



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DISEÑO Y ESTANDARIZACIÓN DE UN ENSAYO DE qPCR
MÚLTIPLE PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS DE
IMPORTANCIA RESPIRATORIA, EMPLEANDO LA TECNOLOGÍA
DE ARREGLOS DINÁMICOS DE NANOFUIDOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:
RODRIGO HERNÁN CORONEL TÉLLEZ**



**DIRECTOR DE TESIS: DR. JOEL ARMANDO VÁZQUEZ PÉREZ
ASESORA DE TESIS: DRA. MARTHA LEGORRETA HERRERA**

MÉXICO, D.F. JULIO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres:

*Por su apoyo incondicional, su inmenso amor,
sus valiosas enseñanzas y sus alegres locuras.*

A mi familia:

Por su confianza, comprensión, cariño y apoyo.

A mis amigos:

*Por tantos momentos de enorme felicidad
y disfrutar la hermosa vida juntos.*

A la U.N.A.M.:

*Por ser una fuente de conocimientos invaluable
y la cuna de mi pasión por la ciencia.*

A mi director de tesis:

Por sus enseñanzas, consejos, paciencia y apoyo.

A la Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del D.F.

proyecto PICTA 12-164

por el apoyo financiero para llevar a cabo este trabajo de tesis.

CONTENIDO

1.	RESUMEN	7
2.	INTRODUCCIÓN	9
3.	ANTECEDENTES	11
3.1.	Definición y epidemiología de las IRAs	11
3.1.1.	Panorama global	11
3.1.2.	Panorama nacional	15
3.2.	Clasificación de las IRAs	17
3.2.1.	Infecciones respiratorias del tracto superior	17
3.2.2.	Infecciones respiratorias del tracto inferior	18
3.3.	Etiología de las IRAs	18
3.3.1.	Infecciones respiratorias del tracto superior	19
3.3.2.	Infecciones respiratorias del tracto inferior	20
3.3.3.	Bacterias causantes de IRAs	21
3.3.3.1.	<i>Bordetella pertussis</i>	21
3.3.3.2.	<i>Bordetella parapertussis</i>	24
3.3.3.3.	<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	24
3.3.3.4.	<i>Chlamydophila psittaci</i>	26
3.3.3.5.	<i>Haemophilus influenzae</i>	27
3.3.3.6.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29
3.3.3.7.	<i>Legionella pneumophila</i>	31
3.3.3.8.	<i>Moraxella catarrhalis</i>	32
3.3.3.9.	Complejo MTB	34
3.3.3.10.	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	36
3.3.3.11.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3.3.3.12.	<i>Staphylococcus aureus</i>	40
3.3.3.13.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	41
3.4.	Diagnóstico de agentes causantes de IRAs	43
3.4.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	46
3.4.2.	PCR en tiempo real (qPCR)	50
3.4.2.1.	Ventajas de la qPCR	55

3.4.2.2.	Aplicaciones de la qPCR en microbiología clínica	55
3.4.3.	qPCR empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos	50
4.	JUSTIFICACIÓN	58
5.	OBJETIVOS	59
5.1.	Objetivo general	59
5.2.	Objetivos específicos	59
6.	TIPO DE ESTUDIO	60
7.	MATERIAL	60
7.1.	Material biológico	60
7.2.	Reactivos y soluciones	60
7.3.	Equipos	61
8.	METODOLOGÍA	62
8.1.	Diseño de iniciadores	62
8.2.	Delimitación de grupos de estudio	63
8.3.	Obtención de muestra	64
8.4.	Extracción de ácidos nucleicos	64
8.5.	Evaluación de especificidad de los iniciadores diseñados	65
8.6.	Estandarización de condiciones de la qPCR múltiple. Evaluación de pool de iniciadores	68
8.6.1.	Pre-amplificación y amplificación en tiempo real de controles bacterianos	68
8.6.2.	Pre-amplificación con pool de iniciadores a distintas concentraciones y con distintos kits de PCR y amplificación en tiempo real	71
8.7.	Estandarización de condiciones para qPCR múltiple empleando el equipo BioMark™	75
8.7.1.	Preparación de soluciones de pares de iniciadores	75
8.7.2.	Evaluación de condiciones de pre-amplificación empleando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 500 STA 10X	75
8.7.2.1.	Pre-amplificación	76
8.7.2.2.	Preparación de soluciones de reacción	78
8.7.2.3.	Carga del IFC 48.48 Gene Expression	79
8.7.2.4.	qPCR múltiple en el equipo Biomark™	81

8.7.3.	Evaluación de condiciones de pre-amplificación empleando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones	79
8.8.	Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™	84
8.9.	Detección de bacterias respiratorias en muestras clínicas mediante qPCR múltiple en el equipo BioMark™	85
8.10.	Caracterización de bacterias respiratorias mediante secuenciación Sanger	85
9.	RESULTADOS	88
9.1.	Diseño de iniciadores	88
9.2.	Extracción de ácidos nucleicos	89
9.3.	Estandarización de amplificación para cada par de iniciadores y evaluación de especificidad	89
9.4.	Estandarización de condiciones de la qPCR múltiple. Evaluación de pool de iniciadores	102
9.5.	Pruebas de estandarización en el equipo Biomark™ evaluando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 500 STA 10X	112
9.6.	Estandarización en el equipo Biomark™ evaluando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones	117
9.7.	Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™	124
9.8.	Detección de bacterias respiratorias en muestras clínicas mediante qPCR múltiple en el equipo BioMark™	128
9.9.	Caracterización de bacterias respiratorias mediante secuenciación Sanger	132
10.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	135
10.1.	Diseño de iniciadores	135
10.2.	Extracción de ácidos nucleicos	135
10.3.	Estandarización de amplificación para cada par de iniciadores y evaluación de especificidad	136
10.4.	Estandarización de condiciones para qPCR múltiple. Evaluación de	

	pool de iniciadores	139
10.5.	Estandarización de qPCR múltiple en el equipo BioMark™ evaluando distintos kits de PCR y el pool de iniciadores a distintas concentraciones	140
10.6.	Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™	142
10.7.	Detección de bacterias respiratorias en muestras clínicas mediante qPCR múltiple en el equipo BioMark™	143
10.8.	Caracterización de bacterias respiratorias mediante secuenciación Sanger	144
11.	CONCLUSIONES	146
12.	PERSPECTIVAS	148
13.	TABLA DE FIGURAS	149
14.	REFERENCIAS	152

1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue diseñar y estandarizar un método molecular novedoso para la detección rápida y confiable de las principales bacterias causantes de infección respiratoria aguda (IRA).

En la actualidad, las infecciones respiratorias bacterianas se mantienen como uno de los problemas sanitarios con mayor morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en niños, adultos mayores y personas de escasos recursos, produciendo cuadros severos y crónicos. A pesar de la importancia de realizar una detección oportuna y confiable de las principales bacterias respiratorias, muchos centros de atención médica continúan empleando técnicas tradicionales como el cultivo o la microscopía para la detección de éstos agentes infecciosos a pesar de sus numerosas desventajas: lentitud, baja precisión, baja sensibilidad, subjetividad, etc. Por estas razones es necesario diseñar e implementar nuevos métodos que sean confiables y eficientes para detectar a las principales bacterias de importancia respiratoria. De los métodos moleculares actuales para la detección de patógenos bacterianos, se empleó la PCR en tiempo real (qPCR) debido a su eficiencia, versatilidad, confiabilidad y sencillez.

En este trabajo se diseñaron iniciadores específicos para la detección de las especies bacterianas *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, Complejo MTB, *Mycoplasma pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Posteriormente se emplearon controles bacterianos y muestras clínicas con el fin de obtener las condiciones óptimas para el uso de los iniciadores diseñados en una reacción de qPCR múltiple, se analizaron distintos kits de PCR y mezclas de los iniciadores a distintas concentraciones. Una vez obtenidas las condiciones óptimas, se detectaron con el equipo BioMark™, que integra la tecnología de nanofluidos, las principales bacterias de importancia respiratoria en 100 pacientes con IRA ingresados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y clasificados según su edad y previa detección a virus respiratorios. Las principales bacterias detectadas en pacientes <15 años fueron *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *M. pneumoniae*. Mientras que en pacientes ≥15 años las principales bacterias detectadas fueron *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *M. catarrhalis* y *P. aeruginosa*. En un estudio complementario se observó que las co-infecciones bacterianas presentan a la especie *S. pneumoniae* como el agente más frecuentemente asociado a otras bacterias respiratorias, mientras que en las infecciones bacterianas-virales, los géneros virales Enterovirus/Rinovirus fueron los más frecuentemente asociados a bacterias respiratorias. Adicionalmente, se determinó el límite de

detección de éste método y se caracterizaron aquellas bacterias detectadas que no contaban con un control positivo mediante secuenciación Sanger.

Este trabajo cumplió con los objetivos planteados al haber logrado diseñar y estandarizar un método molecular capaz de detectar a las principales bacterias de importancia respiratoria de una manera eficiente y confiable. Actualmente es imperativo el diseño e implementación de nuevas tecnologías y metodologías para el diagnóstico de agentes infecciosos con el fin de mejorar la calidad de vida de las personas afectadas y generar nuevo conocimiento microbiológico y molecular

2. INTRODUCCIÓN

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) son las enfermedades infecciosas más comunes en los seres humanos y se mantienen como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo, especialmente en niños y adultos mayores en países en desarrollo; la neumonía por sí sola causa alrededor de dos millones de muertes a nivel mundial en niños menores de cinco años, convirtiéndola en la principal causa de muerte en este grupo etario. En México, estas enfermedades son un problema importante de salud pública debido a su alta morbilidad y mortalidad y a las considerables deficiencias en su diagnóstico y tratamiento.

Las IRAs pueden clasificarse como infecciones del tracto respiratorio superior o inferior, dependiendo de las vías aéreas involucradas y sus agentes etiológicos principalmente son diversos virus, aunque las bacterias también juegan un papel importante, capaces de desarrollar cuadros clínicos severos y crónicos.

Los signos y síntomas producidos por algunas bacterias respiratorias suelen ser característicos, pero en muchos otros casos, las manifestaciones clínicas se superponen y la exploración clínica no es suficiente para un diagnóstico preciso. Por tal razón, se requieren métodos de diagnóstico como el cultivo, microscopia, serología y pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la obtención de resultados más confiables.

De los métodos mencionados, la PCR es por mucho la técnica que presenta mayores ventajas respecto a las demás, al ser la más rápida, precisa, sensible y eficiente al momento de trabajar con un gran número de muestras clínicas. La posibilidad de implementar esta técnica de forma múltiple, la hace ideal para análisis rápidos, robustos y confiables.

En el presente trabajo se diseñó y estandarizó un método de PCR en tiempo real (qPCR) empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos, con el fin de detectar las principales bacterias de importancia respiratoria en pacientes ingresados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) diagnosticados con infección respiratoria aguda.

Se diseñaron y evaluaron un total de 32 iniciadores para la amplificación de 16 blancos genómicos específicos de distintos géneros y especies bacterianas. Con estos iniciadores, se estandarizaron las condiciones ideales para emplearlos en la qPCR múltiple que integra la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos. Una vez

estandarizadas las condiciones ideales de la qPCR múltiple, se analizaron 100 muestras clínicas correspondientes a pacientes ingresados en el INER diagnosticados con IRA y clasificados en cuatro grupos distintos según su edad y previa detección de virus respiratorios. Se detectaron las principales bacterias respiratorias de importancia en cada grupo de pacientes, así como las co-infecciones bacterianas y bacterianas-virales más frecuentes. Por último, se caracterizaron mediante secuenciación de Sanger, aquellas bacterias detectadas que no contaban con un control de referencia inicial para su completa identificación.

3. ANTECEDENTES

3.1. Definición y epidemiología de las IRAs

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs) se definen como el conjunto de enfermedades transmisibles del aparato respiratorio, generalmente de etiología viral o bacteriana, que pueden producir un espectro que comprende desde infecciones asintomáticas o leves como el resfriado común, hasta enfermedades graves y fatales como la neumonía, dependiendo del patógeno causante, factores ambientales y del huésped; con evolución menor a 15 días y con la presencia de uno o más síntomas o signos clínicos como tos, rinorrea, obstrucción nasal, odinofagia, otalgia, disfonía, respiración ruidosa, dificultad respiratoria, los cuales pueden estar o no acompañados de fiebre (1, 2).

Las IRAs son un enorme problema de salud pública a nivel mundial y nacional, manteniéndose como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, principalmente en niños y adultos mayores, además de su alto impacto en países en vías de desarrollo. Su prevalencia y gravedad se ven aumentadas por diversos factores: socio-económicos (acceso a centros de salud, incapacidad de solventar tratamiento, incumplimiento de medidas preventivas, etc.), médicos (diagnóstico impreciso, tratamiento inadecuado o tardío, etc.) e infecciosos (identificación de nuevos agentes patógenos y desarrollo de resistencia a antibióticos).

Mientras que los agentes bacterianos o virales causantes de IRAs son específicos en cada caso, los factores subyacentes son frecuentemente los mismos y pueden incluir mala nutrición, contaminación, hacinamiento y tabaquismo. La pobreza también es un factor de riesgo, lo cual se evidencia en el desproporcionado impacto de las IRAs en los países en desarrollo y poblaciones vulnerables: el rango de muerte por neumonía es 215 veces mayor en países con bajo desarrollo económico que en países con alto desarrollo económico (3).

3.1.1. Panorama global

Las IRAs constituyen las enfermedades infecciosas más frecuentes del ser humano, producen alrededor de 4.25 millones de muertes a nivel mundial cada año, 1.65 millones de muertes en adultos mayores de 60 años y más de medio millón de muertes en personas entre 15 y 59 años de edad (3).

Tabla 1. Las diez causas principales de muerte a nivel mundial

Causa	Porcentaje de muertes totales
1. Enfermedad cardíaca isquémica	12.2%
2. Enfermedad cerebrovascular	9.7%
3. Infecciones respiratorias del tracto inferior	7.1%
4. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	5.1%
5. Enfermedades diarreicas	3.7%
6. VIH/SIDA	3.5%
7. Tuberculosis	2.5%
8. Cáncer de tráquea, bronquio o pulmón	2.3%
9. Accidentes de tráfico	2.2%
10. Bajo peso al nacer o nacimiento prematuro	2%

Modificado de World Lung Foundation. Acute Respiratory Infections Atlas

Tabla 2. Las diez causas principales de muerte en países en desarrollo

Causa	Porcentaje de muertes totales
1. Infecciones respiratorias del tracto inferior	11.2%
2. Enfermedad cardíaca isquémica	9.4%
3. Enfermedades diarreicas	6.9%
4. VIH/SIDA	5.7%
5. Enfermedad cerebrovascular	5.6%
6. Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	3.6%
7. Tuberculosis	3.5%
8. Infecciones neonatales	3.4%
9. Malaria	3.3%
10. Bajo peso al nacer o nacimiento prematuro	3.2%

Modificado de World Lung Foundation. Acute Respiratory Infections Atlas

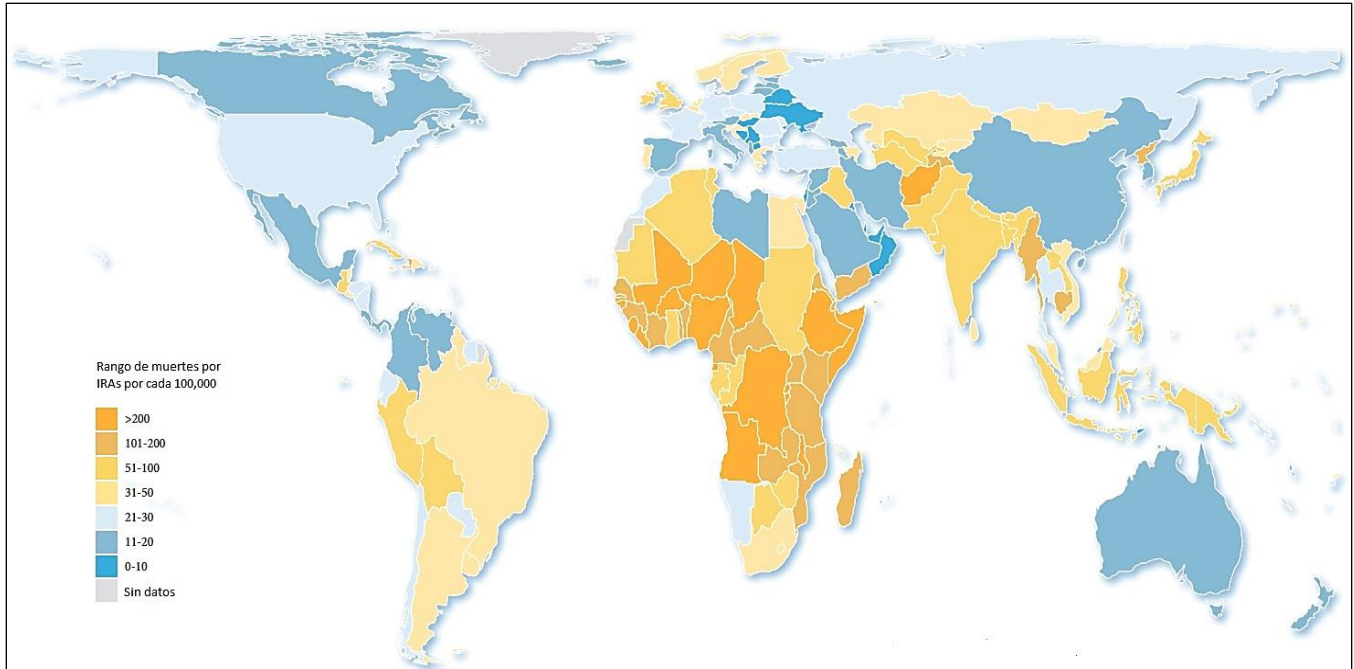


Figura 1. Distribución de muertes por IRAs a nivel mundial
 Modificado de World Lung Foundation. *Acute Respiratory Infections Atlas*

Las IRAs son la principal causa de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años de edad (figura 2). Cada año se presentan alrededor de 156 millones de nuevos episodios de neumonía en menores de cinco años a nivel mundial, más del 95% de estos episodios se presentan en países en desarrollo. De todos estos casos, 8.7% son suficientemente severos para requerir admisión hospitalaria. Se estima que se producen 1.4-2.2 millones de muertes por neumonía anualmente en niños menores de cinco años de edad a nivel mundial (alrededor del 20% de todas las muertes), principalmente en las regiones africanas y del sureste asiático (figura 3 y 4)(4-7). De igual manera, las IRAs son la principal causa de asistencia hospitalaria en el mundo.

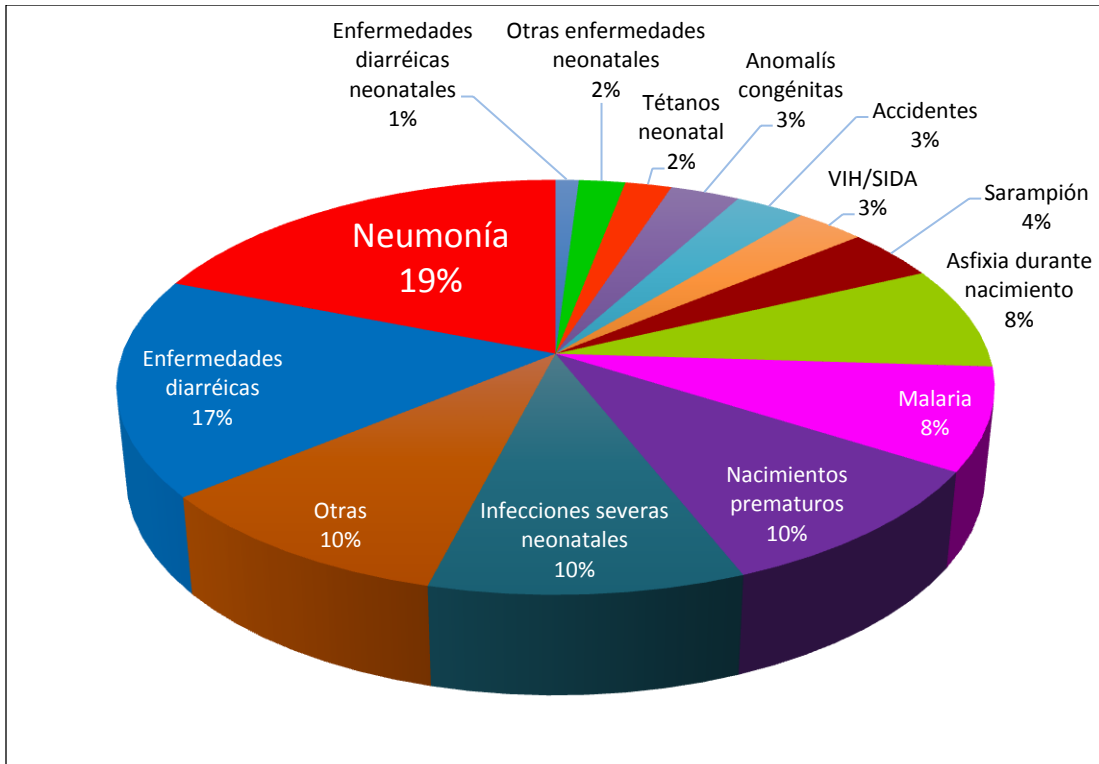


Figura 2. Principales causas de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial
 Modificado de: World Lung Foundation. Acute Respiratory Infections Atlas

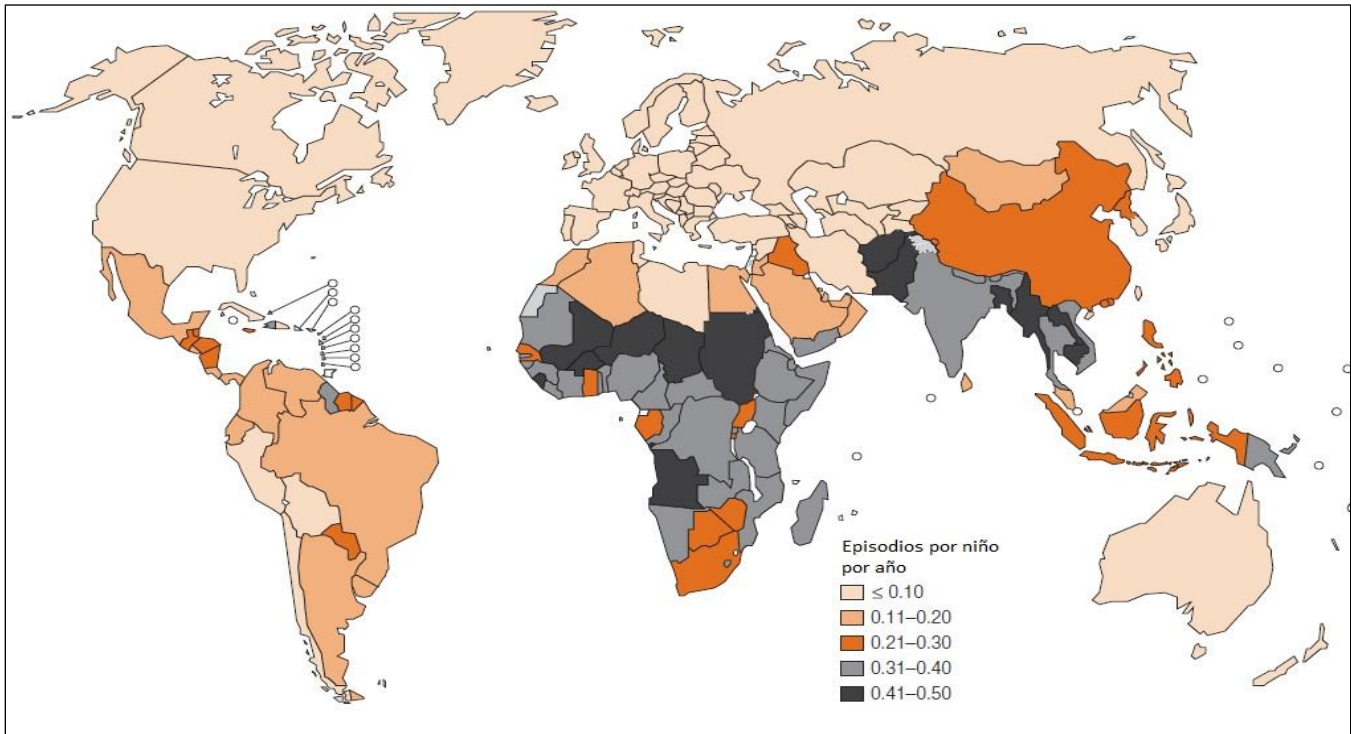


Figura 3. Incidencia de neumonía en niños por país
 Modificado de Epidemiology and etiology of childhood pneumonia, Rudan I.

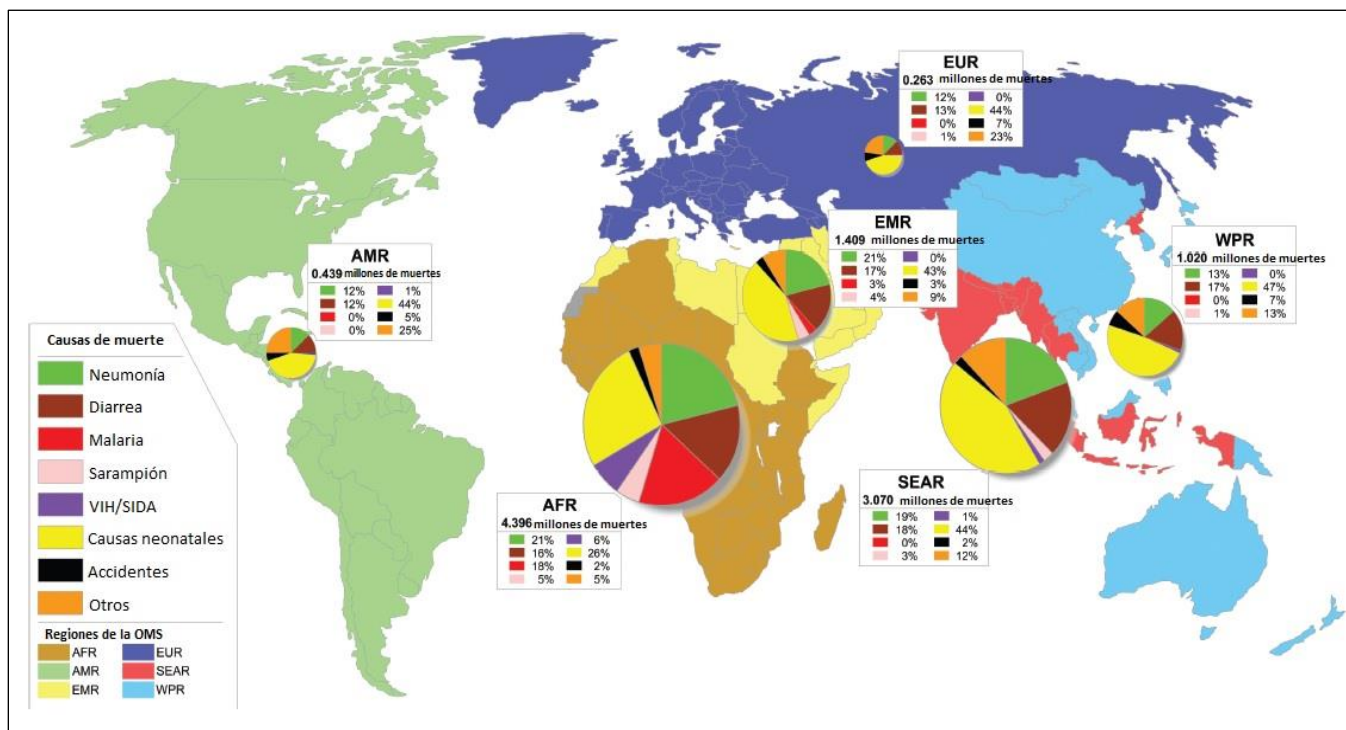


Figura 4. Distribución de muertes por neumonía y otras causas en niños menores de cinco años por región de la OMS
 AFR, Región Africana; AMR, Región de las Américas; EMR, Región Oriental Mediterránea; EUR, Región Europea; SEAR, Región del Sureste de Asia; WPR Región Occidental del Pacífico.
Modificado de Epidemiology and etiology of childhood pneumonia, Rudan I.

3.1.2. Panorama nacional

En México, las principales causas de morbilidad a todas las edades son las relacionadas a IRAs, reportándose anualmente cerca de 27 millones de infecciones, cerca de la mitad de éstas en menores de diez años de edad (8).

Se estima que tres de cada cuatro consultas que se otorgan en los servicios de salud para atender enfermedades infecciosas, corresponden a padecimientos respiratorios agudos. El 90% de los casos que se notifican afectan vías respiratorias superiores y solamente el 10% a vías respiratorias inferiores, como en el caso de la neumonía y bronconeumonía. Las IRAs se ubican entre las diez principales causas de muerte en la población general y dentro de las tres primeras causas de muerte entre los menores de cinco años. La mayor incidencia y letalidad de las IRAs se presenta en el grupo infantil y preescolar, en el que la neumonía es responsable del 85% de las defunciones (9).

En México, las IRAs constituyen la primera causa de morbilidad e ingreso hospitalario en los menores de cinco años de edad, con una frecuencia de 13 episodios por cada 100 consultas médicas. Asimismo, ocurren entre dos y cuatro episodios de IRA al año por niño, aquellas de origen viral representan un alto porcentaje de la consulta y hospitalización. Una proporción de estas infecciones puede complicarse con neumonía grave (9, 10).

Hasta el año 2012, se ha logrado disminuir la mortalidad por neumonías en un 80% en relación a la tasa de 1990 gracias a intervenciones costo-efectivas como la introducción de las vacunas antineumocócica y Hib (*Haemophilus influenza* tipo b) en el esquema básico de inmunizaciones, suministración de micronutrientes como la Vitamina A en Semanas Nacionales de Salud, además de favorecer las medidas preventivas (lavado de manos, alimentación adecuada y la promoción de lactancia materna). Sin embargo, vemos contrastes en la expresión de la morbilidad y mortalidad por infecciones respiratorias agudas entre las entidades federativas, en donde se ha identificado mayor vulnerabilidad relacionada a falla en la identificación de signos de alarma y factores de mal pronóstico, diagnósticos tardíos, tratamientos innecesarios o inoportunos en lo relacionado a antimicrobianos, con las consecuentes complicaciones e incremento de la mortalidad (2).

En 2010, se presentaron un total de 2,377 muertes debido a IRAs en menores de cinco años a nivel nacional, lo que representó un descenso en la tasa de mortalidad en este grupo poblacional a causa de esta enfermedad de un 12.17%, durante el periodo 2000 a 2010 (figura 5)(2).

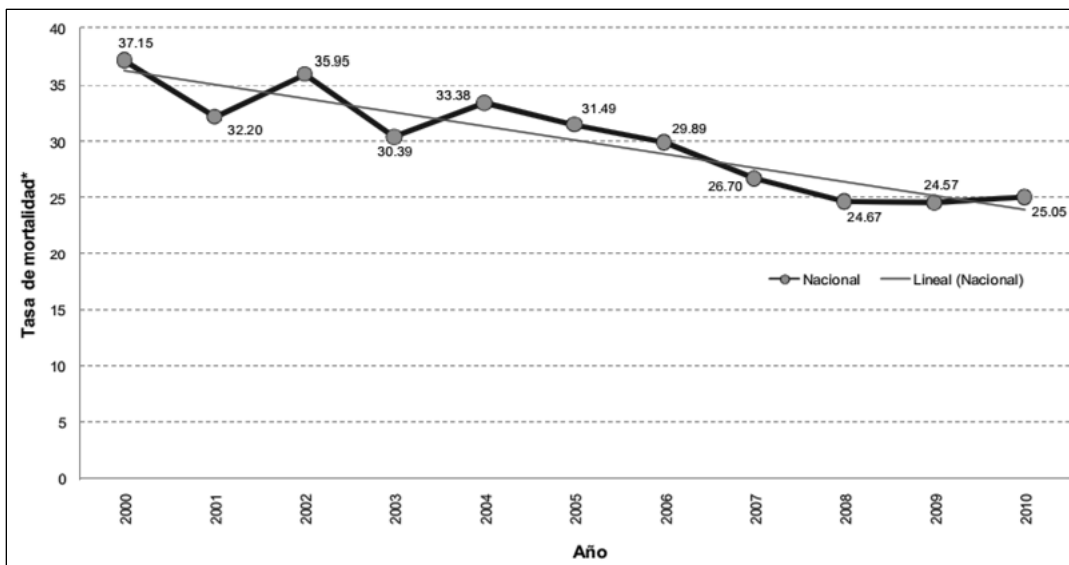


Figura 5. Tasa de mortalidad en menores de cinco años por IRAs; México 2000-2010.

*Tasa observada por 100,000 menores de cinco años. Fuente: *Manual de Enfermedades Respiratorias 2012 Prevención, diagnóstico y tratamiento*

A pesar de la disminución en la mortalidad a causa de IRAs en menores de cinco años comentada en líneas previas, esta patología se ubica actualmente dentro de las tres principales causas de muerte en este grupo de edad. En 2010, la media de las defunciones a nivel nacional fue de aproximadamente 14.63 muertes por 100 mil menores de cinco años (2).

3.2. Clasificación de las IRAs

Las infecciones respiratorias agudas se clasifican como Infecciones Respiratorias del Tracto Superior (IRTS) e Infecciones Respiratorias del Tracto Inferior (IRTI) dependiendo de las vías aéreas involucradas. El tracto respiratorio superior consiste en las vías aéreas desde las fosas nasales hasta las cuerdas vocales en la laringe, incluyendo los senos paranasales y el oído medio. El tracto respiratorio inferior incluye la continuación de las vías aéreas desde la tráquea y los bronquios hasta los bronquiolos y alveolos. Las IRAs no están confinadas al tracto respiratorio y pueden tener efectos sistémicos debido a la posible extensión de la infección o de las toxinas microbianas, a la inflamación y a la función pulmonar reducida (11).

3.2.1. Infecciones Respiratorias del Tracto Superior

Las IRTS son las enfermedades infecciosas más comunes en el ser humano. Éstas incluyen a la rinitis (resfriado común), sinusitis, infecciones del oído, faringitis aguda, epiglotitis y laringitis; de las cuales, las infecciones del oído y la faringitis causan las complicaciones más severas (sordera y fiebre reumática aguda, respectivamente). La gran mayoría de las IRTS tienen una etiología viral, mientras que las bacterias son menos frecuentes. Debido a que las IRTS son auto-limitadas, sus complicaciones son más importantes que la infección. Las infecciones agudas virales predisponen a los infantes a infecciones en los senos nasales y en el oído medio, asimismo, la aspiración de secreciones y células infectadas pueden resultar en una infección del tracto respiratorio inferior (11).

La mayoría de las IRTS suelen desarrollarse con una baja severidad y en un período de tiempo corto, y son atendidas por lo general de forma ambulatoria o por médicos familiares; y aunque la mayoría de estas infecciones tienen una etiología viral, un alto porcentaje son tratadas con antibióticos (12). Aunque pueden producir enfermedad grave, por lo general estas infecciones son leves y su importancia radica en la alta incidencia a todas las edades y el riesgo de complicaciones. En niños menores de 5 años de edad se pueden

presentar de 3 a 11 episodios de IRTS por año y son más frecuentes en el primer año de vida. En los adultos disminuye esta incidencia a la mitad (8).

Por lo general este tipo de infecciones tienen predominio estacional a finales de otoño, invierno y a principios de primavera. Esta relación se explica por varios factores, todos ellos relacionados con el clima frío de estas fechas, así como la mayor convivencia con personas enfermas y la disminución de la temperatura en el epitelio nasal, que inhibe las defensas respiratorias contra la infección como el aclaramiento mucociliar y la actividad fagocítica de los leucocitos (8).

3.2.2. Infecciones Respiratorias del Tracto Inferior

Las IRTI son un problema de salud pública persistente y profundo. Éstas producen una mayor carga de enfermedad a nivel mundial que la infección por VIH, la malaria, el cáncer o los ataques al corazón y producen una mayor morbilidad y mortalidad que cualquier otra infección. Ha habido poco cambio en la mortalidad debida a IRTI durante más de cinco décadas. La evolución de una IRTI depende de la virulencia del microorganismo y la respuesta inflamatoria del pulmón (13).

Las IRTI más comunes en los niños son la neumonía y la bronquiolitis (11). La neumonía no tiene solamente un efecto inmediato durante la infancia, también puede producir función pulmonar alterada en la adultez. Un estudio publicado por Nair, *et al*, reporta que en el año 2010 se presentaron alrededor de 12 millones de admisiones por ALRI severa y tres millones por ALRI muy severa; 96% de estos episodios fueron en países en desarrollo. Sin embargo, aunque el 62% de los niños con ALRI severa fueron admitidos en un hospital, 81% de las muertes ocurrieron fuera del hospital, con casi 99% de las muertes en países en desarrollo (14).

3.3. Etiología de las IRAs

Los virus respiratorios son los agentes causantes más frecuentes de IRAs, siendo responsables de aproximadamente 75% de ellas (15), mientras que las bacterias por lo general son menos prevalentes. Sin embargo, éstas últimas frecuentemente dan lugar a infecciones crónicas importantes y la presentación de cuadros clínicos severos.

A continuación se mencionan los principales microorganismos causantes de IRAs:

3.3.1. Infecciones respiratorias del tracto superior (IRTS)

Los virus más predominantes en niños son: virus sincitial respiratorio (VSR), rinovirus (RV), virus parainfluenza (VPI), virus influenza (VI), enterovirus (EV), adenovirus (AV), metapneumovirus humano (MPVh) y coronavirus humano (CVh) (16, 17). Mientras que en adultos, los virus más comúnmente detectados son: VSR, RV, VI, VPI y CVh (3, 18).

Por otro lado, las especies bacterianas más frecuentes en niños y adultos son: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus* (19, 20).

A continuación se presenta una tabla que relaciona las IRTS más importantes con sus agentes etiológicos más frecuentes:

Tabla 3. Principales agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias agudas del tracto superior

Enfermedad respiratoria	Agentes etiológicos	Enfermedad respiratoria	Agentes etiológicos
Resfriado común	Rinovirus (50%) Virus influenza (10-30%) Coronavirus (10-15%) Virus sincitial respiratorio (5%) Virus parainfluenza (5%) <i>Streptococcus pyogenes</i>	Otitis	Virus sincitial respiratorio Virus influenza Virus parainfluenza Enterovirus Rinovirus <i>S. pneumoniae</i> (38%) <i>Haemophilus influenzae</i> (27%) <i>Moraxella catarrhalis</i> (10%) <i>S. pyogenes</i> (3%) <i>Staphylococcus aureus</i> (2%)
Faringitis	Rinovirus (5%) Coronavirus (5%) Adenovirus (4%) Virus influenza Virus parainfluenza <i>S. pyogenes</i> (15-30%) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Sinusitis	Rinovirus (15%) Virus influenza (5%) Virus parainfluenza (3%) <i>S. pneumoniae</i> (30-40%) <i>H. influenzae</i> (20%) <i>M. catarrhalis</i> (8-20%) <i>S. aureus</i> (4%) <i>S. pyogenes</i> (2%)
Laringitis	Rinovirus (25-29%) Virus influenza (28-35%) Virus parainfluenza (85-90%)	Epiglotitis	<i>H. influenzae</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. aureus</i>

	Adenovirus (22-35%) <i>M. pneumoniae</i> (37%) <i>C. pneumoniae</i> (30%) <i>S. pyogenes</i> (19%)	<i>S. pyogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Laringotraqueobronquitis	Virus parainfluenza (28%) Virus sincitial respiratorio (4%) Virus influenza (3%) Adenovirus <i>M. pneumoniae</i> (2%)	

Fuente: Ramos, *Infectología Clínica* (8), Mandell, *principles and practice of infectious diseases* (21)

3.3.2. Infecciones respiratorias del tracto inferior (IRTI)

Los virus más comunes en niños con IRTI son: VSR, VI, RV, VPI, MPVh y AV(4, 22, 23). Entretanto en adultos, los virus detectados con mayor frecuencia son: RV, EV, VI, VSR, VPI, AV y CV (24, 25).

En el caso de las bacterias causantes de IRTI en niños, las especies más prevalentes son: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (4, 6, 26). Mientras que en adultos, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* y *S. aureus* son las especies más frecuentes (3). Por otro lado, existen especies bacterianas menos frecuentes pero de gran importancia debido a los cuadros y complicaciones que pueden provocar. Entre ellas se encuentran: *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, y especies del género *Legionella sp.* (27, 28).

A continuación se presenta una tabla que relaciona las IRTI más importantes con sus agentes etiológicos más frecuentes:

Tabla 4. Principales agentes etiológicos de las enfermedades respiratorias agudas del tracto superior

Enfermedad respiratoria	Agentes etiológicos
Bronquitis aguda	Virus influenza (75-93%) Adenovirus (45-90%) Rinovirus (32-60%) Coronavirus (10-50%) Virus parainfluenza (20-45%) <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Bordetella pertussis</i>
Bronquiolitis	Virus sincitial respiratorio (40-80%) Virus parainfluenza (5-15%) Adenovirus (3-10%) Rinovirus (3-8%)

	<i>M. pneumoniae</i> (1-7%)
	Virus sincitial respiratorio
	Virus parainfluenza
	Virus influenza
	Adenovirus
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (7-36%)
Neumonía aguda	<i>Haemophilus influenzae</i> (8-12%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (1%)
	<i>M. pneumoniae</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Legionella pneumophila</i>

Fuente: Ramos, *Infectología Clínica* (8), Mandell, *principles and practice of infectious diseases* (21)

3.3.3. Bacterias causantes de IRAs (29, 30)

3.3.3.1. *Bordetella pertussis*.

Pertenece a la familia *Alcaligenaceae*. Cocobacilo gramnegativo diminuto (0.5 a 1 µm) con cápsula. Aerobio estricto no móvil. Crecimiento lento (3 a 7 días) en medio especial. La hemólisis de medio que contiene sangre se relaciona con *B. pertussis* virulento. La fase hemolítica y virulenta se debe a la producción de la toxina pertussis.

Factores de virulencia. La hemaglutinina filamentososa (FHA) es una proteína de superficie que media la adherencia a las células epiteliales ciliadas, estimula la liberación de citocinas e interfiere con las respuestas inmunitarias T_H1. La toxina pertussis (PT) es el principal factor de virulencia de *B. pertussis*, favorece la linfocitosis y produce sensibilización a la histamina. Ambas son proteínas secretadas y se encuentran fuera de las células de *B. pertussis*. El lipopolisacárido presente en la pared celular también es importante como causa de lesión de las células epiteliales del sistema respiratorio superior. Otras toxinas: citotoxina traqueal (TCT. Tóxica para las células ciliadas del epitelio de la tráquea) y adenilato ciclasa (AC. Formadora de poros).

Patogenia. *B. pertussis* sobrevive sólo durante breves períodos fuera del hospedero humano. No hay vectores. La transmisión en gran parte es por la vía respiratoria de casos en etapas iniciales. El microorganismo se adhiere a la superficie epitelial de la tráquea y los bronquios y se multiplica rápidamente e interfiere en la acción ciliar. La bacteria libera las toxinas y las sustancias que irritan las células de la superficie produciendo tos y linfocitosis intensas. Más tarde, puede haber necrosis de partes del epitelio e infiltración por

polimorfonucleares con inflamación peribronquial. Los invasores secundarios como estafilococos o *H. influenzae* pueden originar neumonía bacteriana.

Manifestaciones clínicas. *B. pertussis* produce tos ferina. Después de un periodo de incubación sobreviene la etapa catarral (tos leve y estornudos) en la cual el paciente es muy contagioso. Posteriormente, en la etapa paroxística, la tos desarrolla su carácter explosivo y el característico "coqueluche" con la inhalación. Esto lleva al agotamiento rápido y puede acompañarse de vómito, cianosis y convulsiones. El coqueluche y las complicaciones principales se presentan generalmente en los lactantes; la tos paroxística predomina en los niños mayores y en los adultos. Pocas veces la tos ferina se acompaña de complicaciones graves y potencialmente mortales como la encefalitis. Por último, en la fase convaleciente, el paciente se recupera al disminuir la duración e intensidad de la tos (31).

Pruebas de diagnóstico. El cultivo de muestras nasofaríngeas es el "estándar de oro" para la detección de *B. pertussis*, pero el organismo es fastidioso y de lento crecimiento, haciendo el cultivo un método lento y poco sensible. De igual manera, la sensibilidad de esta técnica se ve considerablemente afectada por factores como la progresión de la enfermedad y el incremento en la edad del paciente (31, 32).

Estudios han demostrado que la PCR posee de dos a cuatro veces más probabilidad de detectar a *B. pertussis* de forma rápida y correcta en comparación que el método por cultivo. Al diseñar un ensayo de PCR, deben incluirse sensibilizadores tanto para *B. pertussis* como para *B. parapertussis*. Entre los blancos genómicos empleados para la detección de *B. pertussis* mediante PCR se encuentra la secuencia de inserción *IS481*, la cual presenta 238 copias dentro del genoma de *B. pertussis* y ninguna dentro del genoma de *B. parapertussis* (31, 33-36). Sin embargo, esta secuencia de inserción presenta de ocho a diez copias en el genoma de la especie bacteriana *B. holmesii*, la cual es un patógeno respiratorio oportunista en pacientes inmunocomprometidos (31, 37) y en algunos aislados de la especie *B. bronchiseptica*, que infecta principalmente a animales como perros, gatos, cerdos, conejos y raramente en seres humanos que presentan condiciones subyacentes como asplenia y síndrome de inmunodeficiencia adquirida (31, 36, 38).

Epidemiología. La tos ferina es endémica en casi todas las regiones densamente pobladas del mundo, se presentan de 20 a 40 millones de casos anualmente y de 200,000 a 400,000 muertes (32, 39) y también se presenta en forma intermitente en brotes cada tres o cinco años (31, 39). La fuente de la infección suele ser un paciente en las primeras etapas catarrales de la enfermedad. Es considerable la contagiosidad y fluctúa de 30 a

90%. Casi todos los casos se presentan en niños menores de cinco años; la mayor parte de las muertes (70%) ocurre durante el primer año de vida.

El control de la tos ferina se basa principalmente en la inmunización activa adecuada de todos los lactantes. Aunque la incidencia de esta enfermedad ha disminuido gracias a la vacunación extensiva a nivel mundial, la tos ferina ha re-emergido especialmente en niños menores de cinco meses de edad y también en mayores de 10 años en la última década. Esto se puede deber a diversos factores, entre los que se encuentran la adaptación de distintas cepas de *B. pertussis* a la inmunidad inducida por las vacunas y una protección incompleta debida a la expansión de cepas que son antigénicamente distintas de aquellas consideradas en el sistema de vacunación (cambios alélicos en genes que codifican para factores de virulencia FHA y PT). Además, los cambios en la definición del cuadro clínico y el perfeccionamiento en las técnicas de detección y reporte de resultados, puede resultar en una mayor incidencia de infecciones por *B. pertussis* (35, 36).

El número de casos reportados se ha incrementado en los Estados Unidos desde 1980 y este comportamiento se ha presentado en otras partes del mundo a pesar de las campañas de vacunación masivas (31, 39) La siguiente figura muestra la incidencia por grupo de edad desde el año 1990 hasta el año 2009 en Estados Unidos. Los índices más altos se presentan en niños menores de un año, pero la proporción de adolescentes y adultos ha crecido en los últimos años.

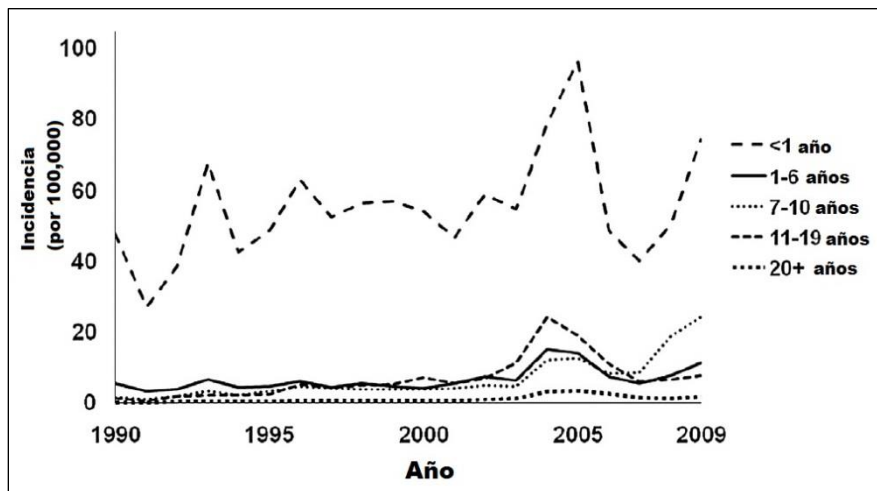


Figura 6. Incidencia de casos de *B. pertussis* en EU desde 1990 en distintos grupos etarios
Modificado de Pertussis: relevant species and diagnostic update, Leber AL.

3.3.3.2. *Bordetella parapertussis*

Segunda especie en importancia dentro del género *Bordetella sp.* Este microorganismo puede producir enfermedad similar a la tos ferina pero en general es menos grave. La infección suele ser asintomática y se presenta en aproximadamente 2-20% de los casos de enfermedad similar a tos ferina (31). *B. parapertussis* se multiplica con mayor rapidez que *B. pertussis* pero no produce la toxina pertussis.

Entre los blancos genómicos empleados para la detección de *B. parapertussis* mediante PCR se encuentra la secuencia de inserción *IS1001*, la cual cuenta con 22 copias dentro del genoma de *B. parapertussis* y ninguna dentro del genoma de *B. pertussis* (34, 36). Esta secuencia de inserción se presenta también en el genoma de la especie *B. bronchiseptica* (31, 36, 38).

3.3.3.3. *Chlamydomphila pneumoniae*

Bacteria gramnegativa perteneciente a la familia *Chlamydiaceae*. Carece de los mecanismos para la producción metabólica y no pueden sintetizar ATP. Esto la limita a una vida intracelular, multiplicándose en el citoplasma de las células del hospedero por medio de un ciclo vital característico, donde la célula hospedadora elabora productos intermedios con abundante energía. Por lo tanto, las “clamidias” son parásitos intracelulares estrictos.

