

Pasantía en One Health: Técnicas moleculares y genómica

Estudiante

Maria Antonia Blandón Tinoco

Director

Laura Silvana Pérez Restrepo

Co-Director

Fabián Gregorio Mejía Franco

Trabajo de Grado

En la modalidad de *Pasantía*

Programa de Biología

Universidad CES

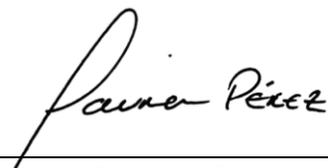
Medellín

2024

18 de octubre de 2024.

Se informa que el estudiante **Maria Antonia Blandón Tinoco** identificado con cédula: No. 1001371336 ha concluido de manera satisfactoria su trabajo de grado titulado “**Pasantía en One Health: Técnicas moleculares y genómica**” en la modalidad de *Pasantía*.

En calidad de **directores** del trabajo de grado en mención, y luego de haber revisado con detalle y alto rigor científico y académico el presente documento final, se aprueba este Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de **Bióloga**.



Laura Silvana Pérez Restrepo
Cédula: 1037572449
One Health



Fabián Gregorio Mejía Franco
Cédula: 71368781
Universidad CES

Resumen

Todos los organismos tienen una información genética específica, su estudio proporciona información valiosa sobre su desarrollo y sostenimiento, además de condiciones que éste pueda padecer. A la secuencia total de genes de un organismo particular se le denomina genoma. La mayoría de los genomas encontrados en la naturaleza están formados por ácido desoxirribonucleico (DNA), aunque algunos virus poseen un genoma codificado en moléculas de ácido ribonucleico (RNA). Ambas moléculas de ácidos nucleicos están conformadas de nucleótidos que, al ser polimerizados, se les suele denominar simplemente bases. La información biológica de este material genético se codifica en asociación al orden de estas bases, y el objetivo de base en la genómica es determinar las secuencias específicas de nucleótidos para cada genoma. La secuenciación de genomas es el proceso utilizado para la identificación del orden de nucleótidos en los genes de un organismo, siendo una herramienta básica para el análisis de nuevos componentes genéticos y su organización. Así mismo, proporciona herramientas predictivas para asociar o proponer en la mayor medida posible el conjunto de todas las proteínas que un organismo puede llegar a expresar. Dados los recientes avances en secuenciación de próxima generación y sus múltiples aplicaciones, fortalecer los conocimientos en esta área y desarrollar habilidades y destrezas es de relevancia en la formación de un biólogo con interés en las áreas moleculares. Para cumplir con el objetivo de fortalecer los conocimientos en el uso de técnicas moleculares para el análisis genómico, se realizó una pasantía de un semestre durante el periodo 2024-1 en el laboratorio de investigación y servicios genómicos One Health, de la universidad Nacional. Se asistió al laboratorio para aprender el proceso preciso de realización de diferentes tipos de técnicas de secuenciación de ácidos nucleicos y el análisis de los datos asociados a los mismos, con el uso de protocolos en prácticas como la preparación y verificación de librerías genéticas, por medio de electroforesis y PCR, así como el manejo de equipos de segunda y tercera generación en el marco de la actividad de secuenciación. Finalmente, con el desarrollo de la pasantía se fortaleció la formación como bióloga, se incorporó la experiencia de inmersión laboral y se desarrollaron habilidades en el análisis genómico y bioinformático, que permitieron adquirir conocimientos que impactan de manera positiva el avance de nuevos proyectos y estudios relacionados con el área.

