



Facultad de ciencias naturales y Matemáticas Escuela profesional de Biología

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR PARA LA DETECCIÓN DE
M. pneumoniae y *C. pneumoniae* EN EL INS-2017**

Tesis para optar por el Título de Licenciado en Biología

Autor:

Enriquez Alva, Giancarlo William

Asesor:

Mg. SALAS ASENCIOS, Ramsés

Jurado:

Mg. SANTA CRUZ CARPIO, Carlos M.

Mg. NOLASCO CARDENAS, Oscar P.

Mg. YUPANQUI SICCHA, Gisela F.

Lima-Perú

2019



Este trabajo está dedicado:

*A dios, quien ha sido mi guía y ha permitido que
llegue a este día con bien.*

*A mis padres, quienes con su amor y esfuerzo me
han permitido cumplir mis metas.*

*A mis seres queridos, que están conmigo dándome
fuerza para superarme cada día.*

*A mis amigos y profesores, por apoyarme y
enseñarme a ser una persona de bien.*



Agradecimientos

Al Blgo. Freddy Condori y al Blgo. Edwin Cabezado por permitirme trabajar con ellos en laboratorio de Sarampión y Rubeola, por orientarme constantemente en el ámbito profesional y académico, y por apoyarme con sus conocimientos a la realización de mi tesis.

Al Mg. Ramsés Salas Asencios por asesorarme durante el planteamiento y la redacción de este trabajo.

A los profesionales del Instituto Nacional de Salud quienes gentilmente me brindaron el apoyo que solicité en la realización de mi proyecto.

A mis profesores de la Universidad Nacional Federico Villarreal quienes me formaron como profesional inculcándome el amor y el respeto por mi carrera.



RESUMEN

Las infecciones respiratorias agudas son un problema de salud a nivel mundial con cifras de mortalidad alarmantes. Dentro de las infecciones respiratorias la neumonía adquirida en la comunidad es una de las mayores amenazas a la población, estas infecciones tienen entre los agentes causales las bacterias *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*. La identificación del agente permite dirigir una terapia antibiótica específica y efectiva. Los métodos de diagnóstico tradicionales para bacterias atípicas presentan diversas dificultades por lo que se requiere el desarrollo de un método con fines clínicos. Con el fin de responder a la necesidad de un método de diagnóstico para estas bacterias se buscó estandarizar una prueba de PCR. Se estandarizaron los parámetros de temperatura y tiempo de anillamiento, concentraciones de iniciadores y magnesio de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de estas bacterias. La especificidad fue óptima al no mostrar amplificación hacia otras bacterias y la sensibilidad de 10 copias por microlitro (c/μL). La técnica de PCR estandarizada fue empleada en muestras clínicas logrando identificar 5 casos de *Mycoplasma pneumoniae* y 2 casos de *Chlamydomphila pneumoniae*.

Palabras Clave: *Mycoplasma pneumoniae*; *Chlamydomphila pneumoniae*; PCR; Estandarización.



ABSTRACT

Acute respiratory infections are a global health problem with alarming mortality figures. Within respiratory infections community acquired pneumonia is one of the greatest threats to the population, these infections have among the causative agents the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydophila pneumoniae*. The identification of the agent allows to direct a specific and effective antibiotic therapy. Traditional diagnostic methods for atypical bacteria present various difficulties, which is why the development of a method for clinical purposes is required. In order to respond to the need for a diagnostic method for these bacteria we sought to standardize a PCR test. The banding temperature and time parameters, initiator and magnesium concentrations of the polymerase chain reaction were standardized for the detection of these bacteria. The specificity was optimal for not showing amplification towards other bacteria and the sensitivity of 10 copies per microliter (c/μL). The standardized PCR technique was used in clinical samples, identifying 5 cases of *Mycoplasma pneumoniae* and 2 cases of *Chlamydophila pneumoniae*.

Key works: *Mycoplasma pneumoniae*; *Chlamydophila pneumoniae*; PCR;
Standardization.



I. INTRODUCCIÓN

1. Descripción y formulación del problema

Las infecciones respiratorias agudas son causantes de 4.5 millones de muertes al año, de las cuales el 70% son neumonías. La tasa de mortalidad es mayor en países en vías de desarrollo en donde entre el 18 al 33% de las muertes de niños son por causa de una infección respiratoria aguda (Balboa, 2007).

La neumonía es una infección aguda del tracto respiratorio inferior con un cuadro clínico que incluye tos y dificultad respiratoria, generalmente causada por una variedad de agentes que incluyen bacterias, hongos y virus. Las neumonías son una causa importante de morbimortalidad, ocasionando cuantiosos gastos a nivel individual, familiar y a la sociedad. Según su origen, se clasifican en neumonía adquirida en la comunidad o intrahospitalaria (Fuentes, 2013).

La neumonía adquirida en la comunidad es una de las mayores amenazas en la población, especialmente en los extremos de la vida (niños y ancianos), en individuos inmunocomprometidos y en pacientes con enfermedades crónicas. Entre los patógenos causantes de las neumonías adquiridas en la comunidad, el más prevalente es *Streptococcus pneumoniae* (30 a 35%), seguido de *Haemophilus influenzae* (4 a 20%) y *Mycoplasma pneumoniae* (15 a 20%), cuya distribución depende de la edad de los pacientes afectados. Recientemente, *Chlamydophila pneumoniae* and *Legionella pneumophila* han sido también identificados como patógenos causantes de neumonías (Morozumi, 2006).



El diagnóstico de neumonías adquiridas en la comunidad se basa en el criterio clínico del médico, el examen físico en donde se sugiere la inflamación pulmonar, la respuesta humoral por la detección de respuesta inmunológica mediante métodos serológicos y por examen de placas radiográficas, asumiendo que el paciente proceda de una comunidad y no haya existido contacto hospitalario en por lo menos 48 horas (Fuentes, 2013).

Las neumonías se tratan con antibióticos de amplio espectro, basándose en los síntomas clínicos, el examen físico y la radiografía, considerando la severidad de la sintomatología. Por otro lado, es importante destacar que el tratamiento empírico se da sin un apropiado estudio de susceptibilidad antibiótica incrementa la resistencia bacteriana, lo que ya es un problema de salud mundial. Una manera efectiva de prevenir la emergencia de nuevas resistencias en las bacterias es manejando la cantidad y los antibióticos usados, pero es necesaria una identificación apropiada y específica de los patógenos presentes (Morozumi, 2006).

La detección rápida y precisa de los agentes causantes de neumonías es crucial para el establecimiento de un tratamiento adecuado y eficaz para combatir la infección; sin embargo, los métodos clásicos de identificación no son muy útiles cuando se tratan de bacterias atípicas debido al lento desarrollo de estos organismos en cultivo si es que logran desarrollarse, lo que retrasa el diagnóstico rápido y causa complicaciones en el paciente. Sumado a esto, la obtención de



una muestra de calidad es crucial para realizar un cultivo, lo que es complicado en niños pequeños debido a la contaminación de la muestra (Khanna, 2005; García, 2015).

Las técnicas de diagnóstico empleadas para bacterias atípicas son el cultivo celular, pruebas serológicas y recientemente PCR. El cultivo garantiza un diagnóstico específico pero con serias desventajas como tiempo de diagnóstico, riesgo de contaminación y alto costo. Los métodos serológicos son métodos rápidos y el tipo de muestra sencilla; sin embargo son dependientes de la fase de la enfermedad en la cual se extrae la muestra; y en el caso de la prueba ELISA, un diagnóstico requiere la comprobación de una seroconversión entre 2 muestras del mismo paciente con un intervalo de al menos 2 semanas (Berebichez, 2015).

Actualmente el Instituto Nacional de Salud cuenta únicamente con métodos serológicos para el diagnóstico de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, siendo necesaria la implementación de técnicas moleculares por los problemas ya mencionados. El propósito del estudio fue estandarizar y optimizar la prueba de PCR dirigida a los genes rRNA 16S y omp, desarrollada por Morozumi en 2006 y Khana en 2005, para posteriormente de validarla y que pueda ser de aplicación en el diagnóstico de bacterias en hisopados nasofaríngeos de pacientes.



2. Antecedentes

En el trabajo de Leven et al. (1996) se comparó 2 juegos de iniciadores para la detección de *Mycoplasma pneumoniae* dirigidos a los genes de la adhesina P1 y al gen rRNA 16S que amplifican un producto de 209pb y 277pb respectivamente. Los resultados mostraron mayor sensibilidad en los iniciadores dirigidos al gen de la adhesina P1, esta diferencia de sensibilidad se atribuyó a las múltiples copias de este gen en el genoma. Adicionalmente en el mismo trabajo analizó muestras de niños observando que 9 de las 13 infecciones detectadas son en niños mayores a 5 años. De manera similar al autor se buscó comparar 2 pares de iniciadores para detectar las bacterias de este trabajo y posteriormente probarlos en hisopados nasofaríngeos.

Posteriormente el trabajo de Dorigo et al. (1999) comparó distintas metodologías para el diagnóstico de *Mycoplasma pneumoniae*, la reacción en cadena de la polimerasa y la inmunofluorescencia con el cultivo y la fijación de complemento, en ese entonces la fijación de complemento era el ensayo serológico más empleado y el cultivo teniendo deficiencias en su sensibilidad era el gold standard. El PCR pudo detectar 9 de 16 casos, coincidiendo con el cultivo en 6 casos, donde los otros 7 casos solo fueron detectados por métodos serológicos. Es importante destacar que el PCR y la fijación de complemento difieren en resultados; sin embargo se complementaban ya que solo estos 2 métodos detectaron todos los casos positivos. Este trabajo mostró que las técnicas



moleculares aportan resultados que complementan el diagnóstico de estas bacterias por métodos serológicos.

Verkooyen et al. (1998) en su trabajo evalúa los métodos de diagnóstico de *Chlamydomphila pneumoniae* tanto serológicos, moleculares y cultivo donde sus resultados de PCR tenían concordancia con los resultados de cultivo, pero carecía de esta comparándola con métodos serológicos, en donde de 23 pacientes con serología positiva solo 9 mostraban un PCR positivo mientras que 22 pacientes tuvieron una reacción de PCR positiva sin una serología compatible. Estos resultados sugieren el comportamiento similar entre *C. pneumoniae* y *M. pneumoniae* en cuanto al diagnóstico molecular y serológico, mostrando la importancia de la implementación de la técnica de PCR para ambos organismos.

Continuando con la búsqueda de métodos de detección de *M. pneumoniae*, el trabajo de Templeton et al. (2003) desarrolló una técnica de PCR y NASBA en tiempo real, que fueron comparados con aglutinación de partículas, fijación de complemento y el PCR convencional, donde el PCR convencional mostro 100% de sensibilidad y especificidad, contrastando con los métodos serológicos que muestran 100% de especificidad, pero solo entre 50 y 75% de sensibilidad. La técnica de PCR convencional se muestra como la técnica base para el posterior desarrollo de técnicas moleculares avanzadas, por lo que el objetivo de este trabajo es estandarizar un PCR convencional.



El trabajo de Campbell et al. (1992) buscó estandarizar una técnica de PCR convencional para detectar *Chlamydomphila pneumoniae*, en el cual empleó iniciadores dirigidos a un fragmento de PstI (Endonucleasa de restricción) donde calibró los parámetros de la reacción de PCR demostrando ser altamente específico logrando un grado de sensibilidad mayor al del aislamiento en cultivo. El autor resalta la importancia del PCR cuando los pacientes inician un tratamiento antibiótico o que desarrollan anticuerpos contra la infección, disminuyendo la viabilidad de las bacterias, lo que causa que el cultivo se dificulte mientras que el PCR no se ve afectado. La optimización de los parámetros para el PCR convencional se realizó tomando en cuenta las condiciones que el autor consideró importantes como concentración de iniciadores, de MgCl₂ y la temperatura de anillamiento.

Aun en la búsqueda de técnicas de detección de *C. pneumoniae*, Fukano et al. (2004) comparó técnicas: 2 ensayos de PCR con iniciadores dirigidos a gen rRNA 16S y Pst-I, 2 ensayos de PCR anidado con iniciadores dirigidos al gen ompA y el fragmento del gen clonado de 53 kDa, y un ensayo de PCR touchdown con iniciadores dirigidos al gen rRNA 16S. Los resultados mostraron mayor sensibilidad al PCR anidado, detectando hasta 1 cuerpo elemental mientras que los tradicionales detectaron hasta 10. Los genes a los cuales se dirijan los iniciadores no mostraron diferencias, sugiriendo que todos pueden ser empleados para posteriores ensayos moleculares para la detección de este agente.



El trabajo de Khanna et al. (2005) buscó solucionar el problema del PCR tradicional diseñando un PCR multiplex en tiempo real para la detección de 6 patógenos respiratorios entre estos *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*, en estas bacterias los iniciadores fueron dirigidos a los genes rRNA16S y de la proteína de la membrana externa (omp) respectivamente. Los resultados mostraron una sensibilidad y especificidad clínicas de 79-100%/91-99% para *M. pneumoniae* y de 82-100%/95-100% para *C. pneumoniae*. Se emplearon los primers descritos en este trabajo con la posibilidad de implementar una técnica de PCR dúplex para ambas bacterias.

De manera similar el trabajo de Morozumi et. al. (2006) diseñó un PCR multiplex en tiempo real para detectar 6 patógenos, entre estos *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*, cuyos iniciadores tenían como blanco el gen rRNA 16S. La sensibilidad y la especificidad de la prueba de PCR para *M. pneumoniae* comparado con el cultivo fue de 100 y 95.4% respectivamente. No se pudo determinar para *C. pneumoniae* por que los 6 casos clínicos empleados dieron positivo por PCR y por serología. El PCR multiplex en tiempo real demostró tener límites de detección de 5 copias para *M. pneumoniae* y 3 copias para *C. pneumoniae* por cada 50µL de reacción. Se emplearon los iniciadores descritos en este trabajo por los límites de detección observados como también con la posibilidad de emplearlos en un ensayo dúplex.



3. Objetivos

i. Objetivo General

Estandarizar la técnica de PCR para la detección de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* en el Instituto Nacional de Salud.

ii. Objetivos Específicos

- Seleccionar el método de extracción que permita obtener mayores concentraciones de ADN.
- Establecer las condiciones de ciclaje y la concentración de los reactivos de la técnica de PCR para detección de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*.
- Determinar el límite de detección de la técnica de PCR para detección de *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae*.



4. Justificación

Las neumonías adquiridas en la comunidad son un importante y frecuente problema de salud a nivel mundial con altos índices de mortalidad y morbilidad, el tratamiento de los pacientes con neumonía es empírico, basándose únicamente en las manifestaciones clínicas y la severidad de los síntomas sin tomar en cuenta el tipo de patógeno que ocasiona la infección. Sin embargo se resalta que se debe tratar de determinar la etiología a pesar de las dificultades del diagnóstico, por la repercusión que tendrá en la selección y adaptación del tratamiento (Taboada, 2015).

Debido a la gran cantidad de patógenos asociados, la identificación del agente causal sería de utilidad al momento de orientar el tratamiento, disminuyendo el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro, evitando generar algún tipo de resistencia futura en otros microorganismos presentes y estableciendo datos epidemiológicos de los principales causantes de este tipo de neumonías, datos que se utilizarán para establecer las condiciones epidemiológicas de estos agentes (Báez, 2013).

En las neumonías adquiridas en la comunidad, la identificación del agente es crucial para establecer un tratamiento químico específico, lo cual no es un problema cuando tratamos con bacterias típicas como *Streptococcus pneumoniae* o *Haemophilus influenzae* que están entre los principales responsables de esta infección. Sin embargo, se han visto también implicadas



en las neumonías bacterias atípicas como *Mycoplasma*, *Chlamydothila* y *Legionella*, etiologías para las cuales los métodos de diagnóstico no son muy eficientes debido al difícil cultivo en líneas celulares especiales y el tiempo de desarrollo hasta una identificación microbiológica (Berebichez, 2015).

En base a las dificultades encontradas en cuanto al diagnóstico de los agentes causales de neumonías por métodos tradicionales con baja rentabilidad, la necesaria obtención de muestras de calidad, el amplio grupo de agentes etiológicos posibles y la importancia de un diagnóstico rápido y específico, surge la necesidad de establecer un método que sea capaz de detectar específicamente una o más etiologías de manera simultánea, por lo que se han desarrollado técnicas de amplificación en cadena de la polimerasa para la identificación de material genético específico de estas bacterias que permiten la detección del agente de forma rápida y sensible, especialmente para los difíciles de cultivar. Estas técnicas han demostrado una importante superioridad diagnóstica para estas bacterias en muestras de aspirado nasofaríngeo (Menéndez, 2010).

El estudio de la etiología local de las neumonías adquiridas en comunidades es importante para establecer índices epidemiológicos, y con estas bases elaborar o adaptar guías en base a los principales microorganismos asociados a esta infección, a la variación de la susceptibilidad al tratamiento con antibióticos y al manejo de recursos a nivel de la localidad (Taboada, 2015).



II. MARCO TEÓRICO

1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Polimerase Chain Reaction) es una técnica de biología molecular, probablemente la más importante y revolucionaria, con una aplicación en infinidad de campos y con distintos fines, en este caso para el diagnóstico molecular de patógenos.

Es una reacción enzimática *in vitro*, en la cual con la enzima DNA polimerasa se sintetizan múltiples copias de un segmento de DNA determinado por los cebadores (Secuencias pequeñas de DNA) que generalmente son 2, a partir de desoxirribonucleótidos trifosfato mediante ciclos de calentamiento a distintas temperaturas. El desarrollo de esta técnica permitió estudiar y entender de una manera amplia el DNA. Esta técnica ha mostrado tener muy altos grados de sensibilidad debido a la amplificación exponencial de la secuencia blanco como también ha mostrado ser muy específica dependiendo del diseño de los iniciadores (Tamay, 2013; Leptospirosis, 2012).

Las aplicaciones de la PCR y de sus numerosas variantes son prácticamente ilimitadas e incluyen:

- Secuenciación directa de genes
- Detección de mutaciones



- Seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades
- Diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas
- Ciencia forense: identificación de restos biológicos, determinación de paternidad, pruebas periciales en criminalística.
- En arqueología y paleontología.

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica biotecnológica muy útil para el diagnóstico de bacterias o virus de difícil cultivo (Cortazar & Silva, 2004).

El segmento de ADN que sirve de molde no requiere de un proceso de purificación previo pues la técnica de PCR tiene la capacidad de amplificar un pequeño segmento de DNA en mezclas complejas de material genético. La técnica permite la amplificación selectiva de cualquier segmento de ADN siempre y cuando se diseñe para tal. En palabras simples es una técnica que consigue “encontrar una aguja en un pajar”, y por si fuera poco simultáneamente produce un pajar de agujas por amplificación selectiva.

El proceso de PCR puede resumirse en 3 etapas (Anexos: Figura 1): Comienza con una cadena doble de DNA cerrada. En la primera etapa, la doble cadena se abrirá por un calentamiento a alta temperatura dejando 2 cadenas de hebra simple. En la segunda etapa, los cebadores (Primers) se unirán específicamente a las cadenas de DNA de hebra simple, esto se da por la disminución de la temperatura hasta el T_m (Temperatura de melting). En la tercera etapa, la polimerasa actúa sintetizando la cadena a partir de los cebadores. Estos pasos



se repiten indefinidamente con una replicación exponencial del fragmento de interés (Coen, 2011).