Ciclo de desarrollo. La partícula infecciosa estable en el ambiente es una célula pequeña llamada cuerpo elemental o EB (*elementary body*). Mide casi 0.3 μm de diámetro y tiene un nucleoide electrodenso. Las proteínas de la membrana del EB poseen grandes enlaces cruzados. Los EB tienen gran afinidad por las células epiteliales del hospedero y penetran en ellas con rapidez. Al parecer cuentan con numerosas adhesinas, receptores y mecanismo de entrada. Entre las adhesinas más importantes se encuentran la proteína principal de la membrana externa (MOMP, *major outer membrane protein*), la MOMP glucosilada y otras proteínas de superficie. Los mecanismos que se cree median la entrada a la célula del hospedador también son variados. Los EB por lo general se observan adheridos cerca de la base de las microvellosidades, donde son fagocitados por la célula hospedera. Al parecer funcionan varios mecanismos: endocitosis mediada por receptores en agujeros revestidos y pinocitosis a través de agujeros sin revestimiento. La fusión lisosómica es inhibida, lo cual crea un entorno protegido rodeado por la membrana alrededor de la clamidia. Poco después de entrar en la célula hospedera, los puentes disulfuro de las proteínas de la membrana del EB ya no tienen enlaces cruzados y el EB

se reorganiza para formar una estructura más grande llamada cuerpo reticulado o RB (*reticulate body*), que mide entre 0.5 y 1 μm y carece de un nucleóide electrodens. Dentro de la vacuola limitada por la membrana, el RB crece y se divide en repetidas ocasiones por medio de fisión binaria. Finalmente la vacuola se llena de cuerpos elementales derivados de cuerpos reticulados para formar una inclusión citoplasmática. Los EB recién formados abandonan la célula hospedadora e infectan a otras células. El ciclo de desarrollo tarda entre 24 y 48 horas.

Metabolismo. Algunas clamidias tienen metabolismo endógeno como otras bacterias. Liberan CO_2 a partir de glucosa, piruvato y glutamato. Además contienen deshidrogenasas. Sin embargo, necesitan a la célula hospedadora para llevar a cabo sus actividades biosintéticas. Numerosos antibacterianos inhiben la proliferación de la clamidia. Los inhibidores de la pared celular como penicilinas y cefalosporinas provocan la formación de variedades con defectos morfológicos pero no son eficaces en las enfermedades clínicas. Los inhibidores de la síntesis de proteínas (tetraciclinas, eritromicina) son efectivos en la mayor parte de las infecciones clínicas. *C. pneumoniae* produce inclusiones intracitoplasmáticas que carecen de glucógeno. Por lo general es resistente a las sulfonamidas. Genera infecciones respiratorias en los seres humanos, quienes son su único hospedador conocido.

Características de la relación hospedador-parásito. Una característica biológica destacada de la clamidiosis es el equilibrio que a menudo alcanzan el hospedador y el parásito, con lo que la infección persiste durante un tiempo prolongado. En el hospedador natural de estos microorganismos, la regla es la infección subclínica y la excepción es la enfermedad manifiesta. El hospedador infectado constantemente produce anticuerpos contra diversos antígenos de las clamidias. Estos anticuerpos tienen un efecto protector mínimo contra la reinfección. El microorganismo persiste en presencia de una concentración elevada de anticuerpos.

Manifestaciones clínicas. La mayor parte de las infecciones por *C. pneumoniae* es asintomática o causa enfermedad leve, pero también se han publicado algunos casos de enfermedades graves. *C. pneumoniae* es capaz de producir pneumonia en humanos. No existen signos o síntomas que permitan distinguir de manera específica la infección por *C. pneumoniae* de la que causan muchos otros microorganismos. Se acompaña de problemas en las vías respiratorias tanto superiores como inferiores. Con frecuencia se trata de faringitis. Otras veces son sinusitis y otitis media acompañadas de problemas de las vías respiratorias inferiores. La enfermedad primaria que se diagnostica con mayor frecuencia es una neumonía atípica similar a la que causa *Mycoplasma pneumoniae*.

Diagnóstico. El cultivo y la serología son los métodos de diagnóstico tradicionales para ésta bacteria y cada método tiene sus limitaciones. El uso de la técnica de cultivo para el aislamiento e identificación de *C. pneumoniae* es lenta, costosa y poco sensible debido a que es necesario que el microorganismo se mantenga viable para una detección apropiada. Por otro lado, la serología también es limitada ya que provee únicamente un diagnóstico retrospectivo al no ser capaz de diferenciar entre una infección previa, una aguda o una crónica (40). Varios estudios han demostrado que la técnica de PCR es más rápida, sensible y específica para detectar a este microorganismo en muestras respiratorias, biopsias pulmonares y sangre (41). Varios estudios emplean el gen *ompA* para la detección específica de esta especie bacteriana, el cual codifica para una proteína de membrana (major outer membrane protein)(40, 41).

Epidemiología. La infección por *C. pneumoniae* es frecuente. Alrededor de 10% de las neumonías adquiridas en la comunidad en personas jóvenes se cree que son causadas por *C. pneumoniae*, así como el 5% de los casos de bronquitis y faringitis. En el mundo, aproximadamente 50% de las personas de 20 años de edad tiene anticuerpos contra *C. pneumoniae*, así como el 70-80% de las personas de 60-70 años de edad (41, 42). Muy pocos niños pequeños tienen anticuerpos, pero después de los seis a ocho años, la prevalencia de los anticuerpos aumenta hasta la madurez. La infección es tanto endémica como epidémica y se han atribuido varios brotes a *C. pneumoniae*. No se conoce un reservorio animal y se supone que se transmite de persona a persona, principalmente por vía aérea.

3.3.3.4. *Chlamydophila psittaci*

Es una bacteria muy similar a *C. pneumoniae*: Gramnegativa, parásito intracelular estricto y con un idéntico ciclo de desarrollo, metabolismo y características de la relación hospedador-parásito. El término “psitacosis” se aplica a la enfermedad por *C. psittaci* en seres humanos adquirida por el contacto con aves y además a la infección psitaciforme (pericos, cacatúas, etc.). En los seres humanos, *C. psittaci* genera un espectro de manifestaciones clínicas que varían desde una infección leve y asintomática hasta neumonía grave con septicemia y una mortalidad elevada.

Patogenia y patología. El microorganismo entra a través del aparato respiratorio, aparece en la sangre en las primeras dos semanas de la enfermedad y en el esputo una vez que penetra en los pulmones. La psitacosis provoca inflamación con forma de placas de los pulmones donde se delimitan las áreas consolidadas. Los

exudados son básicamente mononucleares. En los bronquiolos y bronquios los cambios son mínimos. Las lesiones son similares a las que se observan en la neumonitis causada por ciertos virus y micoplasmas.

Manifestaciones clínicas. La aparición repentina de una enfermedad similar a la influenza o a una neumonía bacteriana en una persona que tiene contacto con aves sugiere la posibilidad de psitacosis. Esta enfermedad se presenta como una infección aguda de las vías respiratorias similar a la infección por el virus influenza, lo cual puede ser malinterpretado con consecuencias fatales. El período de incubación es en promedio de 10 días. El inicio casi siempre es repentino con malestar general, fiebre, tos seca, anorexia, disfagia, fotobia y cefalea intensa. En algunos casos la enfermedad no evoluciona y el paciente mejora en unos cuantos días; en otros, aparecen signos y síntomas de neumonía bronquial al final de la primera semana. A menudo las manifestaciones clínicas son similares a la influenza, neumonía no bacteriana o fiebre tifoidea. La mortalidad es de hasta 20% en los casos que no reciben tratamiento, en especial en ancianos.

Diagnóstico. El carácter de parásito intracelular obligado de esta bacteria presenta grandes inconvenientes al intentar detectarla mediante las técnicas tradicionales como cultivo y serología. Por esta razón, la implementación de métodos moleculares de detección ha ofrecido mejoras significativas para el diagnóstico (43).

Epidemiología. Los brotes en seres humanos ocurren cuando existe contacto cercano y continuo entre personas y aves infectadas que excretan o desechan grandes cantidades de microorganismos infecciosos a través de sus heces. Otro método de infección es manejar tejidos infectados y por la inhalación de un aerosol infectado. A la fecha se reportan 100 a 200 casos de psitacosis por año. Algunas cepas de *C. psittaci* son muy contagiosas y constituyen un riesgo para personal de laboratorio que procesa muestras para el aislamiento de *C. psittaci*. Es poco común la transmisión de persona a persona.

3.3.3.5. *Haemophilus influenzae*

Bacteria polimorfa gramnegativa de la familia *Pasteurellaceae*. Se puede presentar como cocabacilos cortos (1.5 µm) en pares o en cadenas cortas, o bacilos largos, dependiendo de su edad y condiciones de crecimiento. Las cepas más virulentas tienen una cápsula de polisacárido, mientras que las especies no encapsuladas, no son virulentas. *H. influenzae* tipo b (Hib) es un microorganismo patógeno en el ser humano, se detecta en las

mucosas de las vías respiratorias altas, es una causa importante de meningitis en los niños y puede causar infecciones respiratorias en niños y adultos.

Estructura antigénica. *H. influenzae* encapsulado puede contener seis serotipos distintos (a-f) con base en el antígeno capsular de polisacárido. El antígeno capsular de tipo b es un fosfato de polirribosa-ribitol. Los polisacáridos de superficie están sumamente relacionados con la virulencia. Por otro lado, *H. influenzae* no encapsulado (por ende, sin posibilidad de tipificación), no es virulento y sólo puede clasificarse a través de diversos esquemas de determinación basados en las proteínas de la membrana externa y otros factores, pero no tiene asociación conocida con virulencia.

Patogenia. *H. influenzae* no produce exotoxinas. El microorganismo no encapsulado es un miembro regular de la microflora respiratoria normal del ser humano, donde representa alrededor del 10% (44). La adhesión a las células del epitelio respiratorio está mediada por los pilis y las proteínas de la membrana externa. Es posible observar que *H. influenzae* invade el espacio entre las células del epitelio respiratorio y vive algún tiempo entre y debajo de ellas. Una vez que atraviesa la barrera de la mucosa, la cápsula previene la fagocitosis cuando no hay anticuerpos anticapsulares específicos. La cápsula de fosfato de polirribosa de *H. influenzae* tipo b es el principal factor de virulencia. La frecuencia de estado de portador en las vías respiratorias altas para *H. influenzae* tipo b es de 2 a 4%. La tasa de portador para *H. influenzae* no tipificable es 50 a 80% más alta. *H. influenzae* tipo b produce meningitis, neumonía, epiglotitis, celulitis y a veces otras formas de infección invasiva. *H. influenzae* no tipificable tiende a producir bronquitis crónica, otitis media, sinusitis y conjuntivitis después de la destrucción de los mecanismos de defensa normales del hospedador.

Manifestaciones clínicas. *H. influenzae* tipo b entra a través del sistema respiratorio. Puede haber una diseminación local con afectación a los senos paranasales o el oído medio. *H. influenzae* tipo b y los neumococos son dos de los microorganismos más frecuentes de otitis media bacteriana y sinusitis aguda. A veces se presenta una laringotraqueítis obstructiva fulminante en los lactantes que obliga a una traqueostomía inmediata o intubación como procedimiento para salvar la vida del paciente. La neumonitis y la epiglotitis por *H. influenzae* pueden presentarse después de infecciones respiratorias altas en los niños pequeños y en personas mayores o debilitadas. Los adultos pueden tener bronquitis o neumonía a consecuencia de *H. influenzae*.

Epidemiología. *H. influenzae* es un patógeno estrictamente humano y no tiene fuentes animales o ambientales conocidas. Se le puede encontrar en la flora nasofaríngea normal de 20 a 80% de las personas

sanas, dependiendo de la edad, temporada del año y otros factores (45). La mayoría de estos bacilos no tienen cápsula, pero las cepas encapsuladas, incluyendo el Hib, no son raras. El contagio ocurre por gotas respiratorias. Antes de la introducción de vacunas eficaces, aproximadamente 1 de cada 200 niños desarrollaba enfermedad invasiva para la edad de cinco años, actualmente, la incidencia se ha reducido en 99%. Los casos de epiglotitis y neumonía tienden a alcanzar un máximo en el grupo etario de dos a cinco años. Más del 90% de estos casos se deben a un solo serotipo, el Hib.

Diagnóstico. Los métodos más empleados para la detección de *H. influenzae*, son pruebas serológicas que detectan altas concentraciones de polisacárido específico de *H. influenzae* tipo b. Estas pruebas de detección de antígeno por lo general no son más sensibles que una tinción de Gram. La existencia de cepas multirresistentes representa también un grave problema de diagnóstico para los laboratorios, debido a que el uso indiscriminado de los antibióticos predispone a la bacteria a sufrir cambios genéticos y estructurales que impiden su aislamiento en el laboratorio y que, además, la llevan a presentar perfiles de multirresistencia generados por la misma presión selectiva a la que se somete. El serotipo se identifica mediante coaglutinación. Sin embargo, como *H. influenzae* sufre variación antigénica, pueden reportarse cepas encapsuladas con fenotipos no tipificables, debido a que éstas pueden portar los genes para la expresión de la cápsula pero, bajo alguna presión ambiental selectiva, este antígeno de superficie no se procesa y no se detecta en la superficie, escapando a su diagnóstico serológico (46). Debido a estas razones, la detección por PCR ofrece numerosas ventajas frente a los métodos mencionados. Entre los blancos genómicos empleados para la detección de esta bacteria se encuentra el gen *pilA* (47).

3.3.3.6. *Klebsiella pneumoniae*

Bacilo gramnegativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* cuyo hábitat natural es el intestino del ser humano y de los animales. Suele comportarse como patógeno oportunista. Presenta cápsula de polisacárido de gran tamaño y ausencia de motilidad. La resistencia a antibióticos representa un problema serio en esta especie bacteriana, especialmente la creciente prevalencia de cepas productoras de beta-lactamasas de amplio espectro (48).

Estructura antigénica. Poseen antígenos somáticos O (lipopolisacáridos) que se encuentran en la parte más externa de la pared celular y antígenos capsulares K (polisacáridos) que forman grandes cápsulas que recubren

a los antígenos somáticos. Se conocen alrededor de 77 serotipos capsulares (49). Las infecciones del sistema respiratorio en seres humanos se originan sobre todo por los serotipos capsulares 1 y 2.

Patogenia. Esta bacteria se detecta en pequeños números como parte de la microflora normal del sistema respiratorio superior presentándose en alrededor del 5% de las personas sanas y por lo general se vuelve patógena cuando alcanzan a los tejidos fuera de sus zonas normales como microflora. *K. pneumoniae* produce una pequeña proporción (alrededor de 1%) de las neumonías bacterianas, causando una consolidación pulmonar necrosante por hemorragia extensa. A menudo es resistente a múltiples fármacos (50). Las variantes hipervirulentas de *K. pneumoniae* incluyen predominantemente K1 y en menor medida, K2, K5, K20, K54 y K57, han emergido a nivel mundial durante las dos últimas décadas, causando infecciones adquiridas en la comunidad, invasivas y mortales (incluyendo neumonía) en pacientes sanos. Estas variantes hipervirulentas producen una mayor cantidad de cápsula que les permite escapar de las defensas del hospedero y diseminarse de forma metastásica, lo cual es una capacidad inusual para los patógenos dentro de la familia *Enterobacteriaceae* en individuos no inmunocomprometidos(49).

Manifestaciones clínicas. La enfermedad respiratoria es típicamente aguda y severa al inicio, con una aparición súbita de tos, dolor en el pecho, disnea y fiebre seguida de un proceso inflamatorio necrosante en los pulmones que produce esputo espeso y sanguinolento (51).

Diagnóstico. La distinción fenotípica entre especies del género *Klebsiella sp.* basada en pruebas bioquímicas no es muy confiable y es lenta y laboriosa (52). El cultivo bacteriano es el método más frecuentemente usado, pero es difícil estandarizarlo para diagnóstico rutinario en comparación con los métodos basados en la PCR debido a que los medios, protocolos o condiciones de cultivo pueden variar significativamente entre laboratorios. Varios estudios reportan el gen que codifica para la proteína tirosina aminotransferasa (*TyrB*) como un blanco genómico específico y eficaz para la detección de esta bacteria (53, 54).

Epidemiología. *K. pneumoniae* es considerado actualmente como uno de los patógenos oportunistas más importantes causantes de infecciones nosocomiales y comunitarias (55). La mortalidad atribuida a infecciones causadas por cepas resistentes a antibióticos es de 20-30% y alcanza 70% en casos de bacteremia (56).

3.3.3.7. *Legionella pneumophila*

Bacteria gramnegativa, bacilo aeróbico de hasta 20 µm de longitud. Casi no captan el colorante de Gram y no se les identifica en muestras clínicas teñidas por él, lo cual dificulta su identificación. Produce la enfermedad respiratoria aguda conocida como legionelosis.

Antígenos y productos celulares. La especificidad de *L. pneumophila* depende de estructuras antigénicas complejas. Se han identificado como mínimo 16 serogrupos de *L. pneumophila*. Por la técnica de identificación serológica de grupo es imposible identificar especies de *Legionella* porque muestran antigenicidad cruzada entre diferentes especies. Las legionelas sintetizan proteasas, fosfatasa, lipasa DNasa y RNasa. La principal proteína en la secreción, que es una metaloproteasa, posee actividad hemolítica y citotóxica; sin embargo, no se ha demostrado que tal proteína sea un factor de virulencia necesario.

Patogenia. Las legionelas están distribuidas extensamente en entornos húmedos y cálidos. La infección de seres humanos debilitados o inmunodeficientes suele presentarse después de la inhalación de bacterias de aerosoles generados de sistemas contaminados de aire acondicionado, cabezales de regaderas y fuentes similares. *L. pneumophila* es notable por su propensión para atacar el pulmón, donde suele ocasionar una infiltración lobular, segmentaria o irregular. *L. pneumophila* es un patógeno intracelular facultativo, penetra y prolifera fácilmente en macrófagos y monocitos de alvéolos de seres humanos formando vacuolas fagosómicas y no es destruida de modo eficaz por los polimorfonucleares. En este proceso, se ayudan por medio de pilosidades y proteínas de membrana externa (omp), las cuales se unen a componentes del complemento. Otra omp, denominada potenciador de la invasión a macrófagos (mip), facilita las etapas iniciales de la entrada de la célula en la vacuola. Las bacterias se multiplican en el interior de las vacuolas hasta que alcanzan un gran número, destruyen las células y son liberadas, y así se produce la infección de otros macrófagos.

Manifestaciones clínicas. La infección asintomática es frecuente en todos los grupos de edad. La incidencia de enfermedad clínicamente significativa alcanza su máximo en varones mayores de 55 años. La legionelosis es una neumonía tóxica grave. La infección puede ocasionar un cuadro febril indefinido breve, o un trastorno grave de evolución rápida que incluye fiebre alta, escalofríos, malestar general, tos no productiva, hipoxia, diarrea y delirio. En los casos más graves, los pacientes empeoran de manera progresiva y ocurre un estado tóxico en tres a seis días, y la enfermedad termina en estado de choque, insuficiencia respiratoria o ambos. La tasa de mortalidad general es cercana a 15%, pero puede ser de más de 50% en algunos brotes epidémicos

hospitalarios. La mortalidad es particularmente elevada en pacientes con enfermedades graves subyacentes o con alteración de la inmunidad celular.

Diagnóstico. En las infecciones de seres humanos es posible identificar los microorganismos en material de esputo, lavado bronquial, líquido pleural, y muestras de biopsia de pulmón. No es posible identificar legionelas en extensiones de muestras clínicas teñidas con técnica de Gram. El diagnóstico con serología es poco sensible y poco específico, da resultados positivos en sólo 25-50% de los casos demostrados por cultivo. *L. pneumophila* es difícil de cultivar, de lento crecimiento y hay pocas propiedades fenotípicas para utilizarlas en su clasificación (57). Los métodos de amplificación como la PCR, han demostrado ser más rápidos y mucho más sensibles que los métodos serológicos. Varios protocolos de diagnóstico por PCR han empleado el uso de blancos genómicos como el gen *mip* que codifica para el potenciador de la invasión a macrófagos con buenos resultados (58-60).

Epidemiología. Las legionelas proliferan mejor en agua tibia y caliente en presencia de amebas y bacterias acuáticas. Las legionelas pueden existir en biopelículas y sobreviven a métodos de tratamiento hídrico y cuando proliferan penetran en pequeñas cantidades en los sistemas de distribución de agua. Las torres de enfriamiento y los condensadores de evaporación pueden estar muy contaminados por *L. pneumophila*. Es posible que los aerosoles que aparecen en el equipo de ambos tipos propaguen los microorganismos a personas susceptibles. La mayor parte de los brotes epidémicos ha ocurrido en grandes edificios como hoteles, fábricas y hospitales con torres de enfriamiento o en alguna parte del sistema de aire acondicionado como vehículo de diseminación. *L. pneumophila* es el patógeno más común, produce cerca del 90% de todos los casos de legionelosis (59).

Las estimaciones basadas en seroconversiones sugieren que en EU ocurren casi 25,000 casos cada año. La tasa de infección entre los individuos expuestos se calcula en menos de 5% y los casos graves se limitan a individuos con inmunodepresión con una mortalidad de 30-50% (59, 61). La transmisión de persona a persona no se ha documentado y los microorganismos no se han aislado en individuos sanos.

3.3.3.8. *Moraxella catarrhalis*

Cocobacilo gramnegativo inmóvil, aerobio estricto. Patógeno de las vías respiratorias superiores e inferiores.

Patogenia. Este microorganismo representa una causa frecuente de bronquitis, bronconeumonía, sinusitis y otitis. Alrededor del 95% de las cepas producen beta-lactamasas. *M. catarrhalis* posee receptores específicos en

sus pilosidades que le permiten unirse al epitelio del huésped y a los componentes de la matriz extracelular de la mucosa. Una vez unida a la superficie de la mucosa, *M. catarrhalis* tiene la habilidad de interactuar y/o competir con la flora comensal, es capaz de sobrevivir y multiplicarse bajo condiciones limitantes de nutrientes. De igual manera, esta bacteria es capaz de invadir las células epiteliales del huésped, la supervivencia intracelular de este patógeno es un aspecto importante para la evasión del sistema inmune del huésped. La proteína externa de membrana CopB fue la primera proteína que se relacionó con la resistencia al suero del huésped. Esta proteína es un blanco importante de la respuesta inmune contra *M. catarrhalis* y se ha encontrado en todas las cepas reportadas (62, 63).

Manifestaciones clínicas. *M. catarrhalis* suele producir otitis media, sinusitis e infecciones en el sistema respiratorio inferior en niños; mientras que en adultos produce principalmente laringitis, bronquitis y neumonía. Asimismo es una importante causa de exacerbaciones en pacientes adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica. La típica presentación clínica de la infección respiratoria por *M. catarrhalis* es similar al cuadro de una traqueobronquitis, presenta tos y producción de esputo purulento.

Diagnóstico. El cultivo de *M. catarrhalis* a partir de muestras clínicas suele ser complicado debido a la presencia de otras bacterias de la microflora. Asimismo, se requieren numerosas pruebas bioquímicas para establecer un diagnóstico, lo cual requiere mucho tiempo. El desarrollo de técnicas de detección mediante pruebas moleculares como la PCR ha producido diagnósticos más rápidos y específicos (63). Varios estudios han empleado el gen *copB* como un blanco genómico específico para la detección de *M. catarrhalis* (62, 64).

Epidemiología. Debido a que antes se consideraba a *M. catarrhalis* como parte de la flora comensal del aparato respiratorio superior y a que las pruebas de detección tradicionales no producían resultados confiables, es hasta estos años cuando se realizó un estudio más profundo sobre la epidemiología de esta bacteria (64). El desarrollo y empleo de las nuevas técnicas moleculares han permitido la obtención de datos epidemiológicos que antes se desconocían. Además el interés clínico por este patógeno es reciente y muchos laboratorios no lo reportan (63). *M. catarrhalis* solamente infecta seres humanos y es principalmente importante en niños, adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y sujetos inmunodeficientes. La otitis media es la enfermedad por infección bacteriana más común en niños y esta bacteria es su tercera causa, produciendo aproximadamente 20% de todos los casos (65). *M. catarrhalis* es detectada principalmente en otoño e invierno y es la principal causa de laringitis en adultos (62).

3.3.3.9. Complejo MTB

Mycobacterium, es un género de bacilos grampositivos con características ácido-resistentes durante la tinción. Su especie más importante, *Mycobacterium tuberculosis*, es el agente etiológico de la tuberculosis, que actualmente sigue siendo una de las principales causas de muerte por infección en todo el mundo. Las micobacterias son bacilos delgados, aerobios obligados y sin motilidad que no forman esporas. El complejo MTB contiene a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. caprae* y *M. canetti*.

La pared celular de las micobacterias contiene peptidoglucano similar al de otros organismos grampositivos al que se adhieren muchos polisacáridos de cadena ramificada, proteínas y lípidos. A lo largo de toda la pared celular se encuentran porinas y otras proteínas. De particular importancia es la presencia de ácidos grasos de cadena larga llamados ácidos micólicos (por los cuales reciben el nombre de *micobacterias*) y lipoarabinomanano (LAM), un complejo lípido-polisacárido que se extiende de la membrana plasmática a la superficie. El LAM es análogo en sentido estructural y funcional al lipopolisacárido de las bacterias gramnegativas. Estos elementos dan a la micobacteria una pared celular con un contenido inusualmente elevado de lípidos (más de 60% de la masa total de la pared celular), lo cual explica muchas de sus características biológicas. Podría considerarse como una capa de cera que las hace más resistentes, impenetrables e hidrofóbicas. La característica de ácido-resistencia de la tinción es una de estas propiedades que se observa con más frecuencia. Las micobacterias crecen más lentamente que la mayoría de las bacterias patógenas de los humanos debido a su superficie celular hidrofóbica, lo cual provoca que se aglomeren y limita la permeabilidad de los nutrientes dentro de la célula.

A continuación se mencionarán las principales características de *M. tuberculosis* debido a que es la especie más representativa y de mayor importancia clínica dentro del complejo MTB.

El desarrollo de *M. tuberculosis* es muy lento, con un tiempo promedio de generación de 12 a 24 horas. Las colonias en medios complejos aparecen en general después de tres a seis semanas de incubación. Debido a su superficie lípida hidrofóbica, es inusualmente resistente al secado, a la mayoría de los desinfectantes y a los ácidos y álcalis. La composición de antígenos de la pared celular de *M. tuberculosis* incluye muchas proteínas y polisacáridos, entre los que la tuberculina es la que más se ha estudiado. Un derivado proteico purificado (PPD)

de la tuberculina se emplea para pruebas cutáneas de hipersensibilidad y está estandarizado en unidades de tuberculina según la actividad mostrada en la prueba cutánea.

Epidemiología. La morbilidad y mortalidad de la infección por *M. tuberculosis* es alta en países en desarrollo. A nivel mundial se presentan alrededor de 50,000 muertes cada semana. La pandemia de SIDA y la propagación de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a múltiples fármacos agravan el problema que representa la tuberculosis. A nivel global, un tercio de la población mundial está infectada y 30 millones de personas tienen enfermedad activa.

Patogénesis. La mayoría de las infecciones de tuberculosis se contraen por inhalación de diminutas gotas que transportan al organismo causante. Se ha estimado que un solo acceso de tos puede generar hasta 3,000 diminutas gotas infectadas y que menos de diez bacilos pueden iniciar una infección pulmonar en un individuo susceptible. Por otro lado, se ha visto que se requieren grandes dosis o exposición prolongada a dosis infecciosas más pequeñas para iniciar la infección en sujetos sanos.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular y no produce exotoxinas o endotoxinas. La infección primaria por lo general se presenta cuando se inhalan las gotas infectadas con bacilos, éstos se depositan en los alvéolos y los macrófagos los reconocen y fagocitan. *M. tuberculosis* puede alterar los mecanismos digestivos del fagolisosoma interfiriendo con la acidificación del fagosoma, provocando que las enzimas lisosómicas (que requieren un pH ácido) sean menos eficientes. Esto permite que los organismos se multipliquen libremente en el macrófago inactivo. Por otro lado, se pueden presentar las respuestas inmunitarias que comienzan con la digestión y presentación en superficie de los componentes de la micobacteria y concluyen con la activación de las citocinas de los macrófagos. Los resultados de la infección a corto y largo plazos dependen de la capacidad del proceso de activación del macrófago para superar la ventaja intracelular que tiene *M. tuberculosis* como resultado de su capacidad para bloquear la acidificación del fagosoma. Los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* pueden diseminar la infección a otras partes del pulmón y producir una infección primaria o mantener a los bacilos en un estado de latencia durante años o décadas hasta su reactivación.

Manifestaciones clínicas. La tuberculosis primaria por lo general es asintomática o se manifiesta sólo por fiebre y malestar general. En cerca de 5% de los pacientes, la enfermedad primaria no se controla y se produce una tuberculosis grave que puede diseminarse a otros órganos. Aproximadamente 10% de las personas que se recuperan de una infección primaria desarrollan enfermedad clínica en algún momento durante su vida. La

reactivación se asocia con un período de inmunodepresión. La tos es el síntoma universal de la tuberculosis. De inicio es seca, pero a medida que progresa la enfermedad se produce esputo que incluso puede mezclarse después con sangre (hemoptisis). La fiebre, malestar general, fatiga, sudoración y pérdida de peso progresan a medida que avanza la enfermedad.

Diagnóstico. La prueba cutánea de la tuberculina es comúnmente empleada e indica una infección previa o actual, más no precisa una enfermedad activa. Además puede presentarse un resultado positivo ante la infección de otra micobacteria dentro del complejo MTB. Otro método común es el frotis ácido-resistente que emplea muestras clínicas obtenidas de esputo, sin embargo, incluso con los mejores métodos de tinción, poco más de la mitad (alrededor de 65%) de los cultivos positivos de muestras de esputo produce frotis positivos. Por otro lado, los cultivos en medios sólidos requieren por lo general de tres o más semanas para mostrar colonias visibles. La identificación de la micobacteria aislada se logra con varias pruebas bioquímicas o de cultivo, pero el proceso requiere más semanas. En el caso de ésta bacteria, la detección mediante pruebas moleculares ha presentado enormes ventajas respecto a los métodos mencionados. El tiempo se ha visto considerablemente reducido y la facilidad de la prueba ha mejorado al detectar una región de inserción repetitiva dentro del genoma de *M. tuberculosis*. La región *IS6110*, se ha vuelto un blanco empleado en distintos estudios actuales para la identificación de esta bacteria (66-70).

3.3.3.10. *Mycoplasma pneumoniae*

M. pneumoniae es causa importante de neumonía, en particular en personas de cinco a 20 años de edad. Los micoplasmas pertenecen a la familia *Mycoplasmataceae* y son los microorganismos de menor tamaño que pueden vivir libres en la naturaleza y replicarse por sí mismos. Los más pequeños tienen de 125 a 250 nm de tamaño, son muy pleomórficos porque no tienen una pared rígida y en vez de ella están circundados por una membrana unitaria de tres capas que contiene esterol, se reproducen en medios complejos acelulares y muestran afinidad por membranas de células de mamíferos. Es imposible estudiar los micoplasmas por los métodos bacteriológicos usuales, por la pequeñez de sus colonias, y la plasticidad y fragilidad de sus células individuales. El tamaño, morfología y tipo de crecimiento dependen de su ambiente. Su genoma de ADN es pequeño, tal vez por la falta de genes que codifican una pared celular compleja, cuenta con 816,394 pb con 687 genes codificantes (alrededor de un sexto del tamaño de *Escherichia coli*) (71).

Patogenia. La infección por *M. pneumoniae* afecta la tráquea, bronquios, bronquiolos y puede extenderse hacia alveolos y paredes alveolares. Muchos micoplasmas patógenos poseen filamentos y estructuras polares que median su adherencia a las células del hospedador. Dichas estructuras constituyen un grupo complejo de proteínas interactivas, adhesinas y proteínas accesorias de adherencia. Al inicio, el microorganismo se une a los cilios y microvellosidades de las células que recubren el epitelio bronquial. La unión está mediada por una proteína micoplásmica citadhesina (P1) (71) que se une a los oligosacáridos complejos que contienen ácido siálico y que se encuentran en las regiones apicales de las células del epitelio bronquial. Esta proteína es el principal factor de virulencia de *M. pneumoniae* (72). El microorganismo interfiere con la acción ciliar e inicia un proceso que conduce a la descamación de la mucosa afectada y más tarde a reacción inflamatoria. La respuesta inflamatoria es al inicio más pronunciada en el tejido bronquial y peribronquial y está compuesta por linfocitos, células plasmáticas y macrófagos que pueden infiltrar y ocasionar engrosamiento de las paredes de bronquiolos y alvéolos. Los microorganismos se diseminan en las secreciones de vías respiratorias altas por dos a ocho días antes del inicio de los síntomas y la diseminación continúa hasta por 14 semanas después de la infección.

Inmunidad. Ocurren respuestas inmunitarias específicas locales o sistémicas, las cuales parecen ser más eficaces en la prevención de la reinfección. También, a menudo se desarrolla una respuesta inmunitaria inespecífica contra los glucolípidos de la membrana externa del microorganismo, lo cual puede ser nocivo para el hospedador. La inmunidad no es completa y puede ocurrir reinfección con *M. pneumoniae*. La enfermedad clínica parece ser más intensa en personas de edad avanzada en comparación con niños pequeños, lo que ha llevado a sugerir que muchas de las manifestaciones clínicas de la enfermedad son consecuencia de la respuesta inmunitaria más que de la invasión por el microorganismo.

Manifestaciones clínicas. La neumonía por micoplasmas por lo común es de poca intensidad y benigna. El aspecto clínico de la infección por *M. pneumoniae* varía desde un estado asintomático hasta neumonitis grave, con ataque ocasional del sistema nervioso y la sangre. El periodo de incubación varía de una a tres semanas. El comienzo por lo común es insidioso y la persona muestra astenia, fiebre, cefalea, faringitis y tos. En los comienzos de la evolución, el ataque general es moderado y suelen ser poco intensos los signos físicos de consolidación pulmonar, en comparación con la consolidación extraordinaria que se identifica en las radiografías. Más adelante, cuando llega a su máximo la infiltración, la enfermedad puede ser grave. Lentamente en el curso de una a cuatro semanas, el infiltrado pulmonar muestra resolución y hay mejoría clínica. La evolución del trastorno es muy variable, pero muy pocas veces el paciente muere, situación que suele

atribuirse a insuficiencia cardíaca. Los signos patológicos más frecuentes son neumonitis intersticial y peribronquial y bronquiolitis necrosante.

Diagnóstico. El diagnóstico de neumonía por *M. pneumoniae* se hace en gran medida por la identificación clínica del síndrome, y los métodos usuales de laboratorio tienen utilidad secundaria. Los micoplasmas causales se identifican por cultivo en material de la faringe y del esputo, pero la prueba mencionada es muy especializada y lenta por lo que casi nunca se practica. No es posible identificar a *M. pneumoniae* por tinción de Gram debido a su ausencia de pared celular. Las técnicas serológicas son los métodos más comúnmente empleados para la detección de *M. pneumoniae*, aunque presentan múltiples inconvenientes en la práctica. El método de detección por PCR ha demostrado ser más exacto, específico y eficiente en comparación con los métodos tradicionales (73, 74). El gen *P1* que codifica para la proteína P1 ha sido uno de los blancos genómicos más empleados para la detección específica de *M. pneumoniae* (71, 72, 75-78).

Epidemiología. *M. pneumoniae* constituye del 10 al 20% de todos los casos de neumonía adquirida en la comunidad (73, 75). Las infecciones por *M. pneumoniae* son endémicas en todo el mundo. Las poblaciones de niños y adultos jóvenes en que prevalece el contacto muy cercano y en familias, la cifra de infección puede ser grande (50 a 90%), pero la incidencia de neumonía es variable (3 a 30%). Las infecciones en niños menores de seis meses de edad son poco comunes. Al parecer *M. pneumoniae* se transmite de manera predominante por contacto directo en que participan secreciones de vías respiratorias. La exposición experimental indica que la dosis infecciosa en humanos es muy baja, tal vez inferior a 100 unidades formadoras de colonias. Los segundos ataques son poco frecuentes.

3.3.3.11. *Pseudomonas aeruginosa*

Bacilo aerobio, móvil y gramnegativo. Muestra resistencia a los antimicrobianos de manera más consistente que todas las demás bacterias de importancia clínica. Es muy versátil en cuanto a sus necesidades energéticas y de crecimiento.

Estructura antigénica. Los lipopolisacáridos están presentes en la membrana externa como proteínas de porina, que pueden diferir de otras de la familia de las enterobacterias, pues ofrecen menos permeabilidad a una amplia variedad de moléculas, lo que incluye antibióticos. Las pilosidades están compuestas por monómeros repetidos de subunidades estructurales de pilina que se extienden desde la superficie celular. Un

flagelo polar único impulsa con rapidez al microorganismo y facilita la fijación a los tejidos del hospedador. La mayor parte de las cepas de *P. aeruginosa* produce múltiples productos extracelulares: la exotoxina A interrumpe la traducción, lo que conduce a la detención de síntesis de proteínas y muerte celular. La exoenzima S y otras exoenzimas se transportan directamente a las células del hospedador por un sistema de secreción por inyección. En el interior de la célula, la exoenzima S afecta el citoesqueleto, las vías de señalización e induce la apoptosis.

Patogenia. *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista que por lo común requiere de una alteración significativa en las líneas de defensa primarias (p. ej., una herida) o un vía para esquivarlas (p. ej., una solución contaminada o una sonda) e iniciar la infección. La unión a las células epiteliales es el primer paso en la infección y probablemente esté mediada por pilosidades, flagelos y una cubierta de polisacáridos extracelulares. Una vez establecida, *P. aeruginosa* es altamente virulenta dada la gran cantidad de enzimas y otros factores. La elastasa y fosfolipasa son proteínas que desdoblan proteínas y lípidos, respectivamente, lo que permite que el microorganismo adquiera nutrientes del hospedador y se disemine a partir del sitio local. Muchos sustratos de importancia biológica de la elastasa hacen evidente su importancia, en particular el que le da su nombre, elastina. La elastina se encuentra en algunos sitios con ataque preferente por *P. aeruginosa*, como los pulmones y vasos sanguíneos. Asimismo, esta bacteria produce un pigmento llamado piocianina, que parece tener efectos tóxicos en la función de las células ciliares respiratorias.

Manifestaciones clínicas. La neumonía por *P. aeruginosa* es una infección particularmente rápida y destructiva. Se asocia con necrosis alveolar, invasión vascular y bacteremia.

Diagnóstico. Este patógeno suele identificarse mediante cultivo, tinción y pruebas bioquímicas. Al emplear estas pruebas, los resultados pueden ser poco específicos por la presencia de reacciones cruzadas con otras bacterias gramnegativas y diversos factores limitantes entre las distintas cepas existentes (79, 80). Se han desarrollado múltiples pruebas moleculares que emplean el gen *gyrB* como blanco genómico para la detección de *P. aeruginosa* (79, 81-84). Esta proteína es una topoisomerasa procariota que corta ambas cadenas del ADN simultáneamente con el fin de evitar enrollamientos (85).

Epidemiología. El hábitat primario de *P. aeruginosa* es el medio ambiente. Se ha aislado de faringe y heces en 2 a 10% de las personas sanas. Las tasas de colonización son mucho más elevadas en individuos hospitalizados. Esta bacteria es una de las causas más importantes de infección invasora en pacientes hospitalizados con

enfermedades subyacentes. La inhalación de aerosoles contaminados puede evadir los mecanismos de defensa normales del aparato respiratorio.

3.3.3.12. *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos son células esféricas grampositivas de aproximadamente 1 μm por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. No son móviles y no forman esporas. Algunos son miembros de la microflora normal de la piel y las mucosas del ser humano. Los estafilococos desarrollan con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos y pueden plantear problemas terapéuticos importantes. *S. aureus* es un patógeno importante en el ser humano, casi todas las personas presentarán algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida.

Estructura antigénica. Los estafilococos contienen polisacáridos y proteínas antigénicas así como otras sustancias importantes en la estructura de su pared celular. El peptidoglucano, un polímero de polisacárido que contiene subunidades ligadas, proporciona el exoesqueleto rígido de la pared celular. Este componente es importante en la patogenia de la infección: desencadena la producción de interleucina-1 y anticuerpos opsonizantes para los monocitos y puede ser quimioatrayente para los leucocitos polimorfonucleares, tiene actividad endotóxica y activa el complemento. Los ácidos teicoicos están vinculados al peptidoglucano y pueden ser antigénicos. La proteína A es un componente de la pared celular de las cepas de *S. aureus* y es una adhesina que permite la unión a las células anfitrionas. Algunas cepas de *S. aureus* tienen cápsulas, que inhiben la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares a menos que haya anticuerpos específicos presentes.

Enzimas y toxinas. Los estafilococos pueden producir enfermedad a través de su capacidad para multiplicarse y diseminarse ampliamente en los tejidos y a través de su producción de muchas sustancias extracelulares. Algunas de estas sustancias son enzimas; otras se consideran toxinas, aunque pueden funcionar como enzimas. Muchas de las toxinas están sujetas al control genético de los plásmidos y algunas pueden estar sujetas a control cromosómico y extracromosómico. Entre las más importantes se encuentran: catalasa, coagulasa, factor de aglutinación, hialurodinasa, exotoxinas formadoras de poros (α , β , δ y γ), exfoliatina, toxina del síndrome de choque tóxico y enterotoxinas.

Patogenia. Los estafilococos son miembros de la microflora normal del sistema respiratorio. 20-50% de los seres humanos son portadores nasales de *S. aureus*. Las etapas iniciales de adherencia por *S. aureus* se

encuentran mediadas por una variedad de proteínas de superficie que se enlazan a células hospedadoras o a elementos sobre sus superficies. Una vez fija a las mucosas, *S. aureus* persiste y produce toxina α y otras citolisinas que dañan a las células. A medida que las lesiones se vuelven destructivas y se extienden por debajo de la superficie, otras proteínas limitan la efectividad de los fagocitos del hospedador, lo que permite que los estafilococos se multipliquen y que la lesión se expanda. Tras esta extensión, el proceso forma una multitud de compartimentos. En el pulmón, el proceso puede seguir extendiéndose con focos alternativos y compromiso de partes amplias. La acción de las citotoxinas es altamente destructiva y crea cavidades y necrosis masivas con poco respeto por los límites anatómicos. *S. aureus* puede diseminarse, sobrevenir en bacteremia y causar neumonía, meningitis y otras infecciones con formación de pus en cualquier órgano. La historia natural de las infecciones estafilocócicas indica que la inmunidad es corta e incompleta (86).

Diagnóstico. Pueden emplearse diversas muestras dependiendo del órgano afectado, en el caso de infección respiratoria se emplean aspirados traqueales. La detección de esta bacteria suele realizarse mediante frotis, cultivo, pruebas bioquímicas y serología. La detección por PCR ha mostrado resultados confiables y obtenidos en poco tiempo. Diversos estudios emplean el gen *nuc* como un blanco genómico específico para su detección. Este gen codifica para una nucleasa extracelular termoestable que *S. aureus* produce con alta frecuencia (87).

Epidemiología. Los estafilococos son parásitos humanos generalmente ubicuos. El hábitat humano básico de *S. aureus* son las narinas anteriores. Entre 10 y 30% de la población porta este organismo en dicha localización en un momento dado. La mayoría de las infecciones por *S. aureus* adquiridas en la comunidad son autoinfecciones con cepas que el individuo ha estado transportando en las narinas anteriores, en la piel, o en ambas y se transmiten por fómites de individuo a individuo. Por lo general, los brotes comunitarios se asocian con una higiene deficiente. A nivel mundial, *S. aureus* es una de las causas más comunes de infecciones purulentas agudas adquiridas en la comunidad o de manera nosocomial.

3.3.3.13. *Streptococcus pneumoniae*

Los neumococos (*S. pneumoniae*) son diplococos grampositivos, a menudo en forma de lancetas o dispuestos en cadenas. Todas las cepas virulentas poseen una cápsula de polisacárido de alto peso molecular que permite la tipificación con antiseros específicos. Los neumococos rápidamente experimentan lisis por compuestos con actividad en la superficie, lo cual probablemente elimina o inactiva a los inhibidores de las autolisinas de la pared celular. Los neumococos son residentes normales de las vías respiratorias altas de 5 a 40% de los seres

humanos y pueden causar neumonía, sinusitis, otitis, bronquitis, bacteriemia, meningitis y otros procesos infecciosos.

Estructura antigénica. La pared celular del neumococo tiene peptidoglucano y ácido teicoico, al igual que otros estreptococos. El polisacárido capsular se une en forma covalente con el peptidoglucano y con el polisacárido de la pared celular. El polisacárido capsular es inmunitariamente distinto para cada uno de los más de 90 tipos.

Patogenia. En los adultos, los tipos 1 a 8 son causa de casi 75% de los casos de neumonía neumocócica. La adherencia del neumococo a las células nasofaríngeas implica múltiples factores. La principal relación es el efecto comunicante formado por la adhesión de las proteínas fijadoras de colina a las colinas de la pared celular y a los carbohidratos que cubren o están expuestos en la superficie de las células epiteliales del hospedador. La aspiración de secreciones respiratorias que contengan estos neumococos es el primer paso que conduce a la neumonía. Normalmente, los organismos aspirados se eliminan con rapidez gracias a los mecanismos de defensa de las vías respiratorias inferiores, incluyendo la tos y los reflejos de la epiglotis, la capa mucociliar y la fagocitosis de los macrófagos alveolares. Los factores del hospedador que alteran la eficiencia combinada de estas defensas permiten que los neumococos lleguen a los alvéolos y se multipliquen allí; entre ellos se incluyen enfermedades pulmonares crónicas, daño del epitelio bronquial por tabaquismo o contaminación ambiental y disfunción respiratoria debida a alcoholismo, uso de drogas o traumatismo.

Cuando los organismos llegan al alvéolo, los factores de virulencia del neumococo operan en dos etapas. La primera ocurre al principio de la infección, cuando la cápsula superficial de los organismos intactos actúa para bloquear la fagocitosis por medio de inhibición del complemento. Esto permite que los organismos se multipliquen y propaguen a pesar de una respuesta inflamatoria aguda. La segunda etapa ocurre cuando los organismos comienzan a desintegrarse y liberan varios factores, ya sean sintetizados por el neumococo o que forman parte de su estructura, lo cual produce daño. Éstos incluyen a la neumolisina, autolisina y componentes de la pared celular.

Manifestaciones clínicas. El inicio de la neumonía neumocócica suele ser súbito con fiebre, escalofríos y un dolor pleural intenso. En las primeras etapas de la enfermedad, cuando la fiebre es alta, se presenta bacteriemia en 10 a 20% de los casos. Con el tratamiento antimicrobiano adecuado, la enfermedad suele terminar rápidamente; si se administran fármacos en las primeras etapas, se interrumpe el desarrollo de la consolidación.

Desde el aparato respiratorio, los neumococos pueden llegar a otros lugares, los senos paranasales y el oído medio son los que resultan más afectados. La infección puede extenderse hasta las meninges. La bacteriemia por neumonía se manifiesta por una tríada de complicaciones graves: meningitis, endocarditis y artritis séptica.

Diagnóstico. Los métodos convencionales emplean sangre o esputo para su análisis mediante frotis teñidos y/o cultivo. Sin embargo, varios estudios recientes emplean técnicas moleculares más sensibles, específicos y rápidos. El gen *lytA* que codifica para una autolisina, se ha empleado como marcador de la especie *S. pneumoniae* con gran éxito (88, 89).

Epidemiología. La neumonía neumocócica constituye casi 60% de todas las neumonías bacterianas. *S. pneumoniae* es la principal causa de neumonía, meningitis purulenta aguda, bacteriemia y otras infecciones invasivas. En todo el mundo más de cinco millones de niños mueren cada año por enfermedad asociada con neumococo. *S. pneumoniae* también es la causa más común de otitis media, enfermedad casi universal de la infancia con millones de casos cada año. Las infecciones por neumococo ocurren durante toda la vida, pero son más comunes en los niños pequeños (menores de dos años) y en adultos mayores (mayores de 60 años). El alcoholismo, diabetes mellitus, enfermedad renal crónica, asplenia y algunos cánceres se asocian con infección más frecuente y grave por neumococo.

Las infecciones se derivan de colonización nasofaríngea, donde el neumococo se puede encontrar en 5-40% de las personas sanas dependiendo de la edad, temporada del año y otros factores. Las tasas más elevadas se encuentran en niños durante invierno. Las secreciones respiratorias que contienen neumococos pueden transmitirse de una persona a otra por contacto directo o por microaerosoles creados por toser o estornudar. Como ocurre con otras neumonías bacterianas, la infección respiratoria vírica y la enfermedad crónica subyacente son importantes factores predisponentes. Los datos de vigilancia epidemiológica muestran que sólo un poco más de 20 de los 09 serotipos de neumococos producen enfermedad con más frecuencia.

3.4. Diagnóstico de agentes causantes de IRAs

La infección del tracto respiratorio por algunos agentes patógenos suele producir signos y síntomas clínicos fácilmente discernibles e incluso característicos, pero en muchas ocasiones estos signos y síntomas se comparten y es prácticamente imposible un diagnóstico certero basado únicamente en las interpretaciones clínicas. Un ejemplo de esto se refleja en el estudio realizado por Poehling et al, el cual reveló que los médicos

que emplearon únicamente los signos clínicos, identificaron la infección por influenza virus en tan sólo 28% de niños hospitalizados y en 17% de niños no hospitalizados que fueron diagnosticados positivamente con influenza en el laboratorio (90). Por lo anterior, existen métodos de diagnóstico como el cultivo, la microscopía, la serología y pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que permiten un diagnóstico más preciso.

El cultivo y la microscopía empleando la tinción de Gram para el diagnóstico de muestras respiratorias, son métodos tradicionales que tras muchas décadas siguen realizándose de forma casi inalterable en la mayoría de los centros de diagnóstico de infecciones respiratorias y ambos son los métodos microbiológicos predominantes para detectar patógenos bacterianos. Aunque otras áreas de la medicina han realizado enormes avances en su sofisticación tecnológica, ha habido un pequeño ímpetu para hacerlo de la misma forma para el diagnóstico microbiológico. Además, debido a que el tratamiento antibacteriano empírico es capaz de cubrir ampliamente los patógenos más relevantes y los estudios radiográficos se han vuelto más sofisticados, el interés por establecer la etiología microbiana de las IRAs ha disminuido. Este bajo interés se opone a la importante función de mantener una adecuada vigilancia epidemiológica en la sociedad (91).

El método semi-cuantitativo de cultivo en agar usado para el análisis de muestras de expectoración de pacientes con neumonía adquirida en la comunidad (NAC) es lento y los resultados, engañosos, particularmente si no se lleva a cabo una tinción de Gram en paralelo para verificar la calidad del espécimen (desafortunadamente, únicamente del 32-76% de las muestras de expectoración obtenidas de pacientes hospitalizados con sospecha de NAC presentan una calidad adecuada). Los resultados que poseen una relativa confianza, son aquellos que tras el análisis de las tinciones apropiadas, arrojan la identificación inequívoca de una especie bacteriana específica, y de igual forma, su cultivo produce un crecimiento predominante del patógeno bacteriano correspondiente a la misma especie bacteriana. Desgraciadamente, tal concordancia, así como la eficiencia de la prueba, disminuye rápidamente cuando los especímenes son recolectados después del inicio del tratamiento antimicrobiano o cuando su arribo al laboratorio para su análisis es significativamente tardío (92).