Palabras clave: biología molecular, secuenciación de ácidos nucleicos, secuenciación de próxima generación

TABLA DE CONTENIDO

1. PRESENTACIÓN.....	6
2. RESEÑA DE LA INSTITUCIÓN	7
3. OBJETIVOS.....	8
3.1. OBJETIVO GENERAL.....	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. LOGROS ALCANZADOS	9
5. DIFICULTADES.....	10
6. RESULTADOS	11
6.1. TAMIZAJE DE MUESTRAS PARA <i>MANSONELLA</i> SPP	11
6.2. PREPARACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LIBRERÍAS	13
7. CONCLUSIONES	14
8. RECOMENDACIONES	14
9. ANEXOS	15
10. BIBLIOGRAFÍA	15

1. Presentación

El ADN o ácido desoxirribonucleico es una molécula que carga con la información genética necesaria para el crecimiento y el funcionamiento de un organismo (1). La molécula del ADN está compuesta por dos cadenas que se complementan. Éstas se enrollan entre sí y forman lo que llamamos una doble hélice. En la parte central del ADN encontramos una azúcar (desoxirribosa) acompañada de un fosfato, y unida a cada azúcar se encuentra una de cuatro bases nitrogenadas: citosina (C), adenina (A), guanina (G) o timina (T) (1). Las dos cadenas complementarias se unen por enlaces químicos entre las bases; enlaces de citosina con guanina y adenina con timina. La secuencia específica de las bases a través de la estructura del ADN codifica la información genética de un organismo cómo, por ejemplo, los pasos necesarios para sintetizar una proteína (1). El estudio completo del genoma se conoce como la genómica, que es el análisis de todos los genes que podemos encontrar en un organismo, diferenciándose de la genética que observa a los genes individualmente (2). La genómica estudia al genoma completo, se enfoca en toda la secuencia del espécimen para luego deducir y analizar a partir de lo encontrado. El estudio identifica y caracteriza todos los genes y componentes funcionales del genoma, además de la forma en la que éstos interactúan (2).

Para realizar el análisis y procesamiento del genoma surgieron las técnicas moleculares, que permiten la detección del material genético que genera los rasgos precisos de cada especie, así como sus alteraciones en la forma de deleciones, mutaciones y translocaciones, entre otras (3). En el estudio de la microbiología se usa para la detección de fragmentos de ácidos nucleicos que son particulares para cada organismo. Las técnicas moleculares surgen desde la necesidad de detectar microorganismos difíciles de cultivar en el laboratorio, que las técnicas serológicas de detección de anticuerpos y antígenos no revelaban por carencia de especificidad diagnóstica e insuficiencia de sensibilidad (3). Es así como han surgido técnicas moleculares fundamentadas en la biología molecular basadas en los diagnósticos tradicionales, buscando prevención, control y tratamiento de enfermedades.

Actualmente, estas técnicas son herramientas importantes en la asistencia en el diagnóstico de alta complejidad en las ciencias moleculares (3). Entre éstas podemos encontrar la PCR (reacción en cadena de la polimerasa), la electroforesis, entre otras (4). La PCR ha sido la herramienta principal para el diagnóstico dentro de la biología molecular, convirtiéndose en una técnica indispensable de análisis genómico (4). El rendimiento, la fidelidad y la especificidad de la PCR están directamente relacionados con los elementos que la componen; el régimen de ciclado, la mezcla de reacción y la ADN polimerasa empleada. Esta técnica hace posible la amplificación selectiva de cualquier fragmento de ADN, permitiendo el análisis de su secuencia de ADN precisa (4). Sus aplicaciones son ilimitadas y variables, como en estudios de detección de mutaciones, expresión genética, diagnóstico de diferentes tipos de enfermedades, entre otros (4). Dentro del laboratorio de genómica One Health se realizan una variedad de técnicas moleculares para el tamizaje previo de las muestras, principalmente la extracción de ADN con equipos especializados y su posterior procesamiento con PCR. En el laboratorio se usa la técnica de PCR especialmente para tamizaje de muestras. Este tamizaje se hace para encontrar muestras positivas a diferentes patógenos, para que más adelante sean secuenciadas.