Cada etapa de la PCR está determinada por una temperatura diferente determinada por las características de la encima y de los primers empleados en tal proceso. En teoría un proceso de PCR permite generar en 30 ciclos de amplificación más de dos billones de copias de ADN a partir de una sola molécula, demostrando así su alto grado de sensibilidad (Días, 2008).

Componentes de la reacción en cadena de la polimerasa.

Con el pasar del tiempo los estudios en el campo de la PCR han demostrado que su especificidad, rendimiento y fidelidad está influenciada por cada componente de la técnica: la mezcla de reacción, los parámetros del ciclaje y la enzima.

Iniciadores: Son secuencias cortas de DNA que delimitan la zona dentro del blanco que se va a amplificar y son el componente cuyas características repercuten en mayor grado en la reacción del PCR, también son llamados oligonucleótidos, primers o iniciadores. Los primers tienen diferentes características que deben ser tomadas en cuenta durante su diseño para que puedan cumplir con el objetivo para el cual se prepara la reacción, estas características son: longitud, temperatura de fusión, contenido de GC y la complementariedad. Durante el diseño del primer lo primero que se busca es que la secuencia sea idéntica a la región que se busca amplificar y que las



últimas bases en el extremo 3 sean G o C pues esto le aporta estabilidad al punto de inicio de la extensión durante la amplificación del producto (Sánchez, 2014; Rodríguez & Barrena, 2004).

La longitud que tienen los iniciadores es generalmente de entre 18 y 30 pares de bases, aunque lo recomendable es de 20 y 25 pares de bases. El largo de la secuencia le aporta especificidad a la reacción por lo que secuencias cortas disminuyen la especificidad y secuencias largas la aumentan. El aumento del tamaño del iniciador hace más complicado su diseño. Durante el diseño de los cebadores es imprescindible manejar la homología de las bases nitrogenadas dentro del primer, evitando la formación de estructuras parciales de doble cadena o de dímeros de primer, estos acontecimientos que resultan en una PCR de bajo rendimiento. La formación de estructuras parciales de doble cadena interfiere durante la hibridación y cuando existe complementariedad en el extremo 3 entre primers se generan dímeros de primer donde el primer funciona como secuencia blanco, disminuyendo la concentración de primer y de dNTPs para el DNA blanco (Cortazar & Silva, 2004, Rodríguez & Barrena, 2004).

El contenido de GC influye en la hibridación, mayor contenido de GC se formara una unión más sólida al DNA blanco permitiendo el inicio de la amplificación por lo que es recomendable este se encuentre cercano al 60% aunque el rango permisible es de 40 al 75%. A lo largo de la secuencia se deben evitar las regiones de poliX, las regiones poli G o poli C vuelven la hibridación menos específica y las regiones de poliA o poliT disminuyen la fuerza del complejo en



la hibridación al blanco, disminuyendo el rendimiento de la reacción (Cortazar & Silva, 2004).

La longitud y la composición de los primers determinan la temperatura de fusión (T_m) que se define como la temperatura a la cual el 50% de las moléculas se hibridan a los sitios complementarios; a partir de esta temperatura se puede determinar la temperatura de hibridación para la reacción de PCR. Las temperaturas de fusión de ambos primers deberían ser similares o dificultará establecer una temperatura de hibridación, generalmente oscilan entre 45 y 65°C (Asuar, 2007; Cortazar & Silva, 2004, Mas, 2016).

La concentración adecuada de los primers para la reacción de PCR se encuentra entre 0.1 a 0.5 μ M, experimentalmente se ha observado que concentraciones superiores a 0.5 μ M promueven la formación de dímeros de primers y la amplificación inespecífica. Por otro lado concentraciones menores a 0.1 μ M puede generar la falta de primers antes de cumplir con los ciclos que se establecieron (Cortazar & Silva, 2004; Díaz, 2008).

Polimerasa: La polimerasa es la enzima encargada de la replicación del DNA durante el PCR, en los inicios de la técnica se empleaba la DNA polimerasa aislada de la bacteria *Escherichia coli* sin embargo era necesario agregar nueva enzima después de cada calentamiento, lo cual se solucionó con el aislamiento de polimerasas termoestables y termoactivas a partir de bacterias de ambientes extremos. La primera polimerasa termoestable fue aislada a partir de una



bacteria que vive en ambientes de temperatura cercanas a 100°C llamada *Thermus aquaticus*, de la cual recibió el nombre de Taq Polimerasa, volviéndose prontamente la enzima más usada para esta reacción (Díaz, 2008).

Las temperaturas optimas de catálisis de la Taq polimerasa se hayan alrededor de los 72°C, con una progresividad aproximada de 100 nucleótidos por segundo, es importante destacar que no poseen actividad exonucleasa 3'-5'. La actividad exonucleasa 3'-5' es una característica de algunas enzimas de corregir posibles errores durante la extensión, por lo que las que tienen esta capacidad son denominadas de alta fidelidad. La concentración recomendada se encuentra entre 1 y 2.5U por 100 µL de reacción, el exceso de enzima puede generar productos inespecíficos y bajas concentraciones generan una reacción incompleta (Rodríguez & Barrena, 2004; Mas, 2016; Cortazar & Silva, 2004).

Iones: El ion magnesio es un cofactor esencial para la DNA polimerasa y por lo tanto su concentración influye de manera crítica en la reacción, se recomienda que la concentración se optimice para cada reacción. La concentración en la que se usa oscila entre 0.5 y 2.5mM, el exceso de magnesio da como resultado amplificaciones inespecíficas mientras que concentraciones bajan causan el bajo rendimiento de la amplificación. El magnesio se suele usar como Mg⁺² agregándose en forma de MgCl₂ y en una concentración mayor a la de los dNTP, pues estos tienen afinidad por el magnesio compitiendo con la enzima y disminuyendo el rendimiento (Sánchez, 2014; Díaz, 2008). El ion potasio influye



en la denaturación de las hebras de DNA y viene unido a otros iones (KCl), generalmente se encuentra en la solución tampón (Sánchez, 2014, Mas, 2016).

Solución tampón: Es el componente que se encarga de dar la fuerza iónica y mantiene el pH adecuado durante la reacción. Generalmente contiene entre 10 y 50mM de Tris-HCl cuyo pH es de 8.4 a temperatura ambiental y varía entre 7.8 y 6.8 durante las condiciones de temperatura de la reacción. Las sales que contiene el buffer son KCl y MgCl₂ a concentraciones cercanas a 50mM y 1.5mM respectivamente, concentraciones superiores pueden inhibir la actividad de la Taq polimerasa. La gelatina o albumina bovina a concentraciones de 100 y algunos detergentes no iónicos son incluidos para estabilizar la enzima. Algunos autores recomiendan la inclusión de adyuvantes para el incremento de la especificidad y fidelidad; entre ellos el dimetilsulfóxido (DMSO) que disminuye la formación de estructuras secundarias (Mas, 2016; Sánchez, 2014; Cortazar & Silva, 2004).

Desoxirribonucleótidos Trifosfatados (dNTPs): Los dNTPs son las unidades que se ensamblan para durante la síntesis de nuevas cadenas de DNA, son 4 dependiendo de la base nitrogenada que posean (dATP, dGTP, dCTP, dTTP). La concentración de los dNTP puede afectar la fidelidad de la amplificación como también su especificidad. Es importante que los 4 dNTP se encuentren en concentraciones iguales, pues el desbalance en alguno de los 4 disminuye la fidelidad de la amplificación, se ha observado que a concentraciones muy altas disminuyen la actividad de la enzima pudiendo llegar a inhibirla, al poder captar



iones de Mg^{+2} , por lo que es recomendable que la concentración de dNTP sea de 0.5 o 1mM menos que la concentración de Mg^{+2} , las concentraciones a las cuales generalmente se trabajan los dNTPs es de 0.2 a 1mM (Mas 2016, Díaz 2008, Rodríguez & Barrena, 2004).

Los dNTPs tienen un alto grado de estabilidad pues se indica que hasta luego de 50 ciclos de amplificación el 50% permanece como dNTP; sin embargo, se resalta la importancia de la solución tampón pues si el pH se acidifica promueve la hidrólisis de los dNTP volviéndolos dNDP o dNMP (Cortazar & Silva, 2004).

Agua de grado molecular: El agua es el solvente de todos los reactivos y se requiere que sea al menos agua destilada, sin embargo se recomienda que sea desionizada o de grado molecular, y en caso de mejorar el rendimiento se usa agua libre de nucleasas, purificada por luz UV, ozono o dietilpirocarbonato (para la inactivación de las nucleasas) (Sánchez, 2014).

DNA molde: Es el DNA a partir de la cual mediante la reacción se generaran millones de copias de un fragmento que contiene, la cantidad necesaria para que la reacción de amplificación se efectuó de manera correcta puede variar en base su procedencia, desde 1ng en DNA clonado a 20 o 50ng en DNA de células eucariotas o muestras clínicas. Existen muchos protocolos de extracción dependiendo del tipo de muestra clínica que se obtenga, a pesar de que no es necesario la purificación es lo que comúnmente se realiza. Es importante cuidar la presencia de inhibidores enzimáticos especialmente dentro de muestras



obtenidas de sangre o heces, como también mantener la integridad del DNA (Sánchez, 2014; Mas, 2016).

Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

La reacción del PCR se realiza en 3 etapas (Anexos: Figura 3) diferenciadas por la temperatura, la desnaturalización, el anillamiento y la extensión, estas etapas corresponden a un ciclo que se repite un número determinado de veces. Los parámetros de temperatura, tiempo y número de ciclos son fundamentales en el desarrollo de la reacción por lo que deben ser optimizados experimentalmente.

Desnaturalización: Es la primera etapa de la reacción donde el DNA molde que se encuentra en doble cadena se desdoblara para permitir la exposición de las cadenas a los iniciadores. La desnaturalización se realiza normalmente a temperaturas altas desde 94°C donde por la temperatura se rompen los puentes de hidrogeno con un tiempo promedio que va de 30s a 1min, algunos protocolos usan temperaturas superiores pero hay que tener en cuenta que la actividad de la enzima puede disminuir. Se ha determinado la vida media de la enzima a 95°C es de 40min por lo que es recomendable que a esta temperatura se disminuya el tiempo de incubación (Sánchez, 2014; Mas, 2016).

En los protocolos es normal que se aplique una desnaturalización inicial en un tiempo prolongado, esto se realiza para asegurar que la separación de las hebras se de en todo el DNA blanco. Se recomienda aumentar el tiempo de incubación



o la temperatura en casos en los cuales se conoce que el DNA blanco tiene un alto contenido de guaninas y citosinas (Díaz, 2008; Mas, 2016).

Alineamiento o Hibridación: En esta etapa los iniciadores se unen de manera específica al DNA blanco, es necesario que la temperatura de hibridación sea la adecuada para que se forme el complejo Iniciador-DNA. La temperatura de hibridación depende de 3 factores relacionados con los iniciadores: la composición, el tamaño y la concentración (Tamay, 2013). La hibridación del primer se produce a una temperatura que oscila entre 40 y 70°C, aunque es recomendable que se encuentren entre 50 y 65°C. La temperatura de fusión es crítica en la amplificación, las temperaturas bajas podrían generar amplicones inespecíficos mientras que temperaturas muy altas pueden evitar la hibridación. La temperatura de hibridación puede ser calculada hallando la temperatura de fusión de los iniciadores con distintos métodos y disminuir 5 grados al de menor temperatura de fusión, sin embargo la única forma de conocer la temperatura óptima es experimentalmente (Mas, 2016; Sánchez, 2014; Asuar, 2007).

Extensión: La tercera etapa de la reacción es en la cual la polimerasa actúa sintetizando la nueva cadena de DNA a partir del extremo 3', esta etapa en la mayoría de las reacciones se realiza a 72°C porque es la condición a la cual la enzima Taq polimerasa alcanza su mayor rendimiento. El tiempo de esta etapa depende de la longitud del amplicón, donde se estima un tiempo de 1min para la síntesis de una cadena de 1Kb. Al finalizar los ciclos de amplificación se agrega comúnmente una fase de extensión final con un tiempo prolongado



generalmente de 5min con la finalidad de que los fragmentos estén completos al finalizar la reacción (Díaz, 2008; Cortazar & Silva, 2004).

Mycoplasma pneumoniae.

Mycoplasma pneumoniae es un patógeno humano de distribución mundial que se caracteriza por carecer de pared celular, es causante común de diversas infecciones en el tracto respiratorio, incluyendo neumonía adquirida en la comunidad, y es patógeno principal de neumonía atípica primaria (Cardinale 2012, Narita, 2009). Se aisló por primera vez en 1944 del esputo de un paciente con neumonía atípica primaria por Eaton et al en 1944, siendo denominado agente de Eaton y demostrando que causaba infecciones respiratorias en humanos, posteriormente en 1960 se demostró que se trataba de una bacteria y no de un virus (Waites 2004, Atkinson 2008).

Los mycoplasmas son considerados los organismos de menor tamaño capaces de existir en vida libre, dentro de este grupo se han identificado más de 200 especies de las cuales solo algunas han mostrado ser de importancia para el humano como patógenos, de los cuales *Mycoplasma pneumoniae* ha sido el más estudiado (Atkinson 2008). El género *Mycoplasma* se encuentra clasificado dentro de la familia Mycoplasmataceae en el orden Mycoplasmatales en la clase Mollicutes, los organismos dentro de esta clase se caracterizan por sus pequeños genomas, el bajo porcentaje de GC y la ausencia de pared celular (Waites 2004).



El genoma *Mycoplasma pneumoniae* ha sido totalmente secuenciado midiendo alrededor de 816 kpb teniendo 687 genes, un genoma que tiene una relación de 1 a 5 en tamaño y de 1 a 6 en número de genes, con respecto a *E. coli*. El tamaño del genoma de las especies de *Mycoplasma* se cree que debido a una reducción gradual del genoma de un ancestro gram positivo (Waines 2004, Daxboek 2003).

El no poseer una pared celular le ha dado a *Mycoplasma pneumoniae* ciertas características: ausencia de coloración con la tinción de Gram, la resistencia a los antibióticos Betalactámicos y la sensibilidad a variación de las condiciones físicas (Temperatura, pH, Tensión osmótica) (Andreu, 2005).

El diagnóstico microbiológico por cultivo es caro, lento, laborioso y poco sensible por lo que no es una técnica que pueda ser desarrollada en laboratorios de diagnóstico clínico (Andreu 2005). Es una bacteria muy exigente para ser cultivada, el medio de cultivo contiene caldo infusión cerebro corazón, peptona, extracto de levadura, suero (bovino fetal o de caballo), aminoácidos, antibióticos, glucosa y rojo fenol como indicador del pH. Requiere de un medio enriquecido con esteroides, precursores de aminoácidos y nucleótidos preformados debido a su escasa maquinaria celular como todos los mycoplasmas (Waines 2004). El tiempo del aislamiento es irregular pues puede ser dentro de días o llegar hasta 3 semanas (Alkinson 2008). Luego del aislamiento es necesario realizar pruebas de identificación debido a la presencia de otras especies comensales del mismo género (Andreu 2005), para evitar el desarrollo de otros organismos es necesario



agregar al medio antibióticos betalactámicos de amplio espectro y anti fúngicos (Daxboek 2003).

El diagnóstico radiológico no es muy específico pues la presentación de la neumonía primaria atípica es variable y puede mostrar signos similares a los causados por otros patógenos, la respuesta inflamatoria causa inflamación mononuclear en los pulmones que se observan como infiltrados reticulares en las zonas perihiliares o lóbulos inferiores (Waites 2004). En la actualidad, se han implementado técnicas de diagnóstico molecular en donde el PCR en tiempo real ha mostrado ciertas ventajas en comparación con el convencional entre estas el tiempo de respuesta menor y una menor manipulación del producto de PCR, también se ha observado que el PCR en tiempo real puede detectar diseminación sistémica de la infección en el suero, algo que no puede detectar el PCR convencional (Atkinson 2008).

El diagnóstico serológico ha sido el más común método de diagnóstico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*, en donde la confirmación del aumento del título 4 veces entre una muestra obtenida en fase aguda y convaleciente sigue considerándose el "Gold Standard". Por lo que aún para los métodos de diagnóstico por cultivo o PCR son difíciles de considerar sin una comprobación de la seroconversión. Las pruebas serológicas parecen mostrar una alta sensibilidad detectando anticuerpos específicos, sumándole que pueden automatizarse y emite resultados de manera rápida, cabe resaltar que es



necesario obtener una muestra en el periodo de convalecencia (Andreu 2005, Atkinson 2008).

Se ha visto que los resultados de PCR, cultivo y serología no siempre son coincidentes, las técnicas moleculares demuestran una mayor sensibilidad a los demás métodos durante la infección aguda, sin embargo resultados de PCR positivos acompañados de un cultivo negativo sugieren la falta de especificidad del método, persistencia de la bacteria posterior a la infección o ausencia de organismos cultivables, también se ha visto que resultados moleculares positivos acompañados de resultados serológicos negativos podrían deberse a respuesta inmune inadecuada del paciente, tratamiento antibiótico o fallas en el momento de la toma de muestra. Los resultados de PCR negativos con una infección comprobada pueden asociarse a inhibidores en las muestras o por la administración de antibióticos (Atkinson 2008).

Chlamydomphila pneumoniae.

Chlamydomphila pneumoniae es una bacteria intracelular obligada de ciclo difásico altamente prevalente conocida por ser un patógeno humano que causa infecciones respiratorias incluyendo neumonía, bronquitis, sinusitis y faringitis. Adicionalmente a su rol como patógeno, se debate su importancia como un copatogeno, siendo identificado en infecciones mixtas promoviendo la superinfección en células epiteliales bronquiales por otros agentes (Villegas 2008, Ewig 2003).



En el año 1965 fue aislado por primera vez de un niño en Taiwan y en el año 1983 fue aislado por segunda vez de un estudiante de Washington, siendo el nombre de la cepa TWAR. Más tarde en 1989, esta cepa fue designada como una nueva especie *Chlamydophila pneumoniae* (Hanh 2002). Se encuentra dentro de la clase Chlamydiae en el orden Chlamydiales, en la familia Chlamydiaceae; esta familia contenía solo al género Chlamydia con 4 especies: *C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae* y *C. pecorum*; sin embargo, luego de análisis a nivel molecular de los genes 16S y 23S se observaron diferencias entre *C. trachomatis* y el grupo de *C. psittaci* y *C. pneumoniae*, por lo que se dividieron en 2 géneros: Chlamydia y Chlamydophila siendo agrupados en este último grupo (Villegas 2008).

Su ciclo celular consta de 2 fases, una fase extracelular infecciosa (Cuerpo elemental) y otra intracelular replicativa (Cuerpo reticular) las cuales se influyen con el diagnóstico de la infección, el curso clínico de la enfermedad y la terapia con antibióticos. Se replica por fisión binaria, contienen DNA, RNA y algunas proteínas, no pueden sintetizar ATP ni GTP (Burillo 2010).