Otro aspecto que impacta gravemente el diagnóstico y tratamiento del paciente, es el largo tiempo que ocupan las pruebas tradicionales, las cuales requieren de días e incluso semanas para la obtención de resultados, y muchas veces estos no logran ser definitivos. Cuando se incluyen pruebas de drogo-resistencia, los métodos de cultivo requieren un mínimo de 48 horas para completarse, lo cual es demasiado tiempo para llevar

a cabo un tratamiento antimicrobiano adecuado para el cuidado óptimo del paciente, especialmente cuando la bacteria patógena es multidrogo-resistente (ej. *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) (92). Incluso en los estudios más rigurosos no es posible establecer el diagnóstico del agente etiológico en aproximadamente 50% de los casos de NAC mediante técnicas tradicionales (93, 94).

Además de las desventajas mencionadas (lentitud, importante alteración causada por tratamiento antibiótico previo y baja sensibilidad), las técnicas de diagnóstico habituales cuentan con otros serios problemas como son su baja especificidad, la subjetividad en la interpretación de los resultados y su baja eficiencia al trabajar con un gran número de muestras clínicas.

La mayoría de los diagnósticos de enfermedades infecciosas siguen un proceso en el cual se asume un agente etiológico único. Esta suposición suele darse por válida al seguir el proceso de diagnóstico hasta finalizar con la detección del primer patógeno de relevancia. Aunque la probabilidad de co-infecciones suele ser considerada más frecuentemente en las infecciones respiratorias que en otras afecciones, el diagnóstico basado en un único agente etiológico y el respectivo tratamiento subsecuente, siguen siendo prevalentes hoy en día (95).

Ante lo anterior, es imperativo el desarrollo y empleo de nuevos métodos de diagnóstico microbiológico, con el fin de detectar y caracterizar el agente etiológico, permitir una terapia específica dirigida al patógeno causante, y de esta forma promover un uso más razonable de antibióticos, así como obtener información epidemiológica importante (91).

El uso de métodos moleculares para la detección, identificación y caracterización de agentes infecciosos, está ganando importancia en los laboratorios de microbiología clínica. Los acercamientos moleculares para la detección de patógenos bacterianos evolucionan constantemente, y aunque existen laboratorios que emplean novedosos ensayos moleculares para la detección de éstos, la mayoría de los laboratorios de atención primaria siguen basando su diagnóstico en los métodos convencionales a pesar de sus considerables desventajas. Por lo general, se recurre a los diagnósticos moleculares para confirmar los resultados obtenidos por los métodos tradicionales (96).

Los recientes avances en la tecnología de diagnóstico molecular han mejorado la habilidad para determinar rápidamente la etiología de las IRAs. El desarrollo e implementación de técnicas de diagnóstico moleculares

como la PCR en sus múltiples variantes, los microarreglos o la secuenciación de nueva generación, presentan grandes ventajas y una amplia gama de aplicaciones frente a los métodos tradicionales. De las técnicas moleculares mencionadas, la PCR es la más ampliamente empleada como herramienta para el diagnóstico de patógenos respiratorios (93).

3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase chain reaction*) por Kary Mullis y sus colaboradores en 1985 ha revolucionado campos como la biología molecular, la genética humana, la evolución, la medicina forense, entre muchos otros. La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica *in vitro* utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, en la actualidad, empleando la PCR, incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse y producir millones de ejemplares idénticos en tan solo unas pocas horas. Las técnicas de PCR se han hecho indispensables para muchos procedimientos comunes, como la clonación de fragmentos específicos de ADN, la detección e identificación de genes para diagnóstico y medicina legal y en la investigación de modelos de expresión de los genes (97).

Copiando una secuencia específica de ADN mediante una serie de reacciones *in vitro*, la reacción de PCR puede amplificar secuencias de ADN presentes inicialmente en cantidades muy pequeñas, para obtener una alta cantidad de moléculas de ADN. El ADN blanco de doble cadena que se quiere amplificar se coloca en un tubo con la enzima ADN polimerasa, Mg^{2+} (un importante cofactor para la ADN polimerasa) y los cuatro desoxiribonucleósidos trifosfatados. Además, como pre-requisito para la PCR hace falta disponer de algo de información acerca de la secuencia nucleotídica del ADN diana. Esta información sobre la secuencia se utiliza para sintetizar dos oligonucleótidos llamados cebadores o iniciadores: secuencias de ADN de cadena sencilla cortas (normalmente de unos 20 nucleótidos de longitud), uno de ellos complementario al extremo 5' de una cadena del ADN blanco que hay que amplificar y el otro complementario al extremo 3' de la cadena opuesta de ADN blanco. Cuando se los añade a una muestra de ADN de doble de doble cadena que se ha desnaturalizado para obtener cadenas sencillas, los iniciadores se unen a los nucleótidos complementarios que flanquean la secuencia que hay que clonar. La ADN polimerasa puede entonces extender el extremo 3' de cada iniciador para sintetizar una segunda cadena del ADN diana. Por tanto, cada proceso completo de reacción, denominado ciclo,

duplica el número de moléculas de ADN presentes en la reacción (figura 7). La repetición del proceso produce muy rápidamente una gran cantidad de número de copias del ADN.

La cantidad de ADN amplificado que se produce está solo limitada, teóricamente, por el número de veces que repetamos estos ciclos, aunque hay varios factores que impiden que las reacciones de PCR amplifiquen segmentos muy largos de ADN o amplifiquen el ADN de forma indefinida. La mayoría de las aplicaciones de PCR rutinarias implican una serie de tres pasos por cada ciclo de reacción, que son los siguientes:

1. **Desnaturalización.** El ADN de doble cadena que hay que clonar se desnaturaliza para obtener cadenas sencillas. El calentamiento a 92-95°C durante aproximadamente un minuto desnaturaliza el ADN de doble cadena.

2. **Alineación.** La temperatura de la reacción se reduce hasta dejarla entre 45-65°C, lo que provoca la unión de los iniciadores, también llamada alineación, con el ADN de cadena sencilla desnaturalizado. Como hemos descrito anteriormente, los iniciadores son oligonucleótidos cortos complementarios a las secuencias que flanquean el ADN diana. Los iniciadores sirven como punto de partida para que la ADN polimerasa sintetice nuevas cadenas de ADN complementarias al ADN diana. Factores tales como la longitud del iniciador, la composición de las bases de los iniciadores (los iniciadores ricos en GC son térmicamente más estables que los cebadores ricos en AT) y si todas las bases de un iniciador son complementarias a las bases o no, son algunas de las consideraciones principales que hay que tener en cuenta a la hora de seleccionar la temperatura de hibridación para un experimento.

3. **Extensión.** La temperatura de la reacción se ajusta, entre 65-75°C, y la ADN polimerasa utiliza los iniciadores como punto de partida para sintetizar nuevas cadenas de ADN, añadiendo nucleótidos a los extremos de los iniciadores en una dirección 5' a 3'.

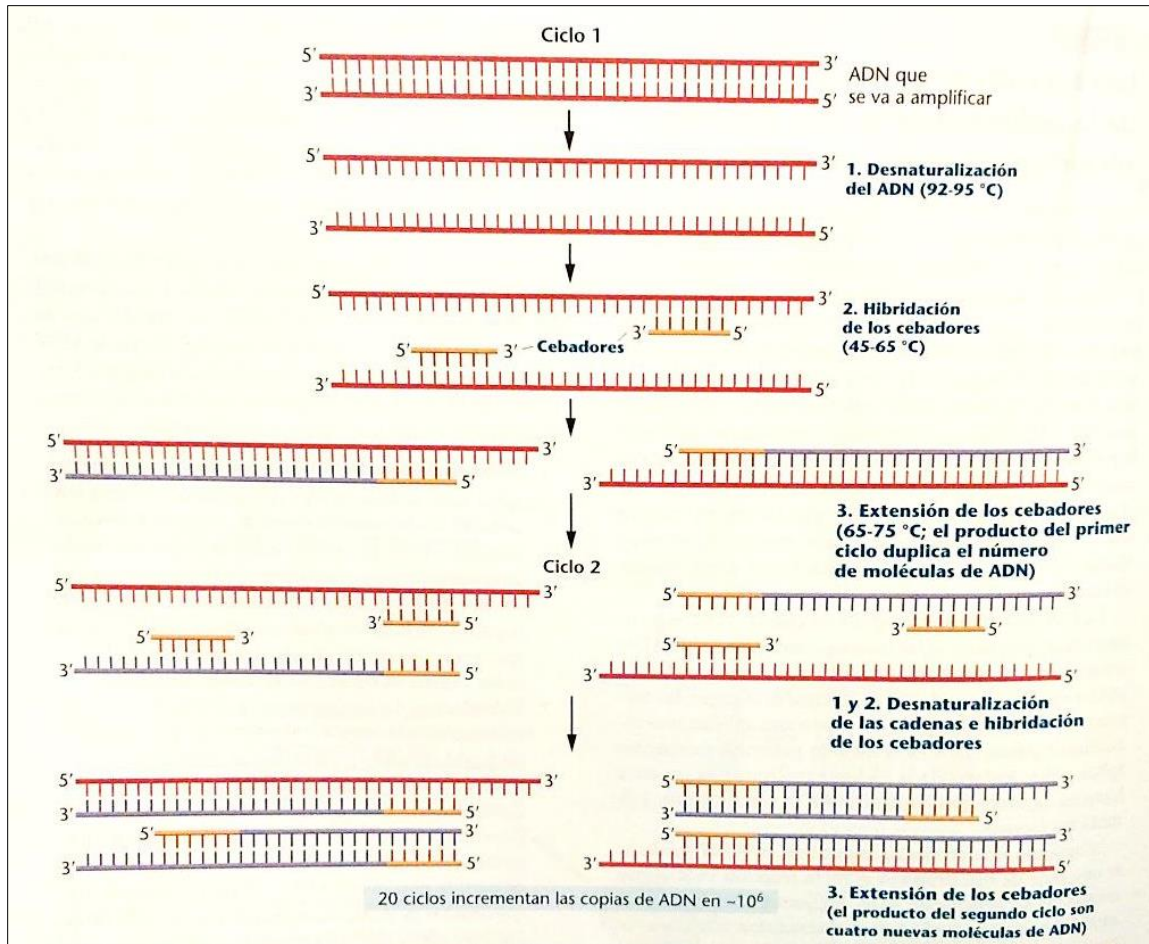


Figura 7. Representación esquemática de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Fuente: Klug, W.S. Conceptos de genética.

La PCR es una reacción en cadena, porque el número de nuevas cadenas de ADN se duplica en cada ciclo, y las nuevas cadenas, junto con las antiguas, sirven como moldes para el ciclo siguiente. Cada ciclo tarda entre dos y cinco minutos y puede repetirse de manera inmediata, así que en menos de un par de horas se pueden realizar entre 25 y 30 ciclos, lo que da como resultado la multiplicación por un millón de la cantidad de ADN. Este proceso se automatiza mediante equipos denominados termocicladores, que pueden programarse para llevar a cabo un número predeterminado de ciclos. Como resultado, se generan grandes cantidades de una secuencia de ADN específica, las cuales pueden utilizarse para muchos propósitos.

A continuación se presentan las principales ventajas y desventajas de la PCR:

Ventajas (91, 94, 96, 98)

- Rapidez. Se requieren únicamente algunas horas para la identificación de prácticamente cualquier agente patógeno, lo cual constituye un tiempo muy corto en comparación con los métodos tradicionales que suelen necesitar de días e incluso semanas para la obtención de un resultado presuntivo, especialmente al tratarse de organismos de difícil o peligroso cultivo o aquellos de lento crecimiento. Asimismo, la oportunidad de realizar detecciones múltiples (detección de distintos microorganismos a la vez en una o varias muestras) y la capacidad de automatización de los distintos procesos, aumenta considerablemente la eficiencia de los métodos moleculares.
- Especificidad. El empleo de blancos genómicos adecuados y específicos (genes, inserciones genómicas, etc.) para la detección de los microorganismos de interés, permite la obtención de resultados exactos y confiables, sin dar lugar a interpretaciones subjetivas o resultados parciales. Estos métodos son altamente específicos al compararlos con los métodos convencionales.
- Sensibilidad. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos poseen una sensibilidad extraordinaria al ser capaces de detectar cantidades mínimas de material genético de prácticamente cualquier patógeno respiratorio permitiendo la obtención de resultados positivos incluso en etapas tempranas de la infección, sin importar la viabilidad del microorganismo y de igual manera, se ven menos afectadas por alguna terapia antimicrobiana previa o por la respuesta inmune del huésped en comparación con las pruebas basadas en cultivo. Estas pruebas tienen una particular importancia en el diagnóstico de infecciones que son muy difíciles o incluso imposibles de diagnosticar rápidamente por otros métodos.
- Versatilidad. La existencia de numerosas variantes y plataformas de PCR permite la adecuación de esta técnica para muchos ensayos distintos de la manera más conveniente. De igual forma, se pueden emplear distintos tipos de muestras clínicas; para el caso específico de la detección de agentes bacterianos causantes de IRAs, se pueden emplear hisopados nasofaríngeos, esputo de expectoración, lavados broncoalveolares, cepillados bronquiales protegidos y aspirados endotraqueales. Otros aspectos importantes que demuestran la versatilidad de las técnicas moleculares son su facilidad de estandarización, automatización y operación.
- Eficiencia en costos. Aunque el costo de las pruebas moleculares varía ampliamente, su uso adecuado puede traer grandes beneficios a los centros de salud que los emplean. Los beneficios relacionados a los costos

al ocupar estas pruebas se reflejan en aspectos como los siguientes: al ser capaces de realizar una detección rápida y altamente específica de los agentes etiológicos, es posible brindar al paciente el tratamiento antibiótico correcto en etapas tempranas de la infección, lo cual minimiza el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro y reduce la duración del tratamiento. De igual manera, al brindarle el tratamiento adecuado, es posible reducir su estancia hospitalaria, lo cual permite la disminución de gastos por parte del centro de salud, así como evitar el uso de pruebas adicionales para el diagnóstico.

Otras ventajas importantes son: obtención de datos epidemiológicos, mayor seguridad para los realizadores de las pruebas (no hay necesidad de cultivar organismos peligrosos), disminución del uso de antibióticos para combatir la adquisición de resistencia por parte de los microorganismos (se estima que alrededor del 55% de las prescripciones de antibióticos para ARIs se otorgaron en casos con etiología no bacteriana), identificación de organismos nuevos, o no-cultivables, determinación de susceptibilidad antimicrobiana y cuantificación de cargas virales o bacterianas para un tratamiento adecuado (15, 96, 99).

Por otro lado, algunas de las desventajas de la PCR es la probabilidad de detección de organismos no viables, la poca disponibilidad de protocolos de diagnóstico aprobados por los organismos sanitarios y los costos relativamente altos (15, 91, 92). Por estas razones, es necesario diseñar protocolos que permitan diferenciar entre colonización e infección y establecer adecuadamente los criterios de infección positiva para cada bacteria, especialmente para aquellas especies que pueden tanto colonizar como infectar el tracto respiratorio. Se requiere también diseñar y estandarizar métodos amplios, confiables y al alcance de los distintos niveles de atención sanitaria. De igual manera, se deben considerar las numerosas ventajas costo-efectivas de las pruebas moleculares mencionadas con anterioridad para alcanzar un balance que permita generar ganancias importantes en la salud pública a corto y largo plazo. Una clara estrategia es implementar un método de diagnóstico molecular específico de acuerdo a las necesidades de atención del centro de salud, especialmente considerando la cantidad y condiciones sanitarias de los pacientes.

3.4.2. PCR tiempo real (qPCR)

En el transcurso del tiempo y gracias a la enorme adquisición de conocimientos e importantes avances tecnológicos en el campo de la genética y la biología molecular, se han desarrollado numerosas variantes de la PCR convencional o PCR punto final (descrita en la sección anterior). En el caso específico de este proyecto, sólo

se describirá una destacada variante de la PCR, denominada PCR tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, *quantification PCR*).

En la PCR tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación. Los termocicladores para llevar a cabo la qPCR incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la qPCR pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos, diseñadas de manera especial.

Agentes intercalantes. Son fluorocromos que aumentan notablemente su emisión de fluorescencia cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR tiempo real es el SYBR Green. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y además, es más barato que las sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de iniciadores, muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben emplear condiciones de reacción óptimas y una selección cuidadosa de los iniciadores para disminuir el riesgo de formación de dímeros. Además, es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*hot start PCR*), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Para ello se pueden usar polimerasas recombinantes modificadas que sólo funcionan después de ser activadas a temperaturas elevadas o anticuerpos que bloquean el centro activo de la polimerasa hasta que la reacción alcanza temperaturas altas en las que el anticuerpo se desnaturaliza liberando la polimerasa y permitiendo su actividad.

Sondas de hibridación específicas. Son sondas marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan y las sondas denominadas *molecular beacons*.

- Sondas de hidrólisis. Son oligonucleótidos marcados con un fluorocromo donador en el extremo 5' que emite fluorescencia al ser excitado y un aceptor en el extremo 3' que absorbe la fluorescencia liberada por el donador. Para que esto ocurra, las moléculas donadora y aceptora deben estar espacialmente próximas. Además, el espectro de emisión de la primera se ha de solapar con el espectro de absorción de la segunda. Mientras la sonda está intacta, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor. Sin embargo, durante la amplificación de ADN blanco, la sonda se hibrida con su cadena complementaria. Al desplazarse a lo largo de la cadena, en su acción de síntesis, la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*, que tiene actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, produciéndose la liberación del fluorocromo donador. Como donador y aceptor están, ahora, espacialmente alejados, la fluorescencia emitida por el primero es captada por el lector (figura 8).

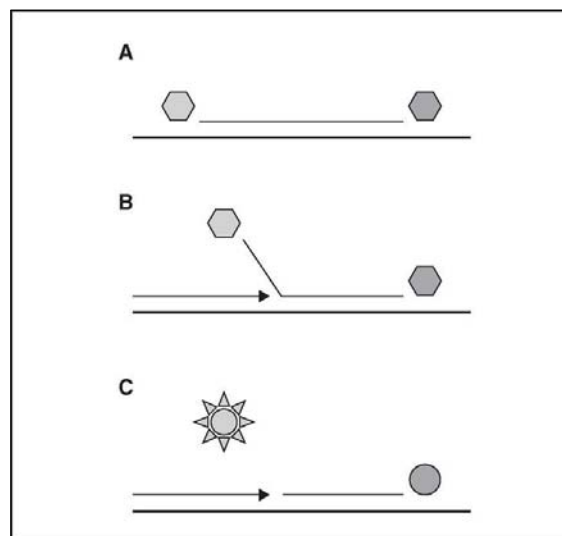


Figura 8. Función general de las sondas de hidrólisis

- *Molecular beacons*. Son sondas parecidas a las anteriores. Tienen una molécula donadora en el extremo 5' y una aceptora en el extremo 3' pero, además, presentan una estructura secundaria en forma de asa, en la que reside la secuencia de unión específica con el ADN blanco. Los extremos permanecen plegados cuando la sonda no está hibridada, lo que conlleva que donador y aceptor estén muy cerca uno de otro. En esta conformación la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor y no es captada por el lector del equipo. Sin embargo, al hibridar con el ADN blanco la sonda se abre, alejándose donador y aceptor, pudiendo ser detectada la fluorescencia emitida por el primero (figura 9).

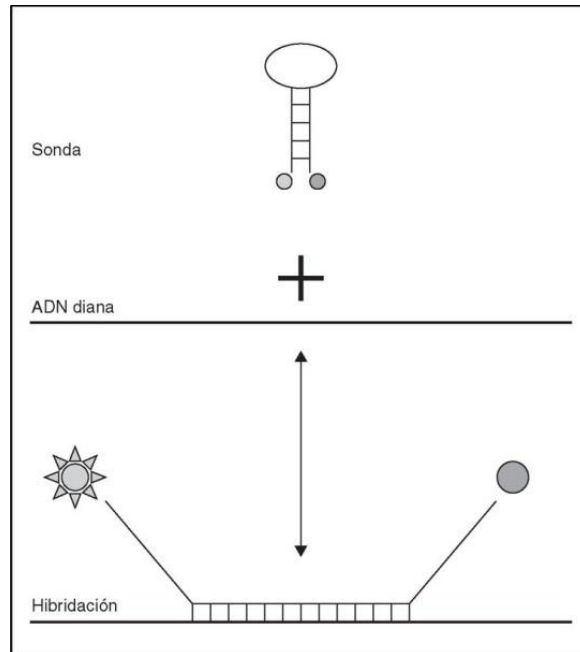


Figura 9. Función general de las *Molecular beacons*

En ambos sistemas, el incremento de ADN en cada ciclo se corresponde con un aumento de hibridación de las sondas, lo que conlleva un aumento en la misma proporción de fluorescencia emitida. El empleo de sondas garantiza la especificidad de la detección y permite identificar polimorfismos o mutaciones puntuales, pero su coste es más elevado que el SYBR Green y la optimización de las condiciones de la reacción resulta más difícil.

Los equipos para PCR tiempo real están compuestos por un termociclador y por un lector de fluorescencia y diseñados para poder efectuar la lectura de la fluorescencia emitida en cada uno de los viales usados y en cualquier momento de la reacción. El número de canales de lectura que presentan los equipos también es importante. Disponer de varios canales de lectura permite detectar la emisión de distintos fluorocromos a la vez. De esa manera, se pueden usar varias sondas marcadas con distintos fluorocromos, para identificar diferentes tipos de ADN diana en la misma reacción (PCR múltiple) o incorporar controles internos a la reacción, para detectar la presencia de inhibidores.

El ADN o ARN inicial en la muestra se puede cuantificar de manera muy sencilla, añadiendo simplemente controles externos con concentraciones conocidas y crecientes de ADN blanco (curva estándar) en el proceso de amplificación. En la PCR tiempo real el programa informático va registrando el incremento de fluorescencia (proporcional al aumento de ADN) en cada ciclo, y esta información se refleja gráficamente en curvas de cinética de la reacción para cada una de las muestras y controles (figura 10). Por tanto, se puede controlar la

amplificación en las fases iniciales, cuando la concentración de los reactivos todavía no es limitante y el efecto de la variabilidad en la eficiencia de amplificación es menos importante. Para cada muestra el programa informático calcula el número de ciclo en el que el lector empieza a detectar un incremento de fluorescencia significativo, con respecto a la señal de base. El ciclo en el que se empieza a detectar el aumento de fluorescencia se denomina punto de corte (C_p , *crossing point*) o ciclo umbral (C_t , *threshold cycle*) y es inversamente proporcional a la concentración inicial de ADN diana presente en la muestra. Con las concentraciones previamente conocidas de los controles externos y sus C_t correspondientes se dibuja una curva patrón. Interpolando en ella los valores de los C_t de cada muestra problema se puede inferir su concentración de ADN inicial.

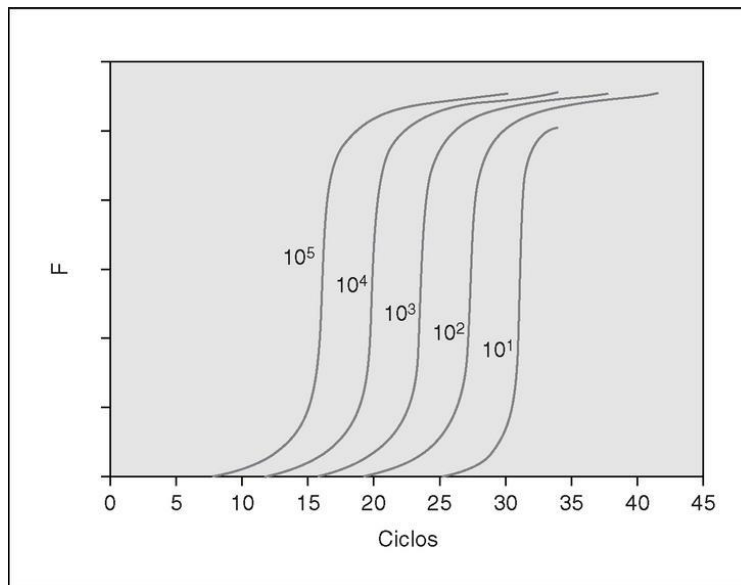


Figura 10. Vista general de curva estándar por qPCR

Una herramienta muy útil para la caracterización de los productos de PCR es el análisis de curvas de disociación mediante “fusión de alta resolución” (*HRM, High Resolution Melting*). Esta técnica se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Mediante esta aplicación se puede determinar la T_m (temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado) de los amplicones para comprobar su especificidad (figura 11). Cada fragmento amplificado tiene una T_m característica, que depende sobre todo de su longitud y de la composición de sus bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR.

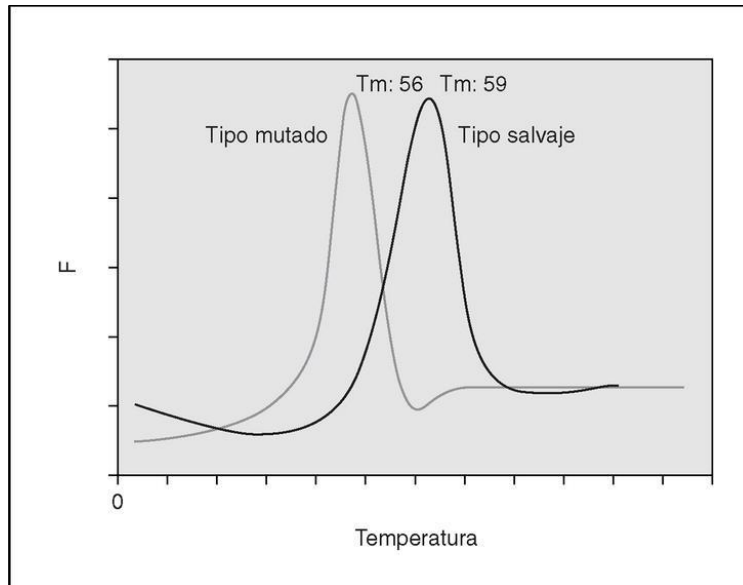


Figura 11. Comparación de mutación por HRM

3.4.2.1. Ventajas de la qPCR

La primera gran ventaja de la qPCR es su rapidez, puesto que no se necesita ningún proceso adicional de detección, pudiéndose completar el proceso de amplificación y detección en 30-40 minutos. Además, gracias a su rapidez, estos equipos se pueden rentabilizar al máximo, permitiendo un flujo mucho mayor de muestras y de ensayos. Otra ventaja muy importante de la qPCR es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Los sistemas en tiempo real permiten cuantificar la concentración inicial de ácido nucleico presente en las muestras de manera mucho más sencilla, más precisa y sobre todo en un rango mucho mayor que en los procedimientos convencionales. Los equipos para qPCR tienen una capacidad muy elevada ya que en el mismo instrumento se pueden llevar a cabo ensayos cualitativos, cuantitativos, determinación de mutaciones, PCR múltiple, etc., mientras que para los procedimientos convencionales se requieren múltiples equipos (100).

3.4.2.2. Aplicaciones de la qPCR en microbiología clínica

Las aplicaciones de la qPCR en el campo de la microbiología clínica son numerosas gracias a sus indudables ventajas y a la sencillez de su empleo, lo cual ha ido produciendo que la qPCR vaya reemplazando la PCR clásica, y que su aplicación se extienda a un número cada vez mayor de agentes infecciosos, implementándose progresivamente en la rutina asistencial. Algunas empresas de diagnóstico han hecho ya una apuesta decidida

por la nueva tecnología y tienen disponibles kits para el diagnóstico de los agentes infecciosos de mayor interés comercial mediante sistemas de qPCR (VIH, VHB, VHC, citomegalovirus, etc.). Sin embargo, hay muchas enfermedades infecciosas, con menor interés comercial, en las que el uso de métodos moleculares de diagnóstico aporta indudables ventajas. La qPCR, combinada con los nuevos sistemas automáticos para la preparación de las muestras, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación o cuantificación de esos agentes infecciosos. Otro campo potencial de aplicación de la qPCR es en la identificación de organismos difícilmente cultivables, cuya detección rápida sea beneficiosa por algún motivo. El éxito de un tratamiento no sólo se basa en un diagnóstico etiológico temprano, sino que en muchas ocasiones la determinación rápida de la sensibilidad del agente causal a los fármacos antimicrobianos puede ser determinante. Hoy día ya están disponibles kits comerciales para algunas aplicaciones comentadas en este apartado y en el futuro irán apareciendo muchos otros. Incluso para las enfermedades infecciosas menos frecuentes están, o estarán disponibles, protocolos bien optimizados, sencillos y rápidos para que puedan ser implementados en la rutina asistencial.

3.4.3. qPCR empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos

El equipo BioMark™ (Fluidigm, California, EU. Figura 12) es una plataforma innovadora que permite diseñar experimentos dentro de un amplio rango de aplicaciones genómicas (qPCR digital, expresión génica, genotipificación, etc.) con una alta capacidad para el procesamiento de un gran número de muestras de forma rápida y eficiente.



Figura 12. Equipo Biomark™

Esta plataforma se basa en el uso de la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos, la cual se refiere al uso de dispositivos conocidos como Circuitos de Fluidos Integrados (IFC, por sus siglas en inglés) que emplean cantidades mínimas (nanolitros) de reactivos y muestras por reacción. Estos dispositivos se encuentran en dos presentaciones básicas: 48.48 IFC y 96.96 IFC (figura13). La primera puede analizar simultáneamente 48 muestras clínicas distintas con 48 ensayos genómicos diferentes, lo cual significa 2,304 reacciones por separado en una sola corrida; mientras que la segunda tiene la capacidad de analizar 96 muestras clínicas con 96 ensayos genómicos, esto quiere decir, 9216 reacciones en la misma prueba.

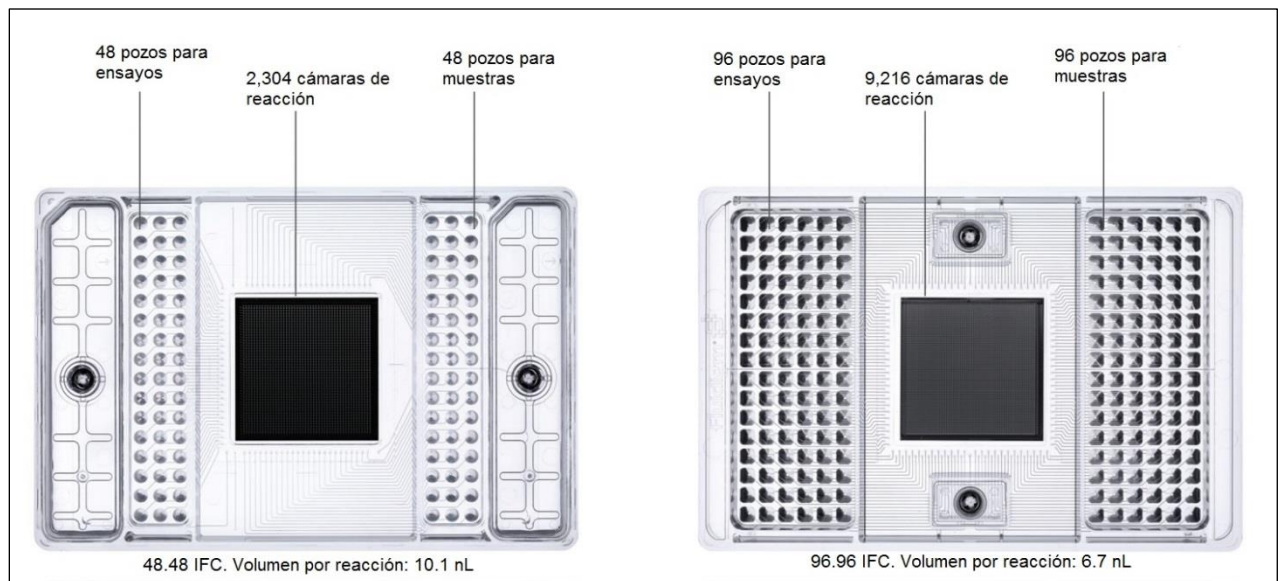


Figura 13. IFCs. Circuitos de Fluidos Integrados

Entre las características destacables de esta plataforma se encuentran las siguientes:

- Flexibilidad para el diseño de experimentos con diversas aplicaciones genómicas.
- Capacidad para trabajar con un gran número de muestras clínicas y ensayos genómicos.
- Alta eficiencia y rapidez. En general, se requieren solamente algunas horas para llevar a cabo una corrida completa que consiste en 2,304 o 9,216 reacciones individuales dependiendo del IFC empujado.
- Uso de cantidades muy pequeñas de muestras y reactivos con la consecuente disminución de gastos.
- Alta sensibilidad y reproducibilidad. Facilidad en la interpretación y análisis de resultados.
- Capacidad de realizar pruebas de HRM con un intervalo de calentamiento de 5°C/segundo.
- Cuenta con fotodocumentador capaz de detectar distintos colorantes en un amplio espectro de absorción y emisión.

4. JUSTIFICACIÓN

En el INER, así como en la mayoría de los centros de salud en el país, se siguen empleando los métodos convencionales de cultivo, microscopía y serología para la detección de las principales bacterias respiratorias de importancia médica, a pesar de sus numerosas e importantes desventajas. El uso de estas técnicas deriva en la obtención de resultados tardíos, poco específicos, con baja sensibilidad y con un reducido número de datos con relevancia epidemiológica; lo cual dificulta un tratamiento oportuno y adecuado del paciente infectado.

Este proyecto tiene su justificación en la necesidad de diseñar y estandarizar un nuevo y mejor método para la detección adecuada y oportuna de las principales bacterias que causan infecciones respiratorias agudas. Es necesario el desarrollo de una técnica rápida, específica, sensible y costo-efectiva, capaz de detectar los patógenos bacterianos respiratorios más importantes y de generar datos epidemiológicos relevantes.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Diseñar y estandarizar un ensayo de qPCR múltiple para la detección de las principales bacterias de importancia respiratoria, empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos

5.2. Objetivos específicos

- Diseñar iniciadores que permitan la amplificación de blancos genómicos específicos para la detección de patógenos bacterianos respiratorios con alta especificidad y sensibilidad, y que puedan ser empleados en distintas plataformas y metodologías de PCR.
- Estandarizar las condiciones óptimas de amplificación de cada par de iniciadores diseñados empleando ADN de controles bacterianos y ADN de muestras clínicas ya tipificadas.
- Adecuar las condiciones de amplificación para la detección bacteriana mediante qPCR múltiple empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos.
- Detectar las principales bacterias de importancia respiratoria en distintos grupos de pacientes con enfermedad respiratoria aguda.
- Comprobar los resultados obtenidos mediante caracterización genómica de las bacterias detectadas por medio de secuenciación convencional Sanger.
- Determinar la frecuencia de las bacterias patógenas respiratorias, así como el tipo y frecuencia de co-infecciones bacterianas y co-infecciones bacterianas/virales presentes en los distintos grupos de pacientes estudiados.
- Proponer una metodología eficiente que sea capaz de detectar un gran número de patógenos respiratorios en una cantidad elevada de pacientes de forma rápida y a bajo costo, de esta forma cubrir las necesidades de diagnóstico en un centro de atención especializado como el INER.

6. TIPO DE ESTUDIO

Experimental, descriptivo, transversal, prospectivo.

7. MATERIAL

7.1. Material biológico

-Hisopados nasofaríngeos de 100 sujetos diagnosticados con IRA

-Cultivos de controles bacterianos:

- *K. pneumoniae* BH1
- *K. oxytoca* ATCC 700324
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *S. aureus* ATCC 6538
- *M. tuberculosis* H37Ra

7.2. Reactivos y soluciones

-Medio de transporte: 5% de albumina bovina, gentamicina (4mg/mL), penicilina/estreptomicina (50,000 U/50,000 µg), fungizona (1mg/mL), NaHCO₃ al 7.5% y solución balanceada de Hank's. Este medio fue ajustado a pH 7-7.2, filtrado y esterilizado.

-Kit de extracción de ADN bacteriano QIAamp® cador® Pathogen (Qiagen, Hilden, Alemania)

-Colorante EvaGreen® (Biotium, California, EU)

-Colorante GelRed® (Biotium, California, EU)

-Kit de PCR TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems, California, EU)

- Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Alemania)
- Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, California, EU)
- Kit de PCR SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (Bio-Rad, California, EU)
- Buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM, pH 8)
- 2.5X Ready Reaction Premix
- 5X BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer
- Polimero POP-6™ (Applied Biosystems, EU)
- EtOH al 100%
- CH₃COONa 3M a pH=5.2

7.3. Equipos

- Epoch (BioTek, Vermont, EU)
- Rotor-Gene (Qiagen, Hilden, Alemania)
- Equipo EC3 Imaging System (Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido).
- Veriti™ (Applied Biosystems, California, EU)
- BioMark™ (Fluidigm, California, EU)
- ABI PRISM® 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EU)

8. METODOLOGÍA

8.1. Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores específicos para la identificación de las principales bacterias que causan IRAs. Se diseñó un par de iniciadores (Forward y Reverse) para el nivel de especie y un par extra para el nivel de género en aquellos casos en los que era necesaria una identificación presuntiva (géneros bacterianos donde dos o más especies son capaces de producir IRAs).

El primer paso para el diseño de los iniciadores fue realizar una búsqueda completa en la literatura para conocer blancos genómicos ya reportados para la identificación de cada una de las bacterias de interés. La gran mayoría de los blancos encontrados fueron genes que codifican para una proteína específica de cada especie bacteriana. En otros casos, se encontraron reportadas inserciones genómicas características de algunas especies bacterianas que permiten su identificación.

Una vez seleccionado el blanco genómico más adecuado (gen o inserción específica), se obtuvieron todas sus secuencias genómicas disponibles en la base de datos GenBank de la página web del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (NCBI, EU), las cuales correspondieron a secuencias parciales o completas, así como secuencias del genoma completo de las distintas cepas disponibles de la bacteria correspondiente. En el caso de los genomas completos, se encontraron las secuencias de interés dentro de éstos y se trabajaron individualmente.

Todas las secuencias obtenidas se trabajaron en formato “fasta” y haciendo uso del software MEGA 5.1, se alinearon aquellas correspondientes al mismo gen, con el fin de visualizar la región de interés de cada bacteria y obtener información sobre la composición y propiedades de ésta.

Una vez recolectada la información necesaria, se diseñaron los iniciadores específicos. Empleando el software gratuito Primer-BLAST disponible dentro de la página web del NCBI, se obtuvieron distintas opciones de iniciadores para cada blanco genómico de interés. Los parámetros que se delimitaron para el diseño de los iniciadores fueron los siguientes:

- Tamaño de 18 a 22 nucleótidos
- 40 a 60% de G+C
- Repeticiones consecutivas no mayores a 3 nucleótidos
- Tm de 57 a 63°C, con una diferencia no mayor a 3°C entre los iniciadores dentro del par
- Tamaño del producto de amplificación entre 150 y 250 pb
- Baja probabilidad de formación de estructuras secundarias de cada iniciador
- Baja probabilidad de formación de dímeros entre ambos iniciadores dentro del par

Los iniciadores resultantes se situaron dentro de las alineaciones previamente elaboradas con el fin de conocer su capacidad para identificar a todos los aislados bacterianos disponibles o la mayor cantidad posible de éstos. De igual forma, cada iniciador obtenido se analizó con la herramienta digital BLAST dentro de la misma página del NCBI con el fin de conocer la especificidad de los iniciadores y su capacidad de identificar única y exclusivamente los blancos genómicos de interés y así evitar la probabilidad de obtener falsos positivos.

En aquellos casos donde no se obtuvieron iniciadores con los parámetros deseados o con baja especificidad usando Primer-BLAST, se procedió a diseñarlos de forma manual, empleando el software MEGA 5.1 y las alineaciones previamente realizadas. Se localizaron de forma visual sitios conservados dentro de la secuencia de interés y dentro de éstos se situaron ambos iniciadores, procurando que cumplieran los parámetros mencionados con anterioridad. Los iniciadores obtenidos se sometieron al mismo análisis de especificidad empleando BLAST.

Se diseñaron un total de 38 iniciadores para la detección de las principales bacterias respiratorias y se sintetizaron a través de la empresa Invitrogen (California, EU). Cada iniciador se resuspendió, se llevó a una concentración 200 µM y se almacenó a -20°C.

8.2. Delimitación de grupos de estudio

En este proyecto se incluyeron 100 pacientes ingresados en el INER. El criterio de inclusión fue el diagnóstico clínico de enfermedad respiratoria aguda (neumonía adquirida en la comunidad, sospecha de influenza, crisis asmática y/o bronquiolitis) al momento de ingreso al instituto. Los pacientes seleccionados se dividieron en cuatro grupos según la siguiente clasificación:

Grupo A: 25 pacientes <15 años con reporte positivo a virus respiratorios

Grupo B: 25 pacientes <15 años con reporte negativo a virus respiratorios

Grupo C: 25 pacientes ≥15 años con reporte positivo a virus respiratorios

Grupo D: 25 pacientes ≥15 años con reporte negativo a virus respiratorios

Los datos correspondientes a virus respiratorios en todos los pacientes incluidos en este proyecto se obtuvieron previamente en el Departamento de Virología y Micología en el INER.

No fueron incluidos en este proyecto pacientes ambulatorios, pacientes positivos al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), ni aquellos con comorbilidades importantes como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC).

8.3. Obtención de muestra

Se obtuvieron hisopados nasofaríngeos de los 100 pacientes y se almacenaron temporalmente en medio de transporte con la siguiente composición: 5% de albumina bovina, gentamicina (4mg/mL), penicilina/estreptomicina (50,000 U/50,000 µg), fungizona (1mg/mL), NaHCO₃ al 7.5% y solución balanceada de Hank's. Este medio fue ajustado a pH 7-7.2, filtrado y esterilizado.

Se realizaron alícuotas de 0.5 mL de cada muestra y se almacenaron en viales a -80°C.

8.4. Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de ácidos nucleicos totales de los 100 hisopados nasofaríngeos se llevó a cabo de forma manual empleando el kit QIAamp® cador® Pathogen (Qiagen, Hilden, Alemania). Se eligió este kit por su capacidad de extraer ácidos nucleicos patógenos (ARN y ADN viral y ADN bacteriano) a partir de muestras clínicas, asegurando que los ácidos nucleicos extraídos se encuentren libres de proteínas, nucleasas y otras impurezas para su uso inmediato en aplicaciones subsecuentes tales como la identificación de patógenos mediante PCR. El principio de la técnica y su procedimiento fue el siguiente:

Se emplearon 200 µL de cada uno de los hisopados nasofaríngeos obtenidos. Estas muestras se sometieron a un proceso de lisis bajo condiciones altamente desnaturalizantes a temperatura ambiente (15-25°C) en

presencia de proteinasa K y buffer de lisis, los cuales en conjunto también aseguran la inactivación de nucleasas. Posteriormente, el buffer de unión provisto en el kit ajustó las condiciones fisicoquímicas del ADN presente para su purificación. El lisado obtenido se transfirió a una columna QIAamp Mini. Se centrifugó esta solución, los ácidos nucleicos se adsorbieron en una membrana de sílice, mientras que las impurezas y contaminantes pasaron a través de ella. Dos lavados eficientes eliminaron los contaminantes restantes así como enzimas inhibitoras. Los ácidos nucleicos purificados se recuperaron en 50 µL de buffer de elución.

Los ácidos nucleicos obtenidos se cuantificaron a 260 nm (absorbancia máxima del ADN) con el equipo Epoch (BioTek, Vermont, EU) y su pureza se determinó con el cociente 260/280. Los ácidos nucleicos extraídos se almacenaron a -80°C.

8.5. Evaluación de especificidad de los iniciadores diseñados

La estandarización y obtención de las condiciones óptimas para la qPCR múltiple se llevó a cabo empleando cultivos bacterianos control*, sembrados en medios sólidos y semisólidos de los siguientes microorganismos:

- *K. pneumoniae* BH1
- *K. oxytoca* ATCC 700324
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *S. aureus* ATCC 6538
- *M. tuberculosis* H37Ra

De igual manera, se utilizaron muestras de pacientes ingresados en el INER con resultado positivo a las siguientes bacterias respiratorias:

- *S. aureus*
- *M. pneumoniae*
- *H. influenzae*
- *P. aeruginosa*

* Todos los cultivos se obtuvieron del cepario de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, con excepción del cultivo de *M. tuberculosis*, el cual se obtuvo del departamento de Microbiología del INER.

El primer paso para la estandarización, fue la extracción y cuantificación de los ácidos nucleicos totales a partir de los cultivos control y las muestras de referencia (véase técnica en “Extracción de ácidos nucleicos”, sección 8.4.). A continuación, todos los iniciadores sintetizados (200 μM) se diluyeron a una concentración de trabajo 20 μM .

Posteriormente se llevó a cabo la amplificación por separado de cada control o muestra de referencia con sus iniciadores correspondientes. Estas pruebas se realizaron en el equipo Rotor-Gene (Qiagen, Hilden, Alemania), empleando el kit de amplificación TaqMan® Gene Expression Master Mix[†] (Applied Biosystems, California, EU) y el colorante de unión a ADN de nueva generación EvaGreen® (Biotium, California, EU) con el siguiente protocolo general:

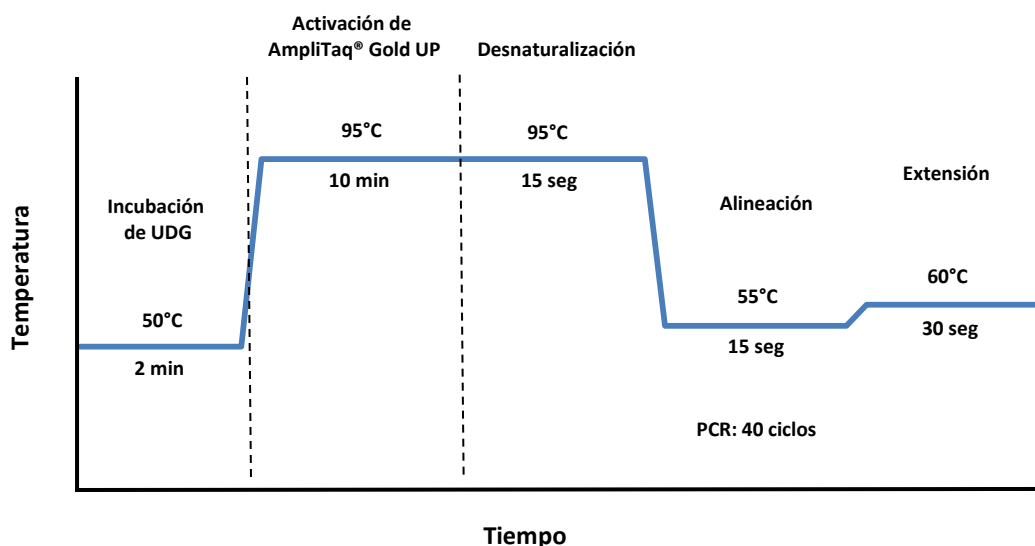
Reactivo	Volumen para una reacción	Concentración final
2X TaqMan® Gene Expression Master Mix	10 μL	1X
20X EvaGreen	1 μL	1X
Iniciador Forward	0.5 μL	10 μM
Iniciador Reverse	0.5 μL	10 μM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Volumen final	20 μL	-

Para este protocolo se empleó una cantidad constante de 100 ng de ADN de cada muestra y control, por lo que se ajustó la cantidad de agua en cada reacción para obtener un volumen final de 20 μL . Asimismo, se incluyó un control negativo y un control de reactivos en cada prueba.

El proceso de amplificación se llevó a cabo con las condiciones que a continuación se presentan:

[†] El kit de amplificación utilizado contiene polimerasa de ADN AmpliTaq Gold® UP (Ultra pura), Uracil-DNA Glicosilasa (UDG), deoxynucleótidos trifosfatados (dNTPs) con deoxyuridina trifosfatada (dUTP), ROX™ como referencia pasiva, y los componentes optimizados del buffer.

Condiciones de amplificación



El equipo Rotor-Gene además de llevar a cabo los ciclos de amplificación en tiempo real mediante calentamiento y enfriamiento por convección, tiene la capacidad de realizar pruebas de HRM (*High Resolution Melting* o Fusión de Alta Resolución), permitiendo incrementos de temperatura de incluso 0.1°C cada segundo. Empleando ésta útil herramienta, se determinó la T_m (temperatura de desnaturalización) específica de los productos amplificados en cada prueba, programando una rampa de HRM desde 75°C hasta 90°C con un aumento de 0.1°C/segundo después del proceso de los ciclos de amplificación.

El siguiente paso dentro de la estandarización, fue realizar electroforesis en geles de agarosa de los productos obtenidos de la amplificación con el fin de analizar su tamaño y pureza, así como contar con otro parámetro para evaluar la especificidad de cada par de iniciadores utilizados. En estas pruebas se incluyeron los controles negativos y los controles de reactivos correspondientes de cada reacción como referencia.

Para este paso, se prepararon geles de agarosa ultra pura con concentraciones de 1.5% o 2% dependiendo del tamaño esperado del producto de amplificación y se utilizó como colorante GelRed® (Biotium, California, EU), reemplazando la técnica tradicional que emplea bromuro de etidio debido a sus características citotóxicas y mutagénicas.

Las cantidades empleadas para la carga de los geles fue la siguiente:

- Muestras: 1 μL de GelRed 200X, 5 μL de buffer de carga y 10 μL del producto de amplificación.
- Marcador de peso molecular (1 Kpb): 1 μL de GelRed® 200X, 5 μL de buffer de carga y 2 μL del marcador de peso molecular.

Se utilizó buffer TBE para el llenado de la cámara y se llevó a cabo la electroforesis a 100 V durante 40 minutos. Los geles se analizaron con el software VisionWorks®LS Versión 7.1 (Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido) del equipo EC3 Imaging System (Ultra-Violet Products, Cambridge, Reino Unido). Se analizó el tamaño de los productos de amplificación obtenidos y se compararon con los controles respectivos.

Mediante las reacciones de amplificación en tiempo real y la rampa de HRM, se obtuvieron el Ct (*Crossing Threshold*) y la Tm de cada producto de amplificación respectivamente, mientras que las pruebas de electroforesis permitieron comparar su tamaño en relación al esperado. Estos datos permitieron evaluar la especificidad y eficiencia de los iniciadores diseñados, así como observar el comportamiento de amplificación en tiempo real de los controles y muestras de referencia, permitiendo la obtención de condiciones óptimas consenso a considerar en las pruebas posteriores.