Sabiendo que el interés en la secuenciación del ADN radica en encontrar el orden de las bases C, A, G y T dentro de un segmento de ADN, el método descrito por Sanger en 1977 (4) permitió la obtención de esta información y se convirtió en la práctica estándar del proceso. Con el tiempo, los avances en el método Sanger han dado pie al desarrollo de diferentes tipos de secuenciación, principalmente a la secuenciación masiva o de nueva generación (SPG) y técnicas basadas en secuenciación por síntesis. Estas técnicas permiten la exploración de genomas completos y la identificación de bases individuales o secuencias cortas localizadas en posiciones determinadas (4). Las técnicas de SPG han revolucionado el estudio de la genómica, posibilitando la secuenciación de muchos genomas en un tiempo reducido (5). Durante la pasantía en el laboratorio One Health se acompañó durante la preparación de librerías y en el manejo de equipos de secuenciación de última generación en donde se terminaba el procesamiento de las muestras. Finalmente, con el desarrollo de la pasantía se fortaleció la formación como bióloga, se incorporó la experiencia de inmersión laboral y se desarrollaron habilidades en el análisis genómico, permitiendo adquirir conocimientos que impactan de manera positiva el avance de nuevos proyectos y estudios relacionados con el área.

2. Reseña de la institución

El laboratorio genómico One Health surge en el 2018 de la alianza entre la Universidad Nacional de Colombia, la Universidad de Wisconsin-Madison y la Corporación Ruta N, con el objetivo de sumar esfuerzos dentro del contexto de la generación de innovación y conocimiento en la tecnología y la ciencia al servicio de la salud. El laboratorio se fundamenta en el concepto de una sola salud, en un enfoque múltiple integral de la salud desde distintas disciplinas como la medicina, las ciencias naturales y las ingenierías, entre otras. Apoyado en profesionales altamente capacitados, la innovación e investigación del laboratorio ahonda en aspectos biológicos, genéticos y de bioingeniería alrededor de patologías en salud animal, humana y del medio ambiente, un marcado énfasis en enfermedades infecciosas (6). En este contexto, cuenta con tecnología de vanguardia que le permite ahondar en investigaciones, principalmente relacionadas con la arbovirosis (zika, dengue, chikunguña) y virus respiratorios, abordando temas de detección y vigilancia epidemiológica.

Entre sus proyectos más destacados, en el 2020 hizo parte de un proyecto de regalías del ministerio de ciencias con el objetivo de adquirir equipos de última generación para la investigación aplicada y el desarrollo experimental, dirigido a la secuenciación genómica y el análisis bioinformático. Más adelante en el mismo, con el avance de la pandemia, como respuesta a la atención de la contingencia en Colombia, XM (operador del Sistema Interconectado Nacional y administrador del Mercado de Energía Mayorista) y Transelca (empresa de transmisión eléctrica), ambas relacionadas al Grupo ISA, apoyaron

económicamente la ejecución de brigadas médicas de diagnóstico y sensibilización en zonas aisladas del territorio colombiano, donde se encuentran generalmente las poblaciones en mayor condición de vulnerabilidad.

En la actualidad, el laboratorio está inmerso en una variedad de proyectos, incluyendo monitoreo y descubrimiento de virus en Colombia, caracterización epidemiológica de casos asociados a síndrome febril indiferenciado en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades por vectores, protocolos para el crecimiento de células de embrionarias, caracterización del panorama mutacional e identificación de biomarcadores de 4 tipos de cáncer de interés y presentes en Antioquia a través de secuenciación de próxima generación, entre otros. Se realizó la pasantía en el laboratorio para crecer en la formación como bióloga, rodeada de investigadores y profesionales en los campos de las ciencias moleculares.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Fortalecer los conocimientos en el uso y práctica de técnicas moleculares en el tamizaje de muestras para análisis genómicos con apoyo de investigadores especializados en el área, aprendiendo la importancia de las correctas prácticas en laboratorios de investigación.

3.2. Objetivos específicos

- Aprender las diferentes técnicas moleculares para la secuenciación del ADN, tales como: PCR, electroforesis, extracción de ADN con equipos especializados, y creación y purificación de librerías.
- Identificar los diferentes factores que influyen en el correcto tamizaje de muestras para la secuenciación de ADN.
- Adquirir destrezas académicas y profesionales con el apoyo de investigadores relacionados al estudio de genómica.
- Experimentar el trabajo de un biólogo dentro de áreas afines al trabajo con el tamizaje de muestras, manejo técnico del laboratorio y la secuenciación genómica.