Esta bacteria es transmitida de humano a humano a través de los aerosoles e inicia la infección en las células epiteliales de los pulmones, aunque también pueden infectar macrófagos alveolares. Los cuerpos elementales son la forma infecciosa de este patógeno careciendo de actividad metabólica, se unen a las



células hospedadoras siendo fagocitados, dentro del fagosoma se replica usando las reservas energéticas de la célula (Hahn 2002).

El diagnóstico de la infección de *Chlamydomphila pneumoniae*, debido a los escasos de métodos estandarizados y disponibles en el mercado es aún difícil, sin embargo, hay metodologías que nos brindan un diagnóstico confiable como el cultivo, la serología, la detección de antígenos y pruebas moleculares. El diagnóstico de esta infección debe de implicar distintas técnicas o no sería válido, incluso es necesario 2 pruebas en distintos tiempos para poder diferenciar la infección aguda de la crónica (Blasi 2009, Hanh 2002).

Los métodos utilizados para detectar una infección aguda se basan generalmente en la demostración de un aumento de al menos 4 veces el título de anticuerpos IgM o IgG (Seroconversión), se debe tener en cuenta que los niveles de anticuerpos IgM se elevan entre 2 o 3 semanas luego de la infección por lo que muestras obtenidas muy temprano podrían dar resultados negativos (Burillo 2010).

La infección primaria por *C. pneumoniae* no siempre induce una inmunidad en el organismo, por lo que las reinfecciones son comunes, por otro lado, en pacientes con infecciones pasadas, hay casos en los cuales la infección no genera anticuerpos IgM, pero los anticuerpos IgG se elevan de manera temprana (Blasi 2009). El cultivo es el estándar de referencia para el diagnóstico de este patógeno, la muestra debe ser correctamente tomada, el objetivo del muestreo



son aquellas células hospedadoras mediante un hisopado nasofaríngeo, y mantenerse en medios de transporte especializados a bajas temperaturas. El cultivo se realiza en células propagadas en laboratorio, se ha observado que en las líneas HI y Hep-2 dan mejores resultados, siendo la última el método de referencia del cultivo celular (Blasi 2009, Burillo 2010).

La reacción en cadena de la polimerasa ha mostrado ventajas en la detección de esta infección, se ha probado la detección con muestras respiratorias, de pulmón, biopsias vasculares y de sangre mostrando resultados adecuados. Diversos estudios han colocado al PCR como una técnica aún más sensible que el aislamiento, siendo el PCR en tiempo real el que más ventajas aporta. El principal obstáculo de estas técnicas es la falta de estandarización desde la extracción del DNA hasta el proceso y la escasez de pruebas comerciales disponibles (Blasi 2009).



III. MÉTODO

1. Tipo de investigación

Este trabajo es una investigación de corte descriptivo sobre el proceso de optimización de las condiciones relevantes en el desarrollo de la técnica de PCR con fines de diagnóstico clínico.

2. Ámbito temporal y espacial

Este trabajo se desarrolló desde el mes de octubre del año 2017 hasta octubre del año 2018 en las instalaciones del laboratorio de referencia nacional de Sarampión y Rubeola en el Instituto Nacional de Salud.

3. Variables

Variable dependiente:

Detección de *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* utilizando PCR

Variables independientes:

Concentración de primers: medido en nanomolar (nM)

Concentración de MgCl₂: medido en milimolar (mM)

Temperatura de anillamiento: medido en grados Celsius (°C)

Tiempo de anillamiento: medido en segundos (s)

Tipo de primers: según el autor que los diseñó (Morozumi y Khanna)



4. Población y muestra

Los ensayos de optimización de condiciones requirieron el uso de material genético de referencia certificado de las bacterias *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydomphila pneumoniae* (AMPLIRUN, Vircell, España). Este material es DNA de las bacterias purificado a una concentración de 14000 y 16000c/μL respectivamente, a partir del cual se prepararon diluciones.

Los iniciadores empleados fueron obtenidos de trabajos realizados previamente descritos en Tokio (Morozumi) y Wisconsin (Khana). Los iniciadores de Morozumi (Morozumi 2006) fueron diseñados para amplificar un producto dentro del gen 16S rRNA para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*. Los iniciadores de Khana (Khanna 2005) fueron diseñados para amplificar un producto dentro del gen 16S rRNA para *M. pneumoniae* y dentro del gen que codifica la proteína principal de la membrana externa para *C. pneumoniae*. Los primers fueron sintetizados por la empresa Eurofins Scientific (Luxemburgo) brindándonos las características de su composición (Tabla 2).

En ensayo de especificidad se empleó el DNA de cepas de bacterias comúnmente halladas en el tracto respiratorio previamente identificadas por técnicas microbiológicas y moleculares. Las cepas utilizadas fueron *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella holmensis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus equi sub equi*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus*



pneumoniae, *Legionella pneumophila*, *Chlamydomphila pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae*. Estas cepas fueron cedidas por el laboratorio de Infecciones Respiratorias Agudas del INS.

Las muestras biológicas empleadas en los ensayos en muestras clínicas fueron 40 hisopados nasofaríngeos de pacientes diagnosticados clínicamente con neumonía durante el año 2015, almacenadas en el laboratorio de Sarampión y Rubeola. Estas muestras se mantuvieron congeladas a -70°C , se descongelaron a 5°C para la extracción de material genético y se almacenaron a -20°C hasta su análisis por PCR. Para los ensayos de extracción se seleccionaron 20 muestras que contenían mayor volumen.

5. Instrumentos

- Agitador de Tubos.
- Espectrofotómetro UV.
- Cámara electroforética.
- Fuente de Poder.
- Cámara de flujo laminar.
- Termociclador.
- Micropipeta de 0.5-10 μL de capacidad.
- Micropipeta de 10-100 μL de capacidad
- Micropipeta de 100-1000 μL de capacidad



6. Procedimientos

Análisis de iniciadores

Los primers que se usaron en el proyecto inicialmente se probaron in silico para verificar las características óptimas de su diseño, para esto se usó la herramienta Primer Blast de la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) y la página web de In Silico PCR (<http://insilico.ehu.es/PCR/>). El análisis con el Primer Blast y con In Silico PCR se realizó dentro del género de cada bacteria analizada.

Extracción de ADN

Se tomaron 20 muestras de los hisopados nasofaríngeos anteriormente descritos. La concentración y calidad del DNA extraído se midió por espectrofotometría empleando un Nanodrop.

El proceso de extracción se realizó con los kit de extracción de DNA de las casas comerciales de Qiagen, InvitroGen y Fermentas, empleando el protocolo de extracción de DNA para muestras de hisopado nasofaríngeo del laboratorio de sarampión y rubeola (Anexo 1) con modificaciones señaladas en el protocolo.

Estandarización de condiciones y concentraciones

Se establecieron una serie de ensayos en duplicado para determinar los parámetros correctos (Tiempo y Temperatura) de la técnica de PCR a partir de los parámetros básicos determinados por el inserto de la enzima, las



características de los primers y la concentración inicial sugerida en protocolos de validación de técnicas moleculares (Tabla 3, Anexos).

De manera similar las condiciones de ciclaje se predeterminaron por las características especificadas en el inserto de la enzima y en el inserto de los primers (Tabla 4, Anexos). El mix de reacción empleado contiene KAPA Taq HotStart DNA Polymerase (1U por cada 25 μ L), dNTPs (0.2mM), MgCl₂ (3mM) y estabilizadores.

Hibridación: La determinación de la temperatura de hibridación se realizó mediante un PCR de gradiente en un termociclador, donde se programó un rango de temperaturas que fueron desde 50°C hasta 65°C en ensayos a concentraciones de controles de 10 y 100 copias/ μ L, la determinación de los tiempos se realizó por ensayos individuales donde se probaron 6 fragmentos de tiempo que fueron de 10, 20, 30, 40, 50 y 60s.

Concentración de iniciadores: La determinación de la concentración óptima de primers se realizó probando 5 concentraciones determinadas por los protocolos de PCR, indicando que la concentración adecuada se encuentra entre 0.1 y 1 μ M. Se probaron concentraciones empezando de 100nM hasta 500nM evaluando la calidad de los amplicones hasta ver formación de amplificación inespecífica.



Concentración de Magnesio: La determinación de la concentración óptima de Magnesio se realizó utilizando $MgCl_2$ a 25mM y adicionándolo al sistema logrando una concentración final de 3 hasta $7\mu M$.

Ensayos de Especificidad

El ensayo de especificidad de primers se realizó empleando el DNA de cepas de bacterias mencionadas anteriormente. El material genético de estas bacterias fue extraído, y seguidamente la concentración de DNA fue ajustada a $20\mu g/\mu L$ mediante dilución. El ensayo se realizó en duplicado incluyendo controles positivos y negativos.

Ensayos de Sensibilidad

Dentro de los ensayos de sensibilidad se buscó determinar el límite de detección y realizar una prueba de inhibición. La determinación del límite de detección se realizó empleando 5 diluciones seriadas al 10% a partir de los controles positivos (ver Población y Muestra) ajustadas a una concentración final de $1000c/\mu L$, esta prueba se realizó en duplicado y se incluyeron siempre controles negativos (agua ultrapura). En este ensayo se buscó determinar la concentración mínima de DNA positivo que puede ser detectado por la técnica. La prueba de inhibición se realizó preparando alícuotas de $10\mu L$ de muestras negativas y agregándole $10\mu L$ de control positivo a $50c/\mu L$ (Concentración final de $25c/\mu L$), realizándoles posteriormente la reacción de PCR (Clavijo, Tesis).



Ensayo en muestras clínicas

Con el PCR estandarizado se realizaron ensayos de diagnóstico en 40 muestras clínicas previamente descritas.

Electroforesis en agarosa

La electroforesis se realizó en cámaras horizontales, se prepararon geles al 2% con agarosa (Merk) y con buffer de corrida Tris Acetato EDTA (TAE) (Scharlau). Para sembrar las muestras se utilizó buffer DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Scientific) y un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Fermentas). Para el revelado se sumergió el gel en bromuro de etidio por 15-20min, luego se documentó en luz UV.

7. Análisis de Datos

La concentración del producto se determinó por medición de las bandas empleando el programa Imagen J (National Institute of Health, USA) y la herramienta de densitometría (Ferreira & Rasband, 2011) para análisis de las fotos obtenidas mediante el fotodocumentador. No se tomaron en cuenta unidades de densidad obtenidos en las fotos que no mostraron una banda, se seleccionó la banda que mostró menos formación de dímeros y mayor de concentración de producto expresado en unidades. Los datos obtenidos de la cuantificación fueron limpiados de datos negativos o inválidos. Se realizaron análisis estadísticos con el programa R de los datos obtenidos de la



cuantificación de DNA, donde se compararon los grupos de con el test de Willcoxon y se aplicó un ANOVA.



IV. Resultados

Análisis de Iniciadores

Primer Blast: Se observan productos de tamaños similares para las especies de *M. pneumoniae* y *M. genitalium* con los iniciadores MycKhaF y MycKhaR (Tabla 5) por otro lado los iniciadores MycMorzF y MycMorzR generan productos en especies dentro del género *Mycoplasma* (Tabla 6). Para *C. pneumoniae*, los iniciadores MycMorzF y MycMorzR muestran ser específicos (Tabla 7), mientras que los iniciadores ChIKhaF y ChIKhaR generan productos de 248pb en *C. pneumoniae* y de 3452pb en la especie *C. ibidis* usando (Tabla 8).

Tabla 5. (A) Características de los iniciadores: Longitud, Porcentaje de GC, Autocomplementariedad, Autocomplementariedad en 3'. (B) Productos generados por los iniciadores MycKhaF y MycKhaR con la herramienta NCBI PrimerBlast.

A)					
Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity	
22	53.85	36.36	6.00	0.00	
30	68.60	46.67	10.00	4.00	

B)					
Products on target templates					
> NC_000912.1 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 chromosome, complete genome					
product length = 241					
Forward primer	1		GTTATGGAAACATAATGGAGGT	22	
Template		119315		119336
Reverse primer	1		TACAAGCTGGCGACTGTTTGTATTGGCCAT	30	
Template		119555		119526
> NC_000908.2 <i>Mycoplasma genitalium</i> G37, complete genome					
product length = 241					
Forward primer	1		GTTATGGAAACATAATGGAGGT	22	
Template		171013		171034
Reverse primer	1		TACAAGCTGGCGACTGTTTGTATTGGCCAT	30	
Template		171253T.....T.....		171224



Tabla 6. (A) Características de los iniciadores: Longitud, Porcentaje de GC, Autocomplementariedad, Autocomplementariedad en 3'. (B) Productos generados con los primers MycMorzF y MycMorzR con la herramienta NCBI PrimerBlast (Abajo).

Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
21	54.29	42.86	5.00	2.00
21	54.60	42.86	6.00	4.00

A)

B) Products on target templates

>[NC_000912.1](#) Mycoplasma pneumoniae M129 chromosome, complete genome

product length = 225
 Forward primer 1 GTAATACTTTAGAGGCGAACG 21
 Template 118388 118408

Reverse primer 1 TACTTCTCAGCATAGCTACAC 21
 Template 118612 118592

>[NC_000908.2](#) Mycoplasma genitalium G37, complete genome

product length = 225
 Forward primer 1 GTAATACTTTAGAGGCGAACG 21
 Template 170086 .C..... 170106

Reverse primer 1 TACTTCTCAGCATAGCTACAC 21
 Template 170310 170290

>[NZ_JMKZ01000001.1](#) Mycoplasma pirum ATCC 25960 T397DRAFT_scaffold0000

product length = 225
 Forward primer 1 GTAATACTTTAGAGGCGAACG 21
 Template 42900 .C.....A..... 42880

Reverse primer 1 TACTTCTCAGCATAGCTACAC 21
 Template 42676 ...C.....A..... 42696

>[NZ_JAD101000016.1](#) Mycoplasma imitans ATCC 51306 P690DRAFT_scaffold0000

product length = 225
 Forward primer 1 GTAATACTTTAGAGGCGAACG 21
 Template 16461 .C.....A..... 16481

Reverse primer 1 TACTTCTCAGCATAGCTACAC 21
 Template 16685 ...C.....A..... 16665



Tabla 7. (A) Características de los iniciadores: Longitud, Porcentaje de GC, Autocomplementariedad, Autocomplementariedad en 3'. (B) Productos generados con los primers ChIKhaF y ChIKhaR con la herramienta NCBI PrimerBlast (Abajo).

Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
20	59.45	50.00	4.00	2.00
21	50.00	28.57	8.00	6.00

A)

B) Products on target templates
>[NC_000922.1](#) Chlamydophila pneumoniae CWL029 chromosome, complete genome

product length = 232
 Forward primer 1 AGGGCTATAAAGGCGTTGCT 20
 Template 780925 780944

Reverse primer 1 GTTAAGTTTAAACAGCTGTA 21
 Template 781156 781136

Tabla 8. (A) Características de los iniciadores: Longitud, Porcentaje de GC, Autocomplementariedad, Autocomplementariedad en 3'. (B) Productos generados con los primers ChIMorzF y ChIMorzR con la herramienta NCBI PrimerBlast (Abajo).

Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
21	53.60	38.10	6.00	4.00
21	54.06	42.86	6.00	6.00

A)

B) Products on target templates
>[NC_000922.1](#) Chlamydophila pneumoniae CWL029 chromosome, complete genome

product length = 248
 Forward primer 1 TGACAACTGTAGAAATACAGC 21
 Template 1001571 1001591

Reverse primer 1 CTGTACTAACCATTGTAGCAC 21
 Template 1001818 1001798

>[NZ_APJW01000003.1](#) Chlamydia ibidis 10-1398/6 ibis.contig.2, whole genome shotgun

product length = 3452
 Forward primer 1 TGACAACTGTAGAAATACAGC 21
 Template 248525TC...TT.....A 248505

Reverse primer 1 CTGTACTAACCATTGTAGCAC 21
 Template 245074GG..... 245094



InSilicoPCR: Los resultados de InSilicoPCR muestran en la figura 4 un producto de amplificación de 241bp específica para la especie *M. pneumoniae* dentro del RNA ribosomal 16S utilizando los primers MycKhaF y MycKhaR (Figura 4), como también en la figura 5 un producto de amplificación de 225bp en la misma región y especie, utilizando los primers MycMorzF y MycMorzR (Figura 5).

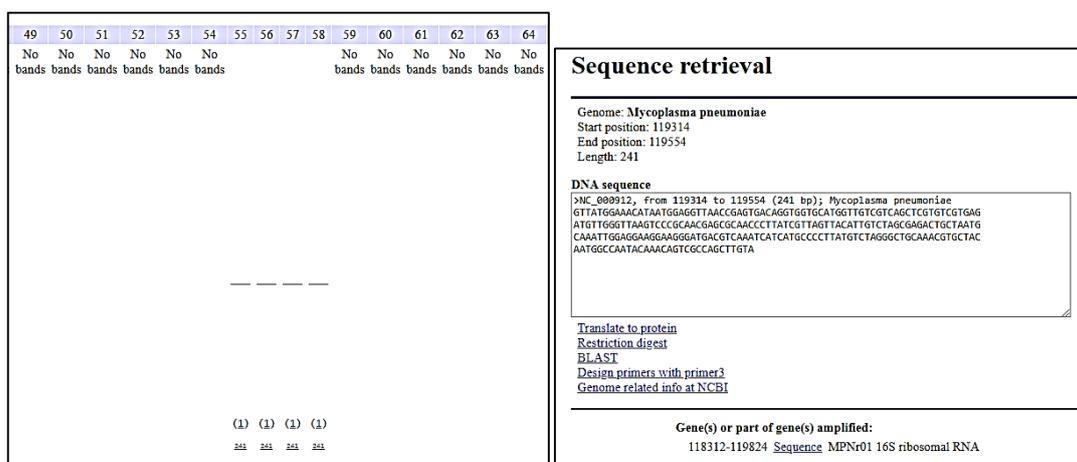


Figura 4. Productos de PCR obtenidos con la herramienta InSilicoPCR (Izquierda) de los primers MycKhaF y MycKhaR dentro del género *Mycoplasma* y detalles del producto (Derecha).

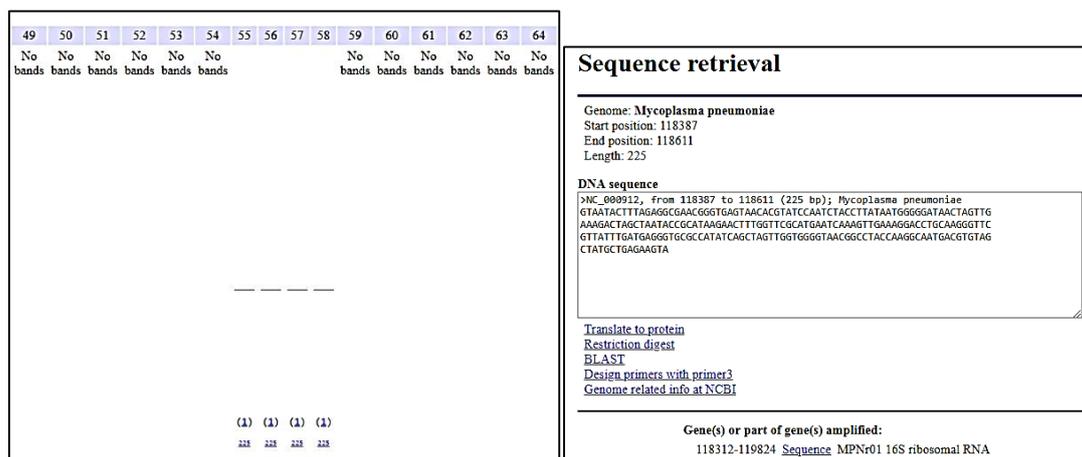


Figura 5. Productos de PCR obtenidos con la herramienta InSilicoPCR (Izquierda) de los primers MycMorzF y MycMorzR dentro del género *Mycoplasma* y detalles del producto (Derecha)

En la figura 6 la amplificación de un producto de 232pb específico para la especie *C. pneumoniae* para el gen de la proteína de membrana externa (omp) usando



los primers ChIKhaF y ChIKhaR (Figura 6). La Figura 7 muestra la generación de un fragmento amplificado de 248bp usando los primers ChIMorzF y ChIMorzR para el gen del RNA ribosomal 16S.