De los 38 iniciadores diseñados inicialmente, se descartaron 6 por no presentar una especificidad adecuada y los 32 restantes se emplearon para las pruebas posteriores de estandarización y detección.

8.6. Estandarización de condiciones de la qPCR múltiple. Evaluación de pool de iniciadores.

8.6.1. Pre-amplificación y amplificación en tiempo real de controles bacterianos

La detección en el equipo BioMark™, el cual posee la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos, requiere de un paso previo de amplificación empleando la mezcla (pool) de todos los iniciadores a emplear con el fin de llevar a cabo una amplificación de los blancos genómicos presentes en las muestras, que permita obtener una cantidad adecuada de material genético para los pasos posteriores. Esta mezcla se denomina STA (*Specific Target Amplification*) y se preparó como se menciona continuación:

A partir de las soluciones iniciales de los iniciadores sintetizados 200 μM (200 pmol/ μL), se prepararon 100 μL de cada iniciador a una concentración 40 μM (40 pmol/ μL). Posteriormente se tomaron 0.5 μL de cada solución 40 μM , se mezclaron en un mismo tubo y se llevó a un volumen final de 100 μL empleando buffer TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8), obteniendo así una concentración final 200 nM (200 nmol/ μL) de cada iniciador dentro de la mezcla. El pool de iniciadores 200 STA obtenido se almacenó a -20°C .

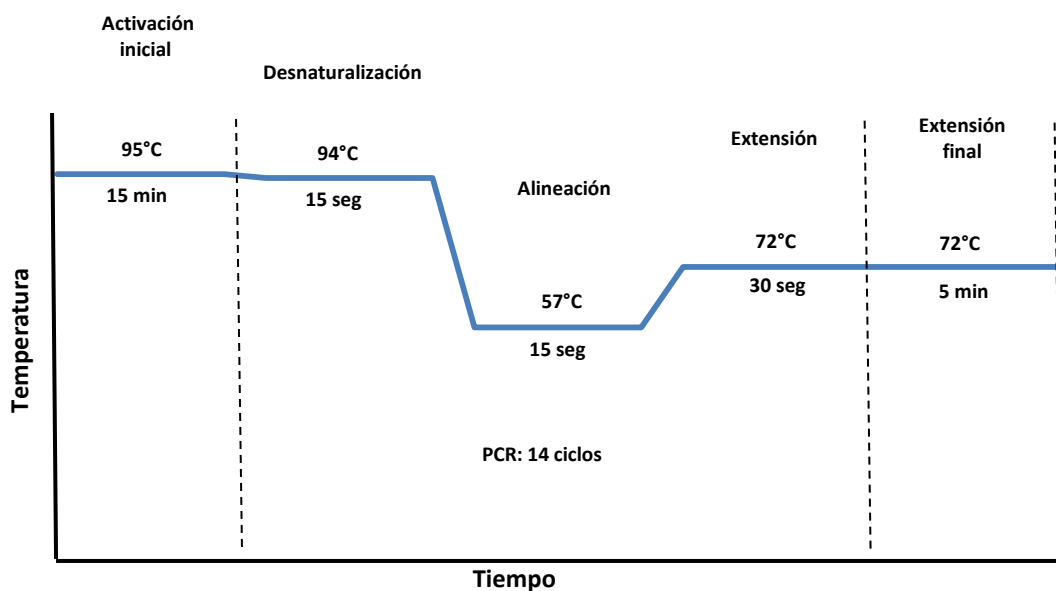
De igual manera, a partir de la solución inicial 200 μM de los iniciadores, se tomaron 0.5 μL (100 pmol) de cada uno, se mezclaron en un mismo tubo y se llevó a un volumen final de 200 μL empleando buffer TE para así obtener una solución con una concentración final 500 nM (500 nmol/ μL) de cada iniciador dentro de la mezcla. El pool de iniciadores 500 STA obtenido se almacenó a -20°C .

Para realizar éste paso de estandarización se empleó el ADN extraído de los controles de *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*, *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* y el pool de iniciadores 200 STA (200 nM) para llevar a cabo una pre-amplificación y evaluar la eficiencia de la misma. Se utilizó siguiente protocolo general para la mezcla de reactivos:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12.5 μL	1X
Pool de iniciadores 200 STA (Cada iniciador 200 nM)	1 μL	8 nM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Total	25 μL	

Esta amplificación, se realizó en el equipo Veriti™ (Applied Biosystems, California, EU) siguiendo el siguiente protocolo de amplificación:

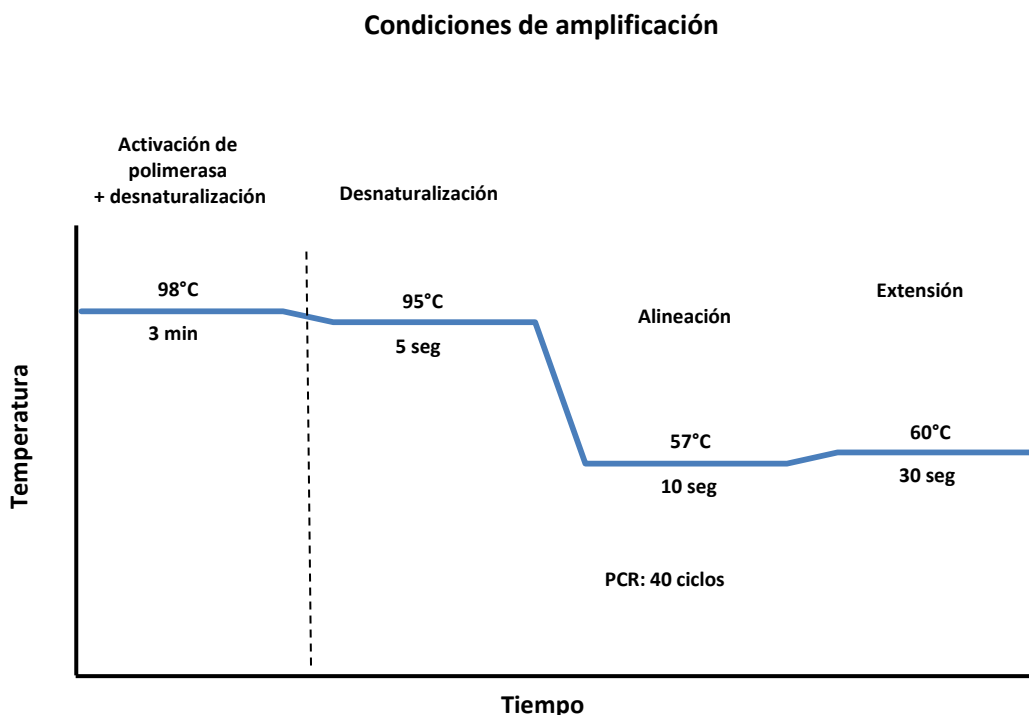
Condiciones de amplificación



Después de cada reacción de pre-amplificación, se ocuparon 5 µL de los productos obtenidos para realizar una reacción individual de PCR en tiempo real de cada control en el equipo Rotor-Gene, empleando los iniciadores correspondientes a una concentración 20 µM y el kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (Bio-Rad, California, EU). Para realizar la prueba de cada control, se incluyó un control negativo, un control de reactivos y una reacción extra con 100 ng de ADN del control de referencia sin pre-amplificar. Se utilizó el siguiente protocolo de mezcla de reactivos:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (2X)	10 µL	1X
Iniciador Forward (20 µM)	0.5 µL	10 µM
Iniciador Reverse (20 µM)	0.5 µL	10 µM
Agua	Variable	-
Producto de pre-amplificación/ADN	5 µL/Variable	5 µL/100 ng
Volumen final	20 µL	-

Las pruebas de amplificación en tiempo real de cada control se efectuaron bajo las siguientes condiciones:



Inmediatamente después de la amplificación de cada control, se programó dentro del equipo Rotor-Gene, una rampa de HRM de 75 a 90°C con un incremento de 0.1°C/segundo y se obtuvo la Tm de cada producto de amplificación obtenido. Los valores de Tm y Ct de cada prueba se encuentran resumidos en la tabla 7.

8.6.2. Pre-amplificación con pool de iniciadores a distintas concentraciones y con distintos kits de PCR y amplificación en tiempo real

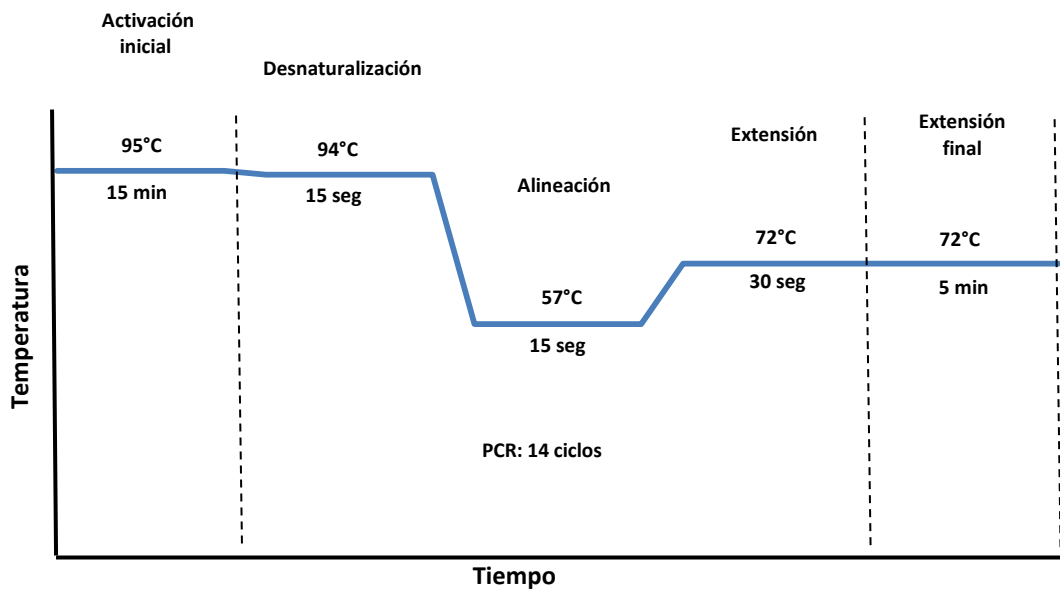
Una vez realizadas las pruebas de estandarización anteriores, se llevaron a cabo tres pruebas adicionales usando el control de *S. pneumoniae* de la siguiente manera:

Con el objetivo de comparar la eficiencia de amplificación respecto a la concentración del pool de iniciadores empleado, en la primera prueba adicional se ocupó el pool de iniciadores 500 STA (500 nM) y se realizó la pre-amplificación siguiendo el mismo protocolo de mezcla de reactivos empleado para la pre-amplificación con el pool de iniciadores 200 STA. Además del control positivo, se incluyó un control negativo y un control de reactivos. Las cantidades y concentraciones se ajustaron de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	12.5 µL	1X
10X Pool de iniciadores 500 STA (Cada iniciador 500 nM)	2.5 µL	1X (50nM)
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Total	25 µL	

Las condiciones de amplificación fueron exactamente las mismas empleadas con el pool de iniciadores 200 STA:

Condiciones de amplificación



Una vez realizada la pre-amplificación con el pool de iniciadores 500 STA, se llevó a cabo la PCR en tiempo real dentro del equipo Rotor-Gene usando los mismos protocolos de mezcla de reactivos y condiciones de amplificación que se emplearon en la qPCR anterior (empleando SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox). Cabe mencionar que en esta prueba de qPCR se emplearon 5 µL del control positivo pre-amplificado y las mismas cantidades del control negativo y el control de reactivos, además, se incluyeron 5 µL del mismo control positivo pre-amplificado diluido 1:5 (con el fin de comparar la eficiencia de la amplificación según la concentración del control positivo pre-amplificado).

De igual manera, para conocer la T_m de los productos obtenidos, se realizó una rampa de HRM de 75 a 90°C con un incremento de 0.1°C/segundo. Obtenidos los resultados de esta prueba, se comparó la efectividad de amplificación respecto a la concentración de pool de iniciadores ocupado (200 y 500 STA).

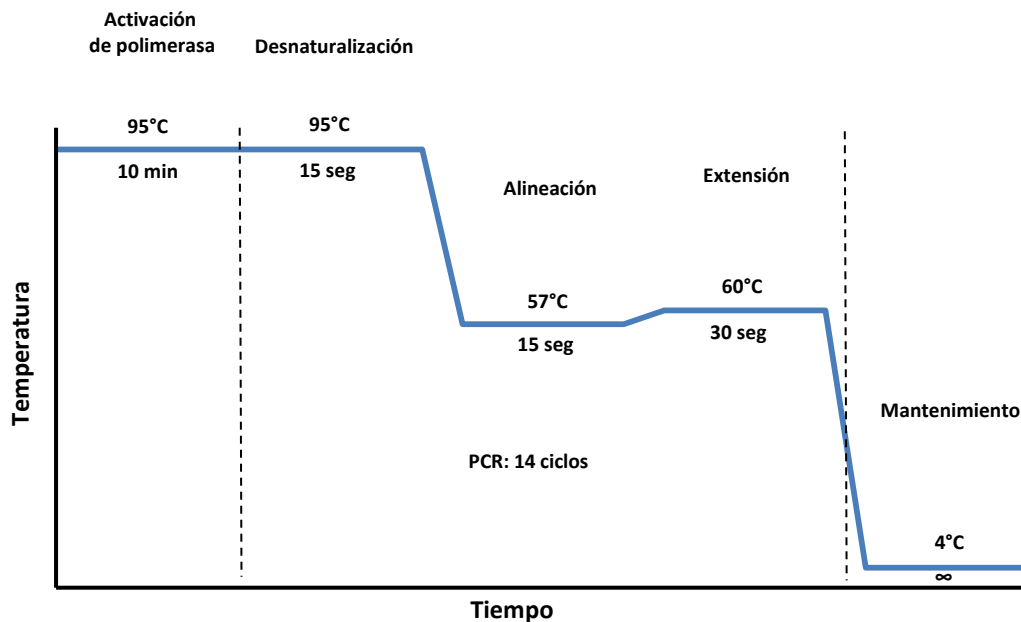
Por otro lado, para comparar la eficiencia de amplificación del mismo control (*S. pneumoniae*) respecto al kit de PCR utilizado, se empleó el kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix (Applied Biosystems, California, EU) durante el paso de pre-amplificación con ambas concentraciones de pool de iniciadores, 200 STA y 500 STA. La mezcla de reactivos se realizó de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X TaqMan® PreAmp Master Mix	12.5 µL	1X
Pool de iniciadores 200 STA (Cada iniciador 200 nM)	1 µL	8 nM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Volumen total	25 µL	-

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X TaqMan® PreAmp Master Mix	12.5 µL	1X
10X Pool de iniciadores 500 STA (Cada iniciador 500 nM)	2 µL	1X (50 nM)
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Volumen total	25 µL	-

Se llevó a cabo la reacción de PCR punto final de ambas pruebas dentro del equipo Veriti™ bajo las siguientes condiciones:

Condiciones de amplificación



Una vez terminada la pre-amplificación con el nuevo kit a ambas concentraciones del pool de iniciadores, se llevaron a cabo las qPCR y las rampas de HRM correspondientes en el equipo Rotor-Gene, cada una con 5 μ L del control positivo pre-amplificado y el mismo volumen del control negativo, el control de reactivos y el control positivo pre-amplificado diluido 1:5. Se mantuvieron los mismos protocolos de mezcla de reactivos y condiciones de amplificación que la prueba de qPCR anterior ya que se utilizó el mismo kit de PCR (SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox).

Obtenidos los resultados de las pruebas de estandarización realizadas, se procedió a comparar y analizar la eficiencia durante el paso de pre-amplificación considerando el kit de PCR y la concentración del pool de iniciadores empleados con el fin de conocer la eficiencia y especificidad de los iniciadores diseñados así como para tener una idea presuntiva del comportamiento del proceso de qPCR en las pruebas posteriores dentro del equipo BioMark™. Estos resultados se resumen en la tabla 8.

8.7. Estandarización de condiciones para qPCR múltiple empleando el equipo BioMark™

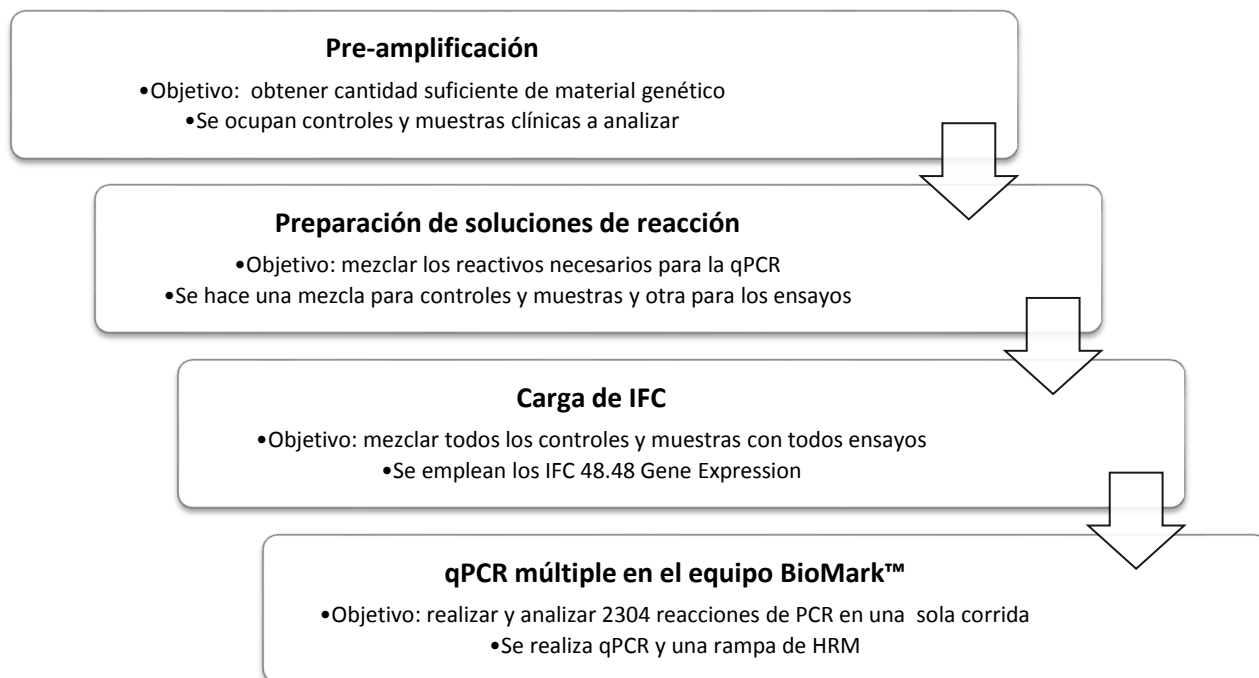
8.7.1. Preparación de soluciones de pares de iniciadores

A partir de las soluciones de iniciadores 40 µM, se tomaron 10 µL de cada iniciador Forward y se mezclaron con 10 µL del iniciador Reverse correspondiente, obteniendo así 16 mezclas con 20 µL de solución a una concentración 20 µM de cada iniciador dentro del par. Cada par obtenido se identificó con una letra del alfabeto (A→P) y se almacenó a -20°C.

Bacteria	
A	<i>C. pneumoniae</i>
B	<i>C. psittaci</i>
C	Género <i>Haemophilus sp.</i>
D	<i>H. influenzae</i>
E	<i>K. pneumoniae</i>
F	<i>L. pneumophila</i>
G	<i>M. catarrhalis</i>
H	Complejo MTB
I	<i>M. pneumoniae</i>
J	Género <i>Staphylococcus sp.</i>
K	<i>S. aureus</i>
L	Género <i>Streptococcus sp.</i>
M	<i>S. pneumoniae</i>
N	<i>B. pertussis</i>
O	<i>B. parapertussis</i>
P	<i>P. aeruginosa</i>

8.7.2. Evaluación de condiciones de pre-amplificación empleando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 500 STA 10X

Para la estandarización de las condiciones para la amplificación múltiple dentro del equipo BioMark™, se llevó a cabo el flujo de trabajo requerido para cualquier prueba realizada dentro del mismo. El proceso se muestra en el siguiente diagrama general y se explica a detalle a continuación.



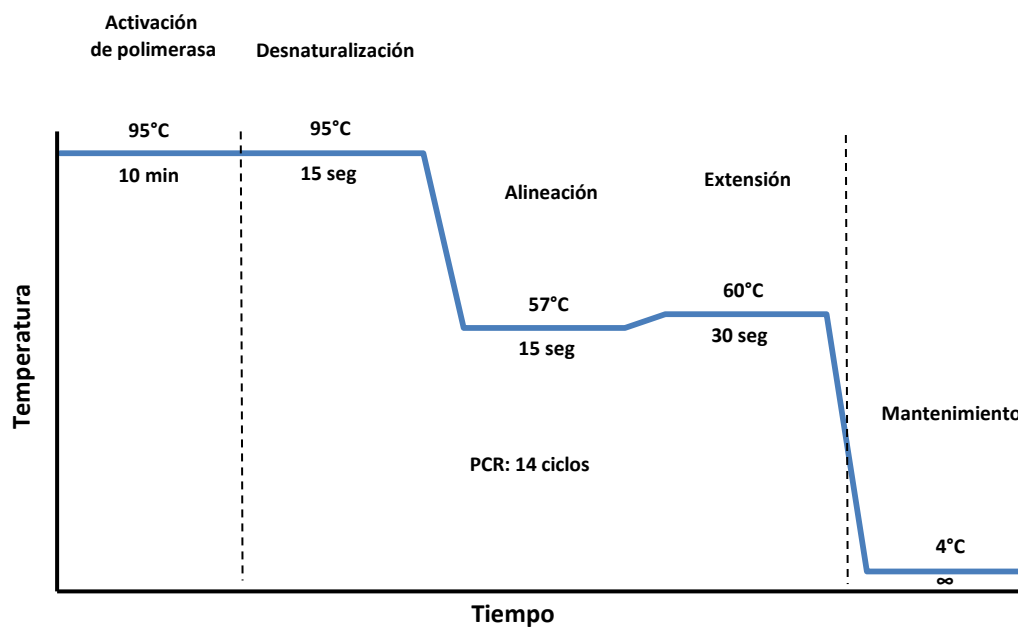
8.7.2.1. Pre-amplificación

La primera prueba de estandarización consistió en la comparación de la eficiencia de la pre-amplificación de muestras y controles al usar dos kits de PCR distintos. Para la primera reacción se empleó el kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix para la amplificación de 16 muestras (diez muestras clínicas, cinco controles de referencia y un control de reactivos), mientras que para la segunda, se utilizó el kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix para la amplificación de las mismas 16 muestras. En ambas reacciones se empleó el pool de iniciadores 500 STA (cada iniciador a una concentración 50 nM).

Los protocolos de mezcla de reactivos y las condiciones de amplificación para la prueba de pre-amplificación utilizando el kit TaqMan® PreAmp Master Mix fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X TaqMan® PreAmp Master Mix	5 µL	1X
10X Pool de iniciadores 500 STA (Cada iniciador 500 nM)	1 µL	1X (50 nM)
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Volumen total	10 µL	-

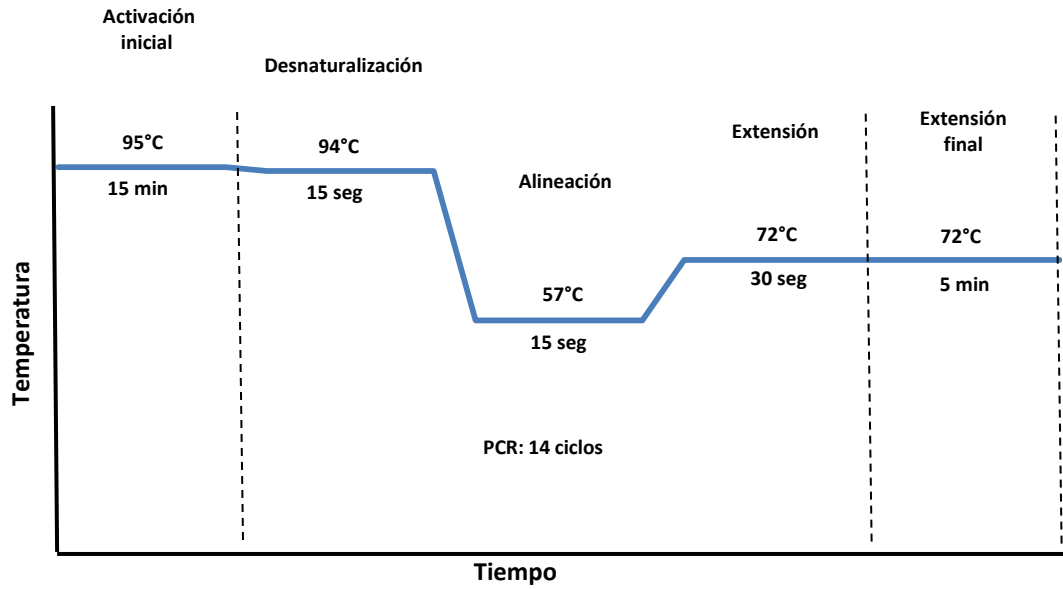
Condiciones de amplificación



Por otro lado, los protocolos de mezcla de reactivos y las condiciones de amplificación para la prueba de pre-amplificación utilizando el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5 µL	1X
10X Pool de iniciadores 500 STA (Cada iniciador 500 nM)	1 µL	1X (50nM)
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Total	10 µL	

Condiciones de amplificación



8.7.2.2. Preparación de soluciones de reacción

Para la carga del IFC empleado en las reacciones de amplificación dentro del equipo BioMark™, se requiere realizar dos mezclas de reacción por separado, una para las muestras a analizar y otra para los iniciadores utilizados. Se ocuparon las cantidades y concentraciones especificadas en el manual del equipo, sin embargo, se empleó un exceso de cada reactivo y en vez de preparar la mezcla para 48 reacciones (32 muestras pre-amplificadas en el paso anterior y 16 sin pre-amplificar), se obtuvo un volumen final suficiente para 60 reacciones. Estas previsiones se realizaron con el fin de evitar déficit de reactivos en pasos posteriores. Los protocolos de mezcla de reactivos fueron los siguientes:

- **Solución mix de muestras**

Reactivo	Volumen por pozo	Volumen con exceso	Volumen para 60 muestras
SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox (2X)	2.5 µL	3.5 µL	210 µL
20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent	0.25 µL	0.35 µL	21 µL
Pre-amplificado	2.25 µL	3.15 µL	-
Volumen total	5 µL	7 µL	*3.85 µL de mezcla c/pozo

- **Solución mix de iniciadores**

Reactivo	Volumen por pozo	Volumen con exceso	Volumen para 60 muestras
2X Assay Loading Reagent	2.5 µL	3.5 µL	210 µL
1X DNA Suspension Buffer (TE)	1.25 µL	1.75 µL	105 µL
Forward+Reverse 20 µM	1.25 µL	1.75 µL	-
Volumen total	5 µL	7 µL	*5.25 µL de mezcla c/pozo

Una vez preparadas ambas mezclas, se transfirieron los volúmenes correspondientes a una placa de 96 pozos: 3.85 µL del mix para muestras en 48 pozos y 5.25 µL del mix para iniciadores en los 48 pozos restantes; en los pozos con el mix para muestras, se adicionaron 3.15 µL de cada producto de la pre-amplificación, mientras que en los pozos con mix de iniciadores se adicionaron 1.75 µL de cada par de iniciadores (A→P) por triplicado.

8.7.2.3. Carga del IFC 48.48 Gene Expression

El primer paso para la carga del IFC 48.48 Gene Expression fue llenarlo con el líquido de flujo provisto junto con los IFC 48.48 Gene Expression, el cual tiene la función de permitir el flujo adecuado de las mezclas a través de los canales y cámaras dentro del chip. Se emplearon dos jeringas con 300 µL de líquido de flujo cada una para llenar las cámaras que se encuentran a los costados del chip:

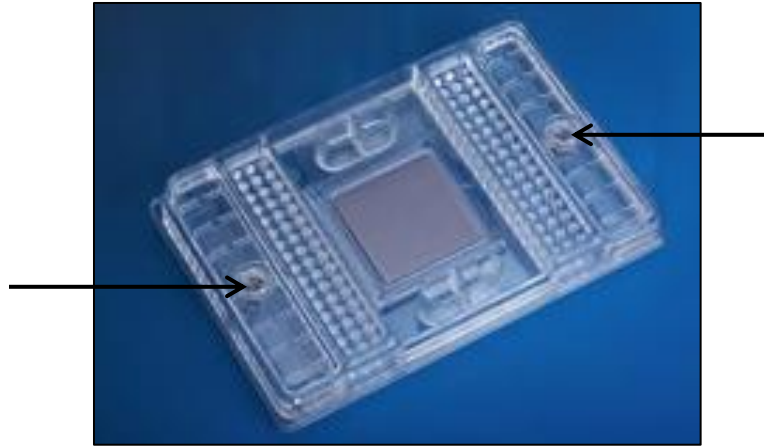


Figura 14. Llenado de cámaras de líquido de flujo en IFC 48.48

A continuación, se insertó el IFC dentro del equipo controlador correspondiente, el cual se encarga de distribuir de manera automática y uniforme el líquido de flujo a través de todos los canales hasta lograr cubrir todas las cámaras individuales en el chip central:

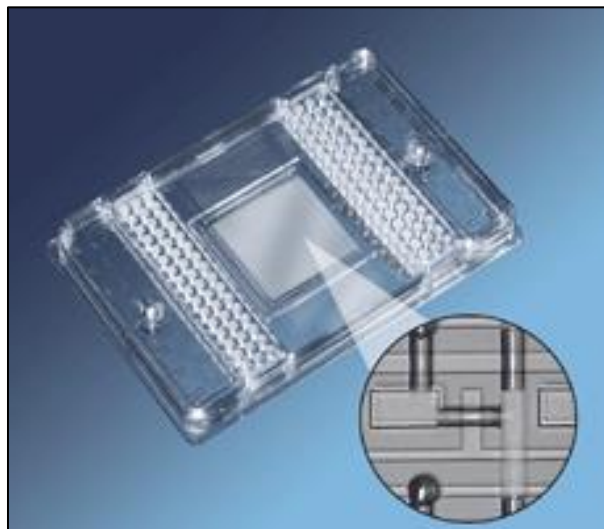


Figura 15. Distribución de líquido de flujo en chip central del IFC 48.48

Una vez cubiertas todas las cámaras con el líquido de flujo, se procedió a colocar 5 μL de cada mezcla de iniciadores y 5 μL de cada mezcla de muestras en sus pozos correspondientes en el IFC 48.48. Finalizado el llenado de los pozos, se insertó nuevamente el IFC dentro del equipo controlador para la mezcla automática de las 48 muestras con los 48 pares de iniciadores y su distribución uniforme en las cámaras del chip, obteniendo así, 2304 mezclas de reacción individuales.

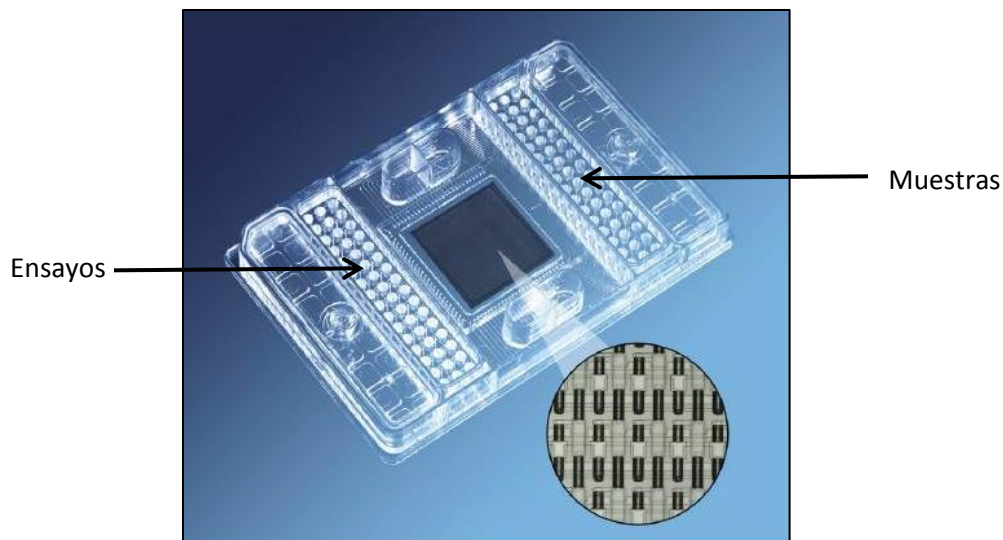
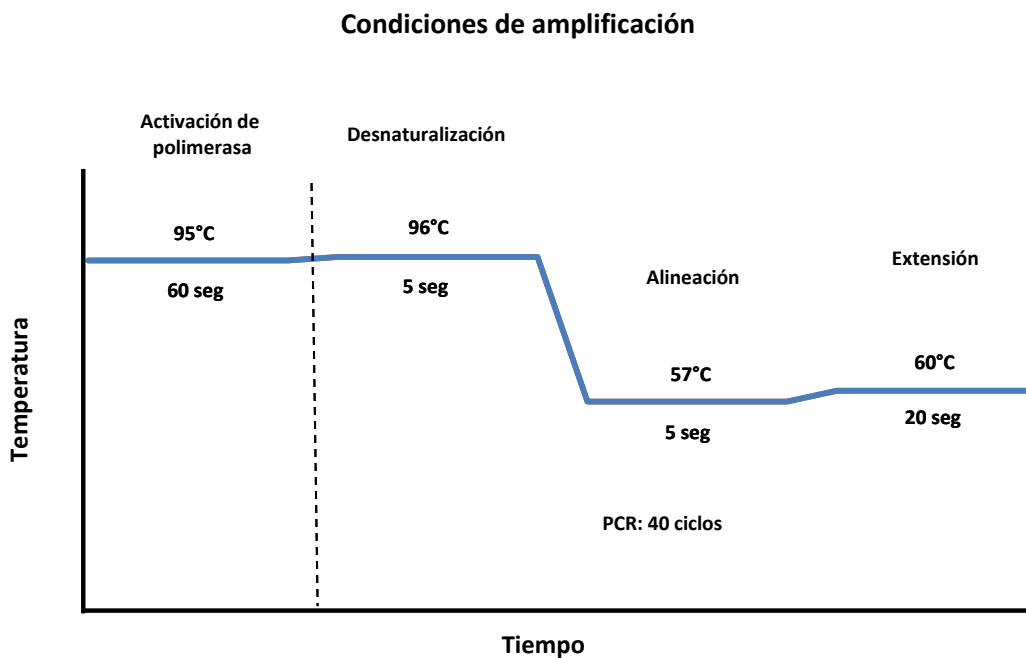


Figura 16. Distribución de mezclas de reactivos para ensayos y muestras en IFC 48.48

8.7.2.4. qPCR múltiple en el equipo Biomark™

Realizadas las mezclas de reacción, se colocó el IFC 48.48 Gene Expression dentro del equipo BioMark™ y se llevó a cabo la amplificación de las 48 muestras (cada una con los 16 pares de iniciadores por triplicado) de manera simultánea siguiendo el siguiente protocolo de amplificación:



Al finalizar los ciclos de amplificación, se programó una rampa de HRM dentro del equipo BioMark™ de 60 a 95°C con un incremento de 1°C/3seg.

Una vez completado este paso, se analizaron los resultados con el software Fluidigm Real-Time PCR Analysis Versión 4.0.1 (Fluidigm, California, EU) y se comparó la eficiencia de amplificación según el kit de PCR empleado durante la pre-amplificación usando el pool de iniciadores 500 STA.

8.7.3. Evaluación de condiciones de pre-amplificación empleando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones

La segunda prueba de estandarización dentro del equipo BioMark™ consistió en el uso de los mismos kits de PCR durante el paso de pre-amplificación mencionados en el punto anterior y el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones finales (8 nM y 20 nM de cada iniciador), resultando así, cuatro condiciones distintas que permitieron evaluar la eficiencia de amplificación respecto a cada kit y pool empleado con el fin de encontrar las condiciones ideales para la amplificación de las muestras clínicas en las pruebas posteriores.

El flujo de trabajo para esta prueba fue idéntico que el mencionado en el punto anterior (pre-amplificación → preparación de soluciones → carga del IFC → qPCR múltiple en BioMark™) modificando únicamente las condiciones dentro del paso de pre-amplificación. Las cuatro condiciones consideradas para esta prueba fueron las siguientes:

- Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix, concentración final de iniciadores: 8 nM
- Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix, concentración final de iniciadores: 20 nM
- Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix, concentración final de iniciadores: 8 nM
- Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix, concentración final de iniciadores: 20 nM

Los protocolos de mezcla de reactivos fueron los siguientes:

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5 µL	1X
Pool de iniciadores 200 STA	0.4 µL	8 nM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Total	10 µL	

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	5 µL	1X
Pool de iniciadores 200 STA	1 µL	20 nM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Total	10 µL	

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X TaqMan® PreAmp Master Mix	5 µL	1X
Pool de iniciadores 200 STA	0.4 µL	8 nM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Volumen total	10 µL	-

Reactivo	Volumen por reacción	Concentración final
2X TaqMan® PreAmp Master Mix	5 µL	1X
Pool de iniciadores 200 STA	1 µL	20 nM
Agua	Variable	-
ADN	Variable	100 ng
Volumen total	10 µL	-

Realizadas las mezclas de reacción de las cuatro condiciones con seis muestras y seis controles cada uno, se llevaron a cabo las amplificaciones dentro del equipo Veriti™ bajo las condiciones correspondientes según el kit empleado (sección 8.7.2.1.). A continuación, se completó el mismo flujo de trabajo mencionado con anterioridad hasta realizar la qPCR múltiple empleando los pre-amplificados resultantes de las cuatro condiciones evaluadas. Los resultados obtenidos se analizaron con el software Fluidigm Real Time PCR Analysis.

Con los resultados obtenidos, se comparó la eficiencia de amplificación respecto a las 6 condiciones empleadas durante el proceso de estandarización dentro del equipo BioMark™ y se eligieron aquellas que

presentaran la detección más sensible y específica de los blancos genómicos de interés dentro de las muestras y controles utilizados.

8.8. Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™

Se llevó a cabo una prueba adicional para conocer la cantidad o concentración mínima de ADN que se puede detectar con fiabilidad por el método de qPCR múltiple en el equipo Biomark™.

Para realizar esta prueba se emplearon 100 ng de ADN extraído de tres especies bacterianas control (*K. pneumoniae* BH1, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 6538), se realizaron cuatro diluciones consecutivas 1:10 de cada una de ellas y se tomó el volumen necesario para obtener al final 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ng de ADN de cada control. Empleando estas cinco cantidades distintas de ADN de cada control, se llevó a cabo el flujo de trabajo correspondiente para llevar a cabo la detección múltiple (pre-amplificación → preparación de soluciones → carga de IFC → qPCR múltiple en BioMark™). Las quince reacciones resultantes fueron comparadas para determinar la cantidad mínima de ADN y el número teórico mínimo de moléculas detectables en la prueba y así determinar si existen limitantes de importancia a considerar.

Control bacteriano	Cantidad ADN
<i>K. pneumoniae</i> BH1	100 ng
<i>K. pneumoniae</i> BH1	10 ng
<i>K. pneumoniae</i> BH1	1 ng
<i>K. pneumoniae</i> BH1	0.1 ng
<i>K. pneumoniae</i> BH1	0.01 ng
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100 ng
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	10 ng
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1 ng
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.1 ng
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0.01 ng
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	100 ng
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	10 ng
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1 ng
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0.1 ng
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	0.01 ng

8.9. Detección de bacterias respiratorias en muestras clínicas mediante qPCR múltiple en el equipo BioMark™

Después de analizar y comparar los resultados de las pruebas de estandarización, se obtuvieron las condiciones consenso a utilizar durante el paso de pre-amplificación de las 100 muestras clínicas y así poder emplearlas para la qPCR múltiple en el equipo BioMark™, con el fin de detectar los principales patógenos bacterianos respiratorios en los cuatro grupos de pacientes considerados.

Se realizaron en total tres pruebas de qPCR múltiple en el equipo BioMark™ para el análisis de las 100 muestras clínicas. Cada prueba se llevó a cabo con el flujo de trabajo completo descrito con anterioridad (pre-amplificación → preparación de soluciones → carga del IFC → qPCR múltiple en BioMark™) empleando 42 muestras clínicas pre-amplificadas, cinco controles de referencia y un control de reactivos en cada qPCR. Durante el paso de pre-amplificación se empleó el kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y el pool de iniciadores 200 STA a una concentración final 8 nM de cada iniciador; mientras que para la qPCR, se empleó el kit SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox. Las condiciones de amplificación para cada una de éstas PCR se mencionan con anterioridad.

Finalizada cada prueba de qPCR, se analizaron los resultados con el software Fluidigm Real Time PCR Analysis y se logró evaluar la presencia de las principales bacterias de importancia respiratoria en las 100 muestras clínicas estudiadas. Asimismo, se detectaron las principales co-infecciones bacterianas (presencia de dos o más agentes patógenos en la misma muestra) y co-infecciones bacterianas/virales en cada grupo de estudio y su frecuencia.

8.10. Caracterización de bacterias respiratorias mediante secuenciación convencional o Sanger

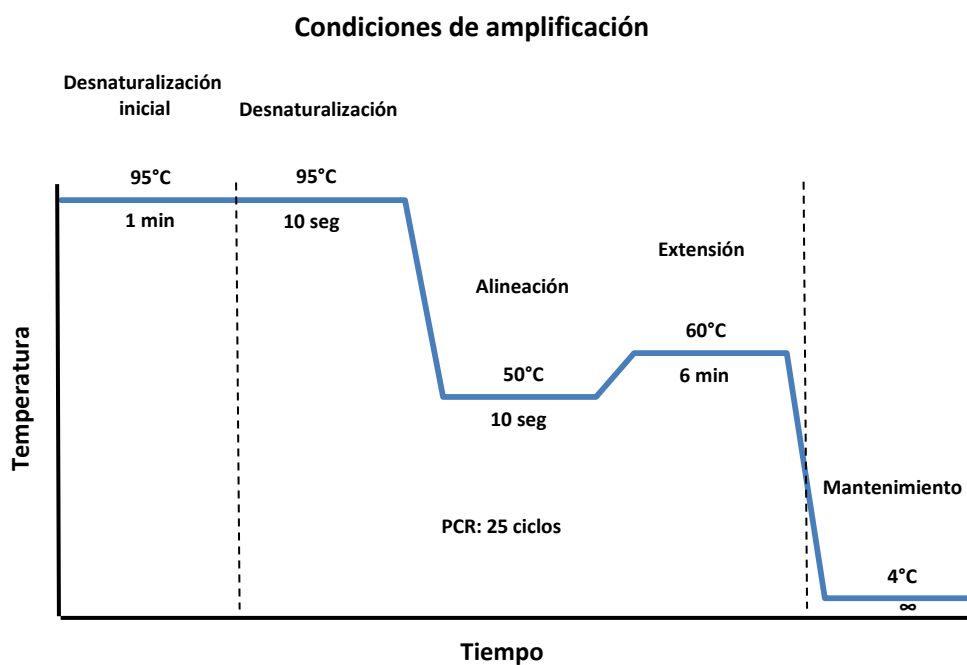
Una vez obtenidos los datos de las bacterias respiratorias presentes en las muestras de los 100 pacientes, se procedió a caracterizarlas para validar los resultados conseguidos y lograr su completa identificación.

Se seleccionaron muestras positivas a aquellas bacterias de las cuales no se contaba con un control positivo bacteriano (cinco muestras positivas para *H. influenzae*, seis muestras positivas para *M. catarrhalis* y cuatro muestras positivas para *M. pneumoniae*), y se caracterizaron mediante secuenciación Sanger. La técnica fue la siguiente:

Se realizó una reacción de PCR punto final en una placa de 96 pozos para la amplificación de 16 muestras en total. Para cada muestra se realizaron dos reacciones de amplificación por separado, una empleando el iniciador Forward y la otra con el iniciador Reverse correspondiente (ambos a una concentración 2 μM). Estas reacciones de amplificación independientes tuvieron como objetivo sintetizar la cadena molde y la cadena complementaria por separado y así contar con ambas secuencias disponibles del mismo producto a secuenciar. Se utilizó el siguiente protocolo de mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen	Concentración final
2.5X Ready Reaction Premix	1 μL	0.5X
5X BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer	1 μL	1X
Iniciador (Forward o Reverse) 2 μM	1 μL	2 pmol
ADN	Variable	Variable
Agua	Variable	-
Volumen total	5 μL	

Una vez preparadas las mezclas de reacción para cada muestra, se llevó a cabo su amplificación bajo las siguientes condiciones:



Finalizada la PCR punto final, se purificó la placa de 96 con los productos de amplificación con el fin de eliminar los nucleótidos no utilizados, el material genético no amplificado y cualquier otro agente que pudiera interferir en el proceso de secuenciación. La purificación se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a. Por cada pozo se agregaron 12.7 μL de EtOH al 100% y 0.5 μL de CH_3COONa 3 M a $\text{pH}=5.2$
- b. Se centrifugó la placa a 2000 g durante 20 min.
- c. Se volteó la placa sobre un material absorbente y se centrifugó 1 min a 150 G.
- d. Se agregaron 35 μL de EtOH al 70% y se centrifugó a 2000 g durante 5 min
- e. Se volvió a voltear la placa sobre un material absorbente y se centrifugó a 150 g durante 1 min.
- f. Finalmente, se resuspendió el producto purificado con 20 μL de formamida y se agitó cuidadosamente.

Con ambas cadenas de ADN de cada producto amplificadas por separado y purificadas, se insertó la placa en el equipo de secuenciación ABI PRISM® 3100-*Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EU) y empleando el Polímero POP-6™ (Applied Biosystems, EU) se llevó a cabo la secuenciación Sanger con el fin conocer la composición nucleotídica precisa de los productos amplificados y comprobar si éstos coincidían totalmente con los blancos genómicos esperados, pudiendo así, tipificar completamente las muestras clínicas analizadas.

9. RESULTADOS

9.1. Diseño de iniciadores

Se diseñaron un total de 38 iniciadores para la detección de 14 especies bacterianas de importancia respiratoria, 4 géneros que contienen más de una bacteria de importancia respiratoria y del complejo MTB que incluye a las especies *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. caprae*.

En la tabla 5 se muestran las bacterias a detectar, el blanco genómico elegido para su detección, así como la temperatura de fusión de los iniciadores y el tamaño teórico del producto de amplificación.

Tabla 5. Iniciadores diseñados para la detección de las principales bacterias de importancia respiratoria

Bacteria	Blanco genómico	Iniciador	T _m (°C)	Tamaño producto (pb)
<i>B. pertussis</i>	IS481	F	64	214
<i>B. pertussis</i>	IS481	RC	62	
<i>B. parapertussis</i>	IS1001	F	62	209
<i>B. parapertussis</i>	IS1001	RC	62	
Género <i>Chlamydomphila</i> sp.	dnaK	F	61	143
Género <i>Chlamydomphila</i> sp.	dnaK	RC	62	
<i>C. pneumoniae</i>	ompA	F	60	174
<i>C. pneumoniae</i>	ompA	RC	62	
<i>C. psittaci</i>	dnaK	F	62	208
<i>C. psittaci</i>	dnaK	RC	62	
Género <i>Haemophilus</i> sp.	recA	F	62	178
Género <i>Haemophilus</i> sp.	recA	RC	58	
<i>H. influenzae</i>	pilA	F	60	226
<i>H. influenzae</i>	pilA	RC	62	
<i>K. pneumoniae</i>	tyrB	F	60	177
<i>K. pneumoniae</i>	tyrB	RC	60	
<i>K. oxytoca</i>	pehX	F	62	199
<i>K. oxytoca</i>	pehX	RC	60	
<i>L. pneumophila</i>	mip	F	62	255
<i>L. pneumophila</i>	mip	RC	60	
<i>M. catarrhalis</i>	copB	F	60	175
<i>M. catarrhalis</i>	copB	RC	61	
Complejo MTB	IS6110	F	64	165
Complejo MTB	IS6110	RC	62	
<i>M. pneumoniae</i>	P1	F	60	246

<i>M. pneumoniae</i>	P1	RC	60	
<i>P. aeruginosa</i>	gyrB	F	64	137
<i>P. aeruginosa</i>	gyrB	RC	62	
Género <i>Staphylococcus sp.</i>	tuf	F	60	251
Género <i>Staphylococcus sp.</i>	tuf	RC	60	
<i>S. aureus</i>	nuc	F	60	174
<i>S. aureus</i>	nuc	RC	60	
Género <i>Streptococcus sp.</i>	sodA	F	60	176
Género <i>Streptococcus sp.</i>	sodA	RC	62	
<i>S. pneumoniae</i>	lytA	F	60	236
<i>S. pneumoniae</i>	lytA	RC	60	
<i>S. pyogenes</i>	sof	F	60	252
<i>S. pyogenes</i>	sof	RC	60	

9.2. Extracción de ácidos nucleicos

El ADN extraído tanto de las 100 muestras clínicas como de los controles bacterianos se cuantificó mediante espectrofotometría. Las lecturas provenientes de las muestras clínicas resultaron en un rango de 19.1 a 124.6 ng/ μ L de ADN (un promedio de 36.2 ng/ μ L de ADN), mientras que los controles bacterianos presentaron un rango de concentraciones de 33.5 a 287.3 ng/ μ L (un promedio de 110.8 ng/ μ L de ADN). Por otro lado, la pureza del ADN extraído de las muestras clínicas expresada mediante el cociente 260/280, resultó en un rango de lecturas de 1.9 a 4.3 (un promedio de 3), mientras que los controles bacterianos presentaron un rango de lecturas de 1.5 a 3.3 (un promedio de 2.4).

9.3. Evaluación de especificidad de los iniciadores diseñados

Para determinar la especificidad de los iniciadores diseñados, se evaluó de forma individual cada par de éstos con su control positivo correspondiente (en caso de que contaran con uno), así como con un control negativo y un control de reactivos. Se incluyeron también muestras clínicas con resultado presuntivo positivo al ensayo correspondiente en caso de que se contara con ellas.

Se llevó a cabo una amplificación por medio de PCR en tiempo real (qPCR) en el equipo Rotor-Gene para observar el comportamiento de la amplificación en cada ensayo, seguido de una prueba de HRM para definir la T_m de los productos de PCR obtenidos, así como la presencia de productos inespecíficos. Por último, para

confirmar la identidad de los productos generados se sometieron a una prueba de electroforesis en gel de agarosa para conocer su tamaño e identificar la presencia de productos no deseados.