4. Logros alcanzados

- Para el aprendizaje de los conocimientos respecto al trabajo dentro del laboratorio One Health se hizo una lectura constante de documentos, tales como: Reglamento interno de trabajo, Guía de integridad científica (declaración del personal), Planes de contingencia y Manual del laboratorio. Adicionalmente, la realización de los siguientes cursos para la capacitación en buenas prácticas en la plataforma The Global Health Network: Introduction to collecting and reporting adverse events in clinical research (7); Introduction to informed consent (8); GCLP: organization and personnel (9); GCLP: facilities, equipment, materials and reagents (10); GCLP: quality management (11), ICH good clinical practice e6 (r2) (12); GCLP: standard operating procedures & analytical plan (13); GCLP: method & systems validation (14); GCLP: sample management, conduct of the work, data recording, and data reporting; introduction to data management for clinical research studies (15); introduction to good clinical laboratory practice (16).
- Para la inmersión dentro del laboratorio One Health, se hizo primero una rotación en el área de esterilización, aprendiendo sobre la correcta limpieza de los diferentes espacios y equipos del laboratorio. También se asistió en la preparación de la autoclave y después de la esterilización en el empaque de los implementos esterilizados.
- Para el crecimiento en el conocimiento del funcionamiento de las diferentes ramas del laboratorio One Health se hizo rotación en el área de serología, acompañando en pruebas de antígenos/anticuerpos de HIV (virus de inmunodeficiencia humana), HBV (hepatitis B), HCV (hepatitis C) y CMV (citomegalovirus). Estas pruebas son realizadas en el equipo Architect Abbott (17) siguiendo la guía de este. En esta misma área se acompaña en el manejo del equipo m2000sp Abbott (18) que en conjunto con el m2000rt (18) permiten realizar una PCR automatizada. Todos los equipos mencionados necesitan un mantenimiento riguroso y deben de ser manejados solo por personas capacitadas.
- Para el aprendizaje en propagación de patógenos, se hizo una rotación en el área de cultivos celulares, se leen los siguientes protocolos: Procedimiento Mantenimiento de Cultivos Celulares - Células de Diversos Orígenes, Procedimiento Propagación Viral en Células de Mosquito, y Procedimiento Propagación Viral en Células de Mamífero. Se acompaña en la preparación de medios para cultivos (suero bovino), y en la incubación y revisión de cultivos células para la propagación de diversos patógenos como dengue, zika, chikunguña, influenza A, entre otros.
- Para la formación en el conocimiento de la secuenciación genómica, se hizo rotación en el área de secuenciación, se leen los siguientes protocolos: Protocolo Secuenciación con MinION Oxford Nanopore (19), MiSeq System: Denature and Dilute Libraries Guide (20), NexteraXT DNA Library Prep (21) y Secuenciación Exoma Completo (DNA prep with enrichment) (22). Se acompaña en disolución serial, haciendo uso de los equipos Nanodrop One (23) y Qubit (24) para la verificación de calidad y concentración de los extraídos. Adicionalmente, se acompaña en la creación y purificación de librerías, haciendo uso

del equipo TapeStation (25) que permite la realización de una electroforesis capilar para verificar el tamaño de los fragmentos de material genético. Así mismo, acompaña en el uso de los equipos MiSeq (26) y NextSeq 1000 (27) para la secuenciación.