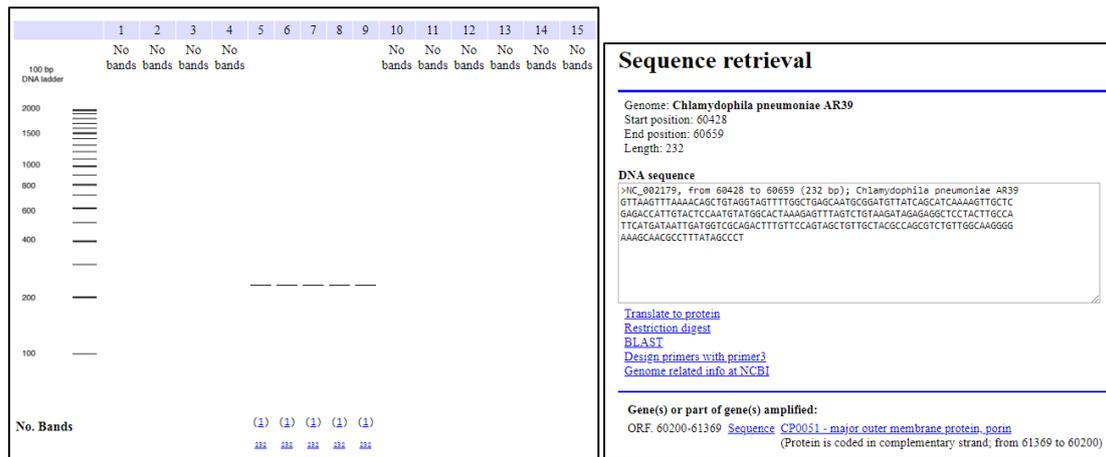


Figura 6. Productos de PCR obtenidos con la herramienta InSilicoPCR (Izquierda) de los primers ChIKhaF y ChIKhaR dentro del género *Chlamydomophila* y detalles del producto (Derecha).

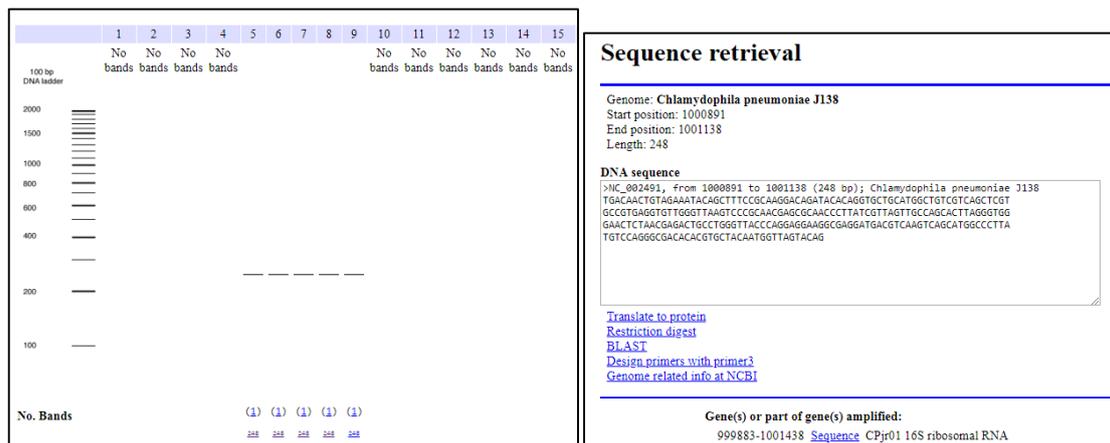


Figura 7. Productos de PCR obtenidos con la herramienta InSilicoPCR (Izquierda) de los primers ChIMorzF y ChIMorzR dentro del género *Chlamydomophila* y detalles del producto (Derecha).



Extracción de ADN

Se realizó la extracción del DNA de las muestras con 3 kits diferentes aplicando las modificaciones realizadas para el tipo de bacterias. Seguidamente al concluir el proceso de extracción se procedió a determinar la concentración del DNA y sus índices de pureza (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de cuantificación de concentración (ng/μL) y pureza hallados en las muestras empleadas en el ensayo de extracción.

Muestras	Qiagen			InvitroGen			Fermentas		
	Conc.	260/280	260/230	Conc.	260/280	260/230	Conc.	260/280	260/230
A04	6.11	1.7	3.89	2.538	1.351	0.909	16.24	1.768	1.306
A07	13.97	1.98	1.48	3.047	1.395	2.609	22.446	1.021	0.254
A12	6.5	1.88	-5.01	2.975	0.983	2.312	18.568	1.653	1.316
A29	6.59	1.45	2.44	1.74	1.36	1.619	9.005	1.676	1.455
A37	6.31	1.94	-5.43	-	-	-	11.461	1.792	1.198
A40	0.87	1.31	-0.21	0.204	0.444	0.16	2.965	1.415	1.871
A56	5.87	2.49	8.14	0.609	0.923	-0.197	13.102	1.804	2.031
A58	4.6	1.59	-4.18	-	-	-	7.314	1.92	1.516
R16	20.18	2.06	1.66	2.827	1.366	3.294	8.884	1.778	1.586
R30	28.2	1.93	2.07	3.527	1.628	-1.628	10.48	1.874	1.981
E13	17.53	1.88	2.14	2.639	2.6	2.6	6.801	1.763	1.155
E16	-	-	-	2.844	3.111	0.848	4.774	1.88	2.474
E19	5.08	2.49	-0.84	7.181	2.121	0.648	4.924	2.087	1.371
E99	3.2	2.54	1.73	6.754	1.692	0.504	4.093	1.481	5.714
E68	-	-	-	6.959	2.125	0.489	-	-	-
E108	-	-	-	11.145	2.057	0.626	4.192	1.864	3.417
E123	1.33	0.51	1.51	-	-	-	3.453	2.267	1.478
A48	1.82	1.11	-0.44	11.377	1.867	0.615	2.946	1.706	1.613
A61	9.38	1.84	2.33	3.735	2.643	9.25	9.085	1.837	3.462
R65	6.76	5.74	0.94	2.318	2.875	-1.045	7.356	1.78	5.615

Se hicieron lecturas por triplicado de la concentración de DNA de las muestras seleccionadas para determinar el mejor método de extracción (Tabla 10).



Tabla 10. Valores estadísticos de los grupos de extracción. Valor mínimo, Primer Cuantil, Mediana, Media, Tercer Cuantil y Valor Máximo.

		Conc.	260/280	260/230
Ext1	Min.	0.87	0.51	-5.43
	1st Qu.	4.6	1.59	-0.44
	Mediana	6.31	1.88	1.51
	Media	8.488	2.026	0.7188
	3st Qu.	9.38	2.06	2.14
	Max.	28.2	5.74	8.14
Ext2	Min.	0.204	0.444	-1.628
	1st Qu.	2.538	1.36	0.489
	Mediana	2.975	1.692	0.648
	Media	4.26	1.797	1.389
	3st Qu.	6.754	2.125	2.312
	Max.	11.377	3.111	9.25
Ext3	Min.	2.946	1.021	0.254
	1st Qu.	4.483	1.691	1.343
	Mediana	7.356	1.78	1.586
	Media	8.847	1.756	2.148
	3st Qu.	10.97	1.869	2.252
	Max.	22.446	2.267	5.714

Los resultados muestran un mayor promedio de concentración con el kit de Fermentas, también se puede ver que son resultados más homogéneos con respecto a concentración y pureza.



Se compararon los grupos de manera pareada para determinar si muestran diferencias entre ellas con el test Willcoxon, los resultados mostraron que efectivamente existían diferencias significativas:

Datos: Ext1 y Ext2:

$W = 197$, $p\text{-valor} = 0.0365$

$H_0 = \text{Rechazada}$

Datos: Ext1 y Ext3:

$W = 139$, $p\text{-valor} = 0.7646$

$H_0 = \text{Rechazada}$

Datos: Ext2 y Ext3:

$W = 61$, $p\text{-valor} = 0.9995$

$H_0 = \text{Rechazada}$

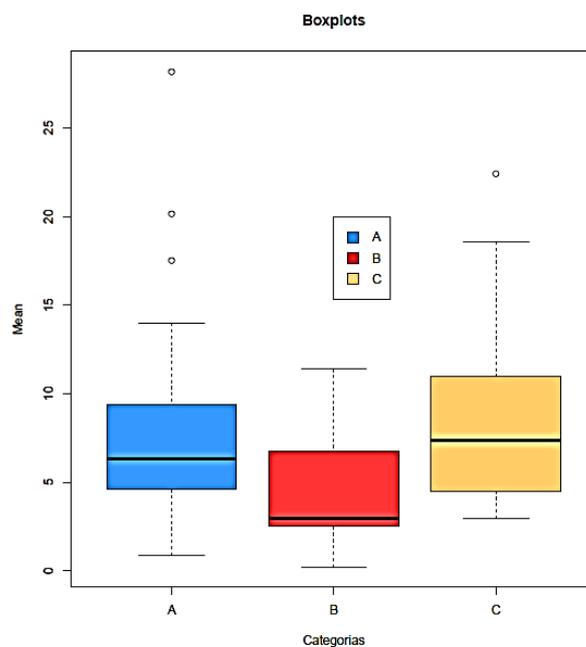


Figura 8. Esquema grafico de la información estadística obtenida de los tipos de extracción comparados. (A: Qiagen, B: InvitroGen y C: Fermentas)



La Figura 8 muestra los resultados de los índices estadísticos determinados para los grupos de tipos de extracción donde se puede observar que el grupo C (Fermentas) presentó un promedio de concentraciones de DNA superiores a los demás tipos.

Se realizó un ANOVA, donde se observó que la significación es menor a 0.05 por lo tanto podemos decir que las diferencias son significativas.

Tabla 11. Resultados del ANOVA de los promedios de concentraciones de los tipos de extracción comparados.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F).
Grupos	2	226.5	113.25	3.555	0.036 *
Residuals	50	1593.0	31.86		

Estandarización de condiciones y concentraciones

Temperatura de hibridación: En la figura 9 y en la tabla 12 se muestra que el mayor rendimiento en la reacción con los primers M. pneu Kha se observó en los carriles 1, 2 y 3, con gran disminución del rendimiento en los carriles 6, 7, 8 y 9. No se observaron productos en el carril 10 ni en el control negativo. Se pudo observar formación de dímeros en los carriles 1 y 2, se seleccionó la temperatura de 56.82 por ser el más alto Tm con buen rendimiento (Figura 9).

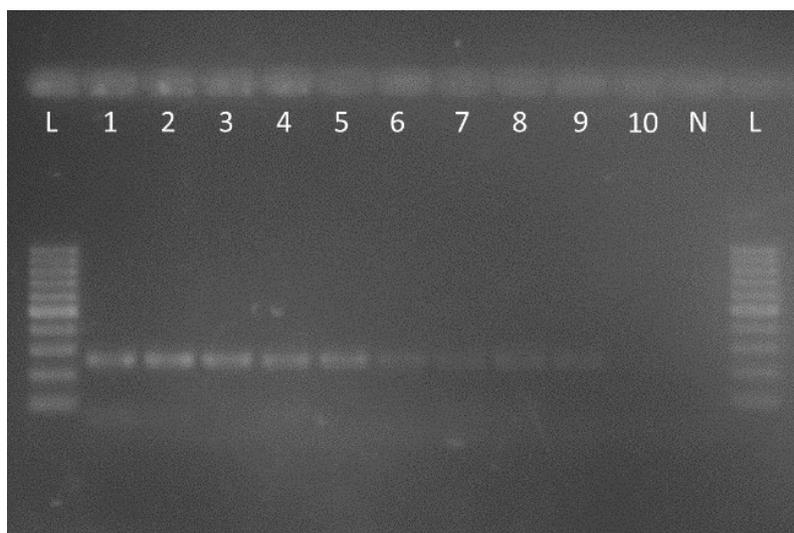


Figura 9. Gradiente de temperaturas para detección de *M. pneumoniae* [50c/μL] con primers MycKha. L: Marcador de peso molecular; 1: Tm51.36°C; 2: Tm52.73°C; 3: Tm54.09°C; 4: Tm55.45°C; 5: Tm56.82°C; 6: Tm58.18°C; 7: Tm59.55°C; 8: 60.91°C; 9: Tm62.27°C; 10: Tm63.64°C y N: Control Negativo. Revelado con Bromuro de Etidio.

Tabla 12. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de hibridación (°C) con los primers MycKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Tm	Producto [241pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	51.36	5690	6222	1933	2411
Carril 2	52.73	7303	6147	846	1586
Carril 3	54.09	6150	5884	-	-
Carril 4	55.45	5099	5749	-	-
Carril 5	56.82	4916	5377	-	-
Carril 6	58.18	2050	1461	-	-
Carril 7	59.55	1501	1338	-	-
Carril 8	60.91	2306	1141	-	-
Carril 9	62.27	1597	1272	-	-
Carril 10	63.64	-	-	-	-
Carril N	-	-	-	-	-

En la figura 10 y en la tabla 13 se puede observar que el mayor rendimiento de la reacción con los primers *M. pneu* Mor se dio en los carriles 2 y 6, así mismo se observó la formación de dímeros en el carril 1, se seleccionó la temperatura de 58.18 por ser el Tm más alto con mejor rendimiento (Figura 10).



Figura 10. Gradiente de temperaturas para detección de *M. pneumoniae* [50c/μL] con primers MycMorz. L: Marcador de peso molecular; 1: Tm51.36°C; 2: Tm52.73°C; 3: Tm54.09°C; 4: Tm55.45°C; 5: Tm56.82°C; 6: Tm58.18°C; 7: Tm59.55°C; 8: 60.91°C; 9: Tm62.27°C; 10: Tm63.64° y; N: Control Negativo. Revelado con Bromuro de Etidio.

Tabla 13. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de hibridación (°C) con los primers MycMorz utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Tm	Producto [225pb]	Dímeros [<100pb]
Carril 1	51.36	2214	2837
Carril 2	52.73	3075	2613
Carril 3	54.09	1969	2841
Carril 4	55.45	2027	2684
Carril 5	56.82	2664	2993
Carril 6	58.18	3085	3364
Carril 7	59.55	2480	2778
Carril 8	60.91	3015	2974
Carril 9	62.27	1548	1081
Carril 10	63.64	-	-
Carril N	-	-	-

En la figura 11 y en la tabla 14 se puede observar que el mayor rendimiento en la reacción con los primers ChIKha se observó en los carriles 2, 4 y 8, se observó la formación de dímeros en el carril 5, se seleccionó la temperatura de 60.91 por ser el Tm más alto con mayor rendimiento (Figura 11).

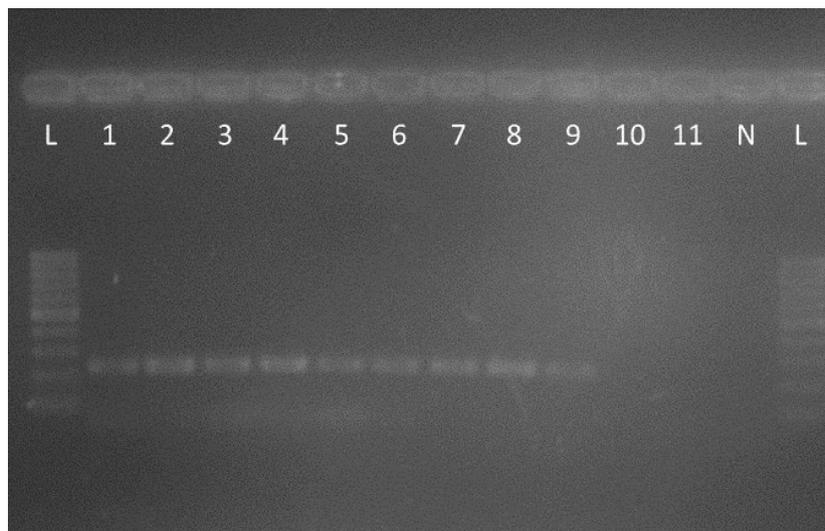


Figura 11. Gradiente de temperaturas para detección de *C. pneumoniae* [50c/μL] con primers ChIKha. L: Marcador de peso molecular; 1: Tm51.36°C; 2: Tm52.73°C; 3: Tm54.09°C; 4: Tm55.45°C; 5: Tm56.82°C; 6: Tm58.18°C; 7: Tm59.55°C; 8: 60.91°C; 9: Tm62.27°C; 10: Tm63.64°C, 11: Tm65°C y N: Control Negativo. Revelado con Bromuro de Etidio.

Tabla 14. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de hibridación (°C) con los primers ChIKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Tm	Producto [232pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	51.36	1813	2257	108	164
Carril 2	52.73	2629	1884	-	-
Carril 3	54.09	1972	2341	161	-
Carril 4	55.45	2926	2563	214	-
Carril 5	56.82	1403	1582	1074	734
Carril 6	58.18	1491	1944	-	-
Carril 7	59.55	1904	1877	-	-
Carril 8	60.91	2618	2487	-	-
Carril 9	62.27	1467	1106	-	-
Carril 10	63.64	-	-	-	-
Carril 11	65.00	-	-	-	-
Carril N	-	-	-	-	-

En la figura 12 y la tabla 15 muestran que el mayor rendimiento de la reacción con los primers ChIMorz se observó en el carril 8, se observó además la formación de dímeros en 1, 2, 3 y 7, se seleccionó la temperatura de 60.91 por ser el Tm más alto con mayor rendimiento(Figura 12).