A continuación se presentan las imágenes de la amplificación en tiempo real, la curva de disociación obtenida en la prueba de HRM y la electroforesis de los productos de PCR de cada uno de aquellos ensayos (pares de iniciadores) que contaban con un control positivo o muestra de referencia positiva.

- *Staphylococcus sp., S. aureus*

Se realizaron dos pruebas. Una para detectar cualquier especie dentro del género *Staphylococcus sp.* (gen *tuf*) y otra prueba para detectar únicamente a la especie *S. aureus* (gen *nuc*). Se empleó un control positivo y una muestra clínica con resultado presuntivo positivo.

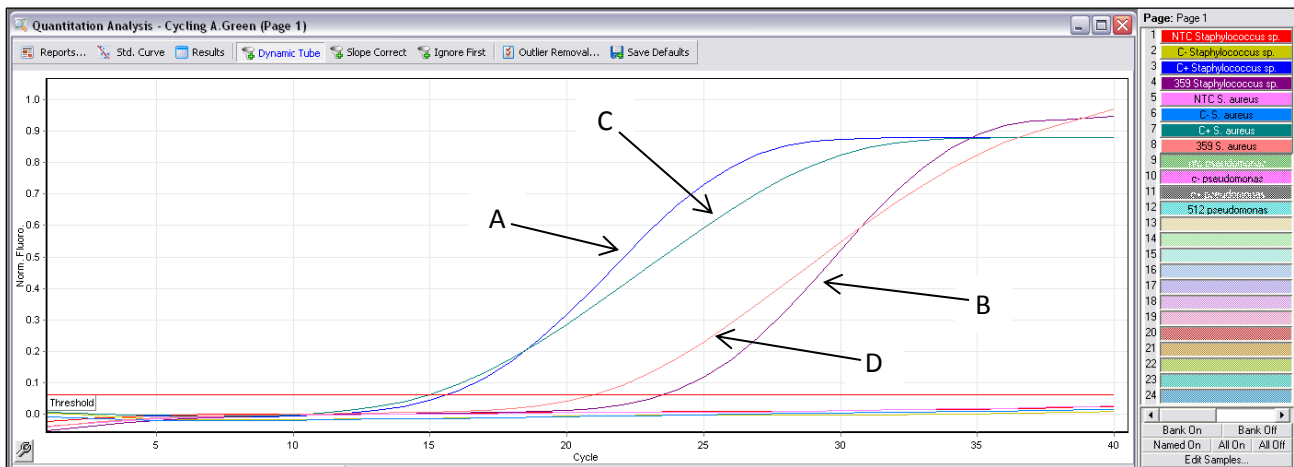


Figura 17. Amplificación en tiempo real de un control positivo y una muestra clínica positiva para los ensayos

Staphylococcus sp. y *S. aureus*

A: Control positivo (*S. aureus*), ensayo *Staphylococcus sp.*; B: Muestra clínica, ensayo *Staphylococcus sp.*; C: Control positivo (*S. aureus*), ensayo *S. aureus*; D: Muestra clínica, ensayo *S. aureus*

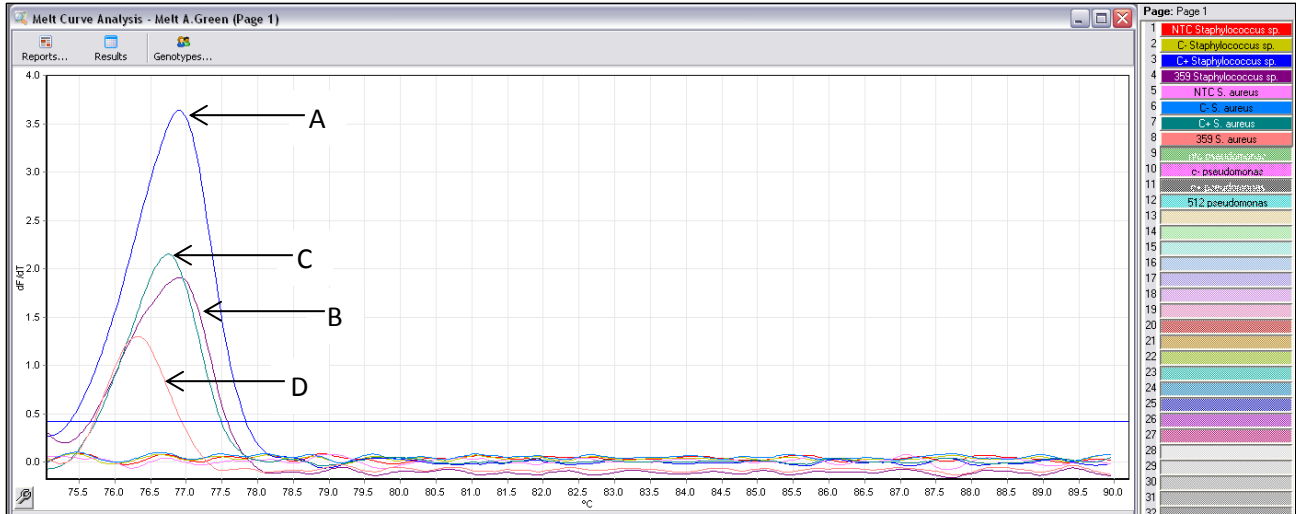


Figura 18. Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos *Staphylococcus sp.* (75°C) y *S. aureus* (74.6°C)

A: Control positivo (*S. aureus*), ensayo *Staphylococcus sp.*; B: Muestra clínica, ensayo *Staphylococcus sp.*; C: Control positivo (*S. aureus*), ensayo *S. aureus*; D: Muestra clínica, ensayo *S. aureus*.

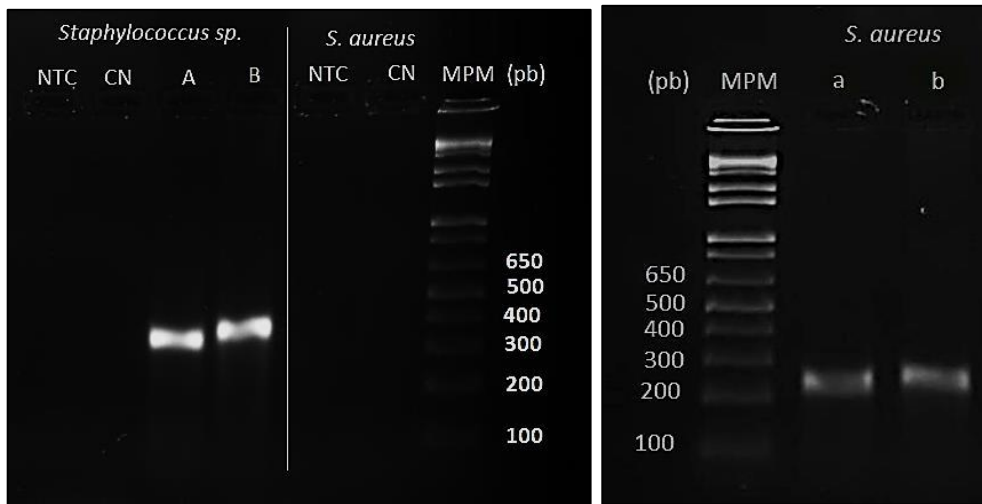


Figura 19. Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos *Staphylococcus sp.* (251 pb) y *S. aureus* (174 pb)
 NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases; CN: Control negativo; A: Control positivo (*S. aureus*), ensayo *Staphylococcus sp.*; B: Muestra clínica, ensayo *Staphylococcus sp.*; a: Control positivo (*S. aureus*), ensayo *S. aureus*; b: Muestra clínica, ensayo *S. aureus*.

- *M. pneumoniae*

Se realizó una prueba para detectar la especie *M. pneumoniae* (gen *P1*). Se empleó una muestra clínica a distintas concentraciones de ADN.

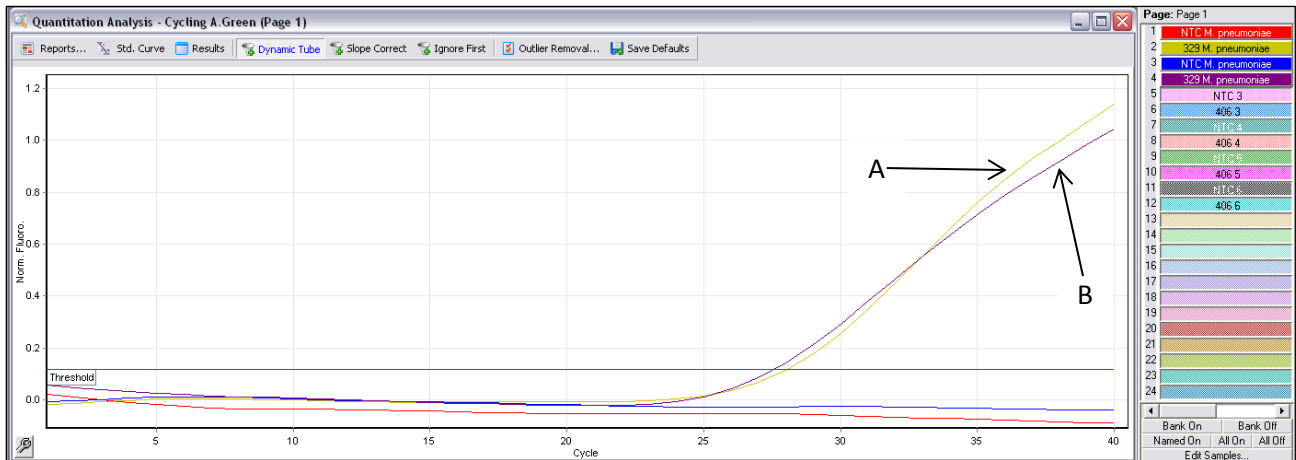


Figura 20. Amplificación en tiempo real de dos muestras clínicas positivas a distintas concentraciones de ADN para el ensayo *M. pneumoniae*
 A: Muestra clínica (100 ng ADN); B: Muestra clínica (200 ng ADN)

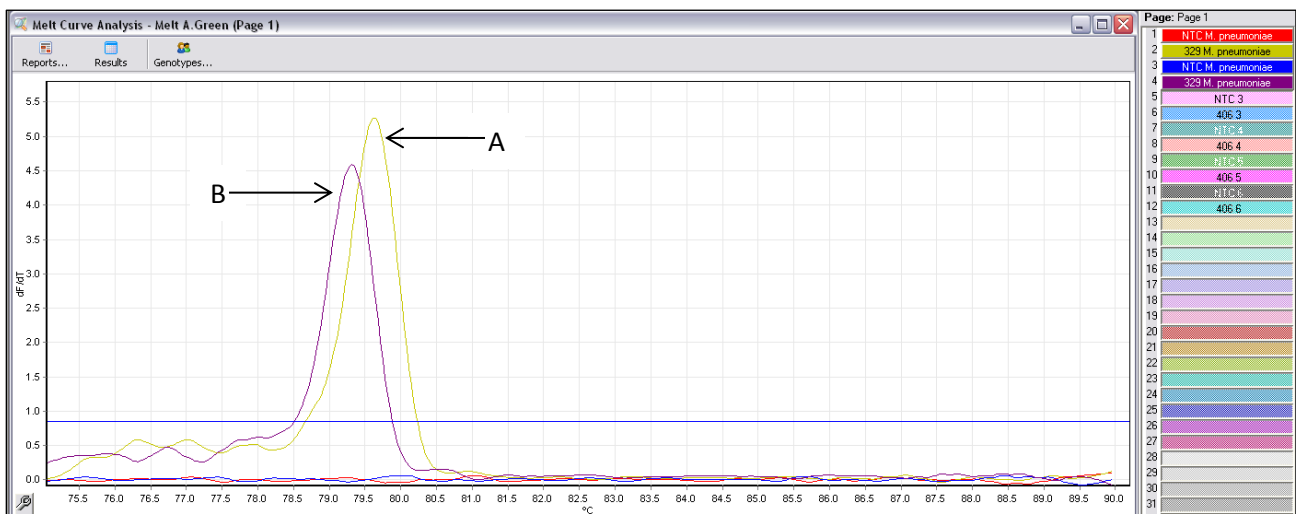


Figura 21. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *M. pneumoniae* (78°C)
 A: Muestra clínica (100 ng ADN); B: Muestra clínica (200 ng ADN)

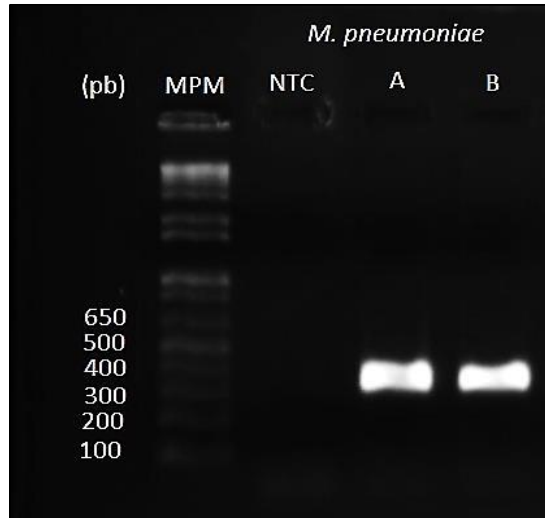


Figura 22. Electroforesis de los productos de amplificación del ensayo *M. pneumoniae* (246 pb)

NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases; A: Muestra clínica (100 ng ADN); B: Muestra clínica (200 ng ADN)

- *Haemophilus sp.*, *H. influenzae*

Se realizaron dos pruebas. Una para detectar cualquier especie dentro del género *Haemophilus sp.* (gen *recA*), y otra para detectar a la especie *H. influenzae* (gen *pilA*). Se emplearon cuatro muestras clínicas distintas con resultado presuntivo positivo.

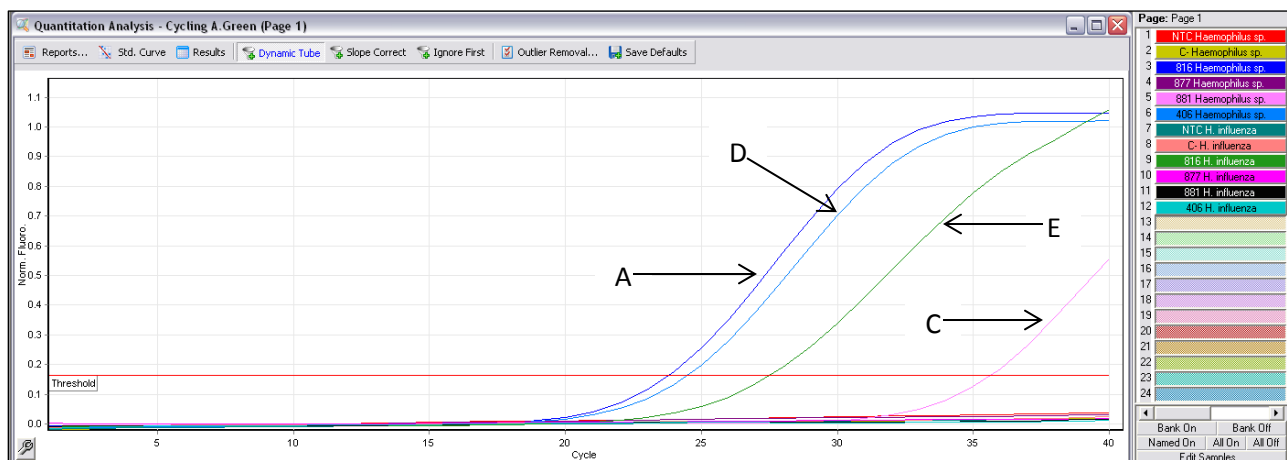


Figura 23. Amplificación en tiempo real de cuatro muestras clínicas positivas para los ensayos *Haemophilus sp.* y *H. influenzae*

A: Muestra clínica 1, ensayo *Haemophilus sp.*; C: Muestra clínica 3, ensayo *Haemophilus sp.*; D: Muestra clínica 4, ensayo *Haemophilus sp.*; E: Muestra clínica 1, ensayo *H. influenzae*

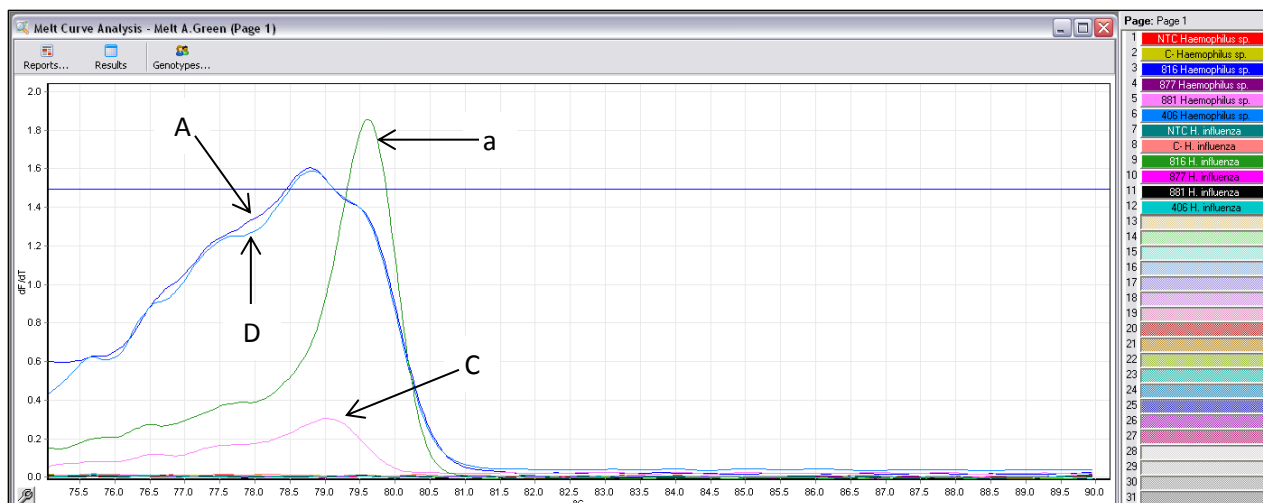


Figura 24. Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos *Haemophilus sp.* (77.8°C) y *H. influenzae* (76.7°C)

A: Muestra clínica 1, ensayo *Haemophilus sp.*; C: Muestra clínica 3, ensayo *Haemophilus sp.*; D: Muestra clínica 4, ensayo *Haemophilus sp.*; E: Muestra clínica 1, ensayo *H. influenzae*

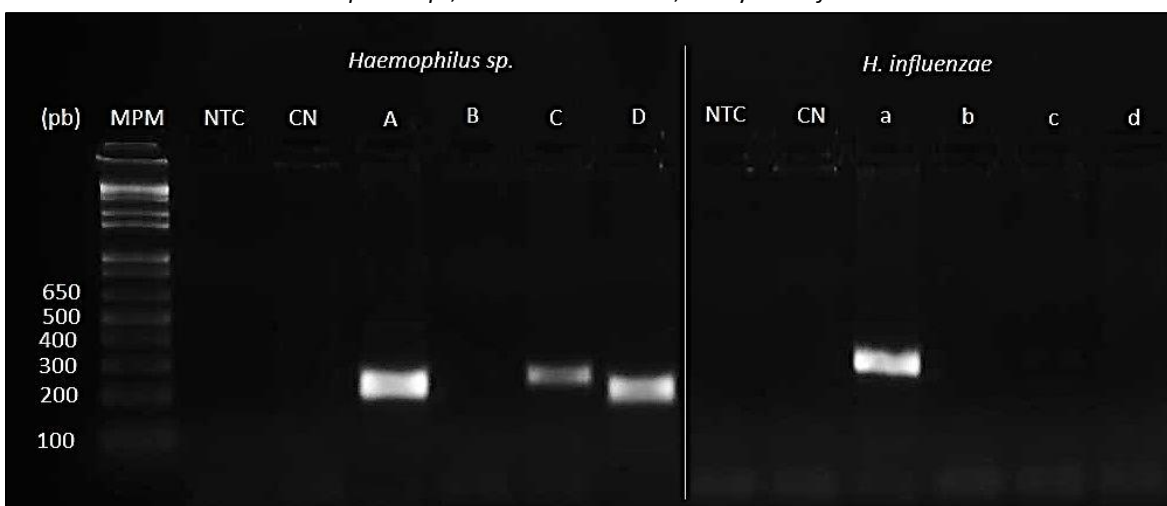


Figura 25. Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos *Haemophilus sp.* (178 pb) y *H. influenzae* (226 pb) NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases; CN. Control negativo; A: Muestra clínica 1, ensayo *Haemophilus sp.*; B: Muestra clínica 2, ensayo *Haemophilus sp.*; C: Muestra clínica 3, ensayo *Haemophilus sp.*; D: Muestra clínica 4, ensayo *Haemophilus sp.*; a: Muestra clínica 1, ensayo *H. influenzae*; b: Muestra clínica 2, ensayo *H. influenzae*; c: Muestra clínica 3, ensayo *H. influenzae*; d: Muestra clínica 4, ensayo *H. influenzae*

- Complejo MTB

Se realizó una prueba para detectar a las especies del género *Mycobacterium sp.* pertenecientes al complejo MTB, que incluye a *M. tuberculosis (IS6110)*. Se empleó un control positivo por duplicado y una muestra clínica con resultado presuntivo positivo.

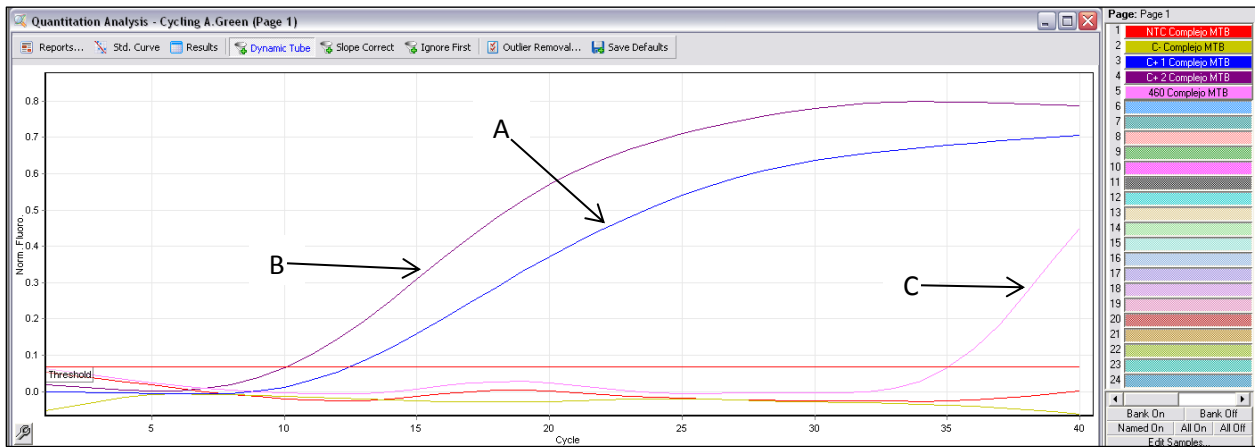


Figura 26. Amplificación en tiempo real de dos controles positivos y una muestra clínica positiva para el ensayo Complejo MTB

A: Control positivo (*M. tuberculosis*); B: Control positivo (*M. tuberculosis*); C: Muestra clínica

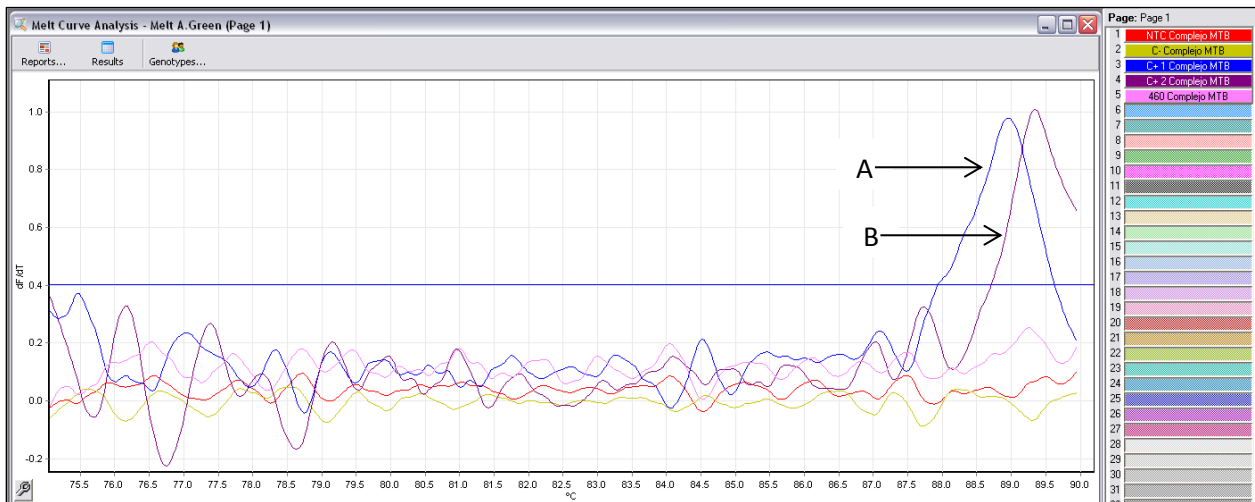


Figura 27. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo Complejo MTB (89.7°C)

A: Control positivo (*M. tuberculosis*); B: Control positivo (*M. tuberculosis*)

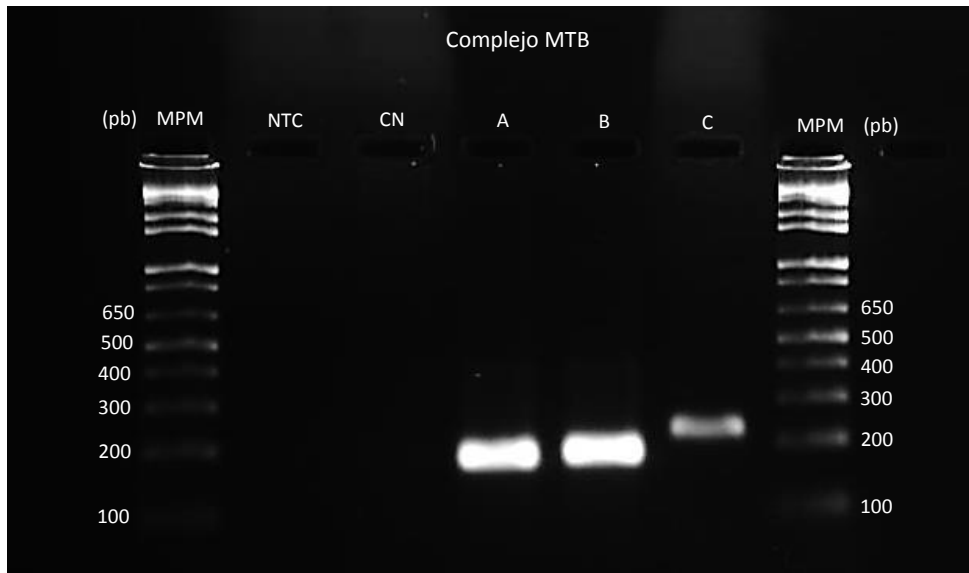


Figura 28. Electroforesis de los productos de amplificación del ensayo Complejo MTB (165 pb)

NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular.; pb: pares de bases; CN. Control negativo; A: Control positivo (*M. tuberculosis*); B: Control positivo (*M. tuberculosis*); C: Muestra clínica

- *P. aeruginosa*

Se realizó una prueba para detectar la especie *P. aeruginosa* (gen *gyrB*). Se empleó un control positivo y tres muestras clínicas con resultado presuntivo positivo.

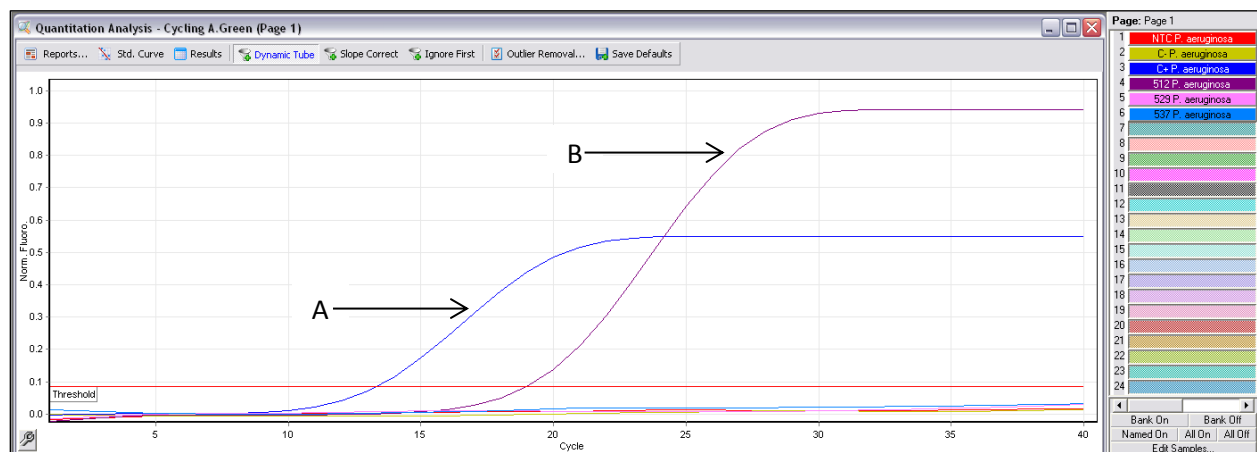


Figura 29. Amplificación en tiempo real de un control positivo y tres muestras clínicas positivas para el ensayo *P. aeruginosa*

A: Control positivo (*P. aeruginosa*); B: Muestra clínica 1.

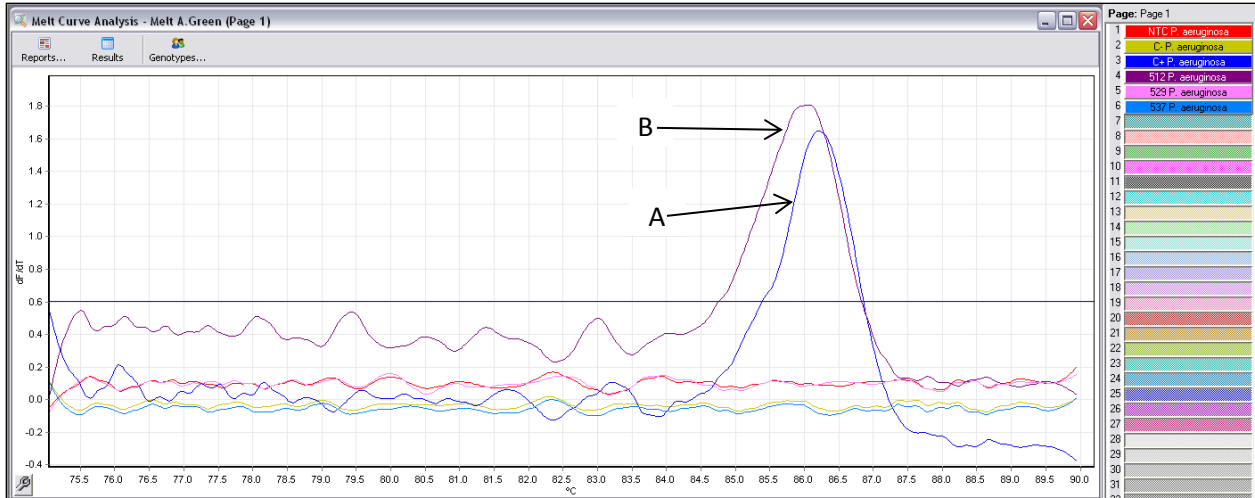


Figura 30. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *P. aeruginosa* (85.9°C)
 A: Control positivo (*P. aeruginosa*); B: Muestra clínica 1.

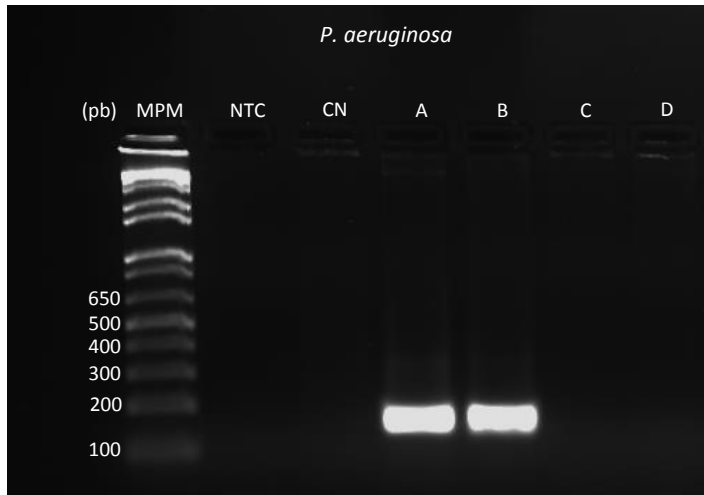


Figura 31. Electroforesis de los productos de amplificación del ensayo *P. aeruginosa* (137 pb)
 NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases; CN. Control negativo; A: Control positivo (*P. aeruginosa*); B: Muestra clínica 1; C: Muestra clínica 2; D: Muestra clínica 3

- *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*

Se realizaron dos pruebas, una para detectar a la especie *K. pneumoniae* (gen *tyrB*) y otra para detectar a la especie *K. oxytoca* (gen *pehX*). Se empleó un control positivo correspondiente a cada especie.

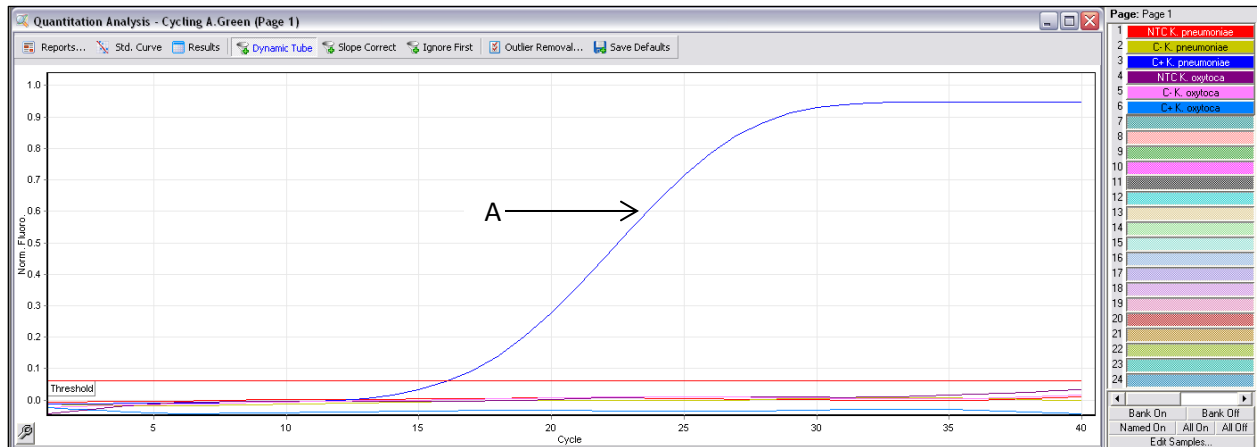


Figura 32. Amplificación en tiempo real de dos controles positivos correspondientes a los ensayos *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*

A: Control positivo (*K. pneumoniae*), ensayo *K. pneumoniae*

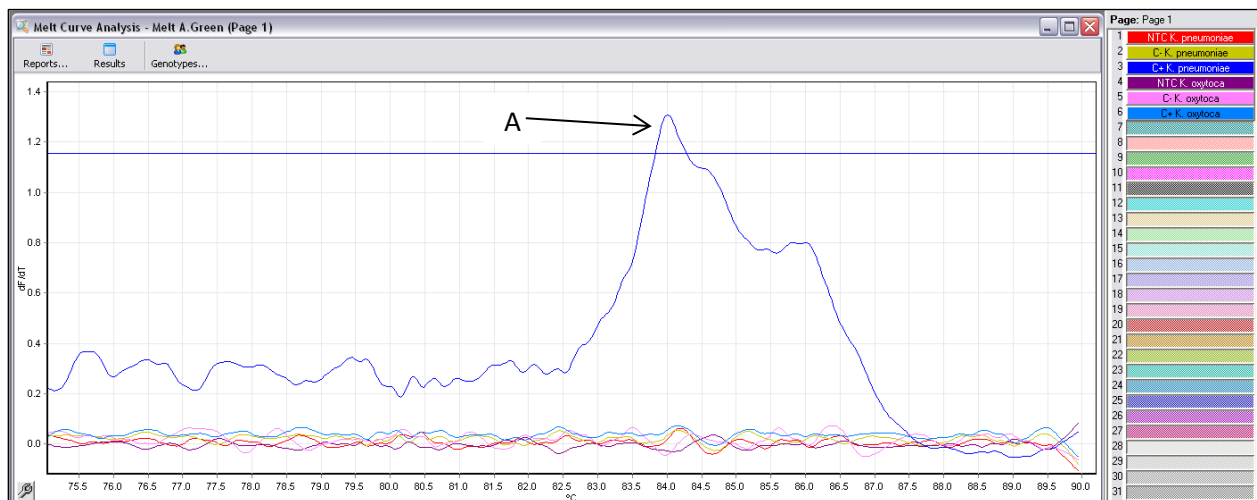


Figura 33. Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos *K. pneumoniae* (82.7°C) y *K. oxytoca* (85°C)

A: Control positivo (*K. pneumoniae*), ensayo *K. pneumoniae*

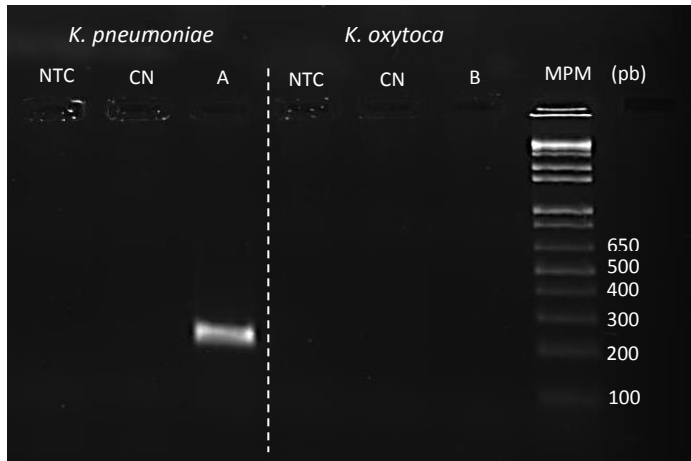


Figura 34. Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos *K. pneumoniae* (177 pb) y *K. oxytoca* (199 pb) NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular; pb: pares de bases; CN. Control negativo; A: Control positivo (*K. pneumoniae*); B: Control positivo (*K. oxytoca*)

- *Streptococcus sp.*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes*

Se realizaron tres pruebas, una para detectar cualquier especie dentro del género *Streptococcus sp.* (gen *sodA*), y las dos restantes para detectar a las especies *S. pneumoniae* (gen *lytA*) y *S. pyogenes* (gen *sof*), respectivamente. Se empleó un control positivo correspondiente a cada especie.

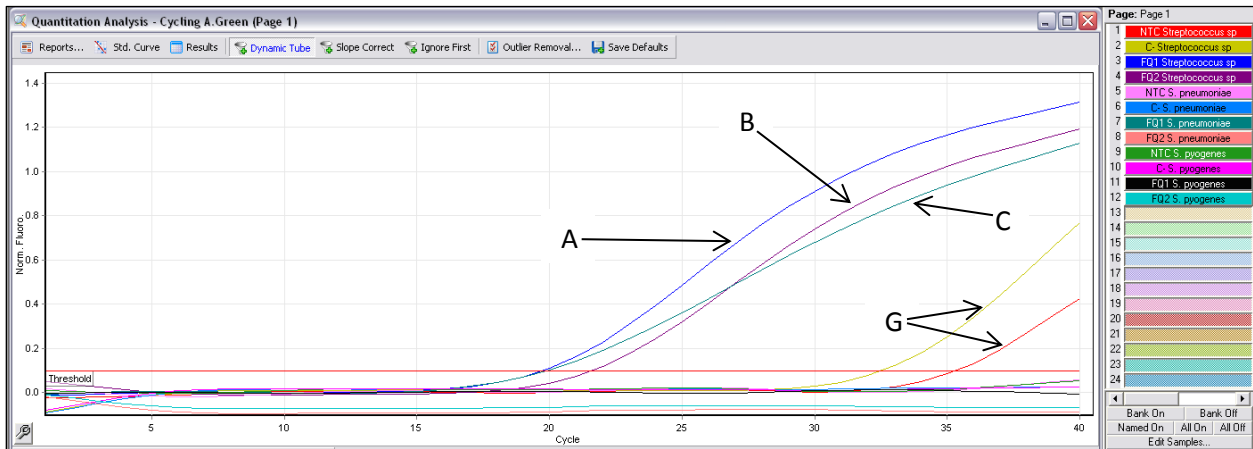


Figura 35. Amplificación en tiempo real de dos controles positivos correspondientes a los ensayos *Streptococcus sp.*, *S. pneumoniae* (78.8°C) y *S. pyogenes*

A: Control positivo (*S. pneumoniae*), ensayo *Streptococcus sp.*; B: Control positivo (*S. pyogenes*), ensayo *Streptococcus sp.*;
C: Control positivo (*S. pneumoniae*), ensayo *S. pneumoniae*; G: Producto inespecífico

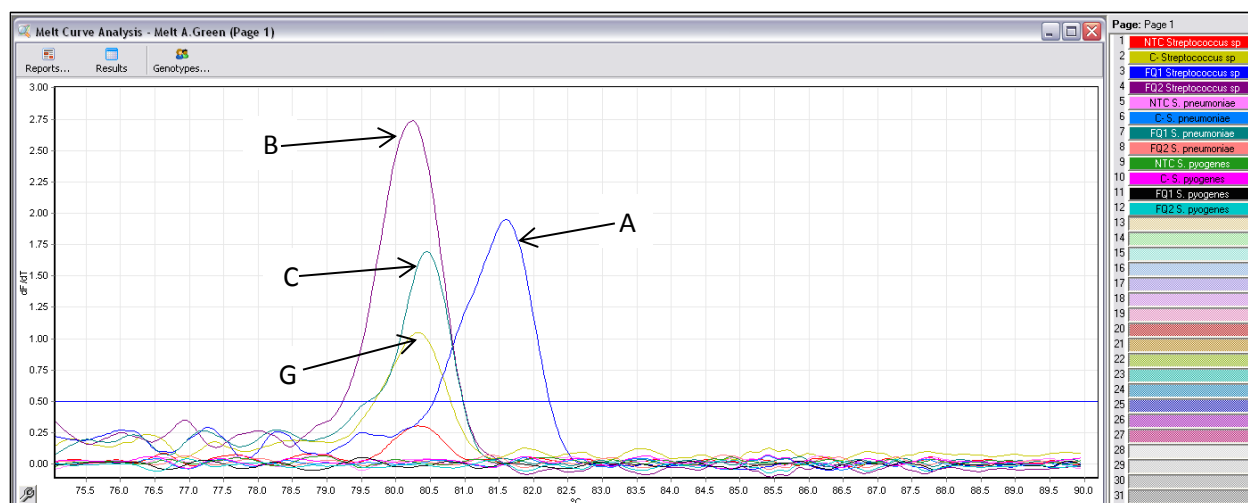


Figura 36. Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos *Streptococcus sp.* (79.2°C), *S. pneumoniae* (78.8°C) y *S. pyogenes* (79.6°C)

A: Control positivo (*S. pneumoniae*), ensayo *Streptococcus sp.*; B: Control positivo (*S. pyogenes*), ensayo *Streptococcus sp.*;
 C: Control positivo (*S. pneumoniae*), ensayo *S. pneumoniae*; G: Producto inespecífico

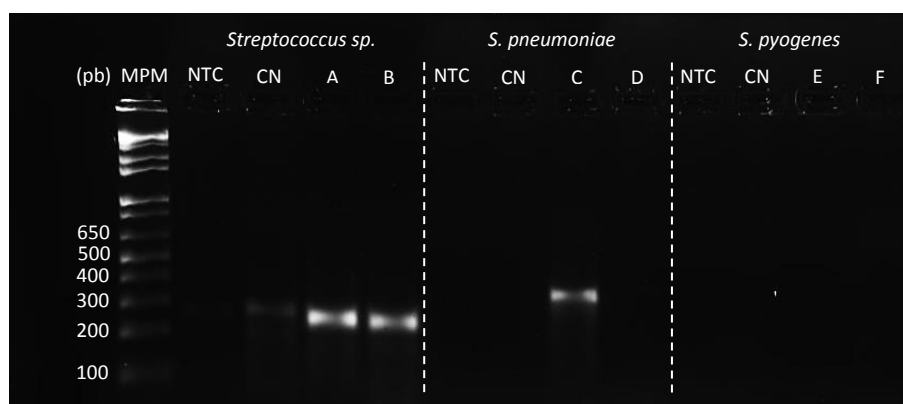


Figura 37. Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos *Streptococcus sp.* (176 pb), *S. pneumoniae* (236 pb) y *S. pyogenes* (252 pb)

NTC: (Negative template control), control de reactivos; MPM: Marcador de peso molecular, pb: pares de bases; CN: Control negativo; A: Control positivo (*S. pneumoniae*); B: Control positivo (*S. pyogenes*); C: Control positivo (*S. pneumoniae*); D: Control positivo (*S. pyogenes*); E: Control positivo (*S. pneumoniae*); F: Control positivo (*S. pyogenes*)

A continuación se presenta una tabla que concentra los valores de Ct y Tm obtenidos en cada una de las pruebas de qPCR anteriores. Asimismo, se muestra la Tm teórica calculada para cada ensayo*. Los resultados se obtuvieron con el equipo Rotor-Gene.

* El proceso de obtención de la Tm teórica para cada ensayo se detalla en la sección 10.3

Tabla 6. Ct y Tm de los productos de amplificación obtenidos en las pruebas de estandarización para qPCR múltiple.
Evaluación de especificidad de iniciadores

Ensayo	Muestra	Ct	Tm experimental (°C)	Tm teórica (°C)
<i>Staphylococcus sp.</i>	Control positivo (A)	15.6	76.9	75
	Muestra clínica (B)	23.5	76.9	
<i>S. aureus</i>	Control positivo (C)	14.9	76.8	74.6
	Muestra clínica (D)	21	76.3	
<i>M. pneumoniae</i>	Muestra clínica 100 ng ADN (A)	28	79.6	78
	Muestra clínica 200 ng ADN (B)	27.6	79.3	
<i>Haemophilus sp.</i>	Muestra clínica 1 (A)	23.8	78.8	77.8
	Muestra clínica 3 (C)	24.5	78.8	
	Muestra clínica 4 (D)	35.7	79	
<i>H. influenzae</i>	Muestra clínica 1 (E)	27.6	79.6	76.7
Complejo MTB	Control positivo <i>M. tuberculosis</i> (A)	12.5	89	89.7
	Control positivo <i>M. tuberculosis</i> (B)	10.1	89.4	
	Muestra clínica (C)	35	-	
<i>P. aeruginosa</i>	Control positivo (A)	13.3	86.2	85.9
	Muestra clínica 1 (B)	19	86.1	
<i>K. pneumoniae</i>	Control positivo <i>K. pneumoniae</i> (A)	16.1	84	82.7
<i>Streptococcus sp.</i>	Control positivo <i>S. pneumoniae</i> (A)	19.7	81.6	79.2
	Control positivo <i>S. pyogenes</i> (B)	21.6	80.3	
<i>S. pneumoniae</i>	Control positivo <i>S. pneumoniae</i> (C)	19.8	80.5	78.8

Después de evaluar individualmente cada uno de los 19 pares de iniciadores diseñados, se decidió rechazar a los siguientes ensayos: *Chlamydomphila sp.*, *K. oxytoca* y *S. pyogenes*. Se llegó a ésta decisión debido a que no se obtuvieron productos de amplificación con los controles positivos, indicando su ineficiencia en la amplificación e identificación de su correspondiente blanco bacteriano.

Los 16 pares de iniciadores restantes se emplearon en las pruebas posteriores debido a su adecuado funcionamiento. Los ensayos elegidos fueron: *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*, Género *Haemophilus sp.*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *M. catarrhalis*, Complejo MTB, *M. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, Género *Staphylococcus sp.*, *S. aureus*, Género *Streptococcus sp.* y *S. pneumoniae*.

Cabe mencionar que a pesar de no contar con los controles bacterianos correspondientes a las especies *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *M. pneumoniae*, se decidió mantener éstos ensayos en las pruebas posteriores debido a su importancia como agentes causantes de IRAs.

9.4. Estandarización de condiciones de la qPCR múltiple. Evaluación de pool de iniciadores.

Posterior a la estandarización de forma individual de cada par de iniciadores, se requiere estandarizar una PCR múltiple que incluya todos los pares de iniciadores diseñados, con el fin de detectar cualquier bacteria presente en una muestra respiratoria y aumentar la cantidad de material genético para su empleo en los siguientes pasos de la prueba. Por lo tanto, se llevó a cabo una reacción de “pre-amplificación” con la mezcla de todos los iniciadores y posteriormente se empleó el producto pre-amplificado y se enfrentó con el par de iniciadores específicos.

Se prepararon dos mezclas con los 16 pares de iniciadores funcionales y específicos evaluados en la sección anterior. Cada mezcla (pool) se preparó a una concentración de 200 μM (200 STA) y 500 μM (500 STA), y se utilizaron 2 diferentes kits de preamplificación (PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix y PCR TaqMan® PreAmp Master Mix). Posteriormente, se realizó una qPCR de cada control o muestra “pre-amplificada” empleando su ensayo (par de iniciadores) específico y el kit de PCR SsoFast™ EvaGreen® Supermix with Low Rox. Finalmente, se realizó una prueba de HRM para cada ensayo con el fin de obtener la curva de disociación respectiva y así determinar la T_m del producto de amplificación y evaluar la presencia de productos inespecíficos.

Se realizó un primer conjunto de pruebas empleando los iniciadores a una concentración 200 μM y el kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix para cada uno de los controles positivos. Mientras que el segundo conjunto de pruebas consistió en la pre-amplificación del control *S. pneumoniae* evaluando cuatro condiciones distintas:

Condición 1: Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool iniciadores 200 STA

Condición 2: Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool iniciadores 500 STA

Condición 3: Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool iniciadores 200 STA

Condición 4: Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool iniciadores 500 STA

Posteriormente, se realizó una reacción de qPCR para cada uno de los productos obtenidos empleando su ensayo correspondiente y finalmente se realizó una prueba de HRM para cada producto generado en la qPCR. Primer conjunto de pruebas: figuras 38-47 y tabla 7. Segundo conjunto de pruebas: figuras 48-53 y tabla 8.

A continuación se muestran las figuras correspondientes a la amplificación en tiempo real y a la curva de disociación de ambos conjuntos de pruebas efectuadas.

