la detección de ADN neumocócico han utilizado fragmentos del gen de la neumolisina (Lahti *et al.*, 2006; Virolainen *et al.*, 1994) o el gen de la autolisina (Hassan-King *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2009; Wessels *et al.*, 2012; Llull *et al.*, 2006; Murdoch *et al.*, 2003) varios de estos ensayos utilizaron una PCR anidada para obtener una sensibilidad óptima. Pero, hay que tomar en cuenta que la PCR anidada conlleva el riesgo de transferencia del producto de amplificación, lo que lleva a resultados falsos positivos, especialmente cuando se analizan grandes cantidades de muestras (Cherian *et al.*, 1998).

Chlamydomydia pneumoniae

Para *C. pneumoniae*, se pudo detectar a la bacteria exitosamente utilizando una solución con bacterias inactivadas previamente. Se tomaron diferentes volúmenes en μL de la solución y se pudo detectar incluso con 1 μL ; la apariencia de la banda obtenida para este último volumen hace pensar que incluso con menos de 1 μL la reacción sería positiva. Para poder obtener datos más exactos, es necesario contar con otro tipo de muestra, una que permita determinar el número de cuerpos elementales mínimos detectados, así como la cantidad exacta de ADN necesario para que se lleve a cabo la PCR; así como muestras de pacientes diagnosticados por el método microbiológico para poder hacer una comparación real entre el método molecular y microbiológico. Hay otros estudios que han podido detectar a *C. pneumoniae*, a pesar de que no son muchos, la mayoría se centra en el desarrollo de PCR multiplex para detectar agentes atípicos que causan NAC. Tal como el trabajo de Guillén *et al.*, 2012 en donde

el equipo de trabajo, desarrolló un protocolo de PCR múltiple para detectar a *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Legionella pneumophila*; en el cual se utilizó el gen *ompA* para la detección de *C. pneumoniae* y se utilizaron como ADN molde plásmidos recombinantes (Guillén *et al.*, 2012). En otros trabajos similares se detectan los mismos tres organismos (*M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* y *L. pneumophila*) pero mediante métodos de PCR múltiple en tiempo real e hibridación en placa (Ginevra *et al.*, 2005; Nomanpour *et al.*, 2012). La elección del diagnóstico de *C. pneumoniae* por PCR empleando como gen blanco *ompA*, ha sido considerado por otros investigadores como una mejor opción comparado con el cultivo y las pruebas serológicas (She *et al.*, 2010) ya que la secuencia del gen *ompA* de esta especie difiere de las otras especies del género *Chlamydomphila* (Gullsby *et al.*, 2008).

4.- Resultados de secuenciación.

Para corroborar que los genes elegidos hayan sido los adecuados, los amplicones se enviaron a secuenciar y los resultados se evaluaron con el programa BLAST de NCBI, obteniéndose en los tres casos buenos porcentajes de identidad y un valor de E-value muy cercano a cero, para la identificación de *S. aureus* a través del gen *nuc* se obtuvo una identidad de 92.93%, para *S. pneumoniae* mediante *lytA* hay un 97.35% de identidad y para *C. pneumoniae* con el gen *ompA* una identidad del 99.02%, por lo que podemos decir que son confiables y específicos. Para explicar porque los resultados aun cuando tengan un E- value muy pequeño no demuestran un 100% de identidad con los organismos a identificar o que no tengan exactamente el tamaño del amplicón, esto se debe a que, en la secuenciación, se introducen algunas letras adicionales que no son reconocidas por el BLAST de NCBI; como M, R, W, S, Y, K, V, H, D, B o N que son códigos para los nucleótidos designados por la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), estas letras se introducen en aquellas situaciones en donde el equipo no puede discernir entre nucleótidos. La adición de un conjunto de alguna de estas letras al resultado de la secuenciación hace que al momento de ingresar el resultado al programa BLAST del NCBI para hacer un alineamiento con la base de datos, este arroje resultados

que rara vez serán del 100% ya que tiene letras adicionales que no se encontraran en el genoma de los organismos.

5.- PCR múltiple para la detección de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*.

Debido a la estandarización de las PCR punto final diseñadas para cada microorganismo, se pudieron encontrar las condiciones óptimas para desarrollar la PCR múltiple, en donde se identificaron a los tres microorganismos en un mismo tubo de reacción, en donde al ser visualizado el resultado mediante una electroforésis en gel de agarosa, se observan tres bandas que corresponden al peso molecular esperado para la detección de cada uno de los agentes causales (*S. aureus*: ~279 pb, *S. pneumoniae*: ~192 pb y *C. pneumoniae*: ~345 pb). Dado que cada uno de los amplicones se secuenció y se analizó, se demostró la especificidad para la detección de los microorganismos estudiados.

A pesar de que los estudios epidemiológicos en dónde se mencionan a los principales organismos causantes de NAC en México se conocen desde hace muchos años, no se había diseñado algún estudio que tomara a estos tres organismos (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*), a pesar del porcentaje etiológico que representan para la NAC en México.

Estudios similares para detectar los principales agentes etiológicos en otros países se han desarrollado, tal como el estudio realizado por Strálin *et al.*, 2005 que desarrolló una PCR multiplex que detecta a *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae* en muestras de esputo. Nomanpour y colaboradores desarrollaron una PCR múltiple en Tiempo Real, que fue rápida, sensible y específica, pero en la cual no se incluyó a *S. aureus*, que es uno de los agentes principales de NAC en México (Nomanpour *et al.*, 2012), y el mismo caso para el estudio realizado por Morozumi *et al.*, 2006. Otros trabajos se centran en la detección de los microorganismos atípicos (Ginevra *et al.*, 2005; Welti *et al.*, 2003) o la detección de un solo agente etiológico (Gillespie *et al.*, 1994; Palomares *et al.*, 2003; Virolainen *et al.*, 1994; Johansson *et al.*, 2008; Boye *et al.*, 2007).

CONCLUSIONES

1. Se logró la validación de la técnica de PCR múltiple en sangre para los 3 agentes principales que causan NAC.
2. Los genes blanco *nucA*, *lytA* y *ompA* que se eligieron fueron los adecuados para detectar a los microorganismos *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, respectivamente.
3. La técnica de PCR múltiple diseñada sirve para detectar simultáneamente a *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *C. pneumoniae* directamente en muestras de sangre completa.
4. El diseño de la PCR múltiple en la cual se puede detectar a *Chlamydomphila pneumoniae* es de gran ayuda, ya que las técnicas serológicas son las más utilizadas en los laboratorios clínicos, pero tienen limitaciones de especificidad, reproducibilidad y correlación clínica.
5. Los resultados de la tesis generan una herramienta innovadora, ya que el diseño de los oligonucleótidos no ha sido reportado anteriormente y puede ser un producto de transferencia tecnológica.
6. La sensibilidad para la detección de *S. aureus* mediante la amplificación de *nuc* fue de 1.6 pg/mL.
7. La sensibilidad para la detección de *S. pneumoniae* mediante la amplificación de *lytA* fue de 0.494 ng/mL.