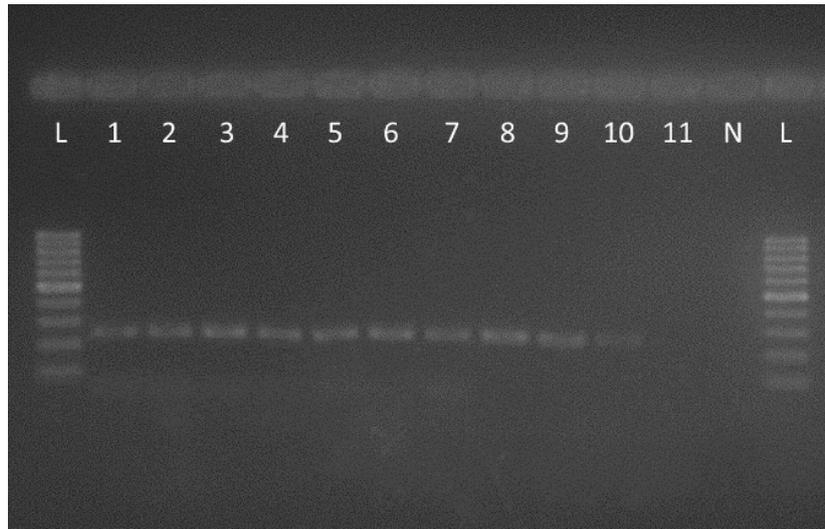


Figura 12. Gradiente de temperaturas para detección de *C. pneumoniae* [50c/μL] con primers ChIMorz. L: Marcador de peso molecular; 1: Tm51.36°C; 2: Tm52.73°C; 3: Tm54.09°C; 4: Tm55.45°C; 5: Tm56.82°C; 6: Tm58.18°C; 7: Tm59.55°C; 8: 60.91°C; 9: Tm62.27°C; 10: Tm63.64°C; 11: Tm65°C y N: Control Negativo. Revelado con Bromuro de Etidio.

Tabla 15. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de hibridación (°C) con los primers ChIMorz utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Tm	Producto [248pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	51.36	3602	2436	1368	1046
Carril 2	52.73	4855	2897	1952	959
Carril 3	54.09	5044	3156	1008	974
Carril 4	55.45	5515	3273	-	-
Carril 5	56.82	6163	2913	867	-
Carril 6	58.18	6387	3684	-	-
Carril 7	59.55	4656	2797	3420	1065
Carril 8	60.91	6857	3465	-	-
Carril 9	62.27	5157	2164	-	-
Carril 10	63.64	2254	1718	-	-
Carril 11	65.00	-	-	-	-
Carril N		-	-	-	-

Estandarización del Tiempo de Hibridación: La Figura 13 y en la tabla 16 muestran que el rendimiento más alto para los primers MycKha se observó con un tiempo de anillamiento de 10s, seguido por 20s (Figura 13).



Figura 13. Gradiente de tiempo de hibridación de primers MycKha para la detección de *M. pneumoniae* [50c/μL]. L: Marcador de peso molecular, 1: Anillamiento de 10s, 2: Anillamiento de 20s, 3: Anillamiento de 30s, 4: Anillamiento de 40s, 5: Anillamiento de 50s, 6: Anillamiento de 60s y N: Control Negativo. Revelado con Bromuro de Etidio.

Tabla 16. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de tiempo (s) de hibridación con los primers MycKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	tiempo	Producto [241pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	10	11869	5781	-	-
Carril 2	20	10309	5603	-	-
Carril 3	30	8214	4643	-	-
Carril 4	40	8862	4285	-	-
Carril 5	50	8085	4154	-	-
Carril 6	60	6204	3648	-	-
Carril N		-		-	-

La Figura 14 y la tabla 16 muestran que el rendimiento más alto para los primers MycMorz se observó con un tiempo de anillamiento de 20s, seguido de 10s (Figura 14).



Figura 14. Gradiente de tiempo de hibridación de primers MycMorz para la detección de *M. pneumoniae* [50c/μL]. L: Marcador de peso molecular, 1: Anillamiento de 10s, 2: Anillamiento de 20s, 3: Anillamiento de 30s, 4: Anillamiento de 40s, 5: Anillamiento de 50s, 6: Anillamiento de 60s y N: Control Negativo. Revelado con Bromuro de Etidio.

Tabla 16. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de tiempo (s) de hibridación con los primers MycMorz utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	tiempo	Producto [225pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	10	7351	4685	-	-
Carril 2	20	8205	4621	-	-
Carril 3	30	7166	4586	-	-
Carril 4	40	5326	3874	-	-
Carril 5	50	6905	3928	-	-
Carril 6	60	5724	3138	-	-
Carril N		-	-	-	-

La Figura 15 y la tabla 17 muestran que el rendimiento más alto para los primers ChIKha se observó con un tiempo de anillamiento de 10s (Figura 15).

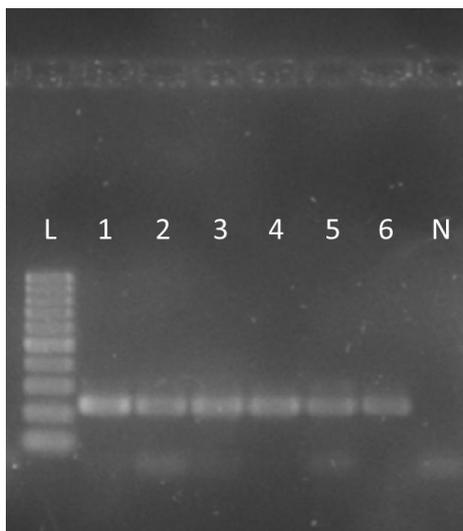


Figura 15. Gradiente de tiempo de hibridación de primers ChIKha para la detección de *C. pneumoniae* [50c/μL]. L: Marcador de peso molecular, 1: Anillamiento de 10s, 2: Anillamiento de 20s, 3: Anillamiento de 30s, 4: Anillamiento de 40s, 5: Anillamiento de 50s, 6: Anillamiento de 60s y N: Control Negativo. Revelado con Sybr Green.

Tabla 17. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de tiempo (s) de hibridación con los primers ChIKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	tiempo	Producto [232pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	10	8265	7156	-	-
Carril 2	20	4581	5465	1569	-
Carril 3	30	6573	6092	-	717
Carril 4	40	5143	5989	-	-
Carril 5	50	4743	5515	1184	-
Carril 6	60	6554	5498	-	-
Carril N		-	-	1235	535

La Figura 16 y la tabla 18 muestran que el rendimiento más alto para los primers ChIMorz se observó con un tiempo de anillamiento de 10 y 30s (Figura 16).

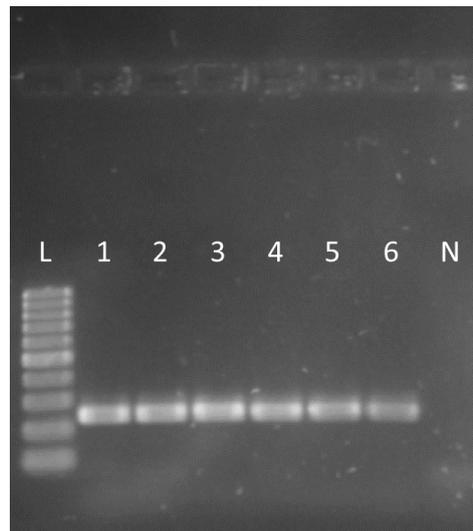


Figura 16. Gradiente de tiempo de hibridación de primers ChIMorz para la detección de *C. pneumoniae* [50c/μL]. L: Marcador de peso molecular, 1: Anillamiento de 10s, 2: Anillamiento de 20s, 3: Anillamiento de 30s, 4: Anillamiento de 40s, 5: Anillamiento de 50s, 6: Anillamiento de 60s y N: Control Negativo. Revelado con Sybr Green.

Tabla 18. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de tiempo (s) de hibridación con los primers ChIMorz utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	tiempo	Producto [248pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	10	10397	11851	-	-
Carril 2	20	9689	10167	-	-
Carril 3	30	11694	10294	-	-
Carril 4	40	10158	11031	-	-
Carril 5	50	8900	9837	-	-
Carril 6	60	8116	9646	-	-
Carril N		-	-	-	-

Estandarización de la concentración de MgCl₂: La figura 17 y la tabla 19 muestran que rendimiento más alto para los primers MycKha se observó a una concentración de 5mM, a lo largo de las concentraciones no se observan diferencias aparentes. La formación de dímeros se da a concentraciones mayores a 6mM (Figura 17).



Figura 17. Gradiente de concentración de $MgCl_2$ para detección de *M. pneumoniae* con primers MycKha. L: Marcador de peso molecular, 1: Myc+ 5 de $MgCl_2$, 2: Myc+ 6mM de $MgCl_2$, 3: Myc+ 7mM de $MgCl_2$, 4: Myc+ 8mM de $MgCl_2$, 5: Myc+ 9mM de $MgCl_2$ y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 19. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de $MgCl_2$ (mM) con los primers MycKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	$MgCl_2$	Producto [241pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	3	9134	8916	-	-
Carril 2	4	10154	10659	-	-
Carril 3	5	10541	10947	-	-
Carril 4	6	7804	9651	6242	3511
Carril 5	7	12301	9461	3422	3141
Carril N	-	-	-	2593	1681

La figura 18 y la tabla 20 muestran que el rendimiento más alto para los primers MycMorz se observó a una concentración de 3 y 5mM, a concentraciones de 6 y 7mM se observa ligera disminución del rendimiento, se seleccionó la concentración de 3mM (Figura 18).



Figura 18. Gradiente de concentración de $MgCl_2$ para detección de *M. pneumoniae* con primers MycMorz. L: Marcador de peso molecular, 1: Myc+ 5mM de $MgCl_2$, 2: Myc+ 6mM de $MgCl_2$, 3: Myc+ 7mM de $MgCl_2$, 4: Myc+ 8mM de $MgCl_2$, 5: Myc+ 9mM de $MgCl_2$ y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 20. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de $MgCl_2$ (mM) con los primers MycMorz utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	$MgCl_2$	Producto [225pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	3	14681	11651	-	-
Carril 2	4	10446	10680	-	-
Carril 3	5	14755	12168	-	-
Carril 4	6	11046	9149	-	-
Carril 5	7	9912	9661	-	-
Carril N	-	-	-	-	-

La figura 19 y la tabla 21 muestran que el rendimiento más alto para los primers ChIKha fue a una concentración de 3mM, a lo largo de las concentraciones no se observan diferencias marcadas. Se observa formación de dímeros a concentraciones superiores a 5mM (Figura 19).

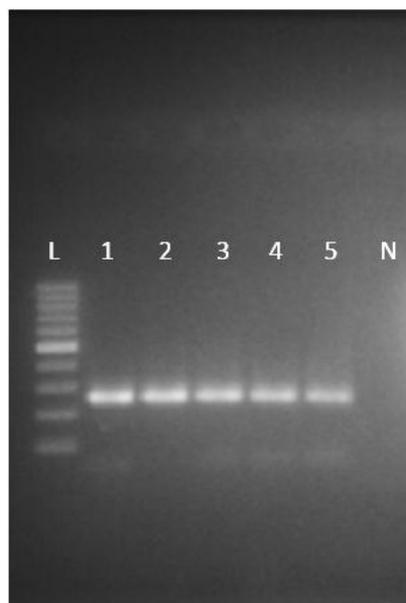


Figura 19. Gradiente de concentración de MgCl₂ para detección de *C. pneumoniae* con primers ChIKha. L: Marcador de peso molecular, 1: ChI+ 0 de MgCl₂, 2: ChI+ 1mM de MgCl₂, 3: ChI+ 2mM de MgCl₂, 4: ChI+ 3mM de MgCl₂, 5: ChI+ 4mM de MgCl₂ y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 21. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de MgCl₂ (mM) con los primers ChIKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	MgCl ₂	Producto [232pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	3	14814	14796	836	-
Carril 2	4	11643	12646	-	-
Carril 3	5	9722	10271	1838	915
Carril 4	6	9200	10113	2222	1352
Carril 5	7	9988	10298	3337	2585
Carril N		-	-	-	-

La figura 20 y la tabla 22 muestran que el rendimiento más alto para los primers ChIMorz fue a una concentración de 3mM, a lo largo de las concentraciones se observa disminución en la intensidad del amplicón (Figura 20).

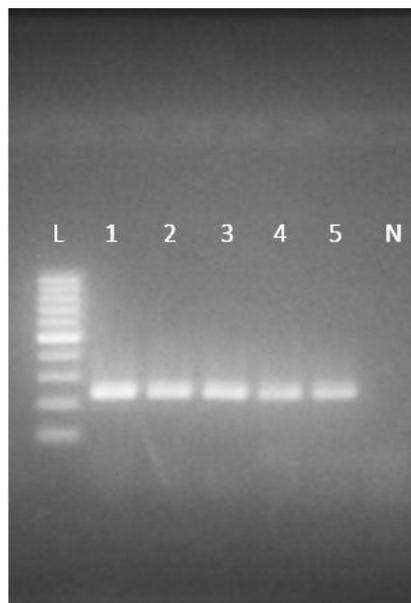


Figura 20. Gradiente de concentración de MgCl₂ para detección de *C. pneumoniae* con ChIMorz. L: Marcador de peso molecular, 1: ChI+ 0 de MgCl₂, 2: ChI+ 1mM de MgCl₂, 3: ChI+ 2mM de MgCl₂, 4: ChI+ 3mM de MgCl₂, 5: ChI+ 4mM de MgCl₂ y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 22. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de MgCl₂ (mM) con los primers ChIMorz utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	MgCl ₂	Producto [248pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	3	12855	13115	-	-
Carril 2	4	8487	9131	-	-
Carril 3	5	8774	9118	-	-
Carril 4	6	6268	5651	-	-
Carril 5	7	6701	5411	-	-
Carril N		-	-	-	-

Estandarización de la concentración de Primers para *Mycoplasma*

***pneumoniae*:** La figura 21 y la tabla 23 muestran que el mayor rendimiento de la reacción se observó a una concentración de 400nM de primers, rendimientos cercanos se observaron a 300 y 500nM. La formación de dímeros se observó a una concentración de 500nM (Figura 21).

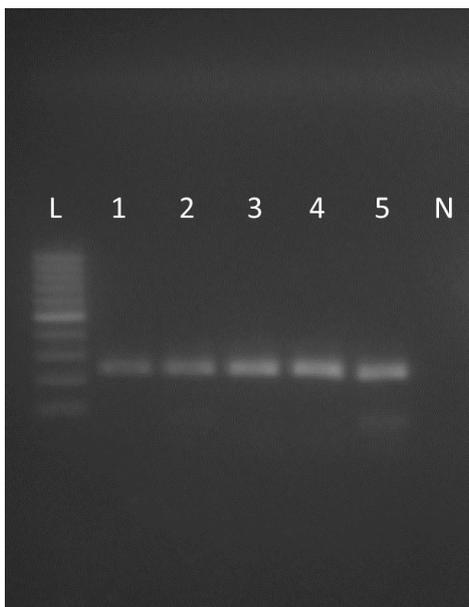


Figura 21. Gradiente de concentración de primers MycKha en *M. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular, 1: Myc+ [Primers a 100nM], 2: Myc+ [Primers a 200nM], 3: Myc+ [Primers a 300nM], 4: Myc+ [Primers a 400nM], 5: Myc+ [Primers a 500nM] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 23. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de primers (nM) MycKha utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. Primer	Producto [241pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	100	5876	8103	-	-
Carril 2	200	8680	8197	-	-
Carril 3	300	13881	12741	-	-
Carril 4	400	16234	13217	-	-
Carril 5	500	15890	12489	7113	4175
Carril N		-	-	-	-

La figura 22 y la tabla 24 no muestran diferencias aparentes entre las concentraciones de primers de 200 a 500nM. A una concentración de 100nM el rendimiento decrece, se seleccionó la concentración de 250nM por ser un punto medio entre los rendimientos más altos (Figura 22).

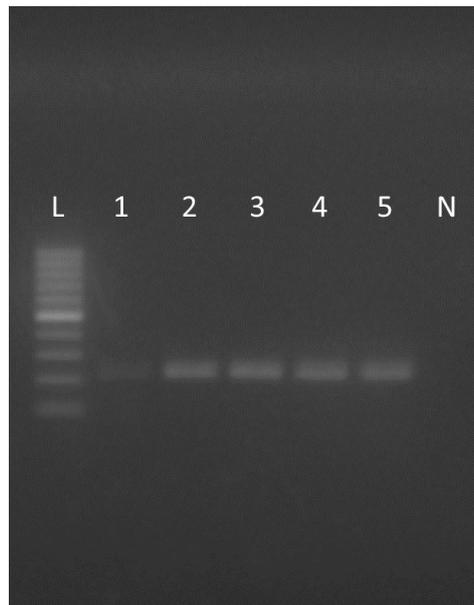


Figura 22. Gradiente de concentración de primers MycMorz en *M. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular, 1: Myc+ [Primers a 100nM], 2: Myc+ [Primers a 200nM], 3: Myc+ [Primers a 300nM], 4: Myc+ [Primers a 400nM], 5: Myc+ [Primers a 500nM] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 24. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de primers MycMorz (nM) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. Primer	Producto [225pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	100	2681	3037	-	-
Carril 2	200	16315	15899	-	-
Carril 3	300	16054	15114	-	-
Carril 4	400	15085	14973	-	-
Carril 5	500	16097	15149	-	-
Carril N	-	-	-	-	-

Estandarización de la concentración de Primers para *Chlamydophila*

***pneumoniae*:** La figura 23 y la tabla 25 muestran que el mayor rendimiento de la reacción se observa a 400nM. Se observan formaciones de dímeros a 500nM (Figura 23).



Figura 23. Gradiente de concentración de primers ChlKha en *C. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular, 1: Chl+ [Primers a 100nM], 2: Chl+ [Primers a 200nM], 3: Chl+ [Primers a 300nM], 4: Chl+ [Primers a 400nM], 5: Chl+ [Primers a 500nM] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 25. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de primers ChlKha (nM) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. Primer	Producto [232pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	100	7172	65154	-	-
Carril 2	200	7510	68338	4378	1133
Carril 3	300	11808	10371	1690	-
Carril 4	400	12683	11977	-	-
Carril 5	500	10654	10814	10465	8317
Carril N		-	-	-	-

La Figura 24 y la tabla 26 muestran que el rendimiento más alto se observa a 400nM, seguido de 300 y 500nM. La formación de dímeros comienza desde una concentración de 400nM, se seleccionó la concentración de 300nM por su rendimiento y no formar dímeros (Figura 24).



Figura 24. Gradiente de concentración de primers ChIMorz en *C. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular, 1: ChI+ [Primers a 100nM], 2: ChI+ [Primers a 200nM], 3: ChI+ [Primers a 300nM], 4: ChI+ [Primers a 400nM], 5: ChI+ [Primers a 500nM] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio

Tabla 26. Densitometría (Unidades) de las bandas del gel de gradiente de concentración de primers ChIMorz (nM) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. Primer	Producto [248pb]		Dímeros [<100pb]	
Carril 1	100	7817	5772	-	-
Carril 2	200	14209	13158	-	-
Carril 3	300	15211	14406	-	-
Carril 4	400	16213	15194	3715	2631
Carril 5	500	15510	15741	3375	1782
Carril N		-	-	-	-

En la tabla 27 se ordenaron las temperaturas y concentraciones que mostraron un mejor rendimiento, estableciendo los parámetros para la reacción de PCR por bacteria (Tabla 27).



Tabla 27. Parámetros estandarizados para cada reacción de PCR.

Bacteria	Iniciadores	Concentración Iniciadores	MgCl ₂	Temperatura de Anillamiento
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MycKhaF MycKhaR	400nM	5mM	56.82°C
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	MycMorzF MycMorzR	250nM	3mM	58.18°C
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ChIKhaF ChIKhaR	400nM	3mM	60.91°C
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	ChIMorzF ChIMorzR	300nM	3mM	60.91°C

Ensayos de Especificidad:

En la Figura 25, los iniciadores MycKha mostraron amplificación específica para el control positivo (Carril 13), no se observa la formación de otro producto (Figura 25).