Primer conjunto de pruebas. Pre-amplificación y qPCR de controles positivos bacterianos

- *S. pneumoniae*

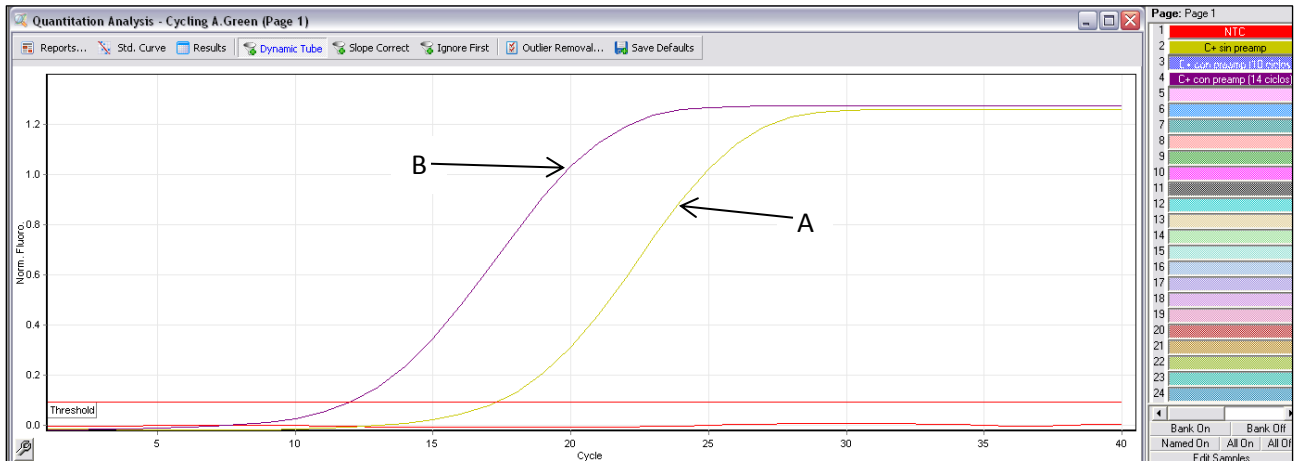


Figura 38. Amplificación en tiempo real del control positivo *S. pneumoniae* para el ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

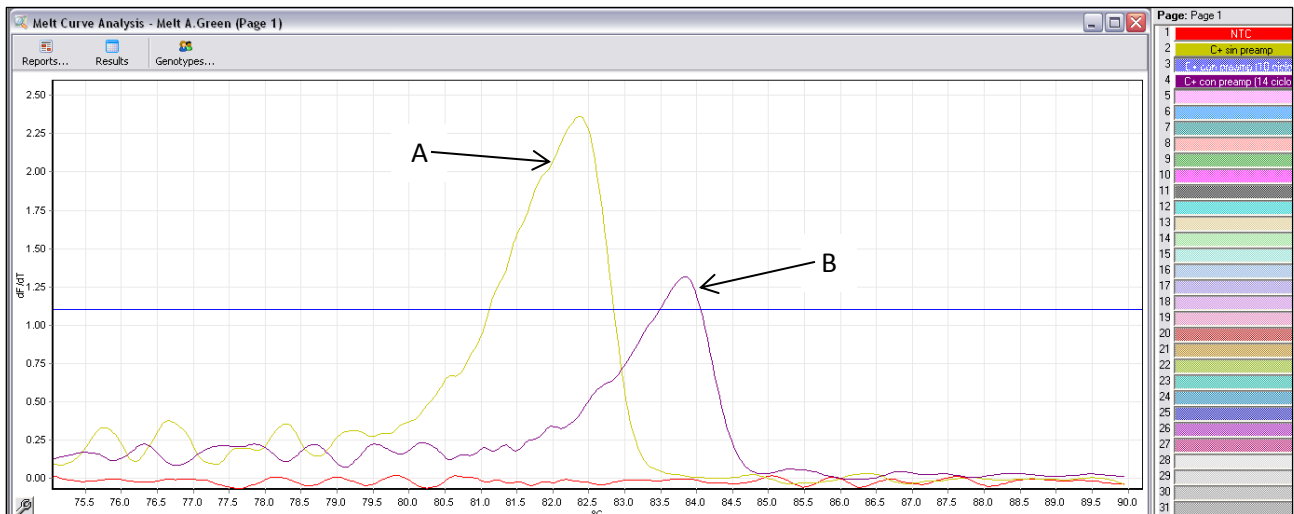


Figura 39. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *S. pneumoniae*

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

- *K. pneumoniae*

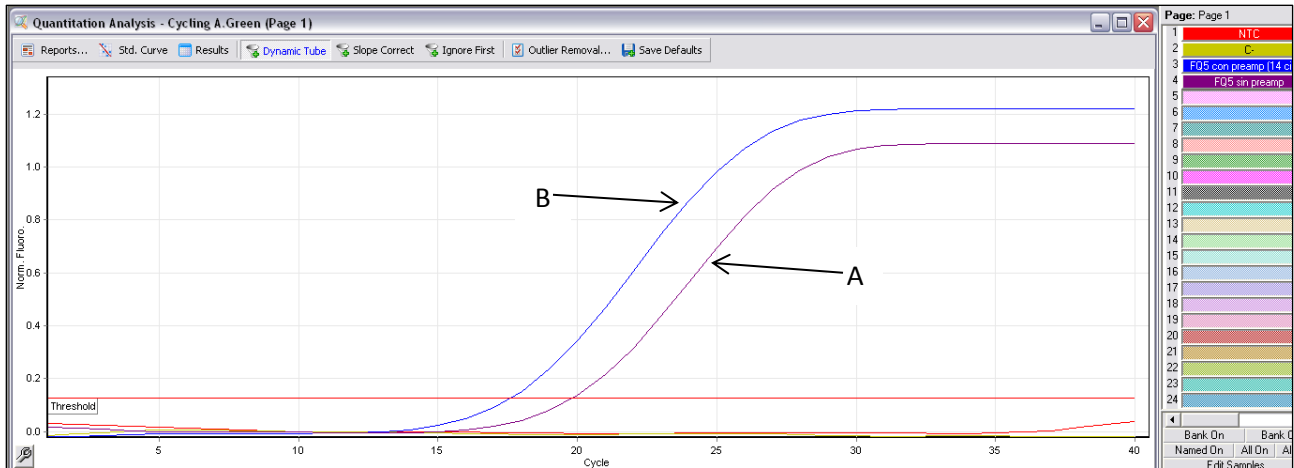


Figura 40. Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo *K. pneumoniae*.

A: Control positivo (*K. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*K. pneumoniae*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

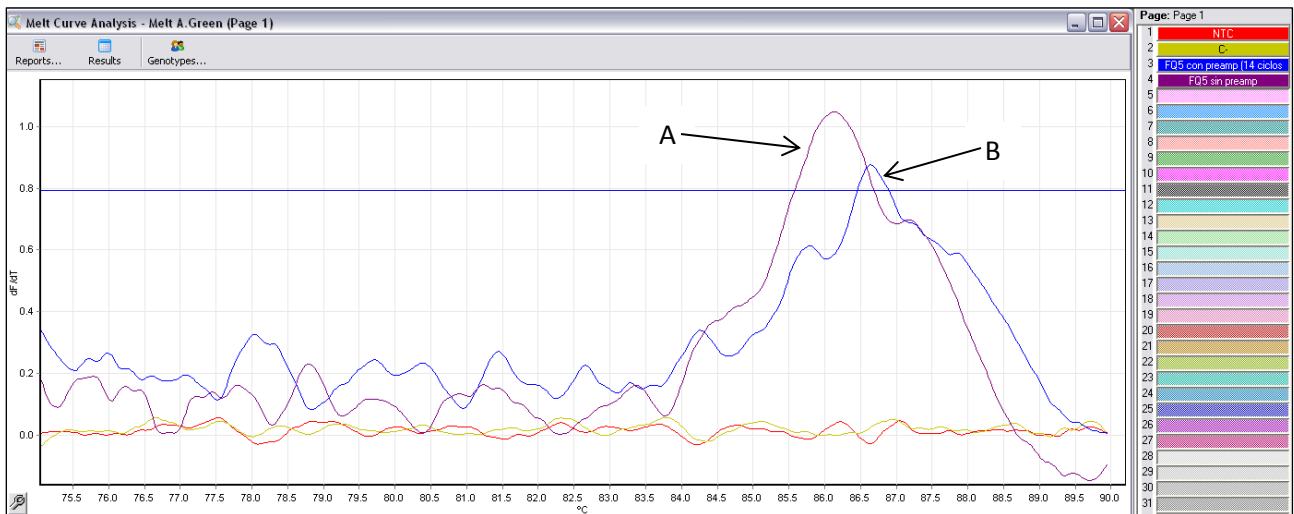


Figura 41. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *K. pneumoniae*.

A: Control positivo (*K. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*K. pneumoniae*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix

- *M. tuberculosis*

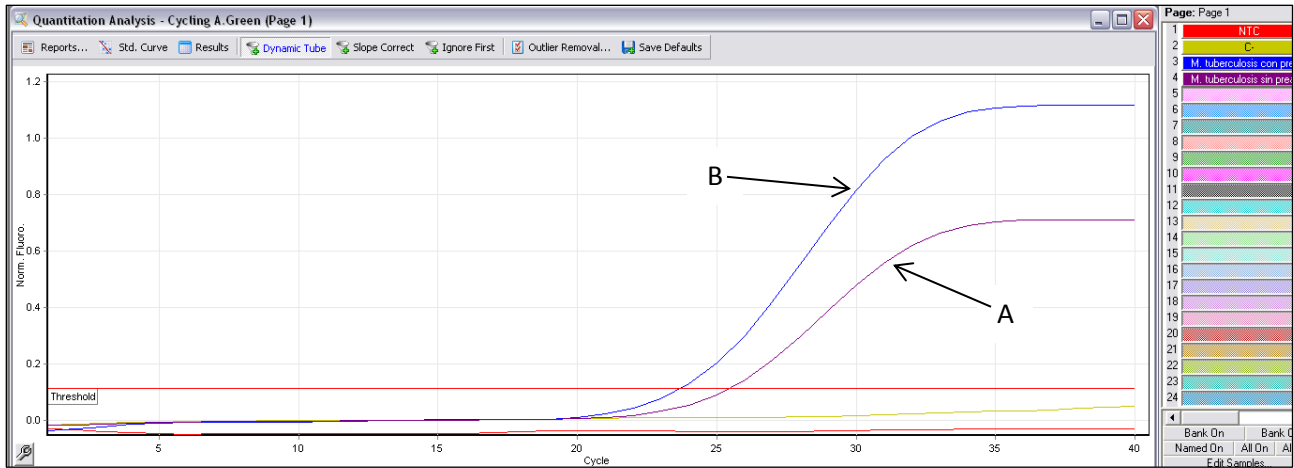


Figura 42. Amplificación en tiempo real del control positivo *M. tuberculosis* para el ensayo complejo MTB
 A: Control positivo (*M. tuberculosis*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*M. tuberculosis*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

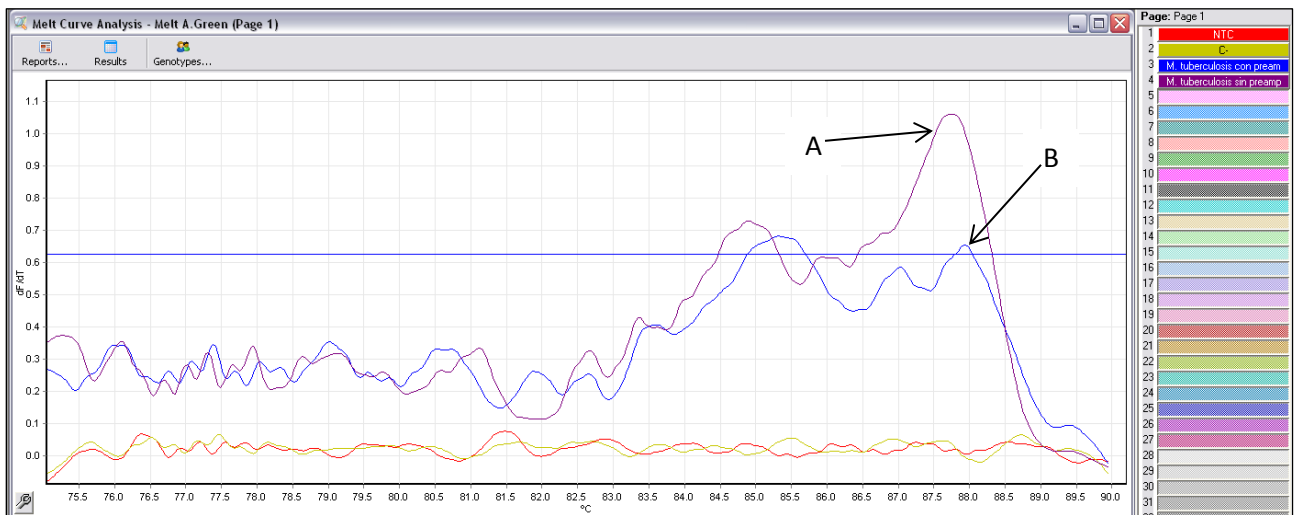


Figura 43. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *M. tuberculosis*.
 A: Control positivo (*M. tuberculosis*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*M. tuberculosis*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

- *P. aeruginosa*

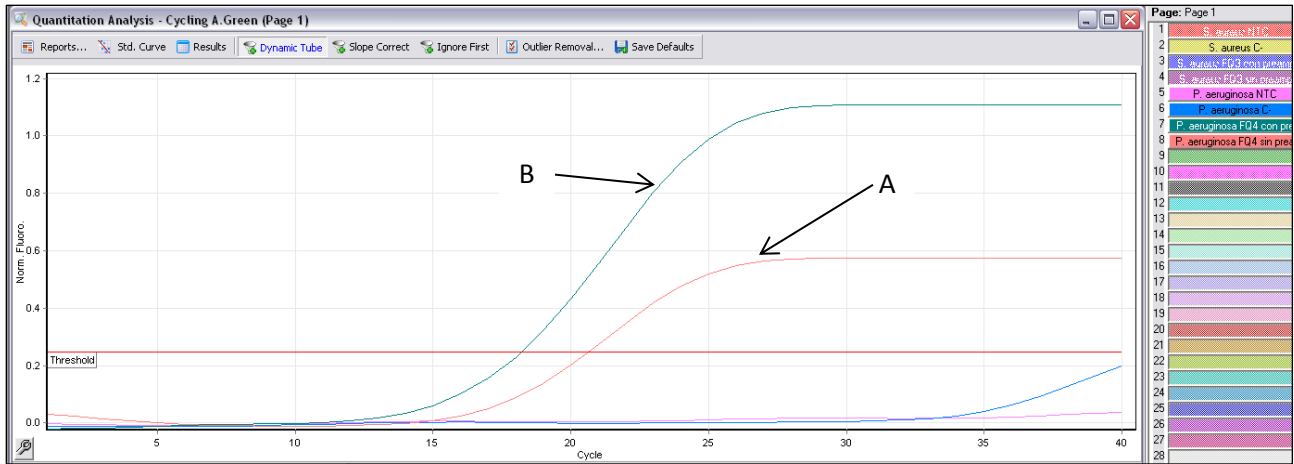


Figura 44. Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo *P. aeruginosa*.
 A: Control positivo (*P. aeruginosa*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*P. aeruginosa*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

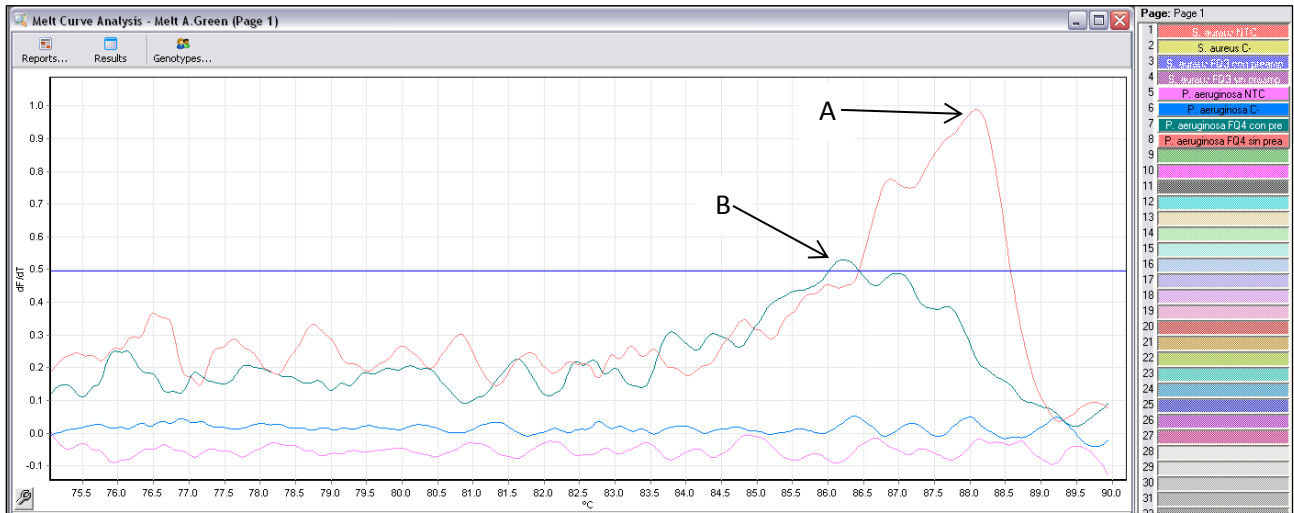


Figura 45. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *P. aeruginosa*.
 A: Control positivo (*P. aeruginosa*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*P. aeruginosa*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

- *S. aureus*

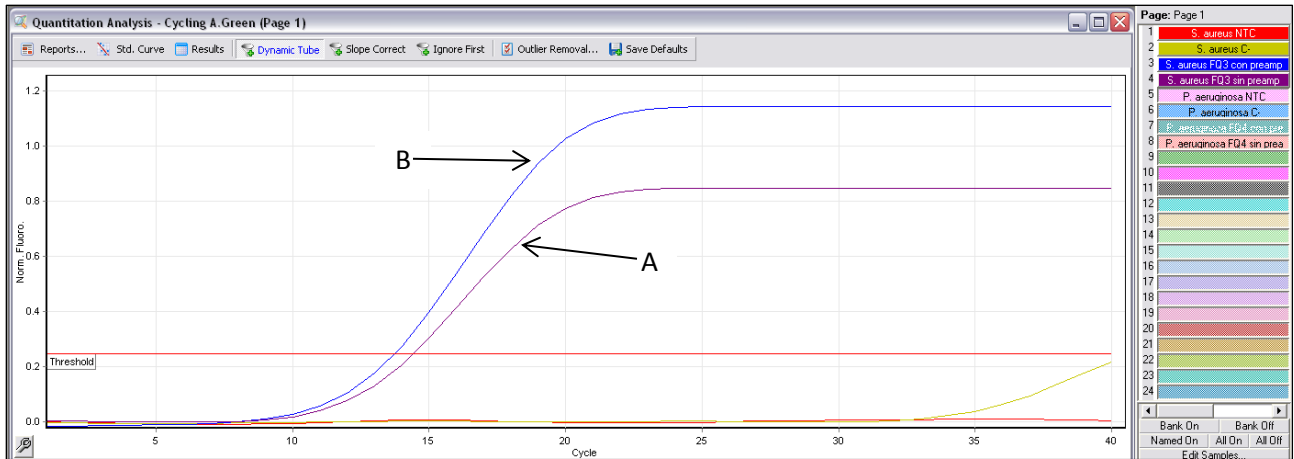


Figura 46. Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo *S. aureus*.

A: Control positivo (*S. aureus*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. aureus*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

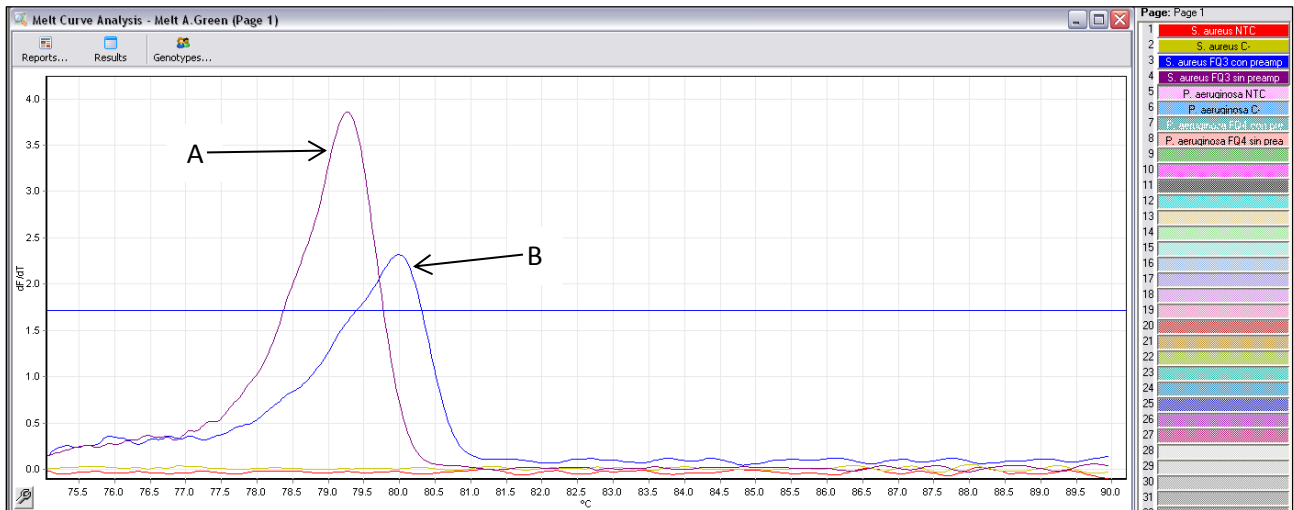


Figura 47. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *S. aureus*.

A: Control positivo (*S. aureus*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. aureus*) con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA y el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix

En la tabla 7 se muestran los valores de Ct y Tm obtenidos en cada una de las pruebas de qPCR anteriores. Asimismo, se muestra la Tm teórica calculada para cada ensayo*. Los resultados se obtuvieron con el equipo Rotor-Gene.

Tabla 7. Ct y Tm de los productos de amplificación obtenidos en las pruebas de estandarización para qPCR múltiple.
Evaluación del pool de iniciadores

Bacteria	Muestra	Ct	Tm experimental (°C)	Tm teórica (°C)
<i>S. pneumoniae</i>	Control positivo sin pre-amplificación	17.3	82.4	78.8
	Control positivo con pre-amplificación	12	83.8	
<i>K. pneumoniae</i>	Control positivo sin pre-amplificación	17.6	86.1	82.7
	Control positivo con pre-amplificación	19.8	86.7	
<i>M. tuberculosis</i>	Control positivo sin pre-amplificación	25.5	87.8	89.7
	Control positivo con pre-amplificación	23.7	87.9	
<i>P. aeruginosa</i>	Control positivo sin pre-amplificación	20.6	88.1	85.9
	Control positivo con pre-amplificación	18.2	86.2	
<i>S. aureus</i>	Control positivo sin pre-amplificación	14.4	79.3	74.6
	Control positivo con pre-amplificación	13.8	80	

Segundo conjunto de pruebas. Pre-amplificación con pool de iniciadores a distintas concentraciones y con distintos kits de PCR y qPCR del control *S. pneumoniae* (la prueba empleando el Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix y el pool iniciadores 200 STA se realizó en la sección previa y por lo tanto sus resultados no se muestran a continuación).

* El proceso de obtención de la Tm teórica para cada ensayo se detalla en la sección 10.3

- *S. pneumoniae*. Pool de iniciadores 500 STA. Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix

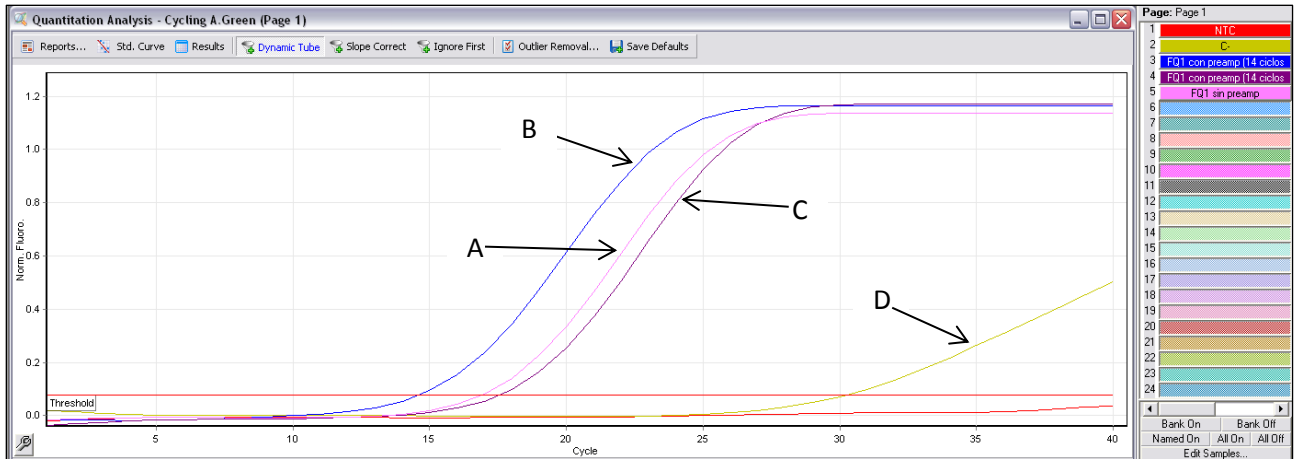


Figura 48. Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación; C: control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación y dilución 1:5; D: Control negativo

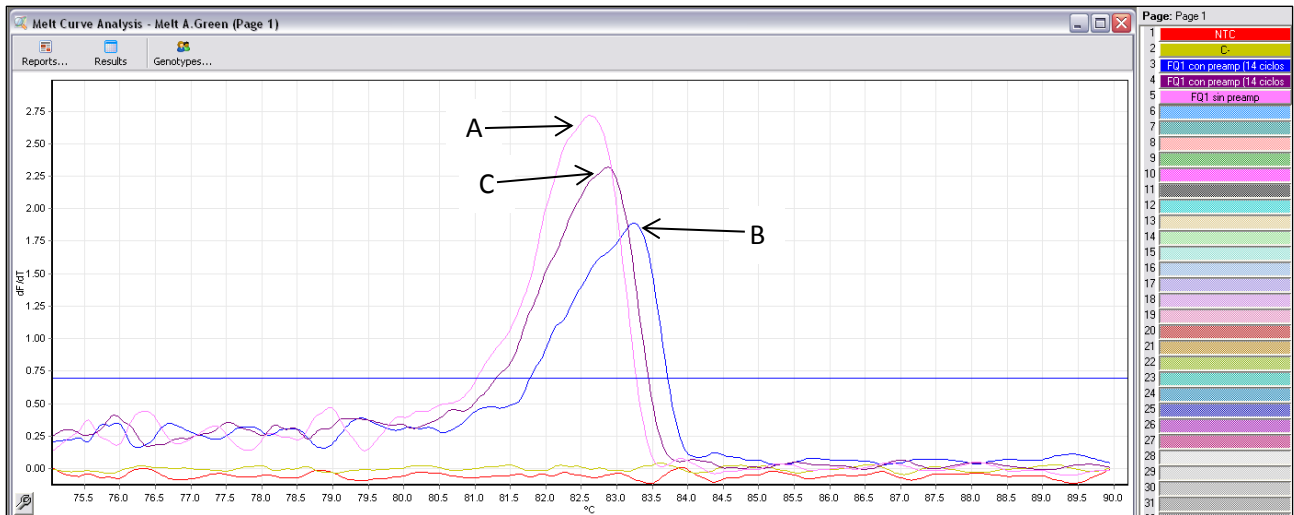


Figura 49. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación; C: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación y dilución 1:5

- *S. pneumoniae*. Pool de iniciadores 200 STA. Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix

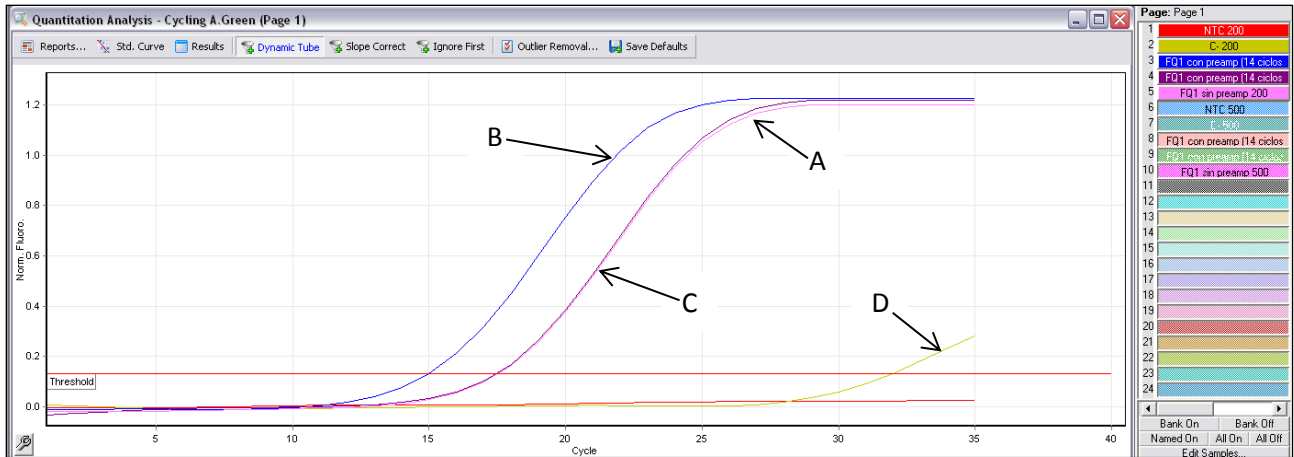


Figura 50. Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación; C: control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación y dilución 1:5; D: Control negativo

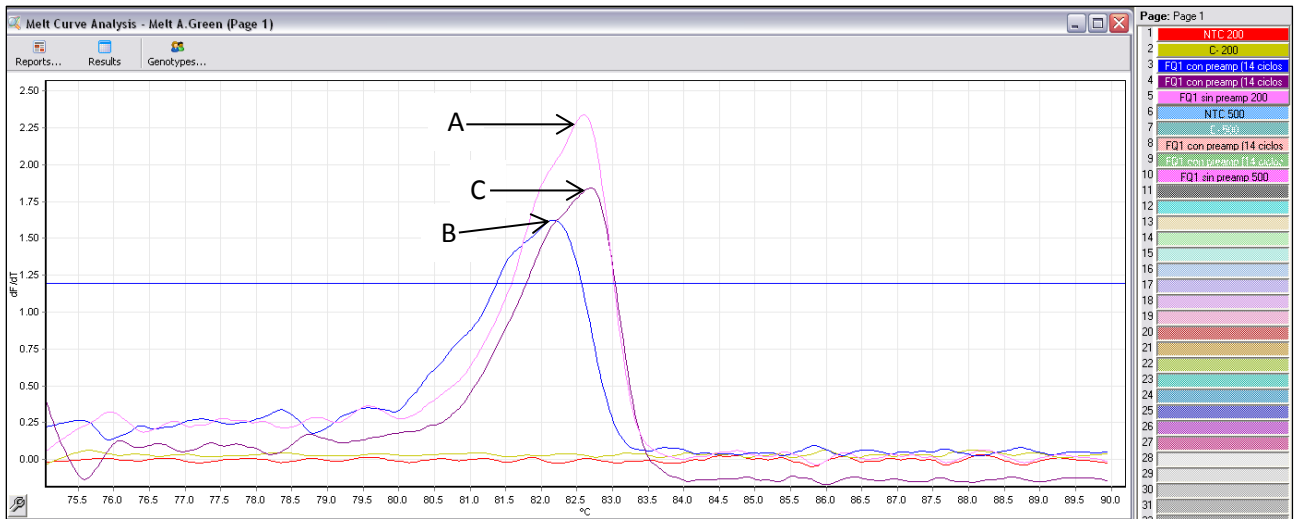


Figura 51. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación; C: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación y dilución 1:5

- *S. pneumoniae*. Pool de iniciadores 500 STA. Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix

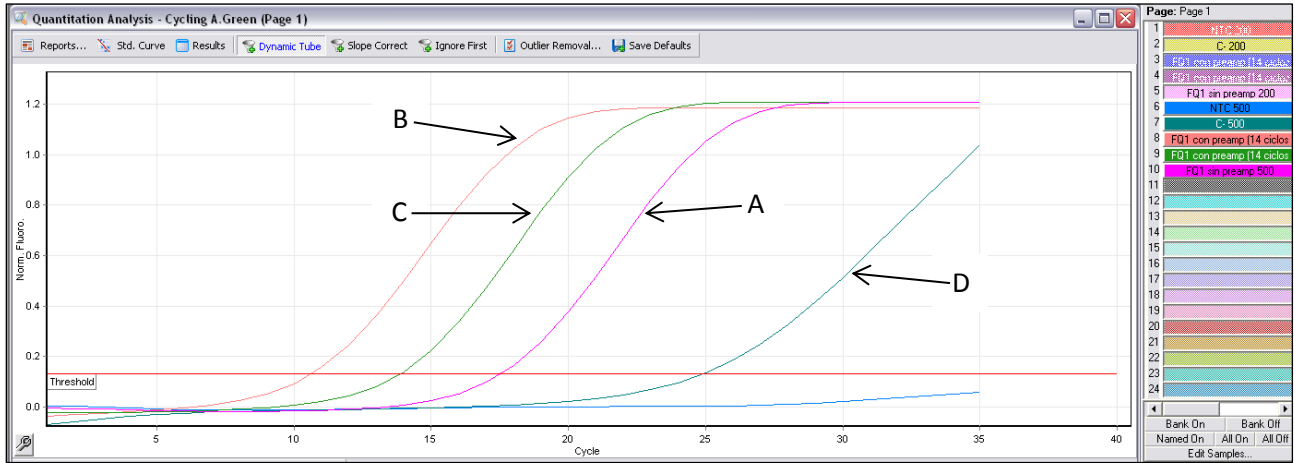


Figura 52. Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación; C: control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación y dilución 1:5; D: Control negativo

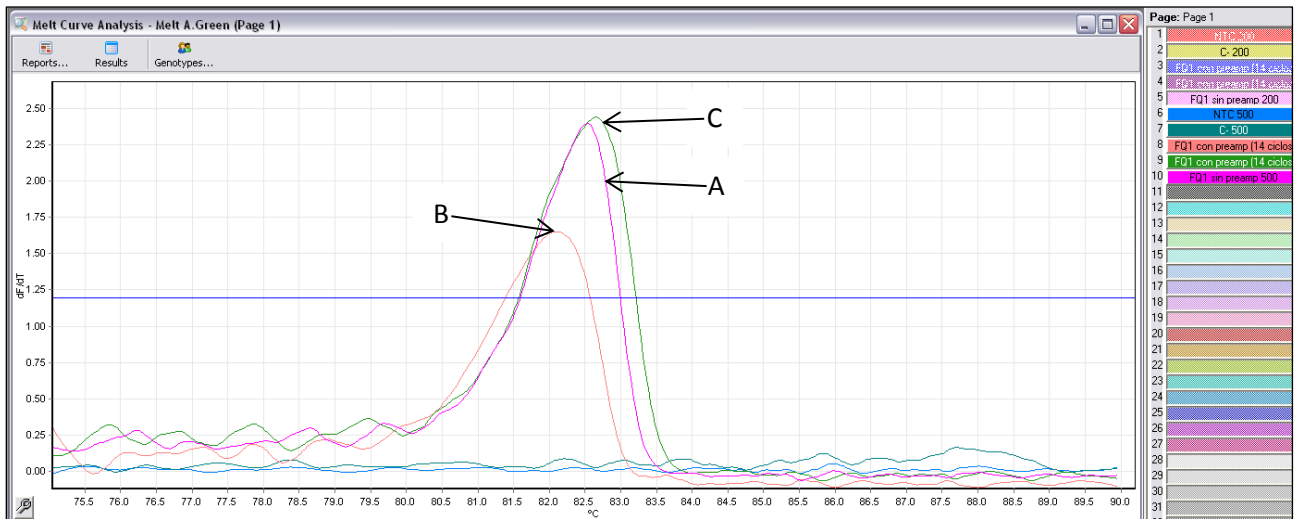


Figura 53. Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo *S. pneumoniae*.

A: Control positivo (*S. pneumoniae*) sin pre-amplificación; B: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación; C: Control positivo (*S. pneumoniae*) con pre-amplificación y dilución 1:5

En la tabla 8 se muestran los resultados de Ct y Tm obtenidos en cada una de las pruebas anteriores durante la qPCR según la condición evaluada. Asimismo, se muestra la Tm teórica calculada para cada ensayo*. Los resultados se obtuvieron con el equipo Rotor-Gene.

Tabla 8. Ct y Tm de las pruebas de estandarización para qPCR múltiple. Pre-amplificación con pool de iniciadores a distintas concentraciones y con distintos kits de PCR y amplificación en tiempo real del control *S. pneumoniae*

Condición	Muestra	Ct	Tm experimental (°C)	Tm teórica (°C)
Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool iniciadores 200 STA* (Condición 1)	Control positivo sin pre-amplificación	17.3	82.4	78.8
	Control positivo con pre-amplificación	12	83.8	
Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool iniciadores 500 STA (Condición 2)	Control positivo sin pre-amplificación	16.9	82.6	
	Control positivo con pre-amplificación	14.6	83.3	
	Control positivo con pre-amplificación (dilución 1:5)	17.6	82.9	
TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool iniciadores 200 STA (Condición 3)	Control positivo sin pre-amplificación	17.6	82.6	
	Control positivo con pre-amplificación	15	82.2	
	Control positivo con pre-amplificación (dilución 1:5)	17.5	82.7	
TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool iniciadores 500 STA (Condición 4)	Control positivo sin pre-amplificación	17.6	82.5	
	Control positivo con pre-amplificación	10.7	82.1	
	Control positivo con pre-amplificación (dilución 1:5)	13.9	82.7	

*Se muestran los resultados obtenidos en la prueba de estandarización anterior (Tabla 7)

9.5. Pruebas de estandarización en el equipo Biomark™ evaluando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 500 STA 10X

El equipo Biomark™ nos permite realizar qPCR de al menos 48 ensayos distintos para 48 muestras (2304 reacciones simultáneamente), por lo que el objetivo de esta prueba es establecer las condiciones de amplificación que nos permitan detectar la mayoría de las bacterias respiratorias en el mayor número de muestras posibles. Para esto se realizaron pruebas de estandarización de qPCR múltiple dentro del equipo Biomark™. Se analizaron 16 muestras (diez muestras clínicas, cinco controles de referencia y un control de reactivos), bajo tres condiciones distintas: con reacción de pre-amplificación con el kit TaqMan® PreAmp Master Mix, con reacción de pre-amplificación con el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix (ambas con el pool de iniciadores 500 STA 10X a una concentración final 50 nM) y una sin reacción de pre-amplificación. Las 16 muestras bajo las tres condiciones distintas se enfrentaron contra los 16 ensayos elegidos tras las pruebas de la sección anterior. Estos 16 ensayos se realizaron por triplicado.

* El proceso de obtención de la Tm teórica para cada ensayo se detalla en la sección 10.3

En la figura 54 se muestran los resultados de la prueba en forma de "Heat Map View", la cual es una forma de visualización de los resultados en el software Fluidigm Real-Time Analysis que representa los valores del Ct de cada amplificación en tiempo real con un código de colores para realizar análisis y comparaciones de una forma sencilla. Entre más "cálido" sea el color de la celda (naranja→amarillo), se presenta una amplificación más temprana (Ct menor), mientras que los colores más "fríos" (azul→morado) indican una amplificación más tardía (Ct mayor). Las celdas en color negro indican ausencia de amplificación. En las celdas horizontales se muestran los controles y muestras con sus distintas condiciones de pre-amplificación y en las celdas verticales los 16 ensayos distintos (16 pares de iniciadores) por triplicado.

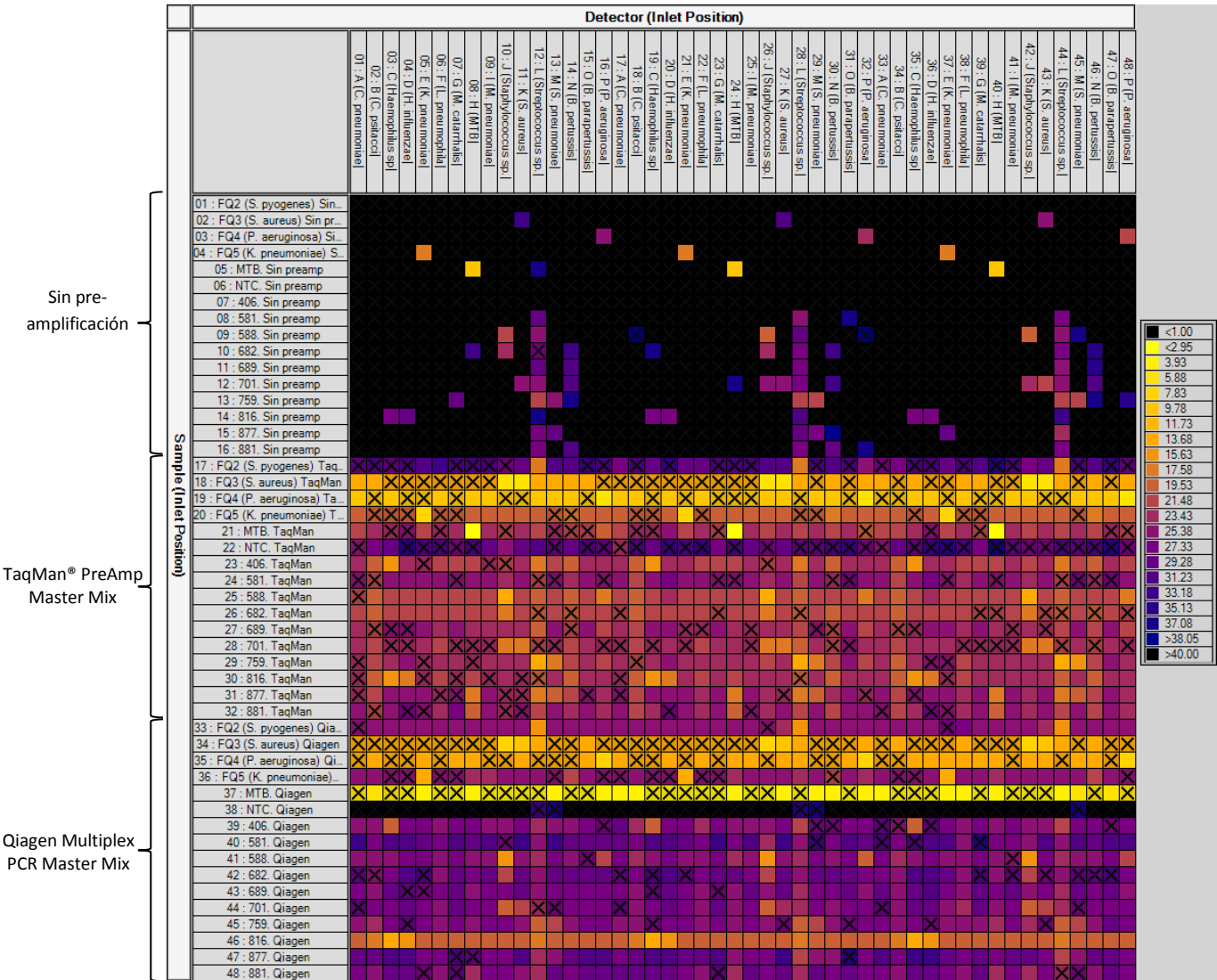


Figura 54. Heat Map View. Pruebas de estandarización en el equipo Biomark™ evaluando muestras y controles positivos pre-amplificados con los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix (pool de iniciadores 500 STA 10X) y muestras y controles positivos sin pre-amplificación.

A continuación se presentan las gráficas correspondientes a la amplificación en tiempo real y la curva de disociación del control de MTB y una muestra clínica positiva al ensayo *Haemophilus sp.* elegidos como ejemplos. En las curvas de qPCR se puede apreciar y comparar el comportamiento de amplificación de la misma muestra bajo las tres condiciones consideradas. De igual manera, en la curva de disociación se puede evaluar la similitud de la Tm bajo las tres condiciones.

- Prueba del control *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Ensayo para complejo MTB.

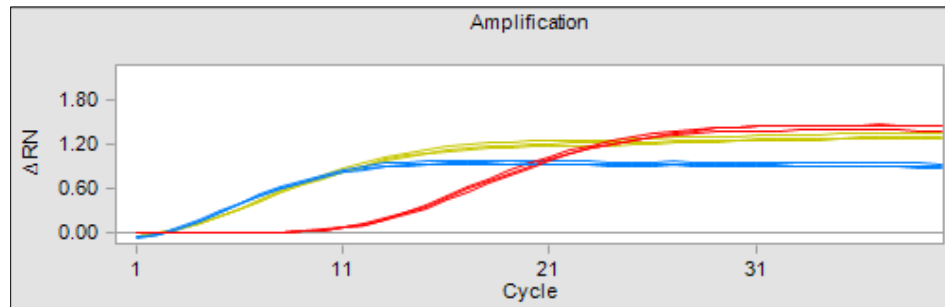


Figura 55. Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR (Pool de iniciadores 50 nM) y una prueba sin pre-amplificación.

Rojo: Sin pre-amplificación

Azul: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

Dorado: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

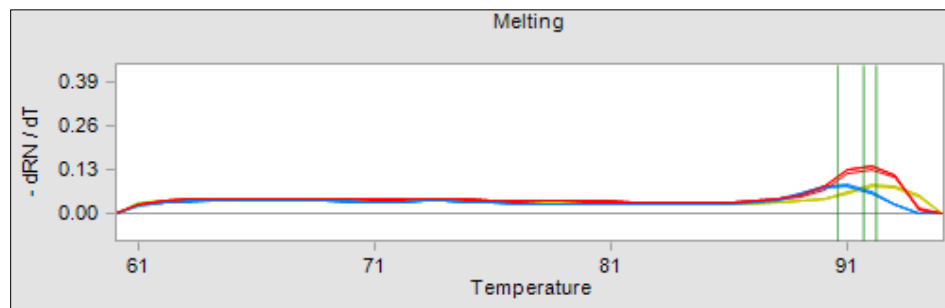


Figura 56. Curva de disociación de los productos de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR y una prueba sin pre-amplificación. Pool de iniciadores 50 nM.

Rojo: Sin pre-amplificación

Azul: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

Dorado: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

- Prueba para muestra clínica. Ensayo para *Haemophilus sp.*

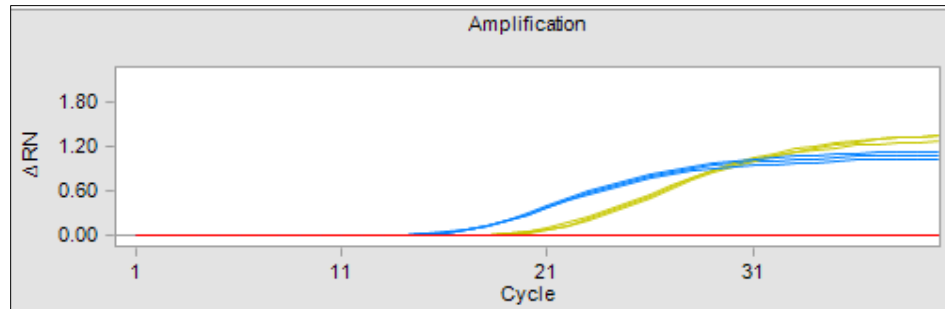


Figura 57. Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR (Pool de iniciadores 50 nM y una prueba sin pre-amplificación).

Rojo: Sin pre-amplificación

Azul: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

Dorado: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

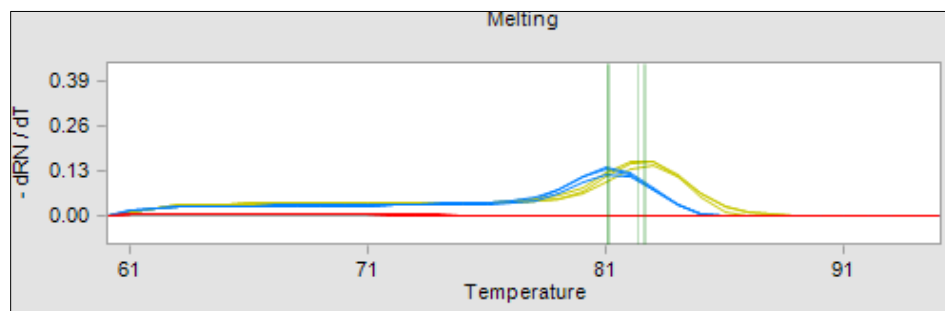


Figura 58. Curva de disociación de los productos de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR (Pool de iniciadores 50 nM) y una prueba sin pre-amplificación.

Rojo: Sin pre-amplificación.

Azul: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

Dorado: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM

A continuación se muestran los valores promedio de Ct (tabla 9) y Tm (tabla 10) de todos los productos de amplificación obtenidos de las muestras con detección positiva en esta prueba de estandarización.

Tabla 9. Ct de los productos de amplificación obtenidos de las muestras con detección positiva en esta prueba de estandarización

Ensayo	Sin pre-amplificación		Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM	
	Ct		Ct		Ct	
	Muestras clínicas (promedio)	Control	Muestras clínicas (promedio)	Control	Muestras clínicas (promedio)	Control
<i>Haemophilus sp.</i>	26.7	-*	16.5	-*	15.8	-*
<i>H. influenzae</i>	27.4	-*	15.6	-*	17.3	-*
<i>Staphylococcus sp.</i>	22.8	-	19.3	7.8	16.2	5.4
<i>S. aureus</i>	25.3	29.7	22.5	9.4	17.9	5.7
<i>P. aeruginosa</i>	-	23.3	20.5	8.6	17	5
<i>K. pneumoniae</i>	-	16.8	-	13	-	8.3
Complejo MTB	-	10.3	-	3	-	2.5
<i>Streptococcus sp.</i>	21.9	-	20.5	14.9	15.3	17.5
<i>S. pneumoniae</i>	25.5	-*	23.2	-*	18.3	-*

*No se cuenta con el control

Tabla 10. Tm de los productos de amplificación obtenidos de las muestras con detección positiva en esta prueba de estandarización.