- Para el aprendizaje sobre tamizaje de muestras previo a la secuenciación genómica, se fue asignado el proyecto Mansonella en donde se realizó el tamizaje de muestras para *mansonella* spp. Se hace lectura de los siguientes documentos: Estandarización y validación de una PCR en Tiempo Real para la identificación de *mansonella* spp., Estandarización y validación de una PCR en Tiempo Real para la identificación de *mansonella* spp., Estandarización y validación de LAMP para identificación de *mansonella* spp., High Prevalence of *mansonella perstans* Filariasisin Rural Senegal (28), Amplificación isotérmica mediada por LOOP (LAMP) de ácidos nucleicos en el diagnóstico clínico y Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *onchocerca volvulus*, *mansonella ozzardi* and *mansonella perstans* in the Amazon Region (29). Después de una orientación se procedió a ejecutar el tamizaje de las muestras siguiendo los protocolos indicados, realizando resuspensión, extracción y PCR con el objetivo de encontrar muestras positivas a *mansonella* spp.
- Para la formación dentro del área de investigación, se asistió semanalmente a reuniones de investigación del laboratorio One Health, donde se trataron temas como análisis de enfermedades transmitidas por vectores en Amazonas, síndrome febril en diferentes localidades colombianas, panorama mutacional de 50 genes en Antioquia, microbiota de una comunidad del Amazonas en proceso de urbanización, entre otros.
- Para la inmersión dentro del trabajo de un biólogo en un laboratorio de genómica, se hizo una rotación en el área de inventario y biobanco. Organización correcta de reactivos y registro de ellos en bases de datos. Complementariamente se hizo una consignación en las bases de datos del biobanco la organización actualizada de las muestras de dos congeladores.

5. Dificultades

Durante la pasantía se tuvieron varios obstáculos, a continuación, se mencionan algunos de ellos:

- En una primera instancia cuando se comenzó el aporte al proyecto Mansonella, en una de las primeras extracciones que se realizó, no se tuvo un buen manejo de la gradilla al momento de mover las muestras para ser ingresadas al equipo, resultando en pequeñas salpicaduras entre las muestras. Las muestras fueron procesadas de todas maneras, al momento de tener los resultados finales todas salieron positivas para *mansonella* spp., se supuso que fue debido a las salpicaduras, fueron repetidas y se obtuvieron los resultados esperados.
- Se realizó una PCR que no dio resultados conclusivos, se supone que fue una contaminación de las muestras por las perlas magnéticas usadas en la extracción de

ácidos nucleicos, aunque también puedo ser un exceso de sonda en los extraídos. Esta se repitió y se obtuvieron los resultados esperados.

Ambas experiencias fueron enriquecedoras, es muy importante experimentar también los obstáculos que pueden aparecer dentro de la aplicación de técnicas moleculares, fue un impulso a buscar más detalladamente cuales son las razones por las cuales un procedimiento no sale como lo esperado.

6. Resultados

Durante la pasantía se desarrollaron diferentes habilidades importantes en la formación como bióloga. Comenzando con la asistencia al laboratorio en cumplimiento de horarios, se aprendió sobre buenas prácticas como el uso de bata, tapabocas y guantes. Se implementó el uso de cronogramas de trabajo con cabinas y equipos para tener tanto un orden en el cuidado de los espacios como un registro de reactivos y materiales fungibles. También, si hablamos de manejo de muestras, se aprendió su almacenamiento y desecho, recalcando mucho las condiciones óptimas de bioseguridad, ya que se trabajaba principalmente con muestras de sangre total. Adicionalmente se aprendió también sobre la buena convivencia y comunicación dentro del laboratorio, la asertividad en la reservación de espacios y la correcta anotación de todos los procedimientos en el diario de laboratorio, esto para permitir que más adelante cualquiera pueda leer los procedimientos y replicarlos o analizar los resultados consignados.

El aprendizaje más importante fue aplicar orden para lograr la eficiencia en procesamiento de muestras, saber dónde se almacenan las muestras para evitar pérdidas, anotar en el diario de laboratorio que muestras en específico se deben repetir por fallos en la extracción o en la PCR, mantener un orden para seguir en un paso seguro con el procesamiento de las muestras. Ser conscientes de los implementos necesarios para todos los procedimientos y dejarlos listos antes de comenzar la práctica para no estar moviéndose entre espacios y así evitar la contaminación por diferentes factores. Finalmente, se desarrollaron habilidades como la agilidad y la efectividad en el momento manipular muestras y reactivos durante la ejecución de procedimientos para hacer de todos los procesos algo más fluido.