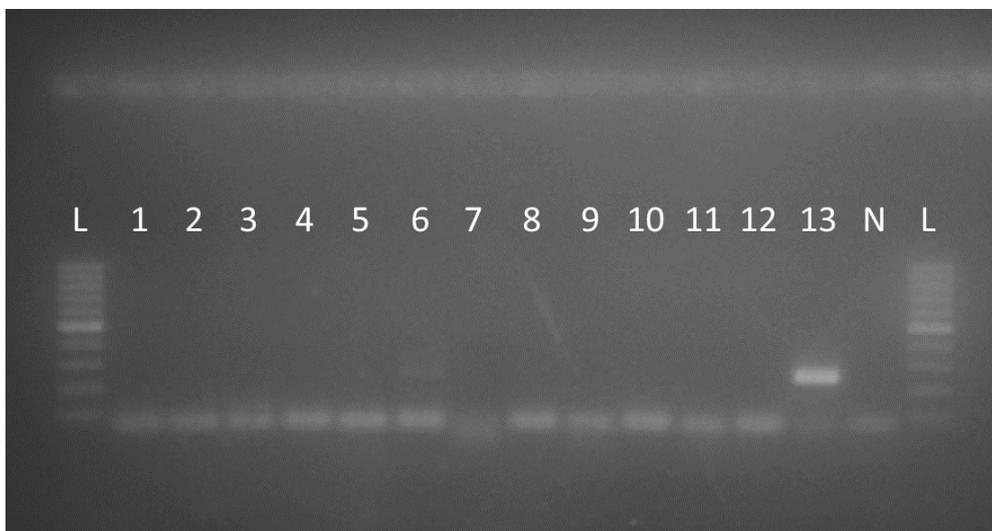


Figura 25. Ensayo de Especificidad de primers MycKha para detección de *M. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular; 1: *Bordetella pertussis*; 2: *Bordetella parapertussis*; 3: *Bordetella holmensis*; 4: *Bordetella bronchiseptica*; 5: *Neisseria meningitidis*; 6: *Streptococcus equi sub equi*; 7: *Streptococcus mutans*; 8: *Staphylococcus aureus*; 9: *Haemophilus influenzae*; 10: *Streptococcus pneumoniae*; 11: *Legionella pneumophila*; 12: *Chlamydomphila pneumoniae*; 13: Control Positivo Myc+ [50c/μL] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.



En la Figura 26, los iniciadores MycMorz amplificaron específicamente solo al control positivo (Carril 13), no se observan amplificaciones en otras bacterias (Figura 26).

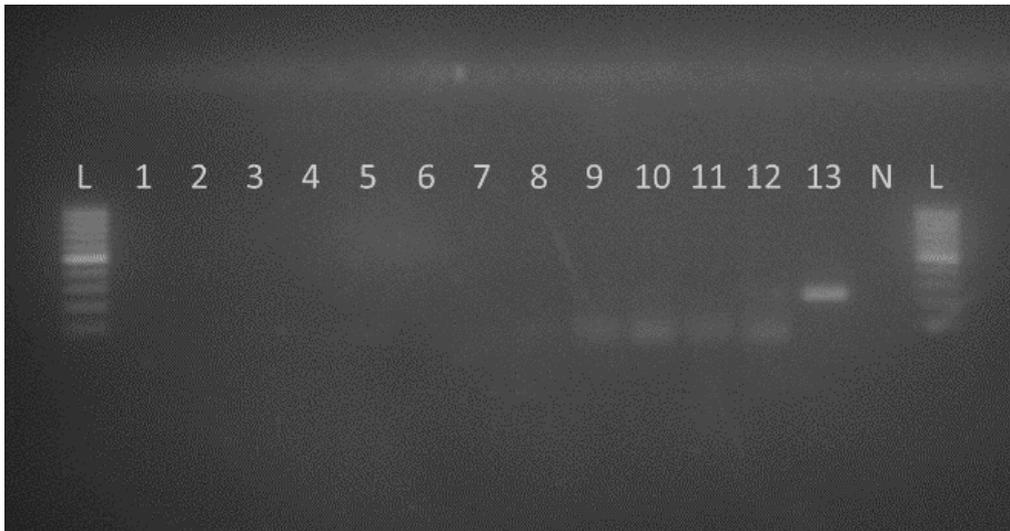


Figura 26. Ensayo Especificidad de primers MycMorz para detección de *M. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular; 1: *Bordetella pertussis*; 2: *Bordetella parapertussis*; 3: *Bordetella holmensis*; 4: *Bordetella bronchiseptica*; 5: *Neisseria meningitidis*; 6: *Streptococcus equi* sub *equi*; 7: *Streptococcus mutans*; 8: *Staphylococcus aureus*; 9: *Haemophilus influenzae*; 10: *Streptococcus pneumoniae*; 11: *Legionella pneumophila*; 12: *Chlamydomphila pneumoniae*; 13: Control Positivo Myc+ [50c/μL] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

En la Figura 27, los iniciadores ChKha mostraron amplificación únicamente en el control positivo (Figura 27), no existe amplificación en otras bacterias. En la figura 28 se pueden observar resultados similares para los primers ChIMorz (Figura 28).



Figura 27. Ensayo Especificidad de primers ChIKha para detección de *C. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular; 1: *Bordetella pertussis*; 2: *Bordetella parapertussis*; 3: *Bordetella holmensis*; 4: *Bordetella bronchiseptica*; 5: *Neisseria meningitidis*; 6: *Streptococcus equi* sub *equi*; 7: *Streptococcus mutans*; 8: *Staphylococcus aureus*; 9: *Haemophilus influenzae*; 10: *Streptococcus pneumoniae*; 11: *Legionella pneumophila*; 12: *Mycoplasma pneumoniae*; 13: Control Positivo ChI+ [50c/μL] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

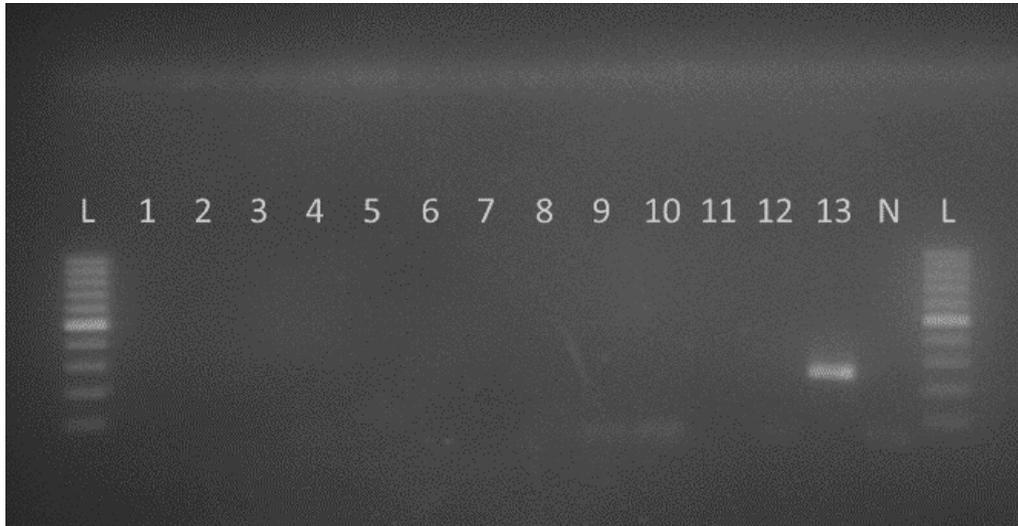


Figura 28. Ensayo Especificidad de primers ChIMorz para detección de *C. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular; 1: *Bordetella pertussis*; 2: *Bordetella parapertussis*; 3: *Bordetella holmensis*; 4: *Bordetella bronchiseptica*; 5: *Neisseria meningitidis*; 6: *Streptococcus equi* sub *equi*; 7: *Streptococcus mutans*; 8: *Staphylococcus aureus*; 9: *Haemophilus influenzae*; 10: *Streptococcus pneumoniae*; 11: *Legionella pneumophila*; 12: *Mycoplasma pneumoniae*; 13: Control Positivo ChI+ [50c/μL] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.



Ensayos de Sensibilidad

Determinación del Límite de Detección para *Mycoplasma pneumoniae*: En el ensayo de gradiente de DNA se observa que el control positivo a concentraciones de 100 y a 10c/μL con los iniciadores MycKha presenta un amplicón detectable, mientras que concentraciones inferiores se observan como negativas (Figura 29).



Figura 29. Ensayo de Gradiente de Concentración de DNA para detección de *M. pneumoniae* con primers de Khana. L: Marcador de peso molecular, 1: Control + (100c/μL), 2: Control + (10c/μL), 3: Control + (1c/μL), 4: Control + (0.1c/μL), 5: Control + (0.01c/μL) y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 28. Medición de la intensidad de color de las bandas del ensayo de gradiente de concentraciones de DNA con iniciadores MycKha (c/μL) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. C+	Producto	
Carril 1	100	21342	25681
Carril 2	10	11056	17263
Carril 3	1	-	-
Carril 4	0.1	-	-
Carril 5	0.01	-	-
Carril N		-	-

En el ensayo de gradiente de DNA se observa que el control positivo a concentraciones de 100 y a 10c/μL con los iniciadores MycMorz presenta un amplicón detectable, mientras que concentraciones inferiores se observan como negativas (Figura 30).



Figura 30. Ensayo de Gradiente de Concentración de DNA para detección de *M. pneumoniae* con primers de Morozumi. L: Marcador de peso molecular, 1: Control + (100c/μL), 2: Control + (10c/μL), 3: Control + (1c/μL), 4: Control + (0.1c/μL), 5: Control + (0.01c/μL) y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 29. Medición de la intensidad de color de las bandas del ensayo de gradiente de concentraciones de DNA con iniciadores MycMorz (c/μL) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. C+	Producto	
Carril 1	100	15824	18349
Carril 2	10	8159	11025
Carril 3	1	-	-
Carril 4	0.1	-	-
Carril 5	0.01	-	-
Carril N		-	-

Determinación del Límite de Detección para *Chlamydomphila pneumoniae*:

El PCR presenta amplificación a concentraciones de 100 y 10c/μL con los iniciadores ChIKha, concentraciones inferiores presentaron un bajo grado de amplificación a 1c/μL y solo en una de las muestras pareadas, en concentraciones inferiores no se observa amplificación (Figura 31).



Figura 31. Ensayo de Gradiente de concentración de DNA para detección de *C. pneumoniae* con primers de Morozumi. L: Marcador de peso molecular, 1: ChI+ [100c/μL], 2: ChI+ [10c/μL], 3: ChI+ [10c/μL], 4: ChI+ [1c/μL], 5: ChI+ [1c/μL], 6: ChI+ [0.1c/μL], 7: ChI+ [0.1c/μL] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 30. Medición de la intensidad de color de las bandas del ensayo de gradiente de concentraciones de DNA con iniciadores ChIKha (c/μL) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. C+	Producto	
Carril 1	100	5192	5719
Carril 2	10	1896	2156
Carril 3	10	2262	2589
Carril 4	1	-	514
Carril 5	1	734	-
Carril 6	0.1	-	-
Carril 7	0.1	-	-
Carril N		-	-

El PCR detecta como positivos al control positivo a concentraciones de 100 y 10c/μL con los iniciadores ChIMorz, en una muestra pareada de control a 1c/μL se observó amplificación, a concentraciones menores no se detecta amplificación (Figura 32).



Figura 32. Gradiente de concentración de ADN de *C. pneumoniae* con primers de Khana. . L: Marcador de peso molecular, 1: ChI+ [100c/μL], 2: ChI+ [10c/μL], 3: ChI+ [10c/μL], 4: ChI+ [1c/μL], 5: ChI+ [1c/μL], 6: ChI+ [0.1c/μL], 7: ChI+ [0.1c/μL] y N: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Tabla 31. Medición de la intensidad de color de las bandas del ensayo de gradiente de concentraciones de DNA con iniciadores ChIMorz (c/μL) utilizando el programa Imagen J (En duplicado).

	Conc. C+	Producto	
Carril 1	100	15075	1294
Carril 2	10	6110	8773
Carril 3	10	9337	9017
Carril 4	1	1717	-
Carril 5	1	-	-
Carril 6	0.1	-	-
Carril 7	0.1	-	-
Carril N		-	-

Pruebas de Inhibición de amplificación para *Mycoplasma pneumoniae*: Los resultados del PCR muestran amplificación en 3 de las 4 muestras negativas a las que se les agregó control positivo, en la muestra D se observa que no se formó amplicón, ninguna de las muestras negativas muestra amplificación (Figura 33).

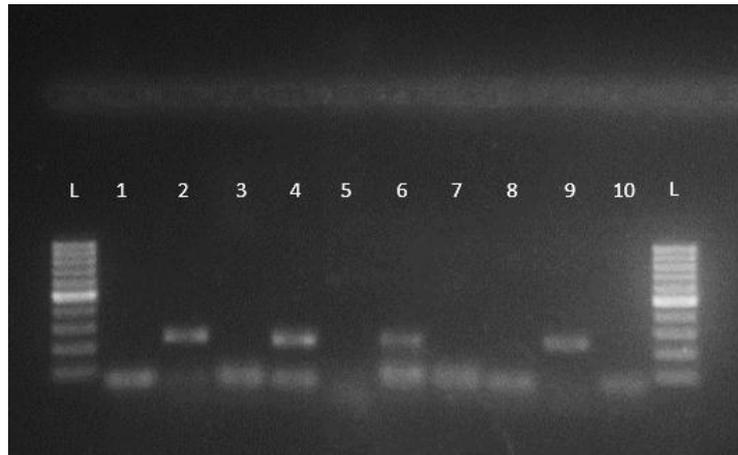


Figura 33. Ensayo de inhibición en PCR para *Mycoplasma pneumoniae* [25c/μL] con primers Khana. L: Marcador de peso molecular, 1: Muestra Negativa A, 2: Muestras Negativa A + Control Positivo, 3: Muestra Negativa B, 4: Muestra Negativa B + Control Positivo, 5: Muestra Negativa C, 6: Muestra Negativa C + Control Positivo, 7: Muestra Negativa D, 8: Muestra Negativa D + Control Positivo, 9: Control Positivo y 10: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Los resultados del PCR muestran amplificación en 3 de las 4 muestras negativos con el agregado de control positivo, en la muestra D se observó inhibición de la reacción, en ninguna muestra negativa se formaron amplicones (Figura 34).

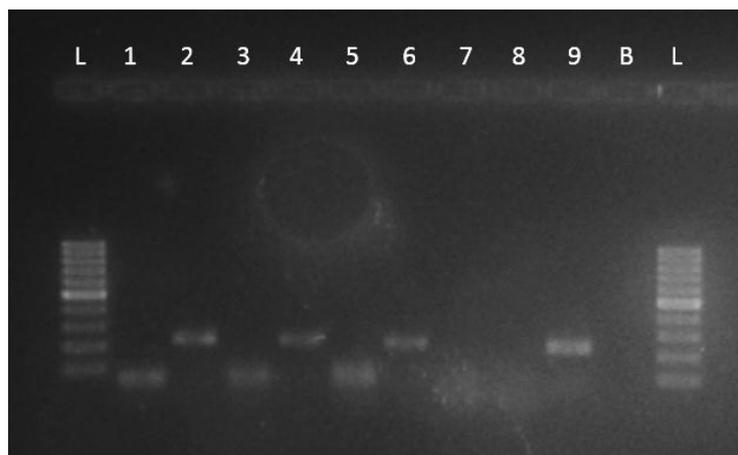


Figura 34. Ensayo de Inhibición en PCR para *Mycoplasma pneumoniae* [25c/μL] con primers Morozumi. L: Marcador de peso molecular, 1: Muestra Negativa A, 2: Muestras Negativa A + Control Positivo, 3: Muestra Negativa B, 4: Muestra Negativa B + Control Positivo, 5: Muestra Negativa C, 6: Muestra Negativa C + Control Positivo, 7: Muestra Negativa D, 8: Muestra Negativa D + Control Positivo, 9: Control Positivo y B: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.



Pruebas de Inhibición de amplificación para *Chlamydomphila pneumoniae*:

Los resultados del PCR muestran amplificación de las muestras negativas a las que se les agregó control positivo, en las muestras B, C y D se observan bandas inespecíficas de mayor tamaño sin embargo siguen mostrando resultados negativos. No se observa inhibición de la reacción en ninguna muestra (Figura 35).

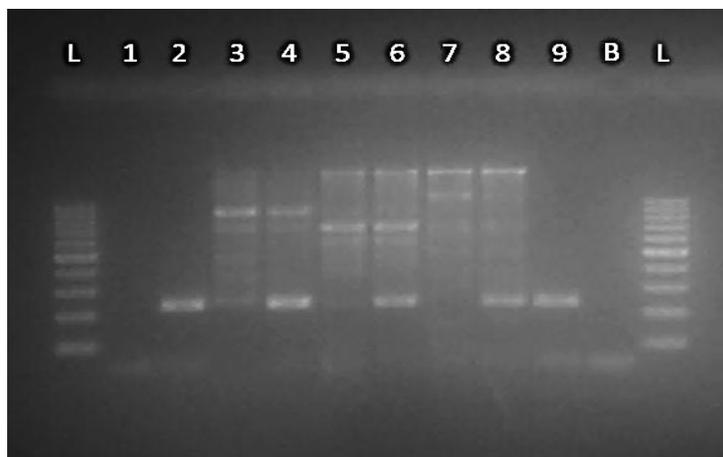


Figura 35. Ensayo de Inhibición en PCR para *Chlamydomphila pneumoniae* [25c/μL] con primers Khana. L: Marcador de peso molecular, 1: Muestra Negativa A, 2: Muestras Negativa A + Control Positivo, 3: Muestra Negativa B, 4: Muestra Negativa B + Control Positivo, 5: Muestra Negativa C, 6: Muestra Negativa C + Control Positivo, 7: Muestra Negativa D, 8: Muestra Negativa D + Control Positivo, 9: Control Positivo y B: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Los resultados de la reacción de PCR muestra la amplificación de las muestras negativas a las que se les agregó control positivo, en un grado menor a la muestra C, las muestras negativas no mostraron amplicones durante la reacción (Figura 36).