Ensayo	Sin pre-amplificación		Qiagen Multiplex PCR Master Mix Pool de iniciadores 50 nM		TaqMan® PreAmp Master Mix Pool de iniciadores 50 nM		Tm teórica (°C)
	Tm (°C)		Tm (°C)		Tm (°C)		
	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo	
<i>Haemophilus sp.</i>	82	-*	82.8	-*	81	-*	77.8
<i>H. influenzae</i>	82.9	-*	83.8	-*	81.9	-*	76.7
<i>Staphylococcus sp.</i>	81	-	81.3	81.1	79.8	79.6	75
<i>S. aureus</i>	80	80.5	80.7	80.9	79	79.4	74.6
<i>P. aeruginosa</i>	-	89.4	89.4	89.5	87.6	87.7	85.9
<i>K. pneumoniae</i>	-	88.2	-	88.6	-	86.9	82.7
Complejo MTB	-	91.7	-	92.2	-	90.6	89.7

<i>Streptococcus sp.</i>	85	-	85	83.6	83.3	81.9	79.2
<i>S. pneumoniae</i>	83.9	-*	84.4	-*	82.6	-*	78.8
*No se cuenta con el control							

En un análisis adicional, se estudió la presencia y frecuencia de productos de amplificación indeseados durante la qPCR múltiple. Su análisis es un paso importante durante la interpretación y obtención de resultados ya que un elevado número de amplificaciones indefinidas en una muestra determinada interfiere con la identificación de aquellas amplificaciones reales, lo cual puede producir falsos negativos o positivos.

Los controles y muestras clínicas que experimentaron el paso de pre-amplificación con el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix presentaron la menor cantidad de productos inespecíficos y éstos interfirieron en menor grado con el análisis de las curvas de los productos de amplificación de los distintos ensayos.

9.6. Estandarización en el equipo Biomark™ evaluando los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix con el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones

Debido a que al emplear el pool de iniciadores con una concentración final 50 nM se formaron dímeros de iniciadores en muchos de los ensayos, se procedió a realizar nuevas pruebas con una concentración menor del pool de iniciadores. En este paso de estandarización utilizando el equipo BioMark™, se emplearon cinco controles positivos bacterianos, seis muestras clínicas y un control de reactivos. Éstas 12 muestras fueron pre-amplificadas bajo cuatro condiciones distintas:

1. Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix, concentración final de iniciadores: 8 nM
2. Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix, concentración final de iniciadores: 20 nM
3. Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix, concentración final de iniciadores: 8 nM
4. Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix, concentración final de iniciadores: 20 nM

Posteriormente se llevó a cabo la qPCR múltiple dentro del equipo Biomark, empleando los 16 pares de iniciadores por triplicado y finalmente se realizó una prueba de HRM de los productos obtenidos de la qPCR. Se obtuvieron las curvas de amplificación en tiempo real y las curvas de disociación generadas en la prueba de HRM y se compararon y evaluaron los resultados de cada una de las condiciones empleadas con el fin de identificar la más adecuada.

En la figura 59 se presentan los resultados de la prueba en forma de “Heat Map View”.

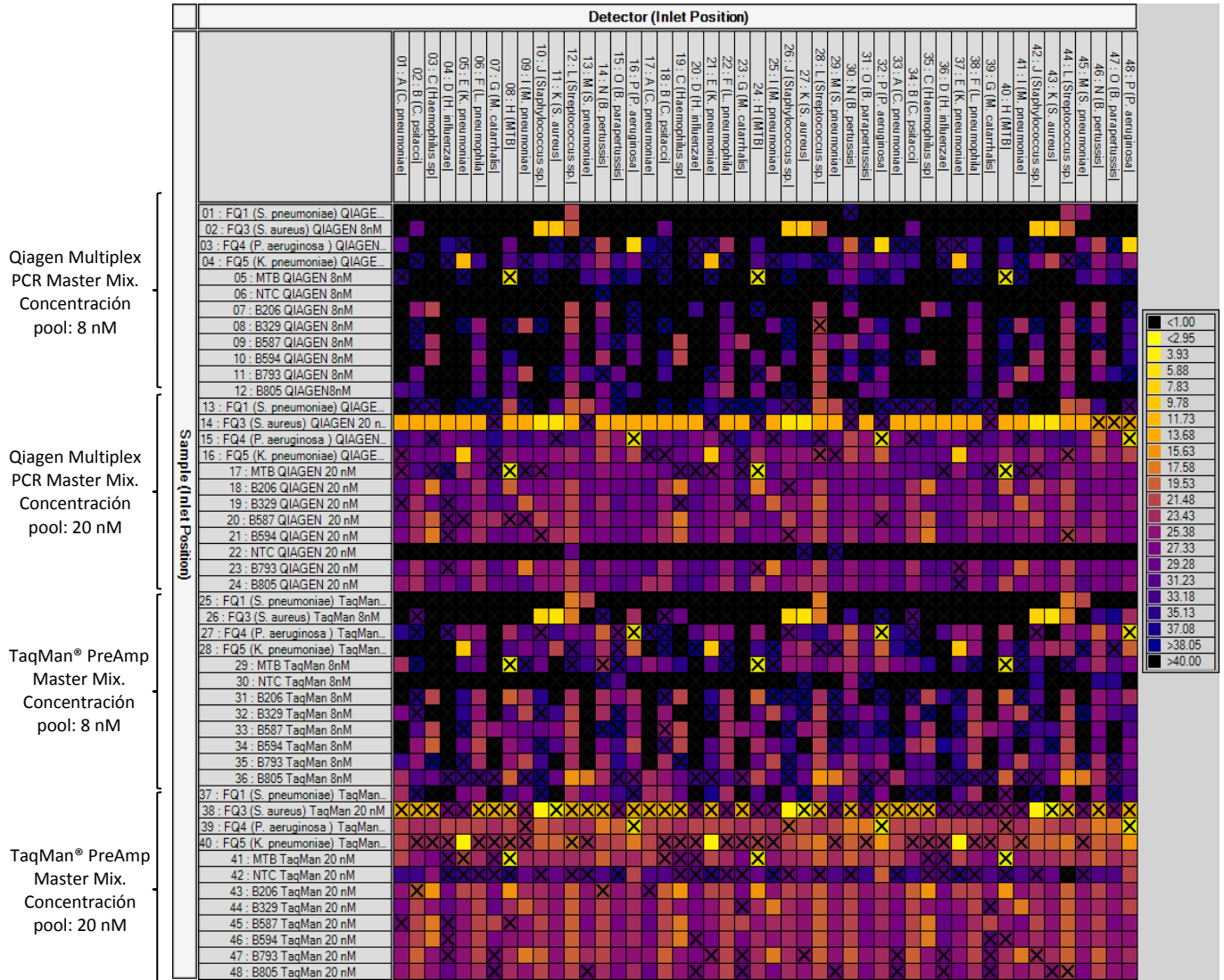


Figura 59. Heat Map View. Pruebas de estandarización en el equipo Biomark™ evaluando muestras y controles positivos pre-amplificados con los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix y el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones.

A continuación se muestran las gráficas de amplificación en tiempo real y la curva de disociación del control de MTB y una muestra clínica positiva al ensayo *Haemophilus sp.* tomadas como ejemplo, bajo las cuatro condiciones evaluadas.

- Prueba para control *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. Ensayo para complejo MTB.

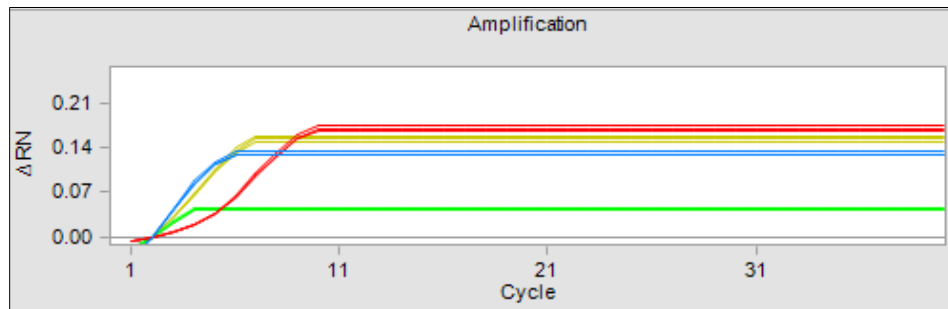


Figura 60. Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.
Rojo: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Azul: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM
Dorado: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Verde: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM

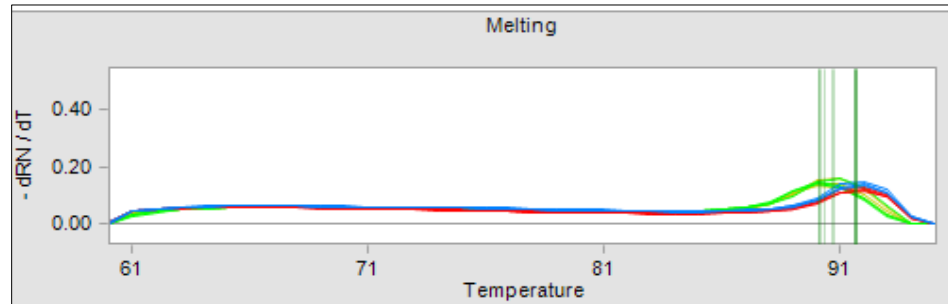


Figura 61. Curva de disociación del producto de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.
Rojo: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Azul: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM
Dorado: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Verde: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM

- Prueba para una muestra clínica. Ensayo para *Haemophilus sp.*

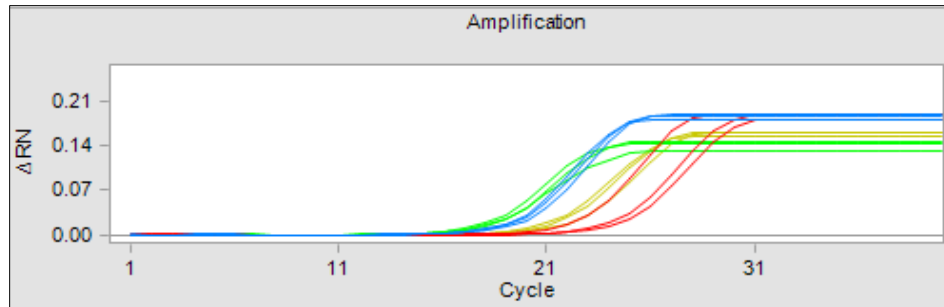


Figura 62. Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.

Rojo: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Azul: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM
Dorado: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Verde: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM

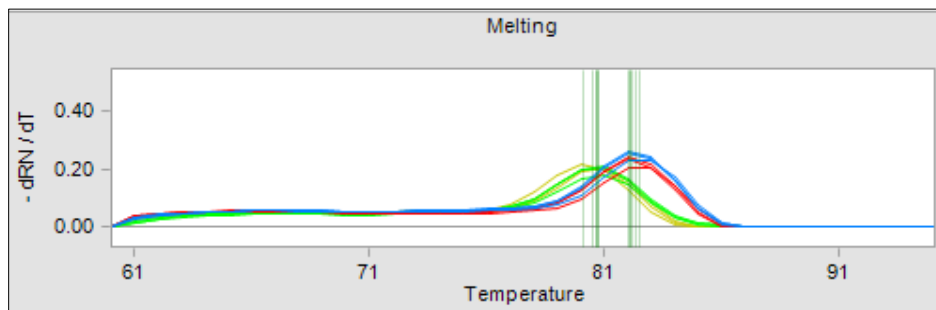


Figura 63. Curva de disociación del producto de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.

Rojo: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Azul: Pre-amplificación con Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM
Dorado: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM
Verde: Pre-amplificación con TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM

A continuación se muestran los valores promedio del Ct (tabla 11) y Tm (tabla 12) de los productos de amplificación obtenidos de las muestras con detección positiva en esta prueba de estandarización.

Tabla 11. Ct de los productos de amplificación obtenidos de las muestras con detección positiva en esta prueba de estandarización.

Ensayo	Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM.		Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM.		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM.		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM.	
	Ct		Ct		Ct		Ct	
	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo	Muestras clínicas (promedio)	Control positivo
<i>Haemophilus sp.</i>	22.3	-*	18.4	-*	21.5	-*	16.8	-*
<i>K. pneumoniae</i>	-	11.8	-	9.6	-	8.9	-	9.6
Complejo MTB	-	3.4	18.9	2.5	20.3	2.7	16.5	2.7
<i>M. pneumoniae</i>	21.9	-*	19.2	-*	21	-*	17.8	-*
<i>P. aeruginosa</i>	-	7.1	-	3.2	-	3.1	-	2.7
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	9.4	-	5.4	-	7.4	-	4.1
<i>S. aureus</i>	-	9.9	-	5.7	-	5.9	-	2.5
<i>Streptococcus sp.</i>	-	22.6	-	18.9	14.8	18.3	-	23.5
<i>S. pneumoniae</i>	-	26	-	21.2	17.4	21.5	-	31.2
*No se cuenta con el control								

Tabla 12. Tm de los productos de amplificación obtenidos de las muestras con detección positiva en esta prueba de estandarización.

Ensayo	Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM.		Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM.		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM.		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM.		Tm teórica (°C)
	Tm (°C)		Tm (°C)		Tm (°C)		Tm (°C)		
	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control	Muestra	Control	
<i>Haemophilus sp.</i>	82.1	-*	82.2	-*	80.5	-*	80.7	-*	77.8
<i>K. pneumoniae</i>	-	88.1	-	88.1	-	86.7	-	88.1	82.7
Complejo MTB	-	91.7	91.3	91.7	89.6	90.4	89.7	90.3	89.7
<i>M. pneumoniae</i>	83.4	-*	83.4	-*	81.8	-*	81.9	-*	78
<i>P. aeruginosa</i>	-	89.2	-	89	-	87.4	-	87.5	85.9

<i>Staphylococcus sp.</i>	-	80.8	-	80.8	-	79.4	-	79.3	75
<i>S. aureus</i>	-	80.6	-	80.6	-	79.2	-	79.2	74.6
<i>Streptococcus sp.</i>	-	84.1	-	84.5	83	83	-	80.9	79.2
<i>S. pneumoniae</i>	-	84	-	84	82.3	82.5	-	84.8	78.8
*No se cuenta con el control									

Tal como en las pruebas de estandarización anteriores (sección 9.5.), se analizó la presencia y frecuencia de productos de amplificación inespecíficos durante la qPCR múltiple considerando las cuatro condiciones evaluadas. Se observó que los controles y muestras clínicas pre-amplificados con el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix y el pool de iniciadores 20 nM exhibieron una menor cantidad productos indeseados y su presencia interfirió menos con los productos de amplificación del ensayo estudiado.

Los resultados de las dos pruebas de estandarización anteriores (empleando el pool de iniciadores 500 STA y 200 STA) se presentan de forma resumida en la tabla 13. Los criterios evaluados fueron el Ct (ciclo en el que se presenta la amplificación) y la Tm (temperatura de desnaturalización del producto de amplificación).

Al analizar y comparar las siete condiciones evaluadas en las dos pruebas de estandarización anteriores, se observó que al emplear el Kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y el pool de iniciadores con una concentración final 8 nM, se obtuvieron los mejores resultados durante la qPCR múltiple al emplear controles y muestras clínicas. Por lo anterior, se eligió esta condición para llevar a cabo la detección múltiple de bacterias respiratorias en las 100 muestras clínicas.

Tabla 13. Resumen de Cts y Tms obtenidos en las pruebas de estandarización en el equipo BioMark™

Control/ Muestra	Resultado	Sin pre- amplificación. Pool de iniciadores 50 nM.		Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM		Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM		Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 8 nM		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 20 nM		TaqMan® PreAmp Master Mix. Pool de iniciadores 50 nM	
		Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	- *	- *	-	-	18.9	84.5	14.9*	83.6*	18.3	83	-	-	17.5*	83.6*
	<i>S. pneumoniae</i>	- *	- *	26 (1/3)	84 (1/3)	21	84	- *	- *	21 (2/3)	82.5 (2/3)	31.2 (2/3)	84.8 (2/3)	- *	- *
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	9.4	80.8	5.4	80.8	5.4	79.6	7.4	79.4	4.1	79.3	5.6	79.6
	<i>S. aureus</i>	29.7	80.5	9.9	80.6	5.7	80.6	9.4	80.9	5.9	79.2	2.5	79.2	5.7	79.4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	23.3	89.4	7.1	89.2	3.2	89	8.6	89.5	3.1	87.4	2.7	87.5	4.9	87.7
<i>K. pneumoniae</i> BH1	<i>K. pneumoniae</i>	16.8	88.2	11.8	88.1	9.6	88.1	13	88.6	8.9	86.7	9.6	88.1	8.3	86.9
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Complejo MTB	10.3	91.7	3.4	91.7	2.5	91.7	3	92.2	2.7	90.4	2.7	90.3	2.5	90.6
406	<i>Haemophilus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	20.2	82.5	-	-	-	-	16.2	81
581	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
588	<i>Staphylococcus sp.</i>	20.3	81.6	-	-	-	-	16.2	81.6	-	-	-	-	13.2	80.2
	<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	20.5	89.4	-	-	-	-	17	87.6
682	<i>Staphylococcus sp.</i>	24 (2/3)	81.1 (2/3)	-	-	-	-	21.5	81.3	-	-	-	-	17.1	80
689	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
701	<i>Staphylococcus sp.</i>	24 (2/3)	80.4 (2/3)	-	-	-	-	20.3	80.9	-	-	-	-	18.2	79.2
	<i>S. aureus</i>	25.3	80	-	-	-	-	22.5	80.7	-	-	-	-	17.9	79
759	<i>Streptococcus sp.</i>	21.9	85	-	-	-	-	18.6	85.2	-	-	-	-	13.8	83.6
	<i>S. pneumoniae</i>	23.1	83.9	-	-	-	-	21	84.3	-	-	-	-	16.7	82.7
816	<i>Haemophilus sp.</i>	26.7	82	-	-	-	-	12.8	83.1	-	-	-	-	15.4	81
	<i>H. influenzae</i>	27.4	82.9	-	-	-	-	15.6	83.8	-	-	-	-	17.3	81.9
877	<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	22.3	84.8	-	-	-	-	16.8	83
	<i>S. pneumoniae</i>	28 (2/3)	83.8 (2/3)	-	-	-	-	25.3	84.4	-	-	-	-	19.9	82.4
881	Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
206	<i>Haemophilus sp.</i>	-	-	22	82	18	82	-	-	21	80.5	16	80.7	-	-
	Complejo MTB	-	-	-	-	18.9	91.3	-	-	19.9	89.5	16.5	89.7	-	-
329	<i>M. pneumoniae</i>	-	-	22	83.5	19.5	83.3	-	-	21	81.7	18	81.8	-	-
587	<i>Haemophilus sp.</i>	-	-	22.1	82.2	18.7	82.1	-	-	22.7	80.6	17.1	80.7	-	-
594	<i>Haemophilus sp.</i>	-	-	22.7	82.1	18.5	82.3	-	-	20.7	80.4	17.3	80.7	-	-
793	<i>M. pneumoniae</i>	-	-	21.8	83.3	18.9	83.5	-	-	21	81.8	17.5	82	-	-
805	Complejo MTB	-	-	-	-	-	-	-	-	20.7	89.7	-	-	-	-
	<i>Streptococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	14.8	83	-	-	-	-
	<i>S. pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	17.4	82.3	-	-	-	-

*En estas pruebas se empleó como control *S. pyogenes*

Los números entre paréntesis indican el número de reacciones que presentaron amplificación dentro del ensayo realizado por triplicado

9.7. Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™

En esta prueba se determinó la cantidad mínima de ADN (expresada en ng), así como el número mínimo de moléculas de ADN que es capaz de detectar con fiabilidad la técnica de qPCR múltiple empleada en este proyecto. Para ello se empleó el material genético de tres controles bacterianos (*K. pneumoniae* BH1, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y *S. aureus* ATCC 6538) a distintas concentraciones y se observó aquella a la cual se seguía presentando una detección clara y confiable.

En la figura 64 se muestran los resultados de la qPCR múltiple correspondientes a esta prueba, expresados en forma de “Heat Map View”:

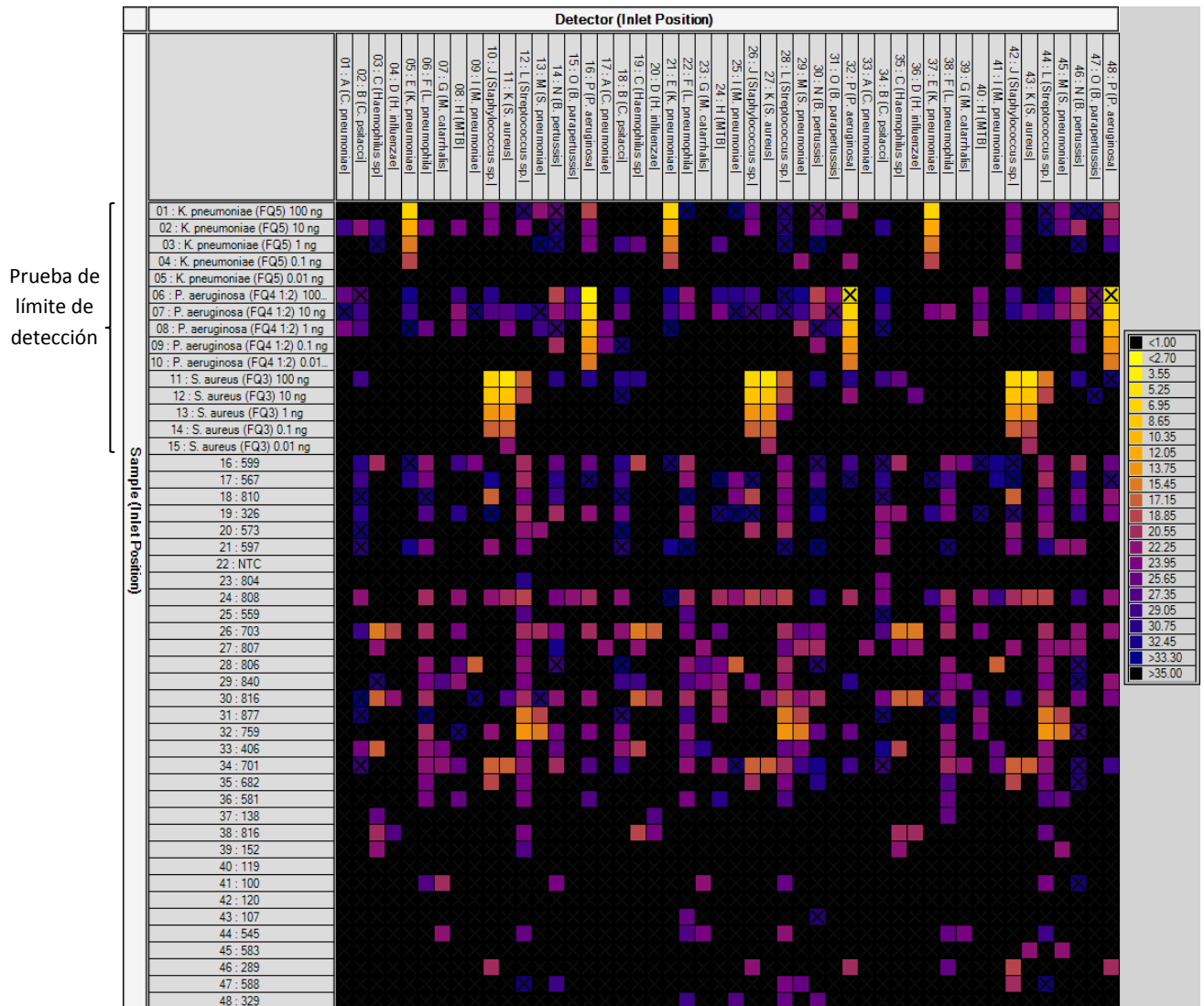


Figura 64. Heat Map View. Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™. Únicamente las primeras 15 filas señaladas corresponden a las distintas diluciones empleadas en esta prueba (cinco filas correspondientes a las cinco diluciones de cada uno de los tres controles bacterianos).

En la tabla 14, se muestran los valores promedio de Ct y Tm obtenidos tras la qPCR múltiple de cada control para cada una de sus concentraciones:

Tabla 14. Ct y Tm de los controles empleados en la prueba para la determinación del límite de detección

Ensayo	100 ng		10 ng		1 ng		0.1 ng		0.01 ng	
	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)	Ct	Tm (°C)
<i>S. aureus</i>	5.9	79.5	8.6	79.3	14.2	79.6	17.8	79.5	20.1	79.7
<i>P. aeruginosa</i>	3.7	87.9	6.9	87.8	9.7	87.8	13.9	87.8	16.2	87.5
<i>K. pneumoniae</i>	7.7	87.2	11.8	87.2	15.7	87.2	18.7	86.9	-	-

En los cálculos realizados para determinar el número de moléculas teóricas de ADN contenidas en cada una de las cinco concentraciones de los tres controles bacterianos empleados, se consideraron los siguientes aspectos:

1) El tamaño del genoma de cada una de las especies bacterianas consideradas*

-*S. aureus*: 2,854,024 pb

-*P. aeruginosa*: 6,601,757 pb

-*K. pneumoniae*: 5,324,709 pb

2) La masa molecular de un fragmento de dsDNA = # de pb x 650 (g/mol)*

3) El número de Avogadro = 6.023×10^{23} moléculas/mol

Los cálculos y el número teórico de moléculas detectadas para cada control bacteriano se detallan a continuación:

Cálculos:

- Control *S. aureus* ATCC 6538.

$$MM \text{ del producto de amplificación} = 2,854,024 \text{ pb} \times 650 \frac{g}{mol}$$

$$MM \text{ del producto de amplificación} = 1,855,115,600 \frac{g}{mol}$$

$$\# \text{ de moléculas} = 1 \times 10^{-7} g \left(\frac{1 \text{ mol}}{1,855,115,600 g} \right) \left(\frac{6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas}}{1 \text{ mol}} \right)$$

$$\# \text{ de moléculas} = 32,466,979$$

* El tamaño teórico del genoma de cada especie bacteriana fue obtenido de la página web del *Wellcome Trust Sanger Institute*: <https://www.sanger.ac.uk/>

* Los cálculos para obtener la masa molecular de un fragmento de dsDNA se obtuvieron de las siguientes fuentes:

<http://bitesizebio.com/20669/how-to-calculate-the-number-of-molecules-in-any-piece-of-dna/>

<https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/molecular-facts-and-figures.pdf?sfvrsn=4>

http://lifescience.roche.com/wcsstore/RASCatalogAssetStore/Articles/NAPI_Manual_page_220-223.pdf

<https://www.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/nucleic-acid-data>

Este mismo cálculo se realizó para las cuatro cantidades restantes (10, 1, 0.1 y 0.01 ng de ADN) y se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 15. Límite de detección para el control *S. aureus*

Cantidad de ADN	Número de moléculas	Detección
100 ng (1×10^{-7} g)	32,466,979	Positiva
10 ng (1×10^{-8} g)	3,246,698	Positiva
1 ng (1×10^{-9} g)	324,670	Positiva
0.1 ng (1×10^{-10} g)	32,467	Positiva
0.01 ng (1×10^{-11} g)	3,247	Positiva

A continuación se presentan los resultados para los dos controles bacterianos restantes, obtenidos tras los cálculos ajustados correspondientes.

- Control *P. aeruginosa* ATCC 27853

Tabla 16. Límite de detección para el control *P. aeruginosa*

Cantidad de ADN	Número de moléculas	Detección
100 ng (1×10^{-7} g)	14,035,890	Positiva
10 ng (1×10^{-8} g)	1,403,589	Positiva
1 ng (1×10^{-9} g)	140,359	Positiva
0.1 ng (1×10^{-10} g)	14,066	Positiva
0.01 ng (1×10^{-11} g)	1,404	Positiva

- Control *K. pneumoniae* BH1

Tabla 17. Límite de detección para el control *K. pneumoniae*

Cantidad de ADN	Número de moléculas	Detección
100 ng (1×10^{-7} g)	17,402,178	Positiva
10 ng (1×10^{-8} g)	1,740,218	Positiva
1 ng (1×10^{-9} g)	174,022	Positiva
0.1 ng (1×10^{-10} g)	17,402	Positiva
0.01 ng (1×10^{-11} g)	1,740	Negativa

9.8. Detección de bacterias respiratorias en muestras clínicas mediante qPCR múltiple en el equipo BioMark™

Se realizó el flujo de trabajo necesario para llevar a cabo la qPCR múltiple en el equipo BioMark™ empleando las mejores condiciones de pre-amplificación elegidas en la sección anterior para las 100 muestras clínicas en este proyecto y así detectar las principales bacterias de importancia respiratoria.

En la tabla 18 se indica el número de casos positivos y negativos a cualquier bacteria respiratoria, así como su porcentaje correspondiente en los cuatro grupos de estudio considerados. Mientras que en la tabla 19 se indica el número de casos positivos a cada bacteria respiratoria detectada, así como su porcentaje correspondiente en los cuatro grupos de estudio considerados.

Tabla 18. Detección positiva/negativa a bacterias respiratorias en los cuatro grupos de estudio

Grupos de estudio N=25 en cada grupo	Casos positivos a cualquier bacteria respiratoria		Casos negativos a cualquier bacteria respiratoria	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Pacientes <15 años, positivos a virus respiratorios	15	60%	10	40%
Pacientes <15 años, negativos a virus respiratorios	15	60%	10	40%
Pacientes ≥15 años, positivos a virus respiratorios	13	52%	12	48%
Pacientes ≥15 años, negativos a virus respiratorios	17	68%	8	32%

Tabla 19. Bacterias respiratorias detectadas en los distintos grupos de estudio.

Ensayo	Pacientes <15 años, positivos a virus respiratorios		Pacientes <15 años, negativos a virus respiratorios		Pacientes ≥15 años, positivos a virus respiratorios		Pacientes ≥15 años, negativos a virus respiratorios	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Complejo MTB	1	5%	1	4%	1	5%	0	0%
<i>Haemophilus sp.</i>	7	33%	4	14%	0	0%	1	4%
<i>H. influenzae</i>	2	10%	1	4%	0	0%	0	0%
<i>M. catarrhalis</i>	2	10%	3	12%	2	10%	0	0%
<i>M. pneumoniae</i>	0	0%	4	15%	0	0%	1	4%
<i>P. aeruginosa</i>	1	5%	0	0%	0	0%	2	9%
<i>Staphylococcus sp.</i>	1	5%	2	8%	8	38%	15	65%
<i>S. aureus</i>	0	0%	2	8%	2	10%	4	17%
<i>Streptococcus sp.</i>	2	10%	5	19%	4	19%	0	0%
<i>S. pneumoniae</i>	5	24%	4	15%	4	19%	0	0%
Total	21	100%	26	100%	21	100%	23	100%

En las figuras 65 a 68 se muestra la prevalencia (expresada en porcentaje) de las bacterias detectadas en cada grupo de estudio. Mientras que en la tabla 20 se presenta el tipo y frecuencia de las co-infecciones bacterianas detectadas en los cuatro grupos de estudio.

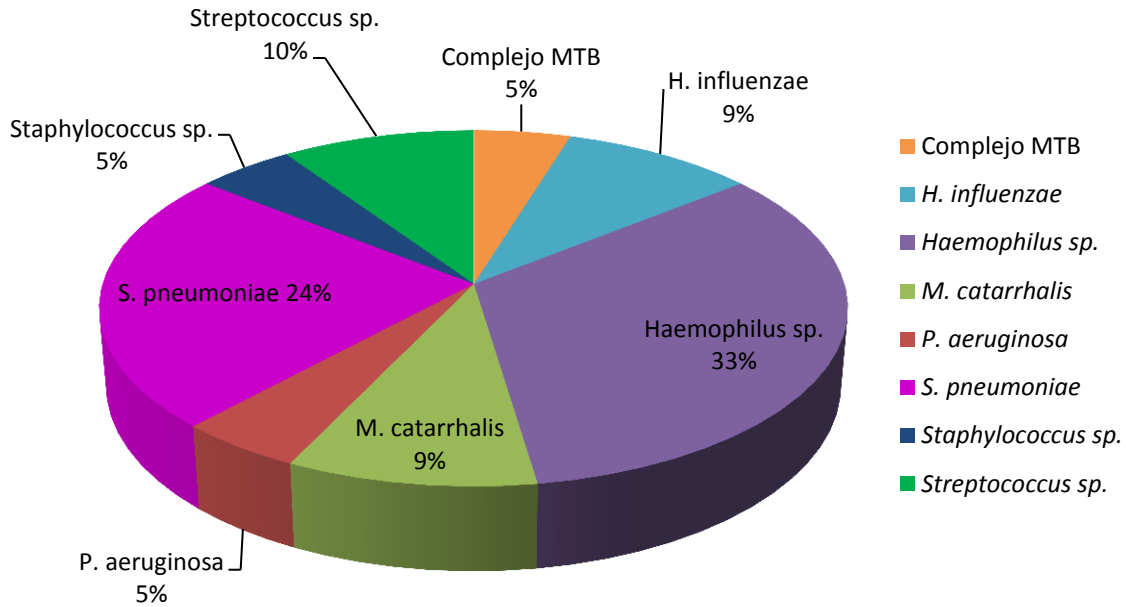


Figura 65. Pacientes <15 años, positivos a virus respiratorios

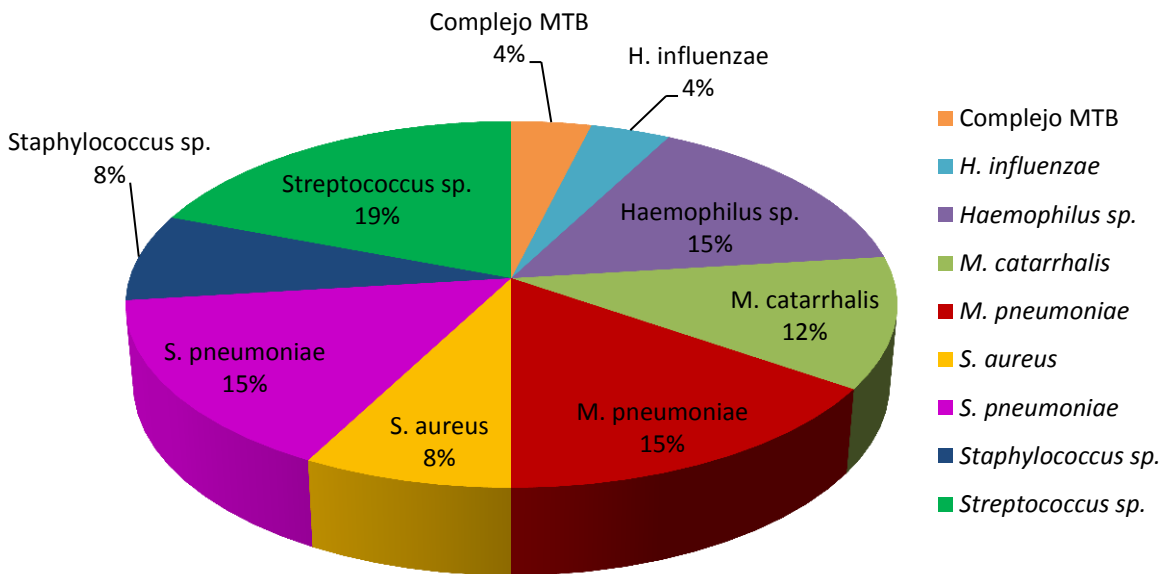


Figura 66. Pacientes <15 años, negativos a virus respiratorios

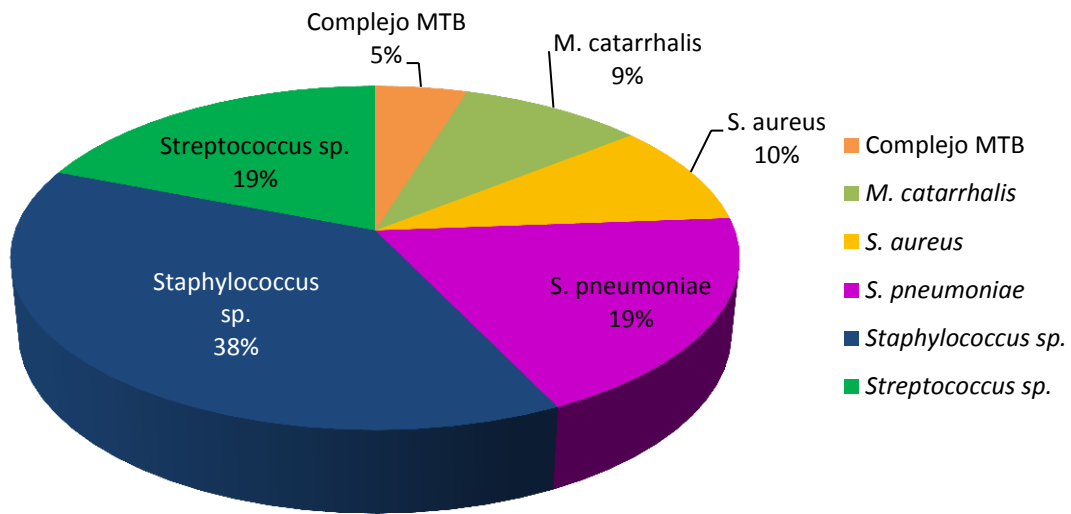


Figura 67. Pacientes ≥ 15 años, positivos a virus respiratorios

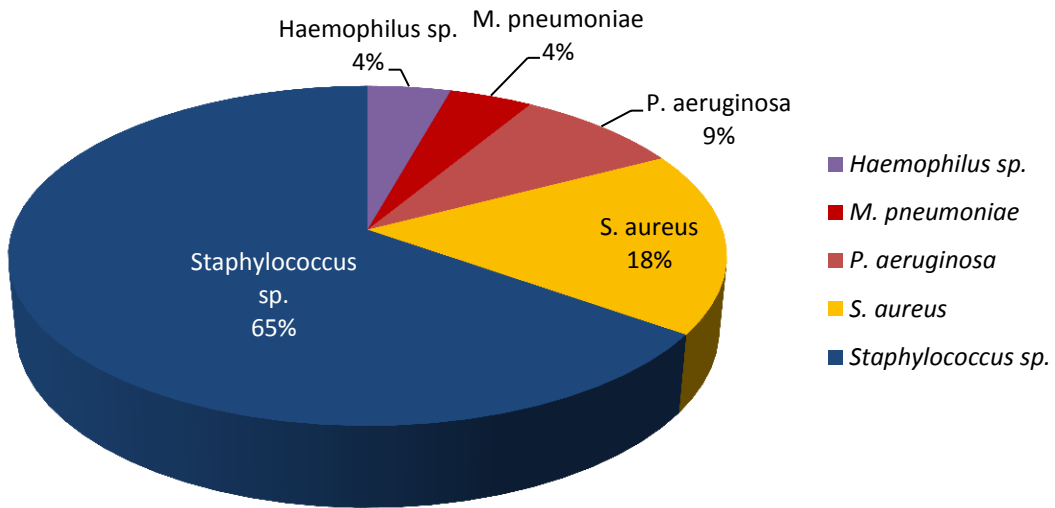


Figura 68. Pacientes ≥ 15 años, negativos a virus respiratorios

Tabla 20. Co-infecciones bacterianas detectadas en los distintos grupos de estudio

Grupo de estudio	Co-infección bacteriana	Número de casos
Pacientes <15 años, positivos a virus respiratorios	<i>P. aeruginosa/S. pneumoniae</i>	1
	<i>Staphylococcus sp./M. catarrhalis</i>	1
Pacientes <15 años, negativos a virus respiratorios	<i>Streptococcus sp./S. aureus</i>	1
	<i>Haemophilus sp./S. pneumoniae</i>	1
	<i>H. influenzae/S. pneumoniae</i>	1
Pacientes ≥15 años, positivos a virus respiratorios	<i>Staphylococcus sp./S. pneumoniae</i>	1
	Complejo MTB/ <i>S. pneumoniae</i>	1
Pacientes ≥15 años, negativos a virus respiratorios	<i>Staphylococcus sp./P. aeruginosa</i>	2

En las tablas 21 y 22, se presenta el tipo y frecuencia de co-infecciones bacterianas/virales detectadas en los dos grupos de pacientes con resultados a virus respiratorios previamente reportados.

Tabla 21. Co-infecciones bacterianas/virales en pacientes <15 años

Pacientes <15 años		
Bacterias respiratorias	Virus respiratorios	Número de casos
<i>Haemophilus sp./H. influenzae</i>	Enterovirus/Rinovirus	4
	VSR B	1
	Coronavirus 229e	1
	Parainfluenza 3	1
<i>Streptococcus sp./S. pneumoniae</i>	Enterovirus/Rinovirus	2
	Adenovirus	1
	VSR A	1
	Parainfluenza 3	1
<i>M. catarrhalis</i>	Enterovirus/Rinovirus	1
	VSR A	1
Complejo MTB	VSR	1
<i>P. aeruginosa</i>	Enterovirus/Rinovirus	1
<i>Staphylococcus sp.</i>	Enterovirus/Rinovirus	1

Tabla 22. Co-infecciones bacterianas/virales en pacientes ≥15 años

Pacientes ≥15 años		
Bacterias respiratorias	Virus respiratorios	Número de casos
<i>Staphylococcus sp./S. aureus</i>	Influenza AH1N1 pdm	2
	Influenza AH3N2	2
	Enterovirus/Rinovirus	2
	Rinovirus	1
	Parainfluenza 2	1
<i>Streptococcus sp./S. pneumoniae</i>	Enterovirus/Rinovirus	3
	VSR B	1

<i>M. catarrhalis</i>	Enterovirus/Rinovirus	1
	Influenza AH1N1	1
Complejo MTB	Enterovirus/Rinovirus	1

9.9. Caracterización de bacterias respiratorias mediante secuenciación Sanger

Obtenidos los resultados de las 100 muestras clínicas analizadas, se seleccionaron muestras positivas a aquellas bacterias de las cuales no se contaba con un control positivo bacteriano (muestras positivas para *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *M. pneumoniae*), y se caracterizaron mediante secuenciación Sanger. En la tabla 23 se muestra el resultado de estas muestras clínicas obtenido tras la qPCR múltiple en el equipo BioMark™ y se compara con el resultado obtenido tras caracterizarlas mediante secuenciación Sanger.

Tabla 23. Resultados de secuenciación Sanger de muestras clínicas sin control positivo de referencia

Muestra clínica	Resultado qPCR múltiple	Resultado secuenciación Sanger
152	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus sp., H. influenzae</i>
587	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus sp., H. influenzae</i>
206	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus sp., H. influenzae</i>
251	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>Haemophilus sp., H influenzae</i>
760	<i>Haemophilus sp., H. influenzae</i>	<i>Haemophilus sp., H. influenzae</i>
169	<i>M. catarrhalis</i>	<i>M. catarrhalis</i>
100	<i>M. catarrhalis</i>	<i>M. catarrhalis</i>
101	<i>M. catarrhalis</i>	<i>M. catarrhalis</i>
474	<i>M. catarrhalis</i>	<i>M. catarrhalis</i>
545	<i>M. catarrhalis</i>	<i>M. catarrhalis</i>
120	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>
656	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>
329	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>

En las siguientes figuras se muestran los resultados obtenidos al alinear las secuencias de las bacterias respiratorias que fueron secuenciadas mediante secuenciación Sanger con secuencias de referencia del blanco genómico correspondiente obtenidas de GenBank (NCBI, EU). Cada figura representa la alineación de las secuencias de nucleótidos con las muestras clínicas en la parte inferior.

- *M. catarrhalis*.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. <i>M. catarrhalis</i> RH4	
2. <i>M. catarrhalis</i> BBH18	
3. <i>M. catarrhalis</i> TTA24	
4. <i>M. catarrhalis</i> O46E	
5. <i>M. catarrhalis</i> O12E	
6. <i>M. catarrhalis</i>	
7. <i>M. catarrhalis</i> 2	
8. <i>M. catarrhalis</i> 4608	
9. <i>M. catarrhalis</i> 430	
10. <i>M. catarrhalis</i> S193	
11. <i>M. catarrhalis</i> 417	
12. Muestra 100	
13. Muestra 101	
14. Muestra 169	
15. Muestra 474	
16. Muestra 545	

Figura 69. Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen copB

- *M. pneumoniae*

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. <i>M. pneumoniae</i> P1 gene	
2. <i>M. pneumoniae</i> 309	
3. <i>M. pneumoniae</i> M129	
4. <i>M. pneumoniae</i> Mp1842	
5. <i>M. pneumoniae</i> Mac	
6. <i>M. pneumoniae</i> Mp4817	
7. <i>M. pneumoniae</i> Mp22	
8. <i>M. pneumoniae</i> Y1	
9. <i>M. pneumoniae</i> P118	
10. <i>M. pneumoniae</i> P64	
11. <i>M. pneumoniae</i> P63	
12. <i>M. pneumoniae</i> P42	
13. <i>M. pneumoniae</i> P36	
14. <i>M. pneumoniae</i> P33	
15. <i>M. pneumoniae</i> Mp3896	
16. <i>M. pneumoniae</i> Y-135	
17. <i>M. pneumoniae</i> T-103	
18. Muestra 120	
19. Muestra 329	
20. Muestra 656	

Figura 70. Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen P1.

- *Haemophilus sp.*

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. <i>H. influenzae</i> 86	
2. <i>H. influenzae</i> 10810	
3. <i>H. influenzae</i> F3031	
4. <i>H. influenzae</i> F3047	
5. <i>H. influenzae</i> PittEE	
6. <i>H. influenzae</i> PittGG	
7. <i>H. influenzae</i> R2866	
8. <i>H. influenzae</i> 10598	
9. <i>H. influenzae</i> 20095	
10. <i>H. influenzae</i> 2318	
11. <i>H. influenzae</i> 7657	
12. <i>H. influenzae</i> 11009	
13. <i>H. influenzae</i> 13071	
14. <i>H. influenzae</i> 1523	
15. <i>H. influenzae</i> 19252	
16. <i>H. influenzae</i> 3431	
17. <i>H. influenzae</i> 5933	
18. <i>H. parainfluenzae</i> HK23	
19. <i>H. parainfluenzae</i> HK755	
20. <i>H. parainfluenzae</i> 1.33	
21. <i>H. parainfluenzae</i> 1.54	
22. <i>H. parainfluenzae</i> 2.74	
23. <i>H. parainfluenzae</i> NCTC	
24. <i>H. parainfluenzae</i> HK 2149	
25. Muestra 152	
26. Muestra 206	
27. Muestra 251	
28. Muestra 587	
29. Muestra 760	
30. Muestra 793	

Figura 71. Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen recA.

- *H. influenzae*

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	
1. 86	
2. F3031	
3. F3047	
4. R2866	
5. 214 pilA gene	
6. 1728MEE pilA gene	
7. 1729MEE pilA gene	
8. 3224A pilA gene	
9. 10548MEE pilA gene	
10. 1885MEE pilA gene	
11. 1714MEE pilA gene	
12. 1236MEE pilA gene	
13. Muestra clinica 152	
14. Muestra clinica 251	
15. Muestra clinica 760	

Figura 72. Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen pilA.

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

10.1. Diseño de iniciadores

El diseño de iniciadores para la detección de las principales bacterias de importancia respiratoria fue el primer paso dentro de éste proyecto y los primeros acercamientos para evaluar su especificidad se llevaron a cabo en el contexto bioinformático. Empleando el software MEGA 5.1 se evaluó la capacidad de cada iniciador para identificar el blanco genómico de interés en la mayor cantidad de aislados bacterianos disponibles. Por otro lado, su especificidad fue evaluada empleando el software BLAST, observando todas las especies bacterianas con las que tenían afinidad. Los iniciadores diseñados después de este análisis contaron con las siguientes características promedio:

Tamaño: 20 nucleótidos

T_m: 61°C

Tamaño del producto de amplificación: 200 nucleótidos

Los blancos genómicos (gen o inserción genómica) en los que se basó el diseño de los iniciadores para su detección, corresponden con aquellos reportados en la literatura por su vigencia y/o eficiencia para identificar a la bacteria respiratoria correspondiente.

10.2. Extracción de ácidos nucleicos

La cantidad de ADN extraído de las 100 muestras clínicas se consideró aceptable ya que no fue necesario realizar diluciones ni concentraciones ulteriores a los pasos de purificación, y por consiguiente, el ADN de cada muestra contenido en el buffer de elución pudo ser empleado directamente en los pasos posteriores del proyecto.

Al analizar la pureza de los ácidos nucleicos extraídos de las 100 muestras clínicas, se obtuvo un rango del cociente 260/280 de 1.9-4.3 para las muestras clínicas y 1.5-3.3 de los controles bacterianos, el cual es considerablemente mayor al cociente representativo de una muestra de ADN puro (1.8-2). Este incremento puede deberse a la presencia de contaminantes orgánicos o inorgánicos provenientes de los reactivos del kit de extracción o a remanentes de la muestra clínica que no fueron eliminados por completo. Asimismo, debido a

que el ARN posee la misma absorbancia que el ADN (260 nm), su presencia suele incrementar el coeficiente 260/280 de una muestra que contenga a ambos.

Coefficientes inferiores a 1.8-2 suelen deberse a una importante contaminación de proteínas en la muestra o a una muy baja concentración de ADN (<10 ng/μL), mientras que valores mayores no suelen representar problemas considerables.

Por las observaciones anteriores, el ADN extraído de las muestras clínicas se consideró apto para su empleo en las pruebas posteriores dentro del proyecto.

10.3. Evaluación de especificidad de los iniciadores diseñados

Los criterios considerados para evaluar y comparar cada una de las pruebas de estandarización fueron los siguientes:

Ct. Se observó el ciclo en el cual se presentó el inicio de la amplificación. El Ct indica el inicio de la amplificación exponencial de los productos generados durante la qPCR. Por lo general, la cantidad de material genético al inicio de la qPCR afecta el Ct de manera inversamente proporcional (entre mayor cantidad, menor Ct y viceversa). Cabe mencionar que un Ct temprano y una curva de amplificación definida permiten la diferenciación de un producto de amplificación esperado, de productos de amplificación inespecíficos o estructuras secundarias indeseadas.

Tm. Se empleó la temperatura de fusión (desnaturalización) como un criterio de identidad de los productos obtenidos de la qPCR. La Tm de las muestras clínicas se comparó con aquella del control correspondiente dentro de la misma prueba y bajo las mismas condiciones, y éstas a su vez se compararon con la Tm teórica. Es importante mencionar que la Tm teórica se calculó empleando la herramienta en línea *Poland service request form* (Departamento de Biofísica. Instituto de Biología y Física. Universidad Heinrich Heine. Düsseldorf, Alemania). El cálculo se basa en el algoritmo de Poland (101) y su implementación descrita por Steger (102). Cabe señalar que las Tms obtenidas teóricamente para cada ensayo se calculan considerando la secuencia completa del producto de amplificación del blanco genómico correspondiente de todas las cepas y aislados disponibles en GenBank, así como condiciones ideales y constantes; mientras que las Tms obtenidas experimentalmente en cada prueba realizada en este proyecto se ven afectadas por numerosas variaciones en

las condiciones experimentales. Por lo tanto, la comparación entre las Tms teóricas y experimentales se empleó solamente como un análisis de acercamiento a la Tm observada.