PERSPECTIVAS

Se espera se le dé continuidad a este trabajo, en el cual se puedan usar muestras provenientes de hospital, para poder hacer el diagnóstico serológico y molecular al mismo tiempo y así poder determinar otros datos cuantitativos como la especificidad de la PCR aunado a una prueba que permita determinar que tan robusta es la mPCR diseñada.

Así como también se podrían adicionar organismos como *Haemophilus influenzae*, que también ocupa un porcentaje alto como agente etiológico de la NAC en México (Báez-Saldaña *et al.*, 2013).

REFERENCIAS

Al-Ruaily, M. A., y Khalil, O. M. (2011). Detection of (*mecA*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince A / Rhman Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia. *Journal of Medical Genetics and Genomics*, 3(3), 41–45.

Ali, R., Al-Achkar, K., Al-Mariri, A., y Safi, M. (2014). Role of Polymerase Chain Reaction (PCR) in the detection of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 15(3), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2014.05.003>

Álvarez Lam, I., & Ponce Bittar, J. (2012). Revista cubana de pediatría. *Revista Cubana de Pediatría* (Vol. 84). Editorial Ciencias Médicas. Recuperado de: scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312012000400007&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Asociación Colombiana de Neumología y Cirugía de Tórax (ACNCT) , Asociación Colombiana de Medicina Crítica y Cuidado Intensivo (AMCI) , Asociación Colombiana de Medicina Interna (ACMI), A. C. de I. (ACIN). (2013). Recomendaciones para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la neumonía adquirida en la comunidad en adultos inmunocompetentes. *Infectio*, 17, 1–38. [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(13\)70019-5](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(13)70019-5)

Báez-Saldaña, R., Gómez-Zamora, C., López-Elizondo, C., Molina-Corona, H., Santillán-Martínez A., Sánchez-Hernández J., Castillo-Pedroza J., Martínez-Rendón M.E., Aguilar-Medina S., González-López V., Orozco-González N., Salas-Hernández J., Carvajal-Gómez G., Guadarrama-Pérez C., Pérez-Padilla R., (2013). Neumonía adquirida en la comunidad. Revisión y actualización con una perspectiva orientada a la calidad de la atención médica. *Neumología y Cirugía de Tórax*, volumen 72, 6-43. Recuperado de: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/contenido.cgi?IDPUBLICACION=4217>

Bartlett, J. G. (2004). Diagnostic test for etiologic agents of community-acquired pneumonia. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(4), 809–827. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.08.002>

Blanquer, J., y Sanz, F. (2010). Neumonía adquirida en la comunidad. *Archivos de Bronconeumología*, 46(SUPPL.7), 26–30. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(10\)70043-0](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(10)70043-0)

Blasi, F., Tarsia, P., y Aliberti, S. (2009). *Chlamydophila pneumoniae*. *Infectious Disease Clinics of North America*, 15(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2009.10.002>

Bolivar, A. M., Rojas, A., y Garcia-lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol). *Avances En Biomedicina*, 3(1), 25–33.

Boman, J., Gaydos, C. A., y Quinn, T. C. (1999). Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(12), 3791–3799. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.3791-3799.1999>

Boye, K., Bartels, M. D., Andersen, I. S., Møller, J. A., y Westh, H. (2007). A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCC mec types I-V. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(7), 725–727. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01720.x>

Brakstad, O. G., Aasbakk, K., y Maeland, J. A. (1992). Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(7), 1654–1660.

Cherian, T., Lalitha, M. K., Manoharan, A., Thomas, K., Yolken, R. H., y Steinhoff, M. C. (1998). PCR-enzyme immunoassay for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in cerebrospinal fluid samples from patients with culture-negative meningitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(12), 3605–3608. <https://doi.org/10.1128/jcm.36.12.3605-3608.1998>

Consejo de Salubridad General (2009). Evidencias y Recomendaciones IMSS-234-09, Guía de Referencia Rápida, Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Neumonía Adquirida en la Comunidad en Adultos. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/234_IMSS_09_Neumonia_comunidad_adultos/RR_IMSS_234_9.pdf

Corless, C. E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A. J., y Kaczmarek, E. B. (2001). Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 39(4), 1553–1558. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.4.1553-1558.2001>

Dabernat, H., Plisson-Saune, M. A., Delmas, C., Seguy, M., Faucon, G., Pelissier, R., y Dellamonica, P. (2003). *Haemophilus influenzae* carriage in children attending French day care centers: a molecular epidemiological study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1664–1672. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1664>

Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., y Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(4), 559–570.

Falguera, M., López, A., Nogués, A., Porcel, J. M., y Rubio-Caballero, M. (2002). Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. *Chest*, 122(6), 2212–2216. <https://doi.org/10.1378/chest.122.6.2212>

Friedman, H., Yamamoto, Y., y Bendinelli, M. (2006). Chlamydia Detection in Blood. En *Chlamydia pneumoniae: Infection and Disease* (286). New York, USA: Springer Science & Business Media.

Fry, A.M., Shay, D.K., Holman, R.C., Curns, A.T., Anderson, L.J. (2005). Trends in Hospitalizations for Pneumonia Among Persons Aged 65 Years or Older in the United States, 1988-2002. *JAMA*.;294(21):2712-2719. doi:10.1001/jama.294.21.2712

Galarce, N., Muñoz, L., Jara, M. A., Lubí, P., Sepúlveda, A., y Anticevic C., S. (2016). Detección del gen *mecA* en cepas de *Staphylococcus coagulasa* positiva aisladas desde gatos. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 410–418. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400005>

Gatti, B.M., Ramirez Gronda, G.A., Etchevarría, M., Vescina, C.M., Varea, A.M., y González Ayala, S.E. (2004). Aislamiento de distintos serotipos de *Haemophilus influenzae* en muestras profundas de pacientes pediátricos. *Revista argentina de microbiología*, 36(1), 20-23. Recuperado en 18 de abril de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412004000100004&lng=es&tlng=es

Gholamhosseini-Moghaddam, T., Rad, M., Mousavi, S. F., y Ghazvini, K. (2015). Detection of *lytA*, *pspC*, and *rrgA* genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated from healthy children. *Iranian Journal of Microbiology*, 7(3), 156–160.