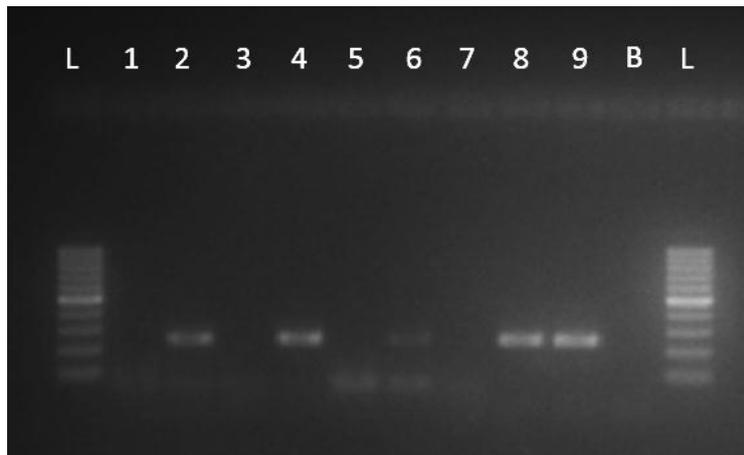


Figura 36. Ensayo de Inhibición en PCR para *Chlamydomphila pneumoniae* [25c/μL] con primers Morozumi. L: Marcador de peso molecular, 1: Muestra Negativa A, 2: Muestras Negativa A + Control Positivo, 3: Muestra Negativa B, 4: Muestra Negativa B + Control Positivo, 5: Muestra Negativa C, 6: Muestra Negativa C + Control Positivo, 7: Muestra Negativa D, 8: Muestra Negativa D + Control Positivo, 9: Control Positivo, B: Control Negativo. Revelado con bromuro de etidio.

Ensayo en muestras clínicas para *Mycoplasma pneumoniae*: En el resultado del PCR ensayado en muestras clínicas, se observan amplicones entre 200-300, que coinciden con el amplicón esperado (Carriles 1, 2 3, 6, 7 y 8). Uno de los controles positivos no presenta amplicón (Figura 37).

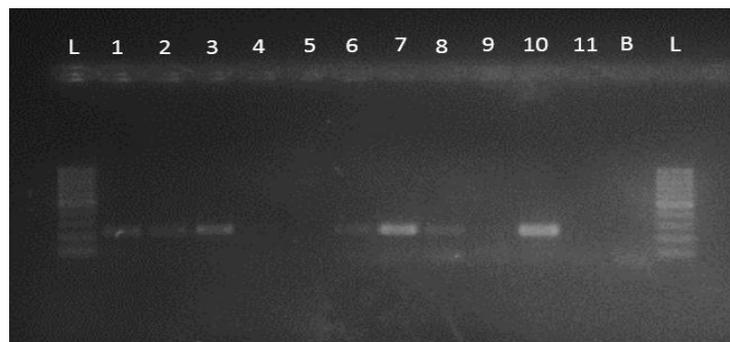


Figura 37. Ensayo en muestras clínicas con primers MycMorz para detección de *M. pneumoniae*. L: Marcador de peso molecular, 1-9: Muestras Clínicas, 10: Control + [50c/μL], 11: Control + [25c/μL] y B: Control Negativo.



El resultado del PCR muestra la ausencia de amplicones en muestras, se observa formación de dímeros, un control no muestra amplificación, el otro control presenta un amplicón a 200-300 (Figura 38).

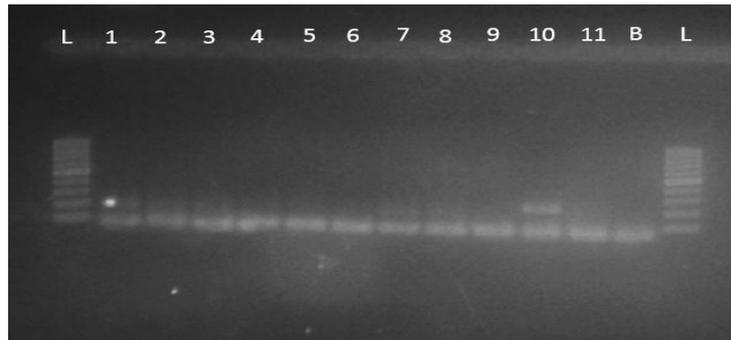


Figura 38. Ensayo en muestras clínicas de detección de *M. pneumoniae* con primers MycKha. L: Marcador de peso molecular, 1-9: Muestras Clínicas, 10: Control + [50c/μL], 11: Control + [25c/μL] y B: Control Negativo.

Resultados de un PCR con primers Kha que generan bandas a 200-300 para el control positivo y para la muestra A, los primers Mor generan amplicones para las 4 muestras. (Figura 39)

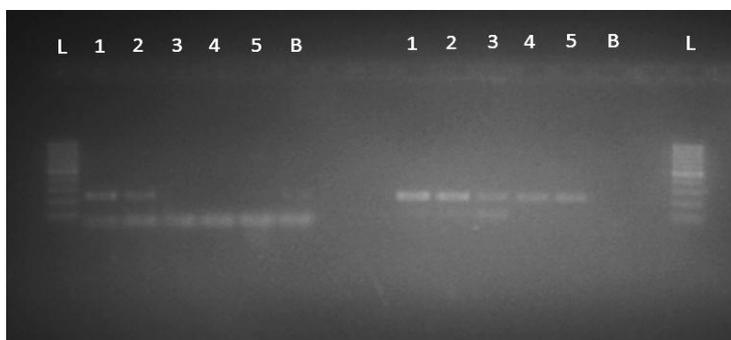


Figura 39. Ensayo en Muestras clínicas de detección de *M. pneumoniae* con primers MycKha (Izquierda) y MycMorz (Derecha). L: Marcador de peso molecular, 1: Myc+ [50c/μL], 2-5: Muestras Clínicas (A, B, C y D) y B: Control Negativo.



Ensayo en muestras clínicas para *Chlamydomphila pneumoniae*: Los resultados de PCR muestran la falta de amplicones en los carriles de las muestras, se observa el control positivo con un amplicón a 200-300 (Figura 40).

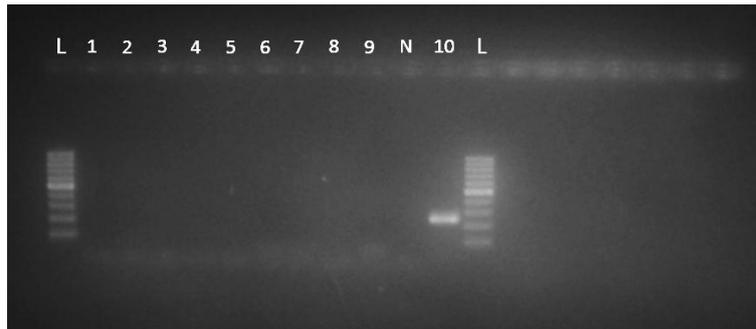


Figura 40. Ensayo en Muestras clínicas de detección de *C. pneumoniae* con primers ChlMorz. L: Marcador de peso molecular, 1-9: Muestras Clínicas, N: Control Negativo y 10: ChI+ [50c/μL].

Los resultados de PCR muestran un ligero amplicón en el carril 9 a 200-300, el control positivo presenta un amplicón intenso de la misma longitud (Figura 41).

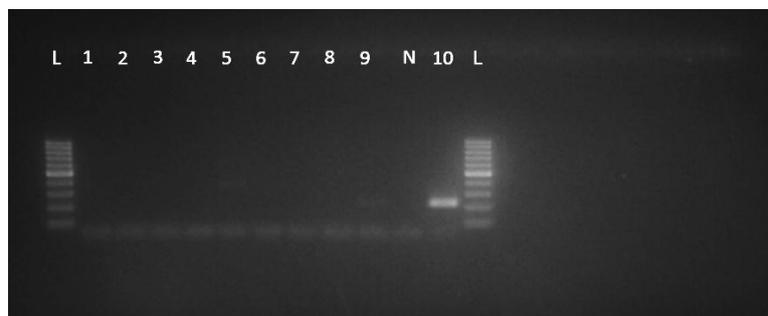


Figura 41. Ensayo en Muestras clínicas de detección de *C. pneumoniae* con primers ChlKha. L: Marcador de peso molecular, 1-9: Muestras Clínicas, N: Control Negativo y 10: ChI+ [50c/μL].



Los resultados de PCR muestran amplicones para ambos primers a 200-300 en las muestras del carril 1 y 5, el control también presenta un amplicón de la misma longitud (Figura 42).



Figura 42. Ensayo en Muestras clínicas de detección de *C. pneumoniae* con primers ChIKha (Izquierda) y ChIMorz (Derecha). L: Marcador de peso molecular, 1-6: Muestras Clínicas, 7: ChI+ [50c/μL] y B: Control Negativo

De las muestras analizadas, 5 muestras fueron positivas a *M. pneumoniae* y 2 a *C. pneumoniae*.



V. DISCUSIÓN

Los iniciadores MycKhaF y MycKhaR en PrimerBlast no muestran características apropiadas: Tm muy distantes (68.6°C y 53.85°C), el iniciador MycKhaR tiene un grado muy alto grado de autocomplementariedad y un Tm alto (68.6°C). Se observa que generan un producto de 241pb para *M. pneumoniae* y para *M. genitalium*. La especie *M. genitalium* es considerado un patógeno importante de transmisión sexual (Coen 2007) por lo tanto no podría encontrarse en una muestra de hisopado nasofaríngeo (HNF) descartando problemas de reacción cruzada.

Los iniciadores MycMorzF y MycMorzR en PrimerBlast muestran características óptimas, sin embargo forman productos de 225pb para la especie *M. pneumoniae* y otras especies del género. En el caso de *M. genitalium*, *M. hominis*, considerado un comensal genital (Brunner 1983, Glodenberg 2008), y *M. pirum*, identificado en el tracto urogenital (Del Giudice, 1985; Grau, 1993), no deberían encontrarse en HNF. Las especies *M. imitans* y *M. gallisepticum* son bacterias patógenas que afectan a las aves (Bradbury, 1993; Levisohn & Kleven, 2000). Estos iniciadores no son específicos; sin embargo podrían emplearse como una prueba de cribado por ser específicos a nivel del género *Mycoplasma*.

Los iniciadores ChIKhaF y ChIKhaR en PrimerBlast no muestran características optimas, sin embargo son aparentemente específicos para la especie *C. pneumoniae* generando un producto de 232pb.



Los iniciadores ChIMorzF y ChIMorzR en PrimerBlast muestran características óptimas. Los iniciadores son exclusivos para la especie *C. pneumoniae*, formando un amplicón de 248pb, sin embargo muestra una amplificación inespecífica para la especie *C. ibidis* de un tamaño de 3452pb, un especie del genero *Chlamydia* aislada del ave africana Ibis recientemente (Vorimore 2013), la diferencia de longitud en el amplicón evitan diagnósticos errados.

Por otro lado, los resultados obtenidos de InSilicoPCR muestran exclusividad por parte de todos los primers, donde es importante resaltar que para los géneros *Chlamydophila* y *Chlamydia* esta base de datos cuenta una cantidad reducida de especies.

Los sitios a los cuales están dirigidos los iniciadores son el RNA Ribosomal 16S y la proteína de membrana externa (omp). El RNA Ribosomal 16S es la secuencia más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía de bacterias. Es una secuencia altamente conservada, sin embargo también se encontró que poseen regiones variables en zonas específicas donde además se encuentran regiones que se mantienen dentro de un grupo de organismos (Del rosario 2004). Baker (2003) presenta un esquema donde muestra las 9 regiones hipervariables del RNA ribosomal 16S en la bacteria *Escherichia coli*, por lo que los iniciadores empleados en este proyecto deberían estar dirigidos a estas regiones para aportarle especificidad a la reacción de PCR. La identificación por PCR de organismos de la familia Chlamydiaceae se realizado empleando primers dirigidos a los genes de proteínas de membrana externa (omp) (Silva et



al. 2009). La proteína de la membrana externa es uno de los antígenos más caracterizados y se halla en mayor proporción en los cuerpos elementales y reticulares (Villegas 2008).

Los datos obtenidos de los ensayos de extracción muestran que el método por el cual se extrajo una mayor concentración de DNA fue por el 3, en el cual se empleó el kit de Fermentas. Es importante resaltar que las concentraciones obtenidas en las primeras 10 muestras son superiores a las obtenidas en las últimas 10, un posible motivo podría relacionarse al tiempo desde la extracción hasta la lectura. Las 10 muestras finales se leyeron 3 días luego de su extracción por temas de disponibilidad de equipos, una lectura oportuna podría haber mostrado resultados de concentración mayores a los obtenidos.

Las bacterias empleadas en los ensayos de especificidad son bacterias patógenas causantes de infecciones respiratorias como también bacterias comensales del tracto respiratorio. Los ensayos de especificidad mostraron resultados adecuados para 3 de las 4 reacciones, únicamente los iniciadores MycKha mostraron amplificación inespecífica aparentemente tenue de similar tamaño al del control positivo con la bacteria *Streptococcus equi*. La especie *Streptococcus equi* es una bacteria del ganado equino que causa una enfermedad comúnmente llamada estrangulación, la subespecie *zooepidemicus* es patógeno zoonótico, la cual en el ganado equino es solo una bacteria oportunista sin embargo en el humano produce una infección severa (Pelkonen, 2013).



En el ensayo realizado en muestras clínicas los iniciadores M. pneu Mor mostraron gran cantidad de diagnósticos positivos que no coincidían como se esperaba con el otro par de iniciadores M. pneu Kha. La reacción de secuenciamiento reveló que estos amplicones inespecíficos correspondían a la especie *M. amphoriforme*, a pesar que esta especie no demostró una reacción cruzada en silico. La especie *Mycoplasma amphoriforme* es una especie relativamente nueva, que fue aislada por primera vez de un paciente inmunodeficiente que padecía bronquitis, y por análisis filogenéticos pertenecía al grupo de los mycoplasmas. Esta bacteria ha sido posteriormente identificada en pacientes inmunocomprometidos e inmunocompetentes con infecciones en el tracto respiratorio (Pitcher, 2005; Pereyre, 2010).

El límite de detección determinado por los ensayos mostró una diferencia en cuanto a las bacterias, los iniciadores para detección de *Mycoplasma pneumoniae* fue a 10c/μL con una repetibilidad del 100% para ambos pares de primers, concentraciones de 1c/μL no amplificaron en ningún ensayo, por otro lado, *Chlamydomphila pneumoniae* mostró un límite de detección de 10c/μL con una repetibilidad del 100% y un límite de detección de 1c/μL con una repetibilidad del 50%. El límite de detección está definido como la menor cantidad de analito que se puede detectar por una prueba en al menos el 50% de las réplicas, sin embargo, por fines clínicos se buscó una repetibilidad del 100% para lo cual sensibilidad analítica se puede establecer como 10c/μL para *M. pneumoniae* y



C. pneumoniae respectivamente. Esta diferencia podría estar relacionada con la cantidad de copias del gen que se encuentran en el genoma.

En el trabajo de Morozumi determina límites de detección de 5c/μL y 3c/μL para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* respectivamente con una repetibilidad del 100%, este incremento en la sensibilidad se debe atribuir al empleo de sondas fluorescentes (Morozumi, 2005). El trabajo de Guillen determina límites de detección de 0.05ng/μL y 0.058ng/μL para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae*, la cuantificaron de los controles a 100c/μL dio concentraciones de 2.344 y 1.795ng/μL datos que al extrapolarlos dan límites de detección de 0.234 y 0.179ng/μL (Guillen, 2012). El trabajo de Khanna mostró límites de detección de 100c/mL (0.01c/μL) y 10c/mL (0.1c/μL) para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* respectivamente (Khanna, 2006). El trabajo de Miyashita mostró valores de sensibilidad de 0.1c/μL para ambos patógenos donde el autor afirmó además que las pruebas de PCR simple y PCR multiplex no muestran diferencias significativas (Miyashita, 2004). El trabajo de Welti podía detectar hasta una 1c/μL de DNA siendo también una prueba en tiempo real (Welti, 2003). En todos los trabajos nombrados se observó un límite de detección menor al determinado en este trabajo mostrando el aumento en la sensibilidad que ganan los ensayos convencionales al volverlos pruebas en tiempo real sin contar con la reducción del tiempo de trabajo y de diagnóstico.

El ensayo en muestras clínicas se realizó con un número de muestras reducido por lo que los datos obtenidos no reflejan la situación epidemiológica a nivel nacional. Con la aplicación de la técnica de PCR previamente estandarizada se



encontró una prevalencia de 12% y 5% para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* respectivamente, resultados comparables a los obtenidos por Guillen, quien de la misma forma con un número de muestras reducidas encontró una prevalencia de 18,3% y 1,7% para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* en 60 muestras (Guillen, 2012) y por Gullsby, quien encontró 18% y 10% para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* en 120 pacientes (Gullsby, 2008), coincidiendo en la superioridad de casos de *M. pneumoniae* sobre *C. pneumoniae*.

La temperatura de anillamiento empleada por Morozumi fue de 50°C por 40 ciclos mientras que en este trabajo empleando los mismos iniciadores se observaron mejores resultados empleando una temperatura de anillamiento de 58.18°C y 60.91°C para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* respectivamente (Morozumi, 2005). Por otro lado, Khana en su protocolo emplea 55°C por 2 ciclos y 60°C los otros 38, en contraste con las temperaturas de 56.82°C y 60.91°C para *M. pneumoniae* y *C. pneumoniae* respectivamente que mostraron mejores resultados (Khanna, 2006).



VI. CONCLUSIONES

1. El método de extracción que mostro concentraciones de DNA más altas fue con el empleo del kit Fermentas.
2. Las condiciones establecidas para cada juego de iniciadores fueron:
 - Para MycKha una temperatura de hibridación de 56.82°C, una concentración de iniciadores de 400nM y una concentración de MgCl₂ de 5mM.
 - Para MycMorz una temperatura de hibridación de 58.18°C, una concentración de iniciadores de 250nM y una concentración de MgCl₂ de 3mM.
 - Para ChIKha una temperatura de hibridación de 60.91°C, una concentración de iniciadores de 400nM y una concentración de MgCl₂ de 3mM.
 - Para ChIMorz una temperatura de hibridación de 60.91°C, una concentración de iniciadores de 300nM y una concentración de MgCl₂ de 3mM.
3. Los límites de detección fueron de 10 copias por microlitro en PCR convencional para todos los iniciadores.



VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda comparar otros kits comerciales en la extracción de DNA por los resultados de pureza observados.

En la etapa de validación se recomienda aumentar el número de muestras por la baja prevalencia de estas bacterias.



VIII. REFERENCIAS

Andreu, L. M., Abós, S. M., Rivas, G. F., Soler, V. G., & Ruiz, V. A (2006). Diagnóstico serológico de las infecciones por *Mycoplasma pneumoniae*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24, 19-23.

Asuar, L. E (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 574p.

Asuar, L. E (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, 574p.

Atkinson, T. P., Balish, M. F., & Waites, K. B (2008). Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS microbiology reviews*, 32(6), 956-973.

Báez Saldaña, R., Gómez Zamora, C., López Elizondo, C., Molina Corona, H., Santillán Martínez, A., Sánchez Hernández, J. & Orozco-González, N. (2013). Neumonía adquirida en la comunidad. Revisión y actualización con una perspectiva orientada a la calidad de la atención médica. *Neumol Cir Torax*, 72(s1).

Baker, G. C., Smith, J. J., & Cowan, D. A (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of microbiological methods*, 55(3), 541-555.



Balboa de Paz, F., Rueda Esteban, S., & De Miguel Lavisier, B. (2007). Neumonías adquiridas en la comunidad. *Acta Pediátrica Española*, 65(10), 489-495.

Berebichez-Fridman, R., Blachman-Braun, R., Azrad-Daniel, S., Vázquez-Campuzano, R., & Vázquez-López, R. (2015). Atypical pneumonias caused by *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. *Revista Médica Del Hospital General De México*, 78(4), 188-195.