Cabe mencionar que la diferencia de Tm de un mismo producto sintetizado bajo distintas condiciones, se puede deber a diversos factores:

- Concentración de ADN.
- Concentración de iones en la solución, principalmente Mg^{++} y K^+ .
- Eficiencia de la polimerasa empleada.
- Formación de estructuras secundarias.

Especificidad. El grado de especificidad de cada par de iniciadores se evaluó considerando varios aspectos:

1. Obtención de una curva de amplificación definida de los controles positivos correspondientes a cada ensayo y verificación de amplificación de muestras clínicas de referencia.
2. Generación de una curva de disociación definida y específica; Tm de los productos de amplificación de muestras clínicas similares a sus controles positivos correspondientes, y la Tm de éstos similar a su vez, con la Tm teórica del ensayo correspondiente.
3. Ausencia de amplificación del control negativo o del control de reactivos.
4. Apreciación de un producto único en el gel de electroforesis para el ensayo correspondiente y que el tamaño de éste sea lo más cercano posible al tamaño teórico del producto de amplificación.

Para llevar a cabo el análisis de este paso de estandarización, se estudiaron las gráficas de amplificación en tiempo real, las curvas de disociación y los geles de electroforesis de las muestras clínicas y controles para cada uno de los ensayos realizados, evaluando los criterios mencionados con anterioridad. A continuación se mencionan las observaciones más sobresalientes.

En todas las pruebas realizadas se aprecia que las curvas de amplificación correspondientes a los controles positivos muestran un Ct temprano y bastante inferior en comparación con las muestras clínicas. Esto es un comportamiento esperado ya que aunque la cantidad de ADN empleado para controles y muestras fue en teoría el mismo (100 ng), es común que las muestras presenten un Ct mayor que los controles debido a que el ADN cuantificado de éstos últimos corresponde únicamente a ADN de la especie bacteriana en cuestión, mientras

que el ADN cuantificado en las muestras clínicas puede corresponder a ADN de otros microorganismos o incluso del huésped, y por lo tanto, es probable que contenga una cantidad mucho menor de la secuencia de interés.

En la prueba correspondiente a los ensayos *Haemophilus sp.* y *H. influenzae* se observa que a pesar de no contar con un control positivo, tres de las cuatro muestras clínicas reportadas previamente como positivas a *H. influenzae* (muestras 1, 3 y 4), presentaron amplificación positiva para el ensayo *Haemophilus sp.*, y de éstas, una tuvo resultado positivo a la amplificación del ensayo *H. influenzae* (muestra 1), lo cual permite apreciar la especificidad de dichos ensayos. Por otro lado, en la prueba correspondiente al ensayo *P. aeruginosa* se aprecia que de las tres muestras clínicas analizadas y previamente reportadas como positivas a dicha bacteria, solamente una arrojó resultado positivo al ser evaluadas conjuntamente con un control positivo. Éstos resultados demuestran que los iniciadores diseñados para los ensayos *H. influenzae* y *P. aeruginosa* probablemente poseen una baja sensibilidad, ya que no lograron amplificar muestras clínicas reportadas como positivas. Mientras tanto, los ensayos *K. oxytoca* y *S. pyogenes* no generaron ningún producto de amplificación a pesar de haber sido probados con sus controles positivos correspondientes, lo cual indica que estos pares de iniciadores no son funcionales. Las pruebas de los ensayos restantes presentaron una amplificación adecuada y específica.

Respecto a las Tms obtenidas en éstas pruebas, se aprecia que en general las muestras clínicas presentan Tms bastante similares a sus respectivos controles positivos, y éstos a su vez presentan valores cercanos a los teóricos. En los casos específicos de los ensayos *M. pneumoniae*, *Haemophilus sp* y *H. influenzae* que no contaban con un control de referencia, se observa que las Tms de las muestras también son cercanas a los valores teóricos. Éstos resultados permiten apreciar una adecuada especificidad de los ensayos evaluados. Sin embargo, la presencia de picos indeseados en las curvas de disociación de algunos ensayos pueden deberse a la formación de estructuras secundarias o dímeros de los iniciadores con Tms difícilmente definibles. Por último, al analizar las pruebas de electroforesis de los productos obtenidos en cada ensayo, se observa que en ninguna prueba se generaron productos inespecíficos considerables.

Tras realizar estas pruebas, se puede concluir que la mayoría de los iniciadores diseñados contaron con una especificidad y eficiencia adecuada al evaluarlos empleando los controles y muestras correspondientes a cada uno de ellos. Sin embargo, es necesario re-evaluar aquellos ensayos que no lograron amplificar de manera apropiada los productos esperados (*H. influenzae*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* y *K. oxytoca*) y si es necesario, diseñar y sintetizar nuevos iniciadores que logren funcionar adecuadamente.

10.4. Estandarización de condiciones para qPCR múltiple. Evaluación de pool de iniciadores.

-Primer conjunto de pruebas. Pre-amplificación y qPCR de controles positivos bacterianos

En todas las pruebas realizadas dentro de este paso de estandarización se aprecia que aquellos controles que contaron con un paso previo de amplificación presentaron Cts menores en comparación con aquellos controles no pre-amplificados, aunque ésta diferencia no es considerable (tabla 7). Esto se debe probablemente a que al emplear controles positivos obtenidos de cultivos bacterianos, la concentración de ADN es elevada, por lo que no hay una diferencia importante entre un control sin pre-amplificar y un control pre-amplificado con pocos ciclos de PCR (14 ciclos). El paso de pre-amplificación sin embargo, puede ser importante e incluso decisivo al momento de trabajar con muestras clínicas que cuentan con menor cantidad de ADN.

Por otro lado, la Tm resultante de los productos de amplificación de los controles es cercana a la teórica y por lo tanto se puede considerar aceptable (tabla 7), ya que como se mencionó con anterioridad, la Tm calculada teóricamente se obtuvo considerando condiciones ideales y constantes, lo cual no puede reproducirse con precisión en las pruebas experimentales. La presencia de picos indeseados en algunas curvas de disociación puede deberse a la formación de dímeros de iniciadores o estructuras secundarias de los mismos, sin embargo, se logran diferenciar claramente de las curvas de disociación de los productos de amplificación de los controles evaluados.

Tras lo anterior, se puede concluir que el empleo de controles con pre-amplificación empleando el pool de iniciadores 200 STA, presentó Cts menores y Tms cercanas a las teóricas. Lo cual puede presentar ventajas al evaluar muestras clínicas que cuentan con un ADN en menor concentración, además de no producir alteraciones significativas durante la qPCR.

-Segundo conjunto de pruebas. Pre-amplificación con pool de iniciadores a distintas concentraciones y con distintos kits de PCR y qPCR del control *S. pneumoniae*

En este paso de la estandarización se realizaron tres pruebas adicionales con el fin de comparar la eficiencia de cuatro condiciones diferentes al momento de pre-amplificar el control positivo *S. pneumoniae* y su posterior afectación durante la qPCR. Al analizar los resultados de la tabla 8, se observa que aquellos productos pre-amplificados con la condición 1 presentaron los Cts más bajos. Finalmente, las curvas de disociación de todas las

condiciones presentaron picos definidos y específicos, además de Tms similares a la teórica. Se puede concluir que la condición 1 (Kit de PCR Qiagen Multiplex PCR Master Mix. Pool iniciadores 200 STA) es la que presenta los resultados más favorables.

10.5. Estandarización de qPCR múltiple en el equipo BioMark™ evaluando distintos kits de PCR y el pool de iniciadores a distintas concentraciones

Durante estas pruebas se evaluaron distintas condiciones durante el paso de pre-amplificación y la forma en que éstas afectaban los resultados producidos durante la qPCR múltiple al momento de detectar a las distintas bacterias respiratorias en las muestras clínicas en el equipo BioMark™. A continuación se mencionan las observaciones más sobresalientes respecto a los resultados presentados en las secciones 8.5 y 8.6.

La primera aproximación al análisis de las pruebas fue la interpretación de la visualización en forma de “Heat Map View”. En la figuras 54 y 59 se observan los resultados obtenidos con las muestras y controles bajo las distintas condiciones evaluadas. En estas figuras se puede apreciar que las muestras y controles sin el paso de pre-amplificación tienen una baja intensidad y únicamente pocos ensayos se pueden considerar como positivos. Incluso los controles presentaron una baja intensidad de color debido a su Ct tardío. Esto se debe a la baja cantidad de ADN bacteriano (y consecuentemente a la baja cantidad del blanco genómico de interés) al inicio de la qPCR múltiple. Por otro lado, de las condiciones evaluadas que implicaban un paso previo de pre-amplificación, aquella que empleó el kit Qiagen Multiplex PCR Master Mix y el pool de iniciadores a una concentración final 8 nM arrojó los mejores resultados: ensayos positivos en muestras y controles fácilmente distinguibles y con una adecuada intensidad de color, así como una baja cantidad de dímeros de iniciadores. El resto de las condiciones presentaron un gran número de amplificaciones inespecíficas y por lo tanto, ensayos positivos difícilmente distinguibles.

Al analizar a detalle los resultados de la qPCR y la prueba de HRM de cada muestra y control individualmente empleando el software Fluidigm Real-Time PCR Analysis, y se obtuvieron las siguientes observaciones:

Al comparar el Ct de los controles y muestras clínicas considerando el ensayo correspondiente (tabla 13), se puede observar que aquellos sin el paso de pre-amplificación tuvieron un Ct elevado o no se presentó ninguna amplificación (lo cual supone un problema importante a considerar), mientras que aquellos que fueron pre-amplificados con el kit TaqMan® PreAmp Master Mix presentaron los Cts menores. Éste aspecto es importante

ya que al analizar las curvas de qPCR, los Cts bajos permiten distinguir y apreciar mejor aquellos productos positivos de los dímeros de iniciadores que pueden presentarse en los últimos ciclos de la amplificación. De igual manera es importante considerar que las propiedades de los componentes de cada kit (eficiencia de la polimerasa, condiciones del buffer, concentración de nucleótidos, etc) juegan un papel importante durante la amplificación en tiempo real.

Por otro lado, al analizar la Tm de los productos de amplificación de cada ensayo bajo las condiciones evaluadas, se puede apreciar que existen diferencias en la Tm entre los productos de amplificación correspondientes al mismo ensayo y a la misma muestra o control según la condición de pre-amplificación empleada. De igual manera, al comparar la Tm del producto de las muestras, con la Tm del producto del control correspondiente, es posible observar que entre ellas existen diferencias en distinto grado dependiendo de la condición evaluada. Las Tms de los productos de las muestras obtenidos tras la pre-amplificación con el kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y el pool de iniciadores 8 nM poseen las diferencias más pequeñas respecto a su control correspondiente, demostrando así que los resultados obtenidos bajo esta condición expresan la especificidad de la prueba con mayor exactitud.

En un análisis adicional, se estudió la presencia y frecuencia de dímeros de iniciadores generados durante la qPCR múltiple de las muestras y los controles positivos según la condición evaluada.

Aquellos controles y muestras que no fueron pre-amplificados presentan baja o nula presencia de dímeros de iniciadores. Esto permite una clara diferenciación y análisis de las curvas de amplificación y disociación, lo cual conlleva a la obtención de resultados confiables, aunque la probabilidad de ausencia de amplificación (como en el caso de algunas muestras) produce una inconveniencia considerable. Por otro lado, en todas las pruebas con un paso de pre-amplificación se aprecia una cantidad considerable de dímeros de iniciadores en los últimos ciclos de la reacción. La presencia de estas amplificaciones no es deseable en la prueba debido a que pueden interferir con el análisis de los resultados, principalmente en las muestras clínicas, ya que si la cantidad del ADN de la muestra es baja, su Ct será alto y existiría la probabilidad de no poder diferenciarlo de los dímeros de iniciadores, lo cual conduciría a un resultado erróneo. Asimismo, en las gráficas que presentan las curvas de disociación de los productos de la qPCR, se observa que las curvas de los dímeros de iniciadores en algunos casos interfieren con la curva de los ensayos positivos, lo cual afecta el análisis visual para este criterio. Las muestras y controles que fueron pre-amplificadas con el kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix son las más

afectadas al poseer amplificaciones inespecíficas en ciclos más tempranos y por lo tanto, mayor probabilidad de realizar un análisis erróneo.

La formación de productos de dímeros de iniciadores al emplear kits de PCR previamente estandarizados pueden deberse a varios factores:

- Formación de dímeros de iniciadores
- Formación de estructuras secundarias de los iniciadores
- Condiciones poco astringentes (temperatura de alineación, duración de alineación y extensión)

De igual manera, la formación de dímeros de iniciadores puede disminuir la eficiencia de la qPCR debido al aumento de competencia por reactivos necesarios para la síntesis.

Tras haber realizado las pruebas de estandarización evaluando dos kits de PCR y el pool de iniciadores a distintas concentraciones, se tomó la decisión de emplear el kit de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y el pool de iniciadores a una concentración 8 nM durante la pre-amplificación de las 100 muestras clínicas analizadas en este proyecto. Esta decisión se tomó al considerar todos los criterios evaluados en ambas pruebas, priorizando la eficiencia, precisión y exactitud de los resultados obtenidos tras realizar la qPCR de las muestras clínicas para la detección de las principales bacterias respiratorias.

10.6. Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™

Este análisis se realizó de manera cualitativa y cuantitativa con el fin de conocer el límite de detección del método diseñado en este proyecto.

Para el análisis cualitativo se estudiaron los resultados presentados en el software Fluidigm Real-Time Analysis y se consideró el criterio de presencia/ausencia de amplificación, así como los valores Ct y Tm de los productos de amplificación. Al observar la figura 64 (Heat Map View) se aprecia que los ensayos para las especies *P. aeruginosa* y *S. aureus* presentaron amplificación con las cinco cantidades de ADN inicial, mientras que el ensayo para la especie *K. pneumoniae* al emplear 0.01 ng de ADN inicial. Por otro lado, al observar la tabla 14, se puede apreciar que el Ct para cada ensayo aumenta conforme la cantidad de ADN disminuye, lo cual es un

comportamiento esperado, mientras que la T_m se mantiene prácticamente constante, prueba de la especificidad de esta prueba.

El análisis cuantitativo tuvo como objetivo determinar el número teórico mínimo de moléculas de ADN que es capaz de detectar éste método. Al estudiar los resultados, se puede observar que al emplear la cantidad más baja de ADN inicial (0.01 ng), el número teórico mínimo de moléculas con amplificación positiva fue 1,403 (control *P. aeruginosa*). Sin embargo, en el caso del control *K. pneumoniae*, un número teórico mayor (1,740 moléculas) no fue detectado.

Éste análisis señala que un número de moléculas de ADN inferior a 1,740 de un producto resultante de la qPCR múltiple, puede no detectarse mediante el método desarrollado en éste proyecto. Ésta ausencia de detección puede deberse a que el bajo número de moléculas generadas no produce una señal suficientemente intensa para ser detectada con el equipo Biomark™.

10.7. Detección de bacterias respiratorias en muestras clínicas mediante qPCR múltiple en el equipo BioMark™

Después de llevar a cabo la qPCR de las 100 muestras incluidas en este estudio, se observa una positividad del 52 al 68% en los cuatro grupos de estudio a nivel de género o especie.

En el grupo de pacientes <15 años positivos a virus respiratorios se detectó al género *Haemophilus sp.* y a la especie *S. pneumoniae* como los agentes más frecuentes, mientras que en el grupo de pacientes <15 años negativos a virus respiratorios, el género *Streptococcus sp.* y las especies *S. pneumoniae* y *M. pneumoniae* fueron las más frecuentes.

Por otro lado, en el grupo de pacientes ≥15 años positivos a virus respiratorios, los géneros *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y la especie *S. pneumoniae* fueron los agentes con mayor prevalencia. Por último, en el grupo de pacientes ≥15 años negativos a virus respiratorios, el género *Staphylococcus sp.* y las especies *S. aureus* y *P. aeruginosa* resultaron las más prevalentes.

En un análisis adicional, se identificaron las principales co-infecciones bacterianas y su frecuencia en los cuatro grupos estudiados (tabla 20). Este análisis mostró que la co-infección *Staphylococcus sp./P. aeruginosa* en

el grupo de pacientes ≥ 15 años negativos a virus fue la más frecuente con dos casos. Asimismo, se puede observar que de manera general la especie *S. pneumoniae* es la especie más comúnmente asociada a otras bacterias en los tres grupos restantes.

Al estudiar las co-infecciones entre virus y bacterias respiratorias, se pudieron realizar las siguientes observaciones: en los pacientes < 15 años, los virus respiratorios asociados con mayor frecuencia a bacterias respiratorias fueron aquellos pertenecientes a los géneros Enterovirus/Rinovirus[†] (nueve casos). Por otro lado, en el grupo de pacientes ≥ 15 años con detección positiva a bacterias respiratorias, se encontró que distintas especies virales dentro de los géneros Enterovirus/Rinovirus presentan una frecuencia considerable (siete casos), seguidas por aquellas especies dentro del género Influenza (cinco casos).

10.8. Caracterización de bacterias respiratorias mediante secuenciación Sanger

De las 15 muestras clínicas secuenciadas, dos no arrojaron resultados, esto probablemente debido a errores durante la lectura o en la preparación de las mezclas para su amplificación. Las 13 muestras restantes presentaron resultados adecuados ya que los productos de amplificación obtenidos durante la qPCR múltiple fueron los esperados, comprobando así la total especificidad de los iniciadores diseñados para aquellos ensayos que no contaban con un control positivo de referencia.

Al alinear las secuencias nucleotídicas generadas en la secuenciación con aquellas obtenidas de GenBank correspondientes a todas las cepas y aislados de referencia, se aprecia una completa homología.

En el caso específico de dos muestras clínicas (152 y 251), se observa una diferencia considerable entre los resultados obtenidos en la qPCR múltiple y la secuenciación. La qPCR múltiple dio un resultado positivo únicamente para el ensayo *Haemophilus sp.*, mientras que la secuenciación demostró que la especie era *H. influenzae*. Esto probablemente puede deberse a una baja cantidad de ADN bacteriano en las muestras que impidió su detección a pesar de la amplificación o a una baja eficiencia en el funcionamiento del par de iniciadores para este ensayo en específico. La ausencia de controles positivos de esta especie bacteriana no permitió realizar los ajustes necesarios durante las pruebas de estandarización de este ensayo, por lo que es recomendable hacer nuevas pruebas para aumentar la eficiencia de estos iniciadores empleando las muestras

[†] Los géneros Enterovirus y Rinovirus pertenecen a la familia Picornaviridae y por su frecuencia e importancia como patógenos respiratorios, en el contexto de este proyecto se consideran en conjunto.

secuenciadas como referencia. La obtención de estos resultados permite el uso de las muestras secuenciadas como muestras de referencia para futuras pruebas.

11. CONCLUSIONES

Durante éste proyecto se logró diseñar y estandarizar un método para la detección de las principales bacterias de importancia respiratoria mediante qPCR empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos. Al tratarse de un proyecto para la estandarización de un método de detección molecular, las conclusiones obtenidas no pueden reducirse a la aceptación o rechazo de una hipótesis, sino que es importante señalar los puntos más relevantes obtenidos:

La mayoría de los iniciadores diseñados para la detección de blancos genómicos bacterianos específicos cumplieron con los criterios necesarios para poder detectar con una adecuada especificidad y eficiencia las principales bacterias de importancia respiratoria. En el caso específico de los iniciadores correspondientes a los ensayos *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *K. oxytoca* y *S. pyogenes* debe considerarse un nuevo diseño, ya que no lograron funcionar adecuadamente. Éste nuevo diseño debe evaluarse en función de la importancia y prevalencia de las especies bacterianas correspondientes. El resto de los iniciadores funcionales pueden ser empleados en distintos protocolos y plataformas de PCR de manera confiable.

Tras someter éstos iniciadores funcionales a distintas pruebas de estandarización de manera individual o en conjunto, se lograron establecer las mejores condiciones para su adecuado funcionamiento durante la qPCR múltiple. La elección de los reactivos y condiciones se basó en su eficiencia, versatilidad, la facilidad para el análisis de los resultados arrojados y la relación costo-beneficio. Al tratarse de una propuesta de método de detección molecular, es importante considerar la relación costo-beneficio ya que éste método debe ser viable para la institución que lo emplee y generar múltiples beneficios que superen a corto y largo plazo, a las técnicas de detección tradicionales.

Una vez elegidos los mejores iniciadores y las condiciones óptimas para su empleo, se detectaron simultáneamente las principales bacterias de importancia respiratoria en 100 pacientes ingresados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (divididos en cuatro grupos según su edad y resultado a infección por virus respiratorio), y se observaron resultados concordantes con los datos reportados en la literatura. Las especies bacterianas *S. pneumoniae* y *S. aureus* fueron en general las más prevalentes en los cuatro grupos de pacientes estudiados, mientras que otras especies como *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *P. aeruginosa* y *M. pneumoniae* tuvieron una importante prevalencia, aunque más específica según el grupo de estudio. Sabiendo que las especies *S. pneumoniae*, *S. aureus* y *H. influenzae* pueden presentarse como parte de

la flora normal de los individuos estudiados, es necesario desarrollar en un futuro una técnica que logre establecer parámetros capaces de diferenciar colonización e infección y así determinar el agente etiológico verdadero de la enfermedad respiratoria. Por otro lado, las co-infecciones bacterianas incluyeron con mayor frecuencia a la especie *S. pneumoniae* debido a que es el agente bacteriano más común en las vías respiratorias, y en un cuadro clínico de IRA es común encontrarlo junto a otros patógenos. *P. aeruginosa* y *M. catarrhalis* fueron otras especies bacterianas encontradas en los pocos casos de co-infección. El desarrollo de una técnica que logre diferenciar colonización e infección y que al mismo tiempo sea capaz de detectar múltiples agentes infecciosos de manera eficaz, permitirá un análisis robusto y confiable, y consecuentemente, generará los datos necesarios para el adecuado tratamiento del paciente y el desarrollo de estudios epidemiológicos relevantes y certeros.

Por último, el empleo de secuenciación Sanger logró confirmar la identidad de aquellas bacterias detectadas que no contaron con un control positivo durante las pruebas de estandarización, lo cual permitió ratificar la especificidad de los iniciadores correspondientes, así como permitir el empleo de las muestras secuenciadas como controles positivos para proyectos posteriores. El uso de esta herramienta y de controles bacterianos positivos aseguró la obtención de resultados exactos y confiables.

Tras lo anterior, se puede concluir que se cumplieron los objetivos planteados durante éste proyecto. El método de detección de bacterias de importancia respiratoria mediante qPCR empleando la tecnología de arreglos dinámicos de nanofluidos, resultó altamente eficiente y confiable en comparación con los métodos tradicionales. La capacidad de ésta prueba para analizar un gran número de muestras en busca de un gran número de blancos genómicos en un corto tiempo, con una muy pequeña cantidad de reactivos y generando datos relevantes y certeros para el adecuado tratamiento del paciente y el desarrollo de estudios epidemiológicos, hacen de éste método una opción rentable, confiable e innovadora para la detección de bacterias de importancia respiratoria. Su empleo implica numerosas ventajas a corto y largo en comparación con las técnicas convencionales y permite la generación de valiosos conocimientos científicos.

12. PERSPECTIVAS

A continuación se mencionan algunas propuestas para aumentar el alcance y empleabilidad de éste método en un futuro:

- Realizar un nuevo diseño y síntesis de aquellos iniciadores que no funcionaron adecuadamente
- Mantener una observación constante de los patógenos respiratorios emergentes y diseñar iniciadores adecuados para su detección.
- Diseñar iniciadores para la detección de genes relacionados con resistencia a antibióticos (Ej. Gen *mecA* presente en *S. aureus* resistente a meticilina, gen *blaKPC* presente en *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos, gen *pbp1* presente en *S. pneumoniae* resistente a cefalosporinas, etc.), con el fin de aminorar los efectos adversos relacionados con ésta resistencia.
- Establecer parámetros durante el análisis de resultados que permitan diferenciar entre colonización e infección bacteriana.
- Estandarización de un método para detectar conjuntamente las principales bacterias y virus de importancia respiratoria.
- Obtención de datos epidemiológicos de una población más grande y representativa.

13. TABLA DE FIGURAS

Número	Figura	Página
1	Distribución de muertes por IRAs a nivel mundial	13
2	Principales causas de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial	14
3	Incidencia de neumonía en niños por país	14
4	Distribución de muertes por neumonía y otras causas en niños menores de cinco años por región de la OMS	15
5	Tasa de mortalidad en menores de cinco años por IRAs; México 2000-2010.	16
6	Incidencia de casos de B. pertussis en EU desde 1990 en distintos grupos etarios	23
7	Representación esquemática de la Reacción en Cadena de la Polimerasa	48
8	Función general de las sondas de hidrólisis	52
9	Función general de las <i>Molecular beacons</i>	53
10	Vista general de curva estándar por qPCR	54
11	Comparación de mutación por HRM	55
12	Equipo Biomark™	56
13	IFCs. Circuitos de Fluidos Integrados	57
14	Llenado de cámaras de líquido de flujo en IFC 48.48	80
15	Distribución de líquido de flujo en chip central del IFC 48.48	80
16	Distribución de mezclas de reactivos para ensayos y muestras en IFC 48.48	81
17	Amplificación en tiempo real de un control positivo y una muestra clínica positiva para los ensayos <i>Staphylococcus sp.</i> y <i>S. aureus</i>	90
18	Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos <i>Staphylococcus sp.</i> (75°C) y <i>S. aureus</i> (74.6°C)	91
19	Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos <i>Staphylococcus sp.</i> (251 pb) y <i>S. aureus</i> (174 pb)	91
20	Amplificación en tiempo real de dos muestras clínicas positivas a distintas concentraciones de ADN para el ensayo <i>M. pneumoniae</i>	92
21	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>M. pneumoniae</i> (78°C)	92
22	Electroforesis de los productos de amplificación del ensayo <i>M. pneumoniae</i> (246 pb)	93
23	Amplificación en tiempo real de cuatro muestras clínicas positivas para los ensayos <i>Haemophilus sp.</i> y <i>H. influenzae</i>	93
24	Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos <i>Haemophilus sp.</i> (77.8°C) y <i>H. influenzae</i> (76.7°C)	94
25	Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos <i>Haemophilus sp.</i> (178 pb) y <i>H. influenzae</i> (226 pb)	94
26	Amplificación en tiempo real de dos controles positivos y una muestra clínica positiva para el ensayo Complejo MTB	95
27	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo Complejo MTB (89.7°C)	95
28	Electroforesis de los productos de amplificación del ensayo Complejo MTB (165 pb)	96
29	Amplificación en tiempo real de un control positivo y tres muestras clínicas positivas para el ensayo <i>P. aeruginosa</i>	96
30	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>P. aeruginosa</i> (85.9°C)	97
31	Electroforesis de los productos de amplificación del ensayo <i>P. aeruginosa</i> (137 pb)	97
32	Amplificación en tiempo real de dos controles positivos correspondientes a los ensayos <i>K. pneumoniae</i> y <i>K. oxytoca</i>	98
33	Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos <i>K. pneumoniae</i> (82.7°C) y <i>K. oxytoca</i> (85°C)	98

34	Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos <i>K. pneumoniae</i> (177 pb) y <i>K. oxytoca</i> (199 pb)	99
35	Amplificación en tiempo real de dos controles positivos correspondientes a los ensayos <i>Streptococcus sp.</i> , <i>S. pneumoniae</i> (78.8°C) y <i>S. pyogenes</i>	99
36	Curva de disociación de los productos de amplificación de los ensayos <i>Streptococcus sp.</i> (79.2°C), <i>S. pneumoniae</i> (78.8°C) y <i>S. pyogenes</i> (79.6°C)	100
37	Electroforesis de los productos de amplificación de los ensayos <i>Streptococcus sp.</i> (176 pb), <i>S. pneumoniae</i> (236 pb) y <i>S. pyogenes</i> (252 pb)	100
38	Amplificación en tiempo real del control positivo <i>S. pneumoniae</i> para el ensayo <i>S. pneumoniae</i> .	103
39	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>S. pneumoniae</i>	103
40	Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo <i>K. pneumoniae</i> .	104
41	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>K. pneumoniae</i> .	104
42	Amplificación en tiempo real del control positivo <i>M. tuberculosis</i> para el ensayo complejo MTB	105
43	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>M. tuberculosis</i> .	105
44	Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo <i>P. aeruginosa</i> .	106
45	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>P. aeruginosa</i> .	106
46	Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo <i>S. aureus</i> .	107
47	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>S. aureus</i> .	107
48	Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo <i>S. pneumoniae</i> .	109
49	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>S. pneumoniae</i> .	109
50	Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo <i>S. pneumoniae</i>	110
51	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>S. pneumoniae</i> .	110
52	Amplificación en tiempo real del control positivo para el ensayo <i>S. pneumoniae</i> .	111
53	Curva de disociación de los productos de amplificación del ensayo <i>S. pneumoniae</i> .	111
54	Heat Map View. Pruebas de estandarización en el equipo Biomark™ evaluando muestras y controles positivos pre-amplificados con los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix (pool de iniciadores 500 STA 10X) y muestras y controles positivos sin pre-amplificación.	113
55	Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR (Pool de iniciadores 50 nM) y una prueba sin pre-amplificación.	114
56	Curva de disociación de los productos de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR y una prueba sin pre-amplificación. Pool de iniciadores 50 nM.	114
57	Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR (Pool de iniciadores 50 nM y una prueba sin pre-amplificación.	115
58	Curva de disociación de los productos de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR (Pool de iniciadores 50 nM) y una prueba sin pre-amplificación.	115
59	Heat Map View. Pruebas de estandarización en el equipo Biomark™ evaluando muestras y controles positivos pre-amplificados con los kits de PCR TaqMan® PreAmp Master Mix y Qiagen Multiplex PCR Master Mix y el pool de iniciadores 200 STA a distintas concentraciones.	118
60	Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.	119
61	Curva de disociación del producto de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.	119
62	Amplificación en tiempo real. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.	120
63	Curva de disociación del producto de amplificación. Evaluación de dos kits de PCR. Pool de iniciadores 8 y 20 nM.	120
64	Heat Map View. Determinación del límite de detección de las pruebas de qPCR múltiple en el equipo Biomark™.	125
65	Pacientes <15 años, positivos a virus respiratorios	129
66	Pacientes <15 años, negativos a virus respiratorios	129
67	Pacientes ≥15 años, positivos a virus respiratorios	130

68	Pacientes ≥ 15 años, negativos a virus respiratorios	130
69	Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen copB	133
70	Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen P1.	133
71	Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen recA.	71
72	Alineación de secuencias de ADN de cepas de referencia y muestras clínicas secuenciadas por Sanger. Gen pilA.	72

14. REFERENCIAS

1. Ferreira-Guerrero E, Báez-Saldaña R, Trejo-Valdivia B, Ferreyra-Reyes L, Delgado-Sánchez G, Chilián-Herrera OL, et al. Infecciones respiratorias agudas en niños y signos de alarma identificados por padres y cuidadores en México. *Salud Pública de México*. 2013;55:S307-S13.
2. Secretaría de Salud. *Manual de Enfermedades Respiratorias 2012. Prevención, diagnóstico y tratamiento*. México, 2012.
3. World Lung Foundation. *Acute Respiratory infection Atlas*. Bookhouse Group, Inc. Estados Unidos de América, 2010.
4. Rudan I. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(5):408-16.
5. Nair H, Simões EAF, Rudan I, Gessner BD, Azziz-Baumgartner E, Zhang JSF, et al. Global and regional burden of hospital admissions for severe acute lower respiratory infections in young children in 2010: a systematic analysis. *The Lancet*. 2013;381(9875):1380-90.
6. Taneja J, Malik A Fau - Malik A, Malik A Fau - Rizvi M, Rizvi M Fau - Agarwal M, Agarwal M. Acute lower respiratory tract infections in children. 20090626 DCOM- 20090902(0019-6061 (Print)). eng.
7. Williams BG, Gouws E, Boschi-Pinto C, Bryce J, Dye C. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2002;2(1):25-32.
8. Ramos, J. J. *infectología Clínica*. Editorial El Manual Moderno, México, 2008.
9. Secretaría de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-031-SSA2-1999, Para la atención a la salud del niño*. México, 1999.
10. Secretaria de salud. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. México. Instituto Nacional de Salud Pública.
11. *Disease Control Priorities in Developing Countries (Second Edition)*. Dean T. Jamison, Joel G. Breman, Anthony R. Measham, George Alleyne, Mariam Claeson, David B. Evans, Prabhat Jha, Anne Mills and Philip Musgrove. *Disease Control Priorities*. April 2006
12. Zoorob R, Sidani Ma Fau - Fremont RD, Fremont Rd Fau - Kihlberg C, Kihlberg C. Antibiotic use in acute upper respiratory tract infections. 20121101 DCOM- 20130212(1532-0650 (Electronic)). eng.
13. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *The New England journal of medicine*. 2008 Feb 14;358(7):716-27. PubMed PMID: 18272895. Pubmed Central PMCID: 2711392.
14. Niederman MS, Krilov LR. Acute lower respiratory infections in developing countries. *The Lancet*.381(9875):1341-2.
15. Ginocchio CC. Strengths and weaknesses of FDA-approved/cleared diagnostic devices for the molecular detection of respiratory pathogens. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011 May;52 Suppl 4:S312-25. PubMed PMID: 21460290.
16. Tregoning JS, Schwarze J. Respiratory viral infections in infants: causes, clinical symptoms, virology, and immunology. *Clinical microbiology reviews*. 2010 Jan;23(1):74-98. PubMed PMID: 20065326. Pubmed Central PMCID: 2806659.
17. Lu Y, Wang S, Zhang L, Xu C, Bian C, Wang Z, et al. Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infections in Jinan, China. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:210490. PubMed PMID: 24363757. Pubmed Central PMCID: 3865640.
18. Galindo-Fraga A, Ortiz-Hernandez Aa Fau - Ramirez-Venegas A, Ramirez-Venegas A Fau - Vazquez RV, Vazquez Rv Fau - Moreno-Espinosa S, Moreno-Espinosa S Fau - Llamosas-Gallardo B, Llamosas-Gallardo B Fau - Perez-Patrigeon S, et al. Clinical characteristics and outcomes of influenza and other influenza-like illnesses in Mexico City. 20130514 DCOM- 20131203(1878-3511 (Electronic)). eng.

19. van den Bergh MR, Biesbroek G, Rossen JW, de Steenhuisen Piters WA, Bosch AA, van Gils EJ, et al. Associations between pathogens in the upper respiratory tract of young children: interplay between viruses and bacteria. *PloS one*. 2012;7(10):e47711. PubMed PMID: 23082199. Pubmed Central PMCID: 3474735.
20. Rawlings BA, Higgins TS, Han JK. Bacterial pathogens in the nasopharynx, nasal cavity, and osteomeatal complex during wellness and viral infection. *American journal of rhinology & allergy*. 2013 Jan;27(1):39-42. PubMed PMID: 23406599. Pubmed Central PMCID: 3903101.
21. Mandell G, Dolin R, Bennett J, Mandell G, Bennett J. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*: Elsevier; 2009.
22. Rey CC, García MG, Flecha IC, Breña PP. Infecciones respiratorias virales.
23. Khor CS, Sam IC, Hooi PS, Quek KF, Chan YF. Epidemiology and seasonality of respiratory viral infections in hospitalized children in Kuala Lumpur, Malaysia: a retrospective study of 27 years. *BMC pediatrics*. 2012;12:32. PubMed PMID: 22429933. Pubmed Central PMCID: 3337250.
24. Yu X, Lu R, Wang Z, Zhu N, Wang W, Julian D, et al. Etiology and clinical characterization of respiratory virus infections in adult patients attending an emergency department in Beijing. *PloS one*. 2012;7(2):e32174. PubMed PMID: 22389685. Pubmed Central PMCID: 3289638.
25. Pavia AT. Viral infections of the lower respiratory tract: old viruses, new viruses, and the role of diagnosis. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011 May;52 Suppl 4:S284-9. PubMed PMID: 21460286. Pubmed Central PMCID: 3106235.
26. Nandí-Lozano E, Espinosa LE, Viñas-Flores L, Avila-Figueroa C. Infección respiratoria aguda en niños que acuden a un centro de desarrollo infantil. *Salud Pública de México*. 2002;44:201-6.
27. Bartlett JG. Diagnostic tests for agents of community-acquired pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2011 May;52 Suppl 4:S296-304. PubMed PMID: 21460288.
28. Kumar S, Wang L, Fan J, Kraft A, Bose ME, Tiwari S, et al. Detection of 11 common viral and bacterial pathogens causing community-acquired pneumonia or sepsis in asymptomatic patients by using a multiplex reverse transcription-PCR assay with manual (enzyme hybridization) or automated (electronic microarray) detection. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Sep;46(9):3063-72. PubMed PMID: 18650351. Pubmed Central PMCID: 2546717.
29. Ray CG, Ryan K. Sherris *Microbiología Médica una introducción a las enfermedades infecciosas*: Mc Graw-Hill; 2005.
30. Jawetz E. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg: El manual moderno*; 1992.
31. Leber AL. Pertussis: relevant species and diagnostic update. *Clinics in laboratory medicine*. 2014 Jun;34(2):237-55. PubMed PMID: 24856526.
32. DeVincenzo JP, Guyton C, Rea H, Elmore E, Patel S, Wynn L, et al. Molecular detection and quantification of pertussis and correlation with clinical outcomes in children. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013 May;76(1):10-5. PubMed PMID: 23490009.
33. Register KB, Sanden GN. Prevalence and sequence variants of IS481 in *Bordetella bronchiseptica*: implications for IS481-based detection of *Bordetella pertussis*. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Dec;44(12):4577-83. PubMed PMID: 17065269. Pubmed Central PMCID: 1698417.
34. Arbefeville S, Levi MH, Ferrieri P. Development of a multiplex real-time PCR assay for the detection of *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* in a single tube reaction. *Journal of microbiological methods*. 2014 Feb;97:15-9. PubMed PMID: 24333686.
35. Nikbin VS, Shahcheraghi F, Lotfi MN, Zahraei SM, Parzadeh M. Comparison of culture and real-time PCR for detection of *Bordetella pertussis* isolated from patients in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013 07//received 04//accepted;5(3):209-14. PubMed PMID: PMC3895556.
36. Tizolova A, Guiso N, Guillot S. Insertion sequences shared by *Bordetella* species and implications for the biological diagnosis of pertussis syndrome. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* :

official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2013 Jan;32(1):89-96. PubMed PMID: 22886091.

37. Pittet LF, Emonet S, Schrenzel J, Siegrist CA, Posfay-Barbe KM. *Bordetella holmesii*: an under-recognised *Bordetella* species. 20140522 DCOM- 20140716(1474-4457 (Electronic)). eng.

38. Tizolova A, Brun D, Guiso N, Guillot S. Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014 Apr;78(4):347-51. PubMed PMID: 24525142.

39. Galiza EP, Heath PT. Pertussis. *Medicine*.37(12):635-7.

40. Hardick J, Maldeis N Fau - Theodore M, Theodore M Fau - Wood BJ, Wood Bj Fau - Yang S, Yang S Fau - Lin S, Lin S Fau - Quinn T, et al. Real-time PCR for *Chlamydia pneumoniae* utilizing the Roche Lightcycler and a 16S rRNA gene target. 20040420 DCOM- 20041119(1525-1578 (Print)). eng.

41. Blasi F, Tarsia P Fau - Aliberti S, Aliberti S. *Chlamydophila pneumoniae*. 20090217 DCOM- 20090810(1469-0691 (Electronic)). eng.

42. Edvinsson M, Asplund MS, Hjelm E, Nystrom-Rosander C. *Chlamydophila pneumoniae* in chronic rhinosinusitis. *Acta oto-laryngologica*. 2006 Sep;126(9):952-7. PubMed PMID: 16864493.

43. Nordentoft S, Kabell S, Pedersen K. Real-time detection and identification of *Chlamydophila* species in veterinary specimens by using SYBR green-based PCR assays. *Applied and environmental microbiology*. 2011 Sep;77(18):6323-30. PubMed PMID: 21764961. Pubmed Central PMCID: 3187146.

44. Theodore MJ, Anderson RD, Wang X, Katz LS, Vuong JT, Bell ME, et al. Evaluation of new biomarker genes for differentiating *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *Journal of clinical microbiology*. 2012 Apr;50(4):1422-4. PubMed PMID: 22301020. Pubmed Central PMCID: 3318567.

45. Tian GZ, Zhang LJ, Wang XL, Zhang L, Li SF, Gu CM, et al. Rapid detection of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in nasopharyngeal swabs by multiplex PCR. *Biomedical and environmental sciences : BES*. 2012 Jun;25(3):367-71. PubMed PMID: 22840589.

46. García CM, Lozano P, Rivera JA, Giono S, Martínez Y, Rocha García RdC. Identificación y tipificación de *Haemophilus influenzae* mediante PCR múltiple 2008; (Journal, Electronic). Available from: http://conricyt1.summon.serialssolutions.com/2.0.0/link/0/eLvHCXMwfv3Na8lwFH9MYR-3fbLNDcLutjZJNT2Orp3COqR62kWyNLKOGYtawf1bu-3qP7akHyA7eAyBJLxH3vu9bwCCrU77n0xgWFAqPRdLhztMTHEvYRprUJK4WulKU_78PCKjmLxFrrYb62IXWiFYn3xteKHKyK6Y20X_Z3td5y3wpV0yy15TT1F78BS8jgfhwH_09c1Wlkwb0GC4AJXRSy2l3S4hVXmKSVew4yWaueKzHeUSnsJhhQrP4ECqczikqj3BQzLOtqppqRitz8KbdAqzXbWiUR9Lmfz7CP9ypcoLUeOfHOJipiQTTU09GM02_6WeYOX8BAGY7_fNq-YVL6byTCIO07RNMYgFXIFTTVX8hqQZ9quSw1evC6nTP8q7EjRdforicEZckNtPYcdLt3twUnZVaEcTTcQXO1yOU9HGv7Xlvmzcr5A2euiXA.

47. Adler B, Binks MJ, Temple B, Kirkham L-A, Wiertsema SP, Dunne EM, et al. Molecular Surveillance of True Nontypeable *Haemophilus influenzae*: An Evaluation of PCR Screening Assays. *PloS one*. 2012;7(3):e34083.

48. Alves MS, Dias RC, de Castro AC, Riley LW, Moreira BM. Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Oct;44(10):3640-6. PubMed PMID: 16928968. Pubmed Central PMCID: 1594763.

49. Chen Z, Liu M, Cui Y, Wang L, Zhang Y, Qiu J, et al. A novel PCR-based genotyping scheme for clinical *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*. 2014;9(1):21.

50. Kaczmarek FM, Dib-Hajj F, Shang W, Gootz TD. High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of bla(ACT-1) beta-lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006 Oct;50(10):3396-406. PubMed PMID: 17005822. Pubmed Central PMCID: 1610099.

51. Prince SE, Dominger KA, Cunha BA, Klein NC. *Klebsiella pneumoniae* pneumonia. *Heart & Lung: The Journal of Acute and Critical Care*.26(5):413-7.

52. Chander Y, Ramakrishnan M, Jindal N, Hanson K, Goyal SM. Differentiation of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*. 2011;9(2):138.
53. Jeong E-S, Lee K-S, HEO S-H, Seo J-H, Choi Y-K. Rapid Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Corynebacterium kutscheri*, and *Streptococcus pneumoniae* Using Triplex Polymerase Chain Reaction in Rodents. *Experimental animals*. 2013;62(1):35-40.
54. Heilbronn J, Wilson J, Berger BJ. Tyrosine aminotransferase catalyzes the final step of methionine recycling in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 1999;181(6):1739-47.
55. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(5):541-7.
56. Spagnolo AM, Orlando P, Panatto D, Perdelli F, Cristina ML. An overview of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology and control measures. *Reviews in Medical Microbiology*. 2014;25(1):7-14.
57. Reller LB, Weinstein MP, Murdoch DR. Diagnosis of *Legionella* infection. *Clinical infectious diseases*. 2003;36(1):64-9.
58. Ballard A, Fry N, Chan L, Surman S, Lee J, Harrison T, et al. Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(11):4215-8.
59. Reischl U, Linde H-J, Lehn N, Landt O, Barratt K, Wellinghausen N. Direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(10):3814-7.
60. Lindsay D, Abraham WH, Fallon RJ. Detection of *mip* gene by PCR for diagnosis of Legionnaires' disease. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(12):3068-9.
61. Raggam R, Leitner E, Mühlbauer G, Berg J, Stöcher M, Grisold A, et al. Qualitative detection of *Legionella* species in bronchoalveolar lavages and induced sputa by automated DNA extraction and real-time polymerase chain reaction. *Medical microbiology and immunology*. 2002;191(2):119-25.
62. de Vries SP, Bootsma HJ, Hays JP, Hermans PW. Molecular aspects of *Moraxella catarrhalis* pathogenesis. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2009;73(3):389-406.
63. Verduin CM, Hol C, Fleer A, van Dijk H, van Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(1):125-44.
64. Greiner O, Day PJ, Altwegg M, Nadal D. Quantitative detection of *Moraxella catarrhalis* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(4):1386-90.
65. Kwambana BA, Barer MR, Bottomley C, Adegbola RA, Antonio M. Early acquisition and high nasopharyngeal co-colonisation by *Streptococcus pneumoniae* and three respiratory pathogens amongst Gambian new-borns and infants. *BMC infectious diseases*. 2011;11(1):175.
66. Green E, Obi LC, Okoh AI, Nchabeleng M, De Villiers BE, Letsoalo T, et al. IS6110 Restriction fragment length polymorphism typing of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Northeast South Africa. *Journal of health, population, and nutrition*. 2013;31(1):1.
67. Fang Z, Morrison N, Watt B, Doig C, Forbes K. IS6110 transposition and evolutionary scenario of the direct repeat locus in a group of closely related *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of bacteriology*. 1998;180(8):2102-9.
68. Reyes A, Sandoval A, Cubillos-Ruiz A, Varley KE, Hernández-Neuta I, Samper S, et al. IS-seq: a novel high throughput survey of in vivo IS6110 transposition in multiple *Mycobacterium tuberculosis* genomes. *BMC genomics*. 2012;13(1):249.
69. Beggs ML, Eisenach KD, Cave MD. Mapping of IS6110 insertion sites in two epidemic strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(8):2923-8.
70. Githui WA, Wilson SM, Drobniowski FA. Specificity of IS6110-based DNA fingerprinting and diagnostic techniques for *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(4):1224-6.

71. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS microbiology reviews*. 2008;32(6):956-73.
72. Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control. *Journal of medical microbiology*. 2006;55(2):149-55.
73. Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(2):441-4.
74. Nilsson AC, Björkman P, Persson K. Polymerase chain reaction is superior to serology for the diagnosis of acute *Mycoplasma pneumoniae* infection and reveals a high rate of persistent infection. *BMC microbiology*. 2008;8(1):93.
75. Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(11):4915-23.
76. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI. Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2012;14(5):437-50.
77. Dumke R, Schurwanz N, Lenz M, Schuppler M, Lück C, Jacobs E. Sensitive detection of *Mycoplasma pneumoniae* in human respiratory tract samples by optimized real-time PCR approach. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(8):2726-30.
78. Gullsbj K, Storm M, Bondeson K. Simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(2):727-31.
79. Le Gall F, Le Berre R, Rosec S, Hardy J, Gouriou S, Boisramé-Gastrin S, et al. Proposal of a quantitative PCR-based protocol for an optimal *Pseudomonas aeruginosa* detection in patients with cystic fibrosis. *BMC microbiology*. 2013;13(1):143.
80. Cattoir V, Gilibert A, Le Glaunec J-M, Launay N, Bait-Mérabet L, Legrand P. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* from positive blood cultures by quantitative PCR. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2010;9(1):21.
81. Motoshima M, Yanagihara K, Fukushima K, Matsuda J, Sugahara K, Hirakata Y, et al. Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2007;58(1):53-8.
82. Anuj SN, Whiley DM, Kidd TJ, Bell SC, Wainwright CE, Nissen MD, et al. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;63(2):127-31.
83. Choi HJ, Kim MH, Cho MS, Kim BK, Kim JY, Kim C, et al. Improved PCR for identification of *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2013;97(8):3643-51.
84. Qin X, Emerson J, Stapp J, Stapp L, Abe P, Burns JL. Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(9):4312-7.
85. Foyosal MJ, Biswas GC, Raihan MJ. PCR based detection of *gyrB2* gene from *Pseudomonas* sp. affected human clinical isolates. *International Current Pharmaceutical Journal*. 2012;1(9):235-8.
86. Hamels S, Gala J, Dufour S, Vannuffel P, Zammattéo N, Remacle J. Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *Biotechniques*. 2001;31(6):1364-72.
87. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(7):1654-60.
88. Maria da Gloria SC, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(8):2460-6.

89. Picard FJ, Ke D, Boudreau DK, Boissinot M, Huletsky A, Richard D, et al. Use of tuf sequences for genus-specific PCR detection and phylogenetic analysis of 28 streptococcal species. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(8):3686-95.
90. Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, Szilagyi P, Staat MA, Iwane MK, et al. The underrecognized burden of influenza in young children. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(1):31-40.
91. America IDSo. An unmet medical need: rapid molecular diagnostics tests for respiratory tract infections. *Clinical Infectious Diseases*. 2011;52(suppl 4):S384-S95.
92. Tenover FC. Developing molecular amplification methods for rapid diagnosis of respiratory tract infections caused by bacterial pathogens. *Clinical infectious diseases*. 2011;52(suppl 4):S338-S45.
93. Murdoch DR. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Apmis*. 2004;112(11-12):713-27.
94. Guclu AU, Baysallar M, Gozen AG, Kilic A, Balkan A, Doganci L. Polymerase chain reaction vs. conventional culture in detection of bacterial pneumonia agents. *Annals of microbiology*. 2005;55(4):313.
95. Brunstein JD, Cline CL, McKinney S, Thomas E. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(1):97-102.
96. Dong J, Olano JP, McBride JW, Walker DH. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2008;10(3):185-97.
97. Mullis KB, Ferré F, Gibbs RA. *The polymerase chain reaction*: Birkhauser Boston Inc.; 1994.
98. Caliendo AM. Multiplex PCR and emerging technologies for the detection of respiratory pathogens. *Clinical infectious diseases*. 2011;52(suppl 4):S326-S30.
99. Nolte FS. Molecular diagnostics for detection of bacterial and viral pathogens in community-acquired pneumonia. *Clinical infectious diseases*. 2008;47(Supplement 3):S123-S6.
100. Villavicencio J. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real.
101. Poland D. Recursion relation generation of probability profiles for specific-sequence macromolecules with long-range correlations. *Biopolymers*. 1974;13(9):1859-71.
102. Steger G. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. *Nucleic acids research*. 1994;22(14):2760-8.