Gillespie, S. H., Ullman, C., Smith, M. D., y Emery, V. (1994). Detection of *Streptococcus pneumoniae* in sputum samples by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(5), 1308–1311. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.5.1308-1311.1994>

Ginevra, C., Barranger, C., Ros, A., Mory, O., Stephan, J. L., Freymuth, F., Joannès, M., Pozzetto, B., y Grattard, F. (2005). Development and evaluation of Chlamylege, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydophila pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory

specimens by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3247–3254. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3247-3254.2005>

Guillén, R., Franco, R., Franco, L., Moraga, P., Ojeda, M., y Russomando, G. (2012). Detección por PCR múltiple de gérmenes atípicos en pacientes con neumonía adquirida de la comunidad que concurren al INERAM. *Memorias Del Instituto de Investigaciones En Ciencias de La Salud*, 10(1), 24–35.

Gullsby, K., Storm, M., Bondeson, K. (2008). Simultaneous detection of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR. *J Clin Microbiol.*

Grupo de Estudio de la Neumonía Adquirida en la Comunidad Área de Tuberculosis e Infecciones Respiratorias (TIR)-SEPAR (2005). Normativas para el diagnóstico y el tratamiento de la neumonía adquirida en la comunidad. Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Archivos de Bronconeumología*, 41(5), 272–289. <https://doi.org/10.1157/13074594>

Hamdan-Partida, A., González García, S., y Bustos-Martínez, J. (2015). Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas*, 16(2), 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>

Hassan-King, M., Baldeh, I., Secka, O., Falade, A., y Greenwood, B. (1994). Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in blood cultures by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(7), 1721–1724. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.7.1721-1724.1994>

Instituto Mexicano del Seguro Social (2009). Guía de Referencia Rápida Evidencias y Recomendaciones. IMSS-234-09, 1–11. Retrieved from http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/234_IMSS_09_Neumonia_comunidad_adultos/RR_IMSS_234_9.pdf

Instituto Nacional de Salud Colombiano (2004). Programa de Vigilancia de los Serotipos y Resistencia Antimicrobiana de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Manual de procedimientos. Organización Panamericana de la Salud. Versión No.4. 100-155. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/cnts/pdfs/LABS-manual-vigilancia-serotipos.pdf>

Javier, C. A. (1999). Bacteriología Clínica de *Haemophilus influenzae*. *Honduras Pediátrica*, XX(3), 81–82. Retrieved from <http://www.bvs.hn/RHP/pdf/1999/pdf/Vol20-3-1999-8.pdf>

Jaqueti, J. (2000). Procedimientos diagnósticos en las infecciones por *Chlamydia pneumoniae*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 18(4), 204–205. Retrieved from <http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-procedimientos-diagnosticos-las-infecciones-por-10370>

Johansson, N., Kalin, M., Giske, C. G., y Hedlund, J. (2008). Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(3), 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.10.011>

Johnson, W. M., Tyler, S. D., Ewan, E. P., Ashton, F. E., Pollard, D. R., y Rozee, K. R. (1991). Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in *Staphylococcus aureus* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 426–430. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.3.426-430.1991>

Kellogg, J. A., Bankert, D. A., Elder, C. J., Gibbs J. L. y Smith, M. C. (2001). Identification of *Streptococcus pneumoniae* Revisited. *American Society for Microbiology*, 39(9), 3373–3375. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.9.3373>

Kiedrowski, M. (2012). Characterization of *Staphylococcus aureus* extracellular nuclease activity. Theses and Dissertations. Retrieved from <http://ir.uiowa.edu/etd/4997>

Lahti, E., Mertsola, J., Kontiokari, T., Eerola, E., Ruuskanen, O., y Jalava, J. (2006). Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(12), 783–789. <https://doi.org/10.1007/s10096-006-0225-9>

Lim, W. S., Baudouin, S. V., George, R. C., Hill, A. T., Jamieson, C., Le Jeune, I., Macfarlane, J. T., Read, R. C., Roberts, H. J., Levy, M. L., Wani, M., Woodhead, M. A., & Pneumonia Guidelines Committee of the BTS Standards of Care Committee (2009). BTS guidelines for the management of community acquired pneumonia in adults: update 2009. *Thorax*, 64 Suppl 3, iii1–iii55. <https://doi.org/10.1136/thx.2009.121434>

Liebl, W., Rosenstein, R., Götz, F., y Schleifer, K. H. (1987). Use of staphylococcal nuclease gene as DNA probe for *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 44(2), 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02264.x>

Liu, C., y Waters, D. D. (2005). *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis: From Koch's postulates to clinical trials. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 47(4), 230–239. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2005.01.001>

Llull, D., Lopez, R., y Garcia, E. (2006). Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1250–1256. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1250>

López-Vázquez, M., Martínez-Castañeda, J., Talavera-Rojas, M., Valdez-Alarcón, J., y Velázquez-Ordóñez, V. (2015). a metilina de origen bovino aisladas en unidades de producción lechera familiar , strains of bovine origin isolated from Family Dairy Farms, Mexico. *Ach Med Vet*, 249, 245–249.

Markoulatos, P., Siafakas, N., y Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 16(1), 47–51. <https://doi.org/10.1002/jcla.2058>

Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R., Rodellar C. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa. *AquaTIC*. No.15. Recuperado de: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/html/art1501/basespcr.htm>

McCrea, K. W., Xie, J., LaCross, N., Patel, M., Mukundan, D., Murphy, T. F., y Gilsdorf, J. R. (2008). Relationships of nontypeable *Haemophilus influenzae* strains to hemolytic and nonhemolytic *Haemophilus haemolyticus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 406–416. <https://doi.org/10.1128/JCM.01832-07>

Mclauchlin, J., Narayanan, G. L., Mithani, V., y O'Neill, G. (2000). The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 63(4), 479–488. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-63.4.479>

Mehrotra, M., Wang, G., y Johnson, W. M. (2000). Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1032–1035. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.3.1032-1035.2000>

Mellroth, P., Daniels, R., Eberhardt, A., Rönnlund, D., Blom, H., Widengren, J., y Henriques-Normark, B. (2012). LytA, major autolysin of *Streptococcus pneumoniae*, requires access to nascent peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), 11018–11029. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.318584>

Ministerio de Salud de Chile (2011). Neumonía Adquirida en la Comunidad en Adultos de 65 años y más. Serie Guías Clínicas MINSAL. Segunda Edición. 04-10. Recuperado de: <http://www.bibliotecaminsal.cl/wp/wp-content/uploads/2016/04/Neumonia-Adquirida-adultos-de-65-a%C3%B1os-y-m%C3%A1s.pdf>

Miravittles, M. (2001). Recomendaciones ALAT sobre la neumonía adquirida en la comunidad. *Archivos de Bronconeumología*, 37(8), 340–348. [https://doi.org/10.1016/S0300-2896\(01\)75104-6](https://doi.org/10.1016/S0300-2896(01)75104-6)

Miyashita, N., Ouchi, K., Kishi, F., Tabuchi, M., Tsumura, N., Bannai, H., Iwata, S., Tanaka, T., y Oka, M. (2008). Rapid and simple diagnosis of *Chlamydomydia pneumoniae* pneumonia by an immunochromatographic test for detection of immunoglobulin M antibodies. *Clinical and Vaccine Immunology*, 15(7), 1128–1131. <https://doi.org/10.1128/CVI.00085-08>

Moghassem Hamidi, R., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S., Poormontaseri, M., Derakhshandeh, A. (2015). Association between the enterotoxin production and presence of *coa*, *nuc* genes among *Staphylococcus aureus* isolated from various sources, in Shiraz. *Iran J Vet Res*. 2015 Fall;16(4):381-4.

Montaño, C. M., Méndez, N. G., Posada, L. G., y Orozco, A. (2016). Estudio clínico-epidemiológico de neumonía adquirida en la comunidad durante la edad pediátrica. Experiencia en el Hospital Ángeles Pedregal. *Acta Médica Grupo Ángeles*, 14(3), 143.

Morozumi, M., Nakayama, E., Iwata, S., Aoki, Y., Hasegawa, K., Kobayashi, R., Chiba, N., Tajima, T., y Ubukata, K. (2006). Simultaneous detection of pathogens in clinical samples from patients with community-acquired pneumonia by real-time PCR with pathogen-specific molecular beacon probes. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1440–1446. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.4.1440-1446.2006>

Muhlestein, J. B., Cohen, J. D., Rogers, W. J., Crouse, J. R., Borrowdale, S. L., Schron, E., Knirsch, C., y Investigators, A. (2005). *New England journal*. 1637–1645. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.006>

Murdoch, D. R., Anderson, T. P., Beynon, K. A., Chua, A., Fleming, A. M., Laing, R. T. R., y Jennings, L. C. (2003). Evaluation of a PCR Assay for Detection of *Streptococcus pneumoniae* in Respiratory and Nonrespiratory Samples from Adults with Community-Acquired Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 63–66. <http://doi.org/10.1128/JCM.41.1.63-66.2003>.

Musher, D. M., y Thorner, A. R. (2014). Community-Acquired Pneumonia. *New England Journal of Medicine*, 371(17), 1619–1628. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1312885>

Nagai, K. (2001). Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(6), 915–918. <https://doi.org/10.1093/jac/48.6.915>

National Center for Immunization and Respiratory Diseases Division of Bacterial Diseases (2016). Center of Disease Control and Prevention. Atlanta, USA. U.S Department of Health & Human Services. Recuperado de: <https://www.cdc.gov/hidisease/>

Nolte, F. S. (2008). Molecular Diagnostics for Detection of Bacterial and Viral Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*, 47(S3), S123–S126. <https://doi.org/10.1086/591392>

Nomanpour, B., Ghodousi, A., Babaei, T., Jafari, S., y Feizabadi, M. M. (2012). Single tube real time PCR for detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella pneumophila* from clinical samples of CAP. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 59(2), 171–184. <https://doi.org/10.1556/AMicr.59.2012.2.3>

Pahissa A., (2009). Infecciones por *Staphylococcus aureus*. Barcelona, España: Editorial Marge Medica Books

Palomares, C., Torres, M. J., Torres, A., Aznar, J., y Palomares, J. C. (2003). Rapid detection and identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture specimens using real-time fluorescence PCR. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45(3), 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00542-4](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00542-4)

Pérez-Roth, E., Claverie-Martín, F., Villar, J., y Méndez-Álvarez, S. (2001). Multiplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and detection of methicillin and mupirocin resistance. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 4037–4041. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.4037-4041.2001>

Poole, S., Kidd, S., Saeed, K. A. (2018). Review of novel technologies and techniques associated with identification of bloodstream infection etiologies and rapid antimicrobial genotypic and quantitative phenotypic determination. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018 Jun;18(6):543-555. doi: 10.1080/14737159.2018.1480369. Epub 2018 Jun 7.

Preado J., V. (2001). Conceptos microbiológicos de *Streptococcus pneumoniae*: BASIC MICROBIOLOGICAL ASPECTS. *Revista Chilena de Infectología*, 18, 6–9. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182001000000002>

Public Health England (2013). GOV.UK. Reino Unido. Infectious diseases. Recuperado de: <https://www.gov.uk/government/collections/haemophilus-influenzae-guidance-data-and-analysis>

Roca, B. (2007). Infecciones por clamidias. *Anales de medicina interna*, 24(6), 292-299.

<https://doi.org/10.4321/s0212-71992007000600009>

Rocchetti, T. T., Martins, K. B., Martins, P. Y. F., Oliveira, R. A. de, Mondelli, A. L., Fortaleza, C. M. C. B., y Cunha, M. de L. R. de S. da. (2018). Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22(2), 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.006>

Rodríguez-Domínguez, M., Sanbonmatsu, S., Salinas, J., Alonso, R., Gutiérrez, J., y Galán, J. C. (2014). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 32, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2013.01.015>

Sahebnaasagh, R., Saderi, H., y Owlia, P. (2014) Jan;43(1):84-92. The Prevalence of Resistance to Methicillin in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Patients by PCR Method for Detection of *mecA* and *nuc* Genes. *Iran J Public Health*.

Sakurada, A. (2013). *Haemophilus influenzae*. *Revista Chilena de Infectología*, 30(6), 661–662. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182013000600015>

Sakurai, S., Suzuki, H., y Machida, K. (1995). Rapid Identification by Polymerase Chain Reaction of Staphylococcal Exfoliative Toxin Serotype A and B Genes. *Microbiology and Immunology*, 39(6), 379–386. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02216.x>

She, R., Thurber, A., Hymas, W., Stevenson, J., Langer, J., Litwin, C., y Petti, C. (2010) Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* for diagnosis of respiratory tract infections. *J Clin Microbiol*. 2010 Sep;48(9):3380-2. doi: 10.1128/JCM.00321-10. Epub 2010 Jul 7.

Smith, M. D., Sheppard, C. L., Hogan, A., Harrison, T. G., Dance, D. A. B., Derrington, P., y George, R. C. (2009). Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections in adults with bacteremia and community-acquired pneumonia: Clinical comparison of pneumococcal PCR and urinary antigen detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), 1046–1049. <https://doi.org/10.1128/JCM.01480-08>

Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., y Witte, W. (2003). Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4089–4094. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4089-4094.2003>

Strålin, K., Bäckman, A., Holmberg, H., Fredlund, H., y Olcén, P. (2005). Design of a multiplex PCR for *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma*

pneumoniae and *Chlamydophila pneumoniae* to be used on sputum samples. *Apmis*, 113(2), 99–111. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2005.apm1130203.x>

Tamay de Dios, L., Ibarra, C. y Velasquillo, C. (2013). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78.

Andrés Martín, A., Moreno-Pérez, D., Alfayate Miguélez, S., Couceiro Gianzo, J. A., García García, M., Korta Murua, J., ... Pérez Pérez, G. (2012). Etiología y diagnóstico de la neumonía adquirida en la comunidad y sus formas complicadas. *Anales de Pediatría*, 76(3), 162.e1-162.e18. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2011.09.011>

ThermoFisher Scientific (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. *Technical Bulletin NanoDrop Spectrophotometers*, 1–2.

Tian, G.Z., Zhang L.j., Wang X.L., Zhang L., Li S.F., Gu C.M., Sun J., y Cui B.Y. (2012). Rapid detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in nasopharyngeal swabs by multiplex PCR. *Biomedical and Environmental Science*, 25(3), 367-371. doi: 10.3967/0895-3988.2012.03.016.

Villegas, E., Sorlózano, A., Camacho, A., y Gutiérrez, J. (2008). *Chlamydophila pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(10), 629–637. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(08\)75279-0](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)75279-0)

Virolainen, A., Salo, P., Jero, J., Karma, P., Eskola, J., y Leinonen, M. (1994). Comparison of PCR assay with bacterial culture for detecting *Streptococcus pneumoniae* in middle ear fluid of children with acute otitis media. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2667–2670. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2667-2670.1994>

Walti, M., Jatón, K., Altwegg, M., Sahli, R., Wenger, A., y Bille, J. (2003). Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 45(2), 85–95. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00484-4](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00484-4)

Wessels, E., Schelfaut, J. J. G., Bernards, A. T., y Claas, E. C. J. (2012). Evaluation of several biochemical and molecular techniques for identification of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pseudopneumoniae* and their detection in respiratory samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1171–1177. <https://doi.org/10.1128/JCM.06609-11>

Whatmore, A. M., y Dowson, C. G. (1999). The Autolysin-Encoding Gene (*lytA*) of *Streptococcus pneumoniae* Displays Restricted Allelic Variation despite Localized

Recombination Events with Genes of Pneumococcal Bacteriophage Encoding Cell Wall Lytic Enzymes. *Infection and Immunity*, 67(9), 4551–4556.

WHO, M. C. (2016). OMS | Neumonía. WHO. World Health Organization. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/es/#.WPVy-Q-fq2M.mendeley&title=Neumonía&description=La neumonía es la causa principal de muerte de niños en todo el mundo. La neumonía puede prevenirse mediante inmunización, una alimentación adecuada y med>

Wilson, I. G., Cooper, J. E., y Gilmour, A. (1991). Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in dried skimmed milk: Use of the polymerase chain reaction for amplification and detection of staphylococcal enterotoxin genes *entB* and *entC1* and the thermonuclease gene *nuc*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1793–1798. <https://doi.org/10.1128/aem.57.6.1793-1798.1991>












Woodhead M. (2008). Epidemiology of adult hospitalized Community-Acquire pneumonia. En Torres A., y Menendez R., (2008), *Community-Acquired Pneumonia: Strategies for Management* (pp.) John Wiley & Sons.

Zendejas, G., Avalos, H., y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, metodos de identificacion. *Revista Biomed*, 25(3), 129–143.

ANEXOS




ANEXO 1. Resultados del análisis de los oligonucleótido sentido (forward) y antisentido (reverse), para amplificar cada uno de los genes usados en este estudio, con la herramienta UNAFoldTool PrimerQuest® program, IDT, Coralville, Iowa, USA. 2018. <https://www.idtdna.com/SciTools>.

Forward

| Structure Name | Image | ΔG (kcal.mole ⁻¹) | T _M (°C) | ΔH (kcal.mole ⁻¹) | ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹) | Output |
|----------------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--------|
| 1 |  | 1.98 | -546.6 | 0.9 | -3.29 | Ct Det |
| 2 |  | 2.38 | -360.2 | 0.5 | -5.74 | Ct Det |
| 3 |  | 2.44 | -19.6 | -8.3 | -32.74 | Ct Det |
| 4 |  | 2.53 | 7.9 | -15.1 | -53.72 | Ct Det |
| 5 |  | 2.64 | -135.9 | -1.9 | -13.84 | Ct Det |
| 6 |  | 2.7 | 5.8 | -15.3 | -54.85 | Ct Det |
| 7 |  | 2.7 | -14.3 | -10.1 | -39.02 | Ct Det |
| 8 |  | 2.72 | -1.4 | -13.1 | -48.21 | Ct Det |
| 9 |  | 2.87 | -42.5 | -6.8 | -29.48 | Ct Det |
| 10 |  | 2.92 | -65.9 | -5 | -24.13 | Ct Det |
| 11 |  | 2.92 | -45.7 | -6.6 | -29.02 | Ct Det |


1A. Resultados del análisis del oligonucleótido *nucA* sentido empleado para diagnóstico de *S. aureus*.

Reverse

| Structure Name | Image | ΔG (kcal.mole ⁻¹) | T _M (°C) | ΔH (kcal.mole ⁻¹) | ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹) | Output |
|----------------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--------|
| 1 |  | 1.36 | 34 | -20 | -65.11 | Ct Det |
| 2 |  | 1.93 | 27.1 | -20.7 | -68.95 | Ct Det |
| 3 |  | 2.04 | 11.8 | -13.5 | -47.37 | Ct Det |



Anexo 1B. Resultados del análisis del oligonucleótido *nucA* antisentido empleado para diagnóstico de *S. aureus*.

Forward

| Structure Name | Image | ΔG (kcal.mole ⁻¹) | T _M (°C) | ΔH (kcal.mole ⁻¹) | ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹) | Output |
|----------------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--------|
| 1 |  | -0.97 | 35.2 | -29.4 | -95.36 | Ct Det |

Anexo 1C. Resultados del análisis del oligonucleótido *lytA* sentido empleado para diagnóstico de *S. pneumoniae*.

Reverse

| Structure Name | Image | ΔG (kcal.mole ⁻¹) | T _M (°C) | ΔH (kcal.mole ⁻¹) | ΔS (cal.K ⁻¹ mole ⁻¹) | Output |
|----------------|---|---------------------------------------|---------------------|---------------------------------------|--|--------|
| 1 |  | -0.51 | 30.9 | -26.1 | -85.84 | Ct Det |
| 2 |  | -0.08 | 26.4 | -16.5 | -55.08 | Ct Det |

Anexo 1D. Resultados del análisis del oligonucleótido *lytA* antisentido empleado para diagnóstico de *S. pneumoniae*.

ANEXO 2. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los diferentes oligonucleótidos sentido (forward) y antisentido (reverse), utilizados para amplificar los genes seleccionados en el presente estudio utilizando UNAFoldTool (PrimerQuest® program, IDT, Coralville, Iowa, USA. 2018. <https://www.idtdna.com/SciTools>.)

```
nucA Forward GCGATTGATGGTGATACTGTTA -3'
nucA Reverse 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC -3'

Maximum Delta G: -47.59 kcal/mole
```

```
Delta G: -5.02 kcal/mole Base Pairs: 3
5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
      : :   |||
3' CGAAATCAAGCAGTTCGAAACCGA
```

```
Delta G: -3.9 kcal/mole Base Pairs: 3
5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
      : |||
3' CGAAATCAAGCAGTTCGAAACCGA
```

```
Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2
5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
      ||      ::
3' CGAAATCAAGCAGTTCGAAACCGA
```

```
Delta G: -3.29 kcal/mole Base Pairs: 3
5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
      : :   |||
3'          CGAAATCAAGCAGTTCGAAACCGA
```

Anexo 2A. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* sentido contra *nucA* antisentido.

lytA Forward TAAAACGCACGAGTATTGCAC -3'
lytA Reverse 5'-TAAGAGCCGTCTGAATGTACG -3'

Maximum Delta G: -39.08 kcal/mole

Delta G: -4.95 kcal/mole Base Pairs: 3
 5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
 : : |||
 3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT

Delta G: -4.95 kcal/mole Base Pairs: 3
 5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
 : : ||| : : :
 3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2
 5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
 || : : : :
 3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2
 5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
 || : : :
 3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT

Anexo 2B. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *lytA* sentido contra *lytA* antisentido.

ompA Forward CAAGCCTACTGGATCCGCTG -3'
ompA Reverse 5'-CCGCATTCCATAAGGCTCC -3'

Maximum Delta G: -43.29 kcal/mole

Delta G: -9.41 kcal/mole Base Pairs: 5
 5' CAAGCCTACTGGATCCGCTG
 ||||| : : : : :
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs: 3
 5' CAAGCCTACTGGATCCGCTG
 : : : : |||
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Delta G: -4.64 kcal/mole Base Pairs: 3
 5' CAAGCCTACTGGATCCGCTG
 ||| : : :
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2
 5' CAAGCCTACTGGATCCGCTG
 : : : |||
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Anexo 2C. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *ompA* sentido contra *ompA* antisentido.

nucA Forward GCGATTGATGGTGATACTGTTA -3'
 lytA Forward 5'-TAAACGCACGAGTATTGCAC -3'

Maximum Delta G: -39.08 kcal/mole

Delta G: -6.75 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
           ||| :: :
3' CACGTTATGAGCACGCAAAAT
  
```

Delta G: -5.38 kcal/mole Base Pairs: 5

```

5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   : |||| :
3'   CACGTTATGAGCACGCAAAAT
  
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
           ||  : :
3' CACGTTATGAGCACGCAAAAT
  
```

Delta G: -3.3 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   : : : ||| :
3' CACGTTATGAGCACGCAAAAT
  
```

Anexo 2D. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* sentido contra *lytA* sentido.

nucA Forward GCGATTGATGGTGATACTGTTA -3'
 ompA Forward 5'-CAAGCCTACTGGATCCGCTG -3'

Maximum Delta G: -40.23 kcal/mole

Delta G: -6.75 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   ||| : : :
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
  
```

Delta G: -3.9 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
           : |||
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
  
```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
           ||
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
  
```

Delta G: -3.07 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'          GCGATTGATGGTGATACTGTTA
           : : ||
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
  
```

Anexo 2E. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* sentido contra *ompA* sentido.

lytA Forward TAAAACGCACGAGTATTGCAC -3'
ompA Forward 5'-CAAGCCTACTGGATCCGCTG -3'

Maximum Delta G: -40.23 kcal/mole

Delta G: -3.9 kcal/mole Base Pairs: 4

```
5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
   : : : |||
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
```

Delta G: -3.9 kcal/mole Base Pairs: 3

```
5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
   : :: :: |||
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
   : || : ::
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
   || : ::
3' GTCGCCTAGGTCATCCGAAC
```

Anexo 2F. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *lytA* sentido contra *ompA* sentido.

nucA Forward GCGATTGATGGTGATACTGTTA -3'
ompA Reverse 5'-CCGCATTCCATAAGGCTCC -3'

Maximum Delta G: -43.29 kcal/mole

Delta G: -6.75 kcal/mole Base Pairs: 3

```
5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   |||
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
```

Delta G: -6.5 kcal/mole Base Pairs: 4

```
5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   : : : ||| : : :
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
```

Delta G: -3.43 kcal/mole Base Pairs: 3

```
5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   ||| :
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```
5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
   || : :
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
```

Anexo 2G. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* sentido contra *ompA* antisentido.

nucA Forward GCGATTGATGGTGATACTGTTA -3'
 lytA Reverse 5'-TAAGAGCCGTCTGAATGTACG -3'

Maximum Delta G: -38.22 kcal/mole

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           GCGATTGATGGTGATACTGTTA
              ||  :  :
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' GCGATTGATGGTGATACTGTTA
      | |  :  :  :  :
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Delta G: -3.42 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5'   GCGATTGATGGTGATACTGTTA
      || |  :  :  :
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           GCGATTGATGGTGATACTGTTA
              ||  ::
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Anexo 2H. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* sentido contra *lytA* antisentido.

lytA Forward TAAAACGCACGAGTATTGCAC -3'
 ompA Reverse 5'-CCGCATTCCCATAAGGCTCC -3'

Maximum Delta G: -43.29 kcal/mole

Delta G: -5.09 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
      :  :  :  : |||
3' CCTCGGAATACCCTTACGCC
  
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           TAAAACGCACGAGTATTGCAC
              :  :  ||
3' CCTCGGAATACCCTTACGCC
  
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5'           TAAAACGCACGAGTATTGCAC
              ||
3' CCTCGGAATACCCTTACGCC
  
```

Delta G: -3.17 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' TAAAACGCACGAGTATTGCAC
      |||  ::
3'           CCTCGGAATACCCTTACGCC
  
```

Anexo 2I. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *lytA* Forward contra *ompA* Reverse.

nucA Reverse AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC -3'
lytA Reverse 5'-TAAGAGCCGTCTGAATGTACG -3'

Maximum Delta G: -47.59 kcal/mole

Delta G: -6.53 kcal/mole Base Pairs: 4

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   :   |||   :
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   :   ||   :
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Delta G: -3.54 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   : :   |||
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Delta G: -3.14 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   :   ||
3' GCATGTAAGTCTGCCGAGAAT
  
```

Anexo 2J. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* antisentido contra *lytA* antisentido.

nucA Reverse AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC -3'
ompA Reverse 5'-CCGCATTCCATAAGGCTCC -3'

Maximum Delta G: -47.59 kcal/mole

Delta G: -11.35 kcal/mole Base Pairs: 6

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   ||||| : : :
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
  
```

Delta G: -7.81 kcal/mole Base Pairs: 4

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   ||| : :
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
  
```

Delta G: -4.74 kcal/mole Base Pairs: 3

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   :   |||
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
  
```

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

```

5' AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC
   : :   ||
3' CCTCGGAATACCCTTAGGCC
  
```

Anexo 2K. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *nucA* antisentido contra *ompA* antisentido.

lytA Reverse TAAGAGCCGCTCTGAATGTACG-3'
ompA Reverse 5'-CCGCATTCCCAT AAGGCTCC-3'

Maximum Delta G: -43.29 kcal/mole

Delta G: -9.38 kcal/mole Base Pairs: 5

5' TAAGAGCCGCTCTGAATGTACG
 ||||| : : : : :
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Delta G: -6.95 kcal/mole Base Pairs: 5

5' TAAGAGCCGCTCTGAATGTACG
 : : : | ||||
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Delta G: -3.61 kcal/mole Base Pairs: 2

5' TAAGAGCCGCTCTGAATGTACG
 : ||
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Delta G: -3.43 kcal/mole Base Pairs: 3

5' TAAGAGCCGCTCTGAATGTACG
 : |||
 3' CCTCGGAATACCCTTACGCC

Anexo 2L. Resultados del análisis de formación de heterodímeros de los oligonucleótidos *lytA* antisentido contra *ompA* antisentido.

ANEXO 3. Resultados del alineamiento de los diferentes oligonucleótidos sentido (forward) y antisentido (reverse), empleados para la amplificación de los genes seleccionados contra la base de datos del NCBI.

| Forward | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---------|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| | Staphylococcus aureus strain ST20130945 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP033114.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ST20130944 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP033112.1 |
| | Staphylococcus aureus strain GHA11 chromosome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP043913.1 |
| | Staphylococcus aureus strain GD1706 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP040232.1 |
| | Staphylococcus aureus strain B6-55A chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP042110.1 |
| | Staphylococcus aureus strain GD1696 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP040233.2 |
| | Staphylococcus aureus strain GD487 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP040229.2 |
| | Staphylococcus aureus strain O217 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP038461.1 |
| | Staphylococcus aureus strain 04-002 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP038021.1 |
| | Staphylococcus aureus strain NCTC11965 genome assembly, chromosome: 1 | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | LR134093.1 |
| | Staphylococcus aureus subsp. aureus strain 80wphwpl chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP034349.1 |
| | Staphylococcus aureus strain 80wphwpl_v1 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP034098.1 |
| | Staphylococcus aureus strain FDAARGOS_504 chromosome, complete genome | 44.1 | 80.3 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP033865.1 |
| | Staphylococcus aureus strain PCFA-221 chromosome, complete genome | 44.1 | 44.1 | 100% | 0.027 | 100.00% | CP035003.1 |

Anexo 3A. Resultados del alineamiento del oligonucleótido *nucA* sentido para la amplificación del gen *nucA* de *Staphylococcus aureus*.

| Reverse | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---------|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| | Staphylococcus aureus strain ST20130945 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP033114.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ST20130944 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP033112.1 |
| | Staphylococcus aureus Tokyo12482 DNA, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | AP019713.1 |
| | Staphylococcus aureus Tokyo12480 DNA, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | AP019712.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ZY05 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP045472.1 |
| | Staphylococcus aureus strain CFSAN007894 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP045866.1 |
| | Staphylococcus aureus strain SCDR-SA1 chromosome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP033390.1 |
| | Staphylococcus aureus subsp. anaerobius strain Zhenghai chromosome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP033117.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER02826.3 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP030661.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER01533.3 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP030675.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03710.3 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP030646.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03544.3 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP030630.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER03556.3 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP030647.1 |
| | Staphylococcus aureus strain ER04324.3 chromosome, complete genome | 48.1 | 48.1 | 100% | 0.003 | 100.00% | CP030650.1 |

Anexo 3B. Resultados del alineamiento del oligonucleótido *nucA* antisentido para la amplificación del gen *nucA* de *S. aureus*.

| Forward | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| | Streptococcus pneumoniae strain 4496 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 84.2 | 100% | 0.080 | 100% | LR129840.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain Halah5 autolysin (lytA) gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH704265.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain Halah3 autolysin (lytA) gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH704264.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain M26365 chromosome, complete genome | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | CP031248.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain M23734 chromosome, complete genome | 42.1 | 84.2 | 100% | 0.080 | 100% | CP031247.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 4041STDY6836169 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | LS483523.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain REO3011 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029594.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain P13229 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029590.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain REO6497 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029580.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain SF1927 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029579.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain REO6329 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029577.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain REO4095 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029570.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain Ex3319 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029569.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain REO1824 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029568.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain REO6224 autolysin gene, partial cds | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | MH029567.1 |

Anexo 3C. Resultados del alineamiento del oligonucleótido *lytA* sentido para la amplificación del gen *lyt A* de *S. pneumoniae*.

| Reverse | Description | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession |
|---------|--|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| | Streptococcus pneumoniae strain NCTC12977 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 76.3 | 100% | 0.080 | 100% | LR134294.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 180-15 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | LR129844.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 180-2 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | LR129843.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 4496 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 76.3 | 100% | 0.080 | 100% | LR129840.1 |
| | Streptococcus pneumoniae ASP0581 DNA, complete genome | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | AP019192.1 |
| | Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 DNA, complete genome | 42.1 | 76.3 | 100% | 0.080 | 100% | AP018938.1 |
| | Streptococcus pneumoniae NU83127 DNA, complete genome | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | AP018936.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain M26365 chromosome, complete genome | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | CP031248.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain M16808 chromosome, complete genome | 42.1 | 76.3 | 100% | 0.080 | 100% | CP031245.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain M26368 chromosome, complete genome | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | CP031246.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain M23734 chromosome, complete genome | 42.1 | 76.3 | 100% | 0.080 | 100% | CP031247.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 4041STDY6836169 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | LS483523.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 4041STDY6836166 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 110 | 100% | 0.080 | 100% | LS483451.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain 4041STDY6583227 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | LS483450.1 |
| | Streptococcus pneumoniae strain NCTC11902 genome assembly, chromosome: 1 | 42.1 | 42.1 | 100% | 0.080 | 100% | LS483417.1 |

Anexo 3D. Resultados del alineamiento del oligonucleótido *lytA* antisentido para la amplificación del gen *lytA* de *S. pneumoniae* contra la base de datos del NCBI.

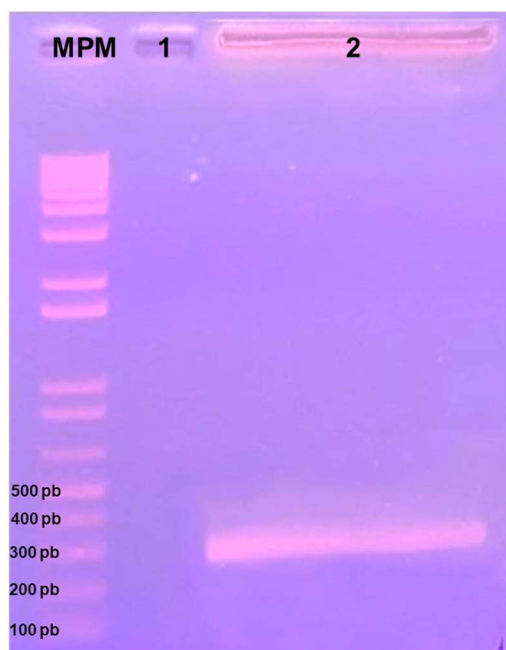
| Forward | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---------|--|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| | Chlamydia pneumoniae AR39, complete genome | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | AE002161.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly YK41, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN849043.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien3, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847257.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien2, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847254.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly UZG1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847246.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly U1271, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847244.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly PB2, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847241.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly PB1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847240.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Panola, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847236.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly MUL2216, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847227.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly K7, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847221.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly H12, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847194.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly GiD, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847008.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL029c, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847005.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL011, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847000.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CV15, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846999.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CV14, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846996.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CM1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846995.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846980.1 |
| | Chlamydia pneumoniae strain AR-39 major outer membrane protein, gene, complete cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | KC512913.1 |
| | Uncultured Chlamydia sp. isolate TOR1 major outer membrane protein (MOMP), gene, partial cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | GQ918217.1 |
| | Chlamydia pneumoniae isolate WA97001 major outer membrane protein (MOMP), gene, partial cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | GQ918216.1 |
| | Chlamydia pneumoniae TW-183, complete genome | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | AE009440.1 |
| | Chlamydia pneumoniae LKK-1 outer membrane protein A (ompA), gene, partial cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | AY555078.1 |

Anexo 3E. Resultados del alineamiento del oligonucleótido *ompA* sentido para la amplificación del gen *ompA* de *C. pneumoniae*.

| Reverse | Description | Max Score | Total Score | Query Cover | E value | Per. Ident | Accession |
|---------|---|-----------|-------------|-------------|---------|------------|----------------------------|
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly YK41, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN849043.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien3, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847257.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien2, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847254.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly UZG1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847246.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly U1271, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847244.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly PB2, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847241.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly PB1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847240.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Panola, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847236.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly MUL2216, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847227.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly K7, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847221.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly H12, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847194.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly GiD, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847008.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL029c, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847005.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CWL011, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN847000.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CV15, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846999.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CV14, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846996.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly CM1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846995.1 |
| | Chlamydia pneumoniae genome assembly Wien1, chromosome : 1 | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | LN846980.1 |
| | Chlamydia pneumoniae strain AR-39 major outer membrane protein gene, complete cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | KC512913.1 |
| | Uncultured Chlamydia sp. isolate TOR1 major outer membrane protein (MOMP) gene, partial cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | GQ918217.1 |
| | Chlamydia pneumoniae isolate WA97001 major outer membrane protein (MOMP) gene, partial cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | GQ918216.1 |
| | Chlamydia pneumoniae TW-183, complete genome | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | AE009440.1 |
| | Chlamydia pneumoniae LKK-1 outer membrane protein A (ompA) gene, partial cds | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | AY555078.1 |
| | Chlamydia pneumoniae AR39, complete genome | 40.1 | 40.1 | 100% | 0.42 | 100.00% | AE002161.1 |

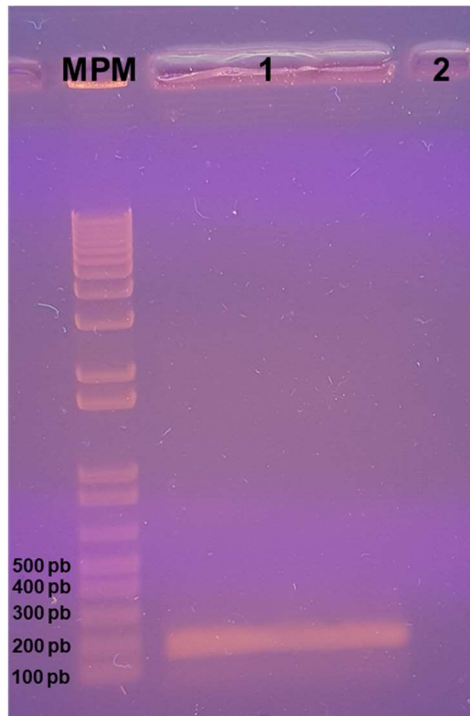
Anexo 3F. Resultados del alineamiento del oligonucleótido *ompA* Reverse para la amplificación del gen *ompA* de *Chlamydia pneumoniae*.

ANEXO 4. Se muestran los gels preparativos de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL de donde se extrajo el ADN de los amplicones para enviarlos a secuenciar, también sirvieron para evaluar la integridad del ADN.



Anexo 4A. Gel preparativo del amplicón para el gen *nucA* de la cepa ATCC® 25923™ de *S. aureus*.

MPM (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder), **2)** Banda utilizada para extracción de ADN.



Anexo 4B. Gel preparativo del amplicón para el gen *lytA* de la cepa clínica de *S. pneumoniae*.

MPM (Thermo Scientific GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder), **1.-** Banda utilizada para extracción de ADN.