6.1. Tamizaje de muestras para *mansonella* spp.

El tamizaje de muestras tiene un papel primordial en identificar factores de riesgo, además de establecer la presencia o ausencia de enfermedades en individuos enfermos. La detección de *mansonella* spp. (parasito) es fundamental en el control de infecciones, esta enfermedad es transmitidas por vectores (mosquitos culicoides) y afecta a comunidades en regiones tropicales. Las muestras de sangre total que fueron usadas son procedentes del proyecto “Caracterización epidemiológica de casos asociados a síndrome febril indiferenciado en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades transmitidas por vectores”, recolectadas en cuatro localidades: Leticia, Villavicencio, Apartadó y Acacias.

Para obtener los resultados se siguió la siguiente metodología: siguiendo protocolos previamente validados, las muestras seleccionadas fueron resuspendidas en PBS (buffer salino fosfato) al 1%, luego se llevó a cabo la extracción de material genético, haciendo uso del equipo King Fisher de extracción automatizada de ácidos nucleicos y el kit MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation (30), siguiendo el protocolo de “Extracción Automatizada De Ácidos Nucleicos KingFisher”. Después de realizar la extracción se crearon pools de 3 a 6 extraídos, de los cuales se tomó un volumen de 10 µL teniendo un volumen final de entre 30-60 µL. Estos pools fueron evaluados por PCR en tiempo real para determinar la presencia de *mansonella* spp. Se individualizaron aquellos pools con resultados positivos y se sometieron a otra PCR en tiempo real para identificar cuáles muestras, dentro de cada pool, eran positivas. Los controles positivos usados fueron muestras que habían sido procesadas anteriormente por microscopía electrónica, también se verificaron por PCR en tiempo real antes de comenzar el tamizaje.

El 13 de febrero del 2024 se inició el procesamiento de muestras y el 23 de mayo 2024 se realizó la última PCR en tiempo real. Se analizó un total de 1964 muestras (Tabla 1), seleccionadas aleatoriamente entre las cuatro localidades de Colombia participantes: Villavicencio, Leticia, Apartadó y Acacias. Todas las muestras resuspendidas fueron extraídas exitosamente, un solo pool no se pudo procesar debido a falta de reactivos. Todas las muestras positivas vienen de la localidad de Leticia (Tabla 2), este es un resultado esperado dada la prevalencia de *mansonella* spp. en la región amazónica. Esta región tiene condiciones ecológicas y ambientales que favorecen la transmisión de la Mansonella, como la presencia de vectores particulares que facilitan la propagación de esta enfermedad. Analizando los valores de CT (ciclo umbral) podemos encontrar más información acerca de la carga parasitaria de las muestras. En su mayoría las muestras presentaron valores por debajo de 36, lo que indica que tienen una carga parasitaria alta, solo se tiene una muestra con un CT por encima de 38, con una carga parasitaria más baja.

Tabla 1. Muestras y pools procesados para *mansonella* spp.

Localidad	Muestras resuspendidas	Muestras extraídas	Pools procesados	Pools sin procesar	Pools positivos
Villavicencio	579	579	122	1	0
Leticia	519	519	116	0	8
Apartadó	482	482	98	0	0
Acacias	384	384	86	0	0
Total	1964	1964	422	1	8

Tabla 2. Muestras positivas para *mansonella* spp. con su respectivo CT (ciclo umbral).

Muestras positivas	CT
LET-0029	34,01
LET-0031	38,28
LET-0039	26,75
LET-0044	29,84
LET-1355	33,58
LET-1370	33,82
LET-1435	35,90
LET-1769	36,84
LET-1785	35,67

6.2. Preparación y purificación de librerías

Se estuvo presente también en la realización del proyecto “Caracterización del panorama mutacional e identificación de biomarcadores de 4 tipos de cáncer de interés y presentes en Antioquia a través de secuenciación de nueva generación”. Se acompañó durante la extracción por medio de columnas, de muestras en fresco y embebidas en parafina, de pacientes con cáncer. En este estudio se tomaron los cuatro tipos de cánceres más prevalentes en Antioquia: mama, colon, próstata y ovario.

Durante esta práctica se aprendió principalmente sobre disoluciones, haciendo uso del equipo Qubit (24) para la verificación de concentraciones. Se hacían anotaciones en el diario del laboratorio y se iban haciendo ajustes a medida que se hacían las disoluciones. Cuando ya se obtenían las concentraciones esperadas se