Blasi, F., Tarsia, P., & Aliberti, S (2009). *Chlamydia pneumoniae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(1), 29-35.

Blasi, F., Tarsia, P., Aliberti, S., Cosentini, R., & Allegra, L (2005, December). *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae*. In *Seminars in respiratory and critical care medicine* (Vol. 26, No. 06, pp. 617-624). Copyright© 2005 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA..

Bradbury, J. M., Abdul-Wahab, O. M. S., Yavari, C. A., Dupiellet, J. P., & Bové, J. M (1993). *Mycoplasma imitans* sp. nov. is related to *Mycoplasma gallisepticum* and found in birds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(4), 721-728.



Brunner, H., Weidner, W., & Schiefer, H. G (1983). Studies on the role of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in prostatitis. *Journal of Infectious Diseases*, 147(5), 807-813.

Burillo, A., & Bouza, E (2010). *Chlamydia pneumoniae*. *Infectious Disease Clinics*, 24(1), 61-71.

Campbell, L. A., Melgosa, M. P., Hamilton, D. J., Kuo, C. C., & Grayston, J. T (1992). Detection of *Chlamydia pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2), 434-439.

Cardinale, F., Chironna, M., Chinellato, I., Principi, N., & Esposito, S (2013). Clinical relevance of *Mycoplasma pneumoniae* macrolide resistance in children. *Journal of clinical microbiology*, 51(2), 723-724.

Clavijo Castro, D. P., & Tovar Espinosa, P. A. Evaluación de la aplicabilidad de una prueba de PCR para la detección de *trypanosoma cruzi* en tejidos incluidos en parafina (Bachelor's thesis, Facultad de Ciencias).

Coen, D. M (2011). The polymerase chain reaction. *Current protocols in molecular biology*. 15.0.1-15.0.3

Cohen, C. R., Nosek, M., Meier, A., Astete, S. G., Iverson-Cabral, S., Mugo, N. R., & Totten, P. A (2007). *Mycoplasma genitalium* infection and persistence in a



cohort of female sex workers in Nairobi, Kenya. Sexually transmitted diseases, 34(5), 274-279.

Cortazar M, A., Silva R, E (2004). MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS. Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México.

Daxboeck, F., Krause, R., & Wenisch, C (2003). Laboratory diagnosis of Mycoplasma pneumoniae infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(4), 263-273.

Del Giudice, R. A., Tully, J. G., Rose, D. L., & Cole, R. M (1985). Mycoplasma pirum sp. nov., a terminal structured mollicute from cell cultures. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 35(3), 285-291.

Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4), 238-45.

Díaz, A. S., Rentería, L. F., Cortez, J. A., & Palacios, E. S (2008). PCR: reacción en cadena de la polimerasa. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, 53.



Dorigo-Zetsma, J. W., Zaat, S. A. J., Wertheim-van Dillen, P. M. E., Spanjaard, L., Rijntjes, J., Van Waveren, G., ... & Dankert, J (1999). Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *Journal of clinical microbiology*, 37(1), 14-17.

Ewig, S., & Torres, A (2003). Is *Chlamydia pneumoniae* an important pathogen in patients with community-acquired pneumonia. 741-742.

Ferreira, T., & Rasband, W (2012). ImageJ user guide. ImageJ/Fiji 1.46r pp. 144-146.

Fuentes Cruz, M. A., Sarduy Paneque, M. A., Cintra Cala, D., Presno Labrador, M. C., Barnes Domínguez, J. A., & Pérez Pérez, J. A. (2013). Neumonías adquiridas en la comunidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 29(2), 202-213.

Fukano, H (2004). Comparison of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA. *Microbiology and immunology*, 48(6), 441-448.

García-Elorriaga, G., Palma-Alaniz, L., García-Bolaños, C., Ruelas-Vargas, C., Méndez-Tovar, S., & Rey-Pineda, G. D. (2015). Microbiología de lavado broncoalveolar en lactantes con neumonía bacteriana adquirida en la comunidad de mala evolución. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 72(5), 307-312.



Goldenberg, R. L., Andrews, W. W., Goepfert, A. R., Faye-Petersen, O., Cliver, S. P., Carlo, W. A., & Hauth, J. C (2008). The Alabama Preterm Birth Study: umbilical cord blood Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis cultures in very preterm newborn infants. *American journal of obstetrics and gynecology*, 198(1), 43-e1.

Graterol, H., Amaíz, L., Torquati, E. y Cotreras L (2007). Determinación y Caracterización Parcial DE Proteasas Obtenidas del Fruto Thevetia ahouai (L.). A.DC. *Faraute Ciens. y Tec.*, 2(2).: 16-25.

Grau, O., Kovacic, R., Griffais, R., & Montagnier, L (1993). Development of a selective and sensitive polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma pirum. *FEMS Microbiology Letters*, 106(3), 327-333.

Gullsby, K., Storm, M., & Bondeson, K (2008). Simultaneous detection of Chlamydomydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 46(2), 727-731.

Hahn, D. L., Azenabor, A. A., Beatty, W. L., & Byrne, G. I (2002). Chlamydia pneumoniae as a respiratory pathogen. *Front Biosci*, 7(1), 66-76.

Ieven, M., Ursi, D., Van Bever, H., Quint, W., Niesters, H. G. M., & Goossens, H (1996). Detection of Mycoplasma pneumoniae by two polymerase chain



reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *Journal of infectious diseases*, 173(6), 1445-1452.

Kuo, C. C., Jackson, L. A., Campbell, L. A., & Grayston, J. T (1995). Chlamydia pneumoniae (TWAR). *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 451-461.

Khanna, M., Fan, J., Pehler-Harrington, K., Waters, C., Douglass, P., Stallock, J., & Henrickson, K. J. (2005). The pneumoplex assays, a multiplex PCR-enzyme hybridization assay that allows simultaneous detection of five organisms, *Mycoplasma pneumoniae*, Chlamydia (*Chlamydophila*) pneumoniae, Legionella pneumophila, Legionella micdadei, and Bordetella pertussis, and its real-time counterpart. *Journal of clinical microbiology*, 43(2), 565-571.

Levisohn, S., & Kleven, S. H (2000). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, 19(2), 425-434.

Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P., Osta, R., & Rodellar, C (2016). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Revista AquaTIC*, (15).

Menéndez, R., Torres, A., Aspa, J., Capelastegui, A., Prat, C., & Rodríguez de Castro, F. (2010). Neumonía adquirida en la comunidad. Nueva normativa de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). *Archivos de bronconeumología*, 46(10), 543-558.



Morozumi, M., Nakayama, E., Iwata, S., Aoki, Y., Hasegawa, K., Kobayashi, R., ... & Acute Respiratory Diseases Study Group. (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.

Narita, M (2009). Pathogenesis of neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Pediatric neurology*, 41(3), 159-166.

Pelkonen, S., Lindahl, S. B., Suomala, P., Karhukorpi, J., Vuorinen, S., Koivula, I., ... & Tuuminen, T (2013). Transmission of *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus infection from horses to humans. *Emerging infectious diseases*, 19(7), 1041.

Pereyre, S., Renaudin, H., Touati, A., Charron, A., Peuchant, O., Hassen, A. B., ... & Bébéar, C. M (2010). Detection and susceptibility testing of *Mycoplasma amphoriforme* isolates from patients with respiratory tract infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(7), 1007-1009.

Pitcher, D. G., Windsor, D., Windsor, H., Bradbury, J. M., Yavari, C., Jensen, J. S., ... & Webster, D (2005). *Mycoplasma amphoriforme* sp. nov., isolated from a patient with chronic bronchopneumonia. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(6), 2589-2594.



Rodríguez Sánchez, I. P., & Barrera Saldaña, H. A (2004). La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*, 7(3).

Sánchez, A. M. B., Rojas, A. D. V., & Lugo, P. J. G (2014). PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Avances en Biomedicina*, 3(1), 25-33.

Silva-Zacarias, F. G. D., Alfieri, A. A., Spohr, K. A. H., Lima, B. A. D. C., Negrão, F. J., Lunardi, M., & Freitas, J. C. D (2009). Validation of a PCR assay for *Chlamydomytila abortus* rRNA gene detection in a murine model. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(SPE), 99-106.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*, 2(2), 70-78.

Taboada, L. B., Castro, A. L. L., Caicedo, M. P., Camargo, C. B., & Roa, J. H. (2015). Etiología de la neumonía adquirida en la comunidad en un hospital de cuarto nivel en Bogotá: estudio descriptivo de un registro institucional durante los años 2007 a 2012. *Infectio*, 19(1), 10-17.

Templeton, K. E., Scheltinga, S. A., Graffelman, A. W., van Schie, J. M., Crielaard, J. W., Sillekens, P., ... & Claas, E. C (2003). Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification,



conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4366-4371.

Verkooyen, R. P., Willemse, D., Hiep-van Casteren, S. C. A. M., Joulandan, S. M., Snijder, R. J., Van den Bosch, J. M. M., ... & Verbrugh, H. A (1998). Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *Journal of clinical microbiology*, 36(8), 2301-2307.

Villegas, E., Sorlózano, A., Camacho, A., & Gutiérrez, J (2008). *Chlamydia pneumoniae*: desde su proteómica hasta la arteriosclerosis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 26(10), 629-637.

Vorimore, F., Hsia, R. C., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., ... & Laroucau, K (2013). Isolation of a new *Chlamydia* species from the feral sacred ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS One*, 8(9), e74823.



IX. ANEXOS

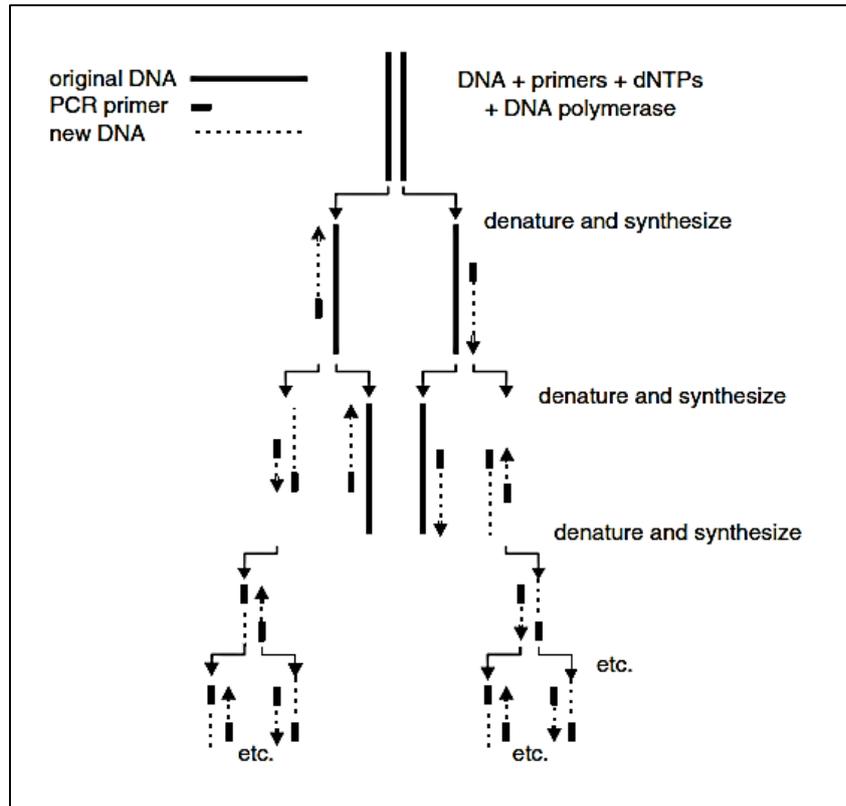


Figura 1. Base teórica de la reacción en cadena de la polimerasa (Coen, 2011).

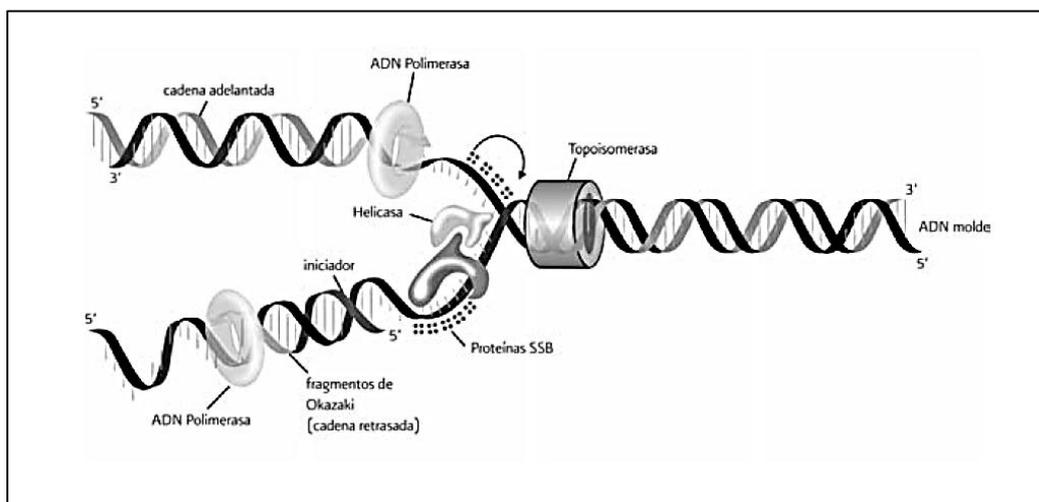


Figura 2. Esquema gráfico de la autoreplicación del DNA en células (Días, 2008).

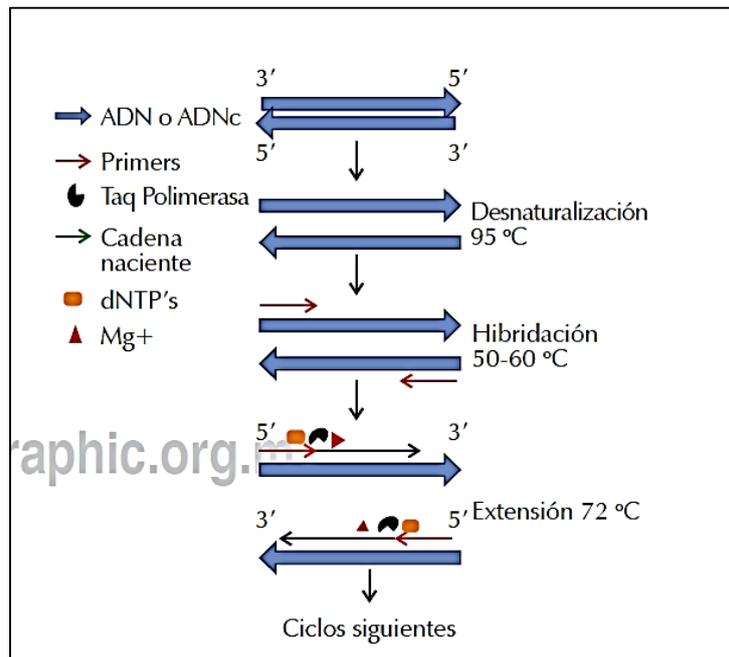


Figura 3. Etapas dentro de un ciclo de la reacción en cadena de la polimerasa (Cortazar & Silva, 2004).

Tabla 1. Composición y características de los Primers sintetizados para *P. pneumoniae* y *C. pneumoniae*.

Iniciador	Longitud	%GC	Tm	Masa (nmol)
M. pneu Morz F	21	42.9	58.7	174.7
M. pneu Morz R	21	42.9	58.7	170.6
C. pneu Morz F	21	38.1	56.7	162.3
C. pneu Morz R	21	42.9	58.7	158.8
M. pneu Kha F	22	36.4	57.1	147.8
M. pneu Kha R	30	46.7	67.4	171.6
C. pneu Kha F	20	50	60.4	165.2
C. pneu Kha R	21	28.6	52.8	189.6



Tabla 2. Iniciadores empleados en la estandarización de la técnica de PCR

AUTOR	BACTERIA	INICIADOR	SECUENCIA	PROD.
Morozumi	Mycoplasma	MycMorzF	5'- GTAATACTTTAGAGGCGAACG -3'	225pb
Morozumi	Mycoplasma	MycMorzR	5'- TACTTCTCAGCATAGCTACAC- 3'	
Morozumi	Chlamydophila	ChIMorzF	5'- TGACAACGTAGAAATACAGC- 3'	248 pb
Morozumi	Chlamydophila	ChIMorzR	5'- CTGTACTAACCATTGTAGCAC- 3'	
Khana	Mycoplasma	MycKhaF	5'- GTTATGGAAACATAATGGAGG T-3'	241 pb
Khana	Mycoplasma	MycKhaR	5'- TACAAGCTGGCGACTGTTTGT ATTGGCCAT-3'	
Khana	Chlamydophila	ChIKhaF	5'- AGGGCTATAAAGGCGTTGCT- 3'	232 pb
Khana	Chlamydophila	ChIKhaR	5'- GTTAAGTTTAAAACAGCTGTA- 3'	



Tabla 3. Concentraciones de los componentes en la preparación de la mezcla de reacción

Componentes	Conc _i	Vol _i	Conc _F
Agua Ultra pura	-	6.5μL	-
2X Kappa 2G Fast	2X	10μL	X
Iniciador Sentido	10uM	0.5μL	250nM
Iniciador Anti sentido	10uM	0.5μL	250nM
DNA	¿?μg/μL	2.5μL	-

Tabla 4. Parámetros predeterminados de la reacción de PCR

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación	95°C	3min	1
Denaturación	95°C	30s	
Hibridación	55°C	30s	40
Elongación	72°C	15s	
Elongación final	72°C	10min	1



Anexo 1: Protocolo de Extracción de DNA de bacterias por columna.

Extracción:

- Se preparó un termobloque a 55°C (Modificado de 50°C).
- Se centrifugó la muestra de hisopado nasofaríngeo eliminando el sobrenadante y tomando 200µL.
- Se agregó 180uL de buffer de digestión. Seguidamente se agregó 20uL de Proteinasa K para lisar las células. Se mezcló por agitación.
- Se incubó el tubo a 55°C con agitación ocasional durante 1 hora (modificado de 10min).
- Se agregó 20uL de RNAasa, se mezcló por agitación y se incubó a temperatura ambiente por 10min (modificado de 1min).
- Se agregó 200µL de Buffer de lisis y se mezcló bien por agitación hasta obtener una mezcla homogénea (Se modificó calentando previamente el buffer de lisis a 30°C).
- Se agregó 200µL 96-100% etanol al lisado. Se mezcló bien por agitación por 5s hasta homogenizar (Se modificó agregando etanol a 8°C).
- Se procedió a la unión del DNA.

Purificación:

- Se transfirió la mezcla a las columnas de purificación.
- Se centrifugó a 10000rpm por 1 min, cambiando el tubo de colección.
- Se agregó a la columna 500uL del buffer de lavado 1.
- Se centrifugó a 10000rpm por 1min, se cambió nuevamente el tubo de colección.



- Se agregó a la columna 500uL de buffer de lavado 2.
- Se centrifugó a 14000rpm por 3min, se cambió nuevamente el tubo de colección.
- Se pasó la columna a un tubo de 1.5mL, eluyó en 100μL del buffer.
- Se centrifugó a 10000rpm por 1 min, se separó el tubo y se almacenó el DNA eluído a -20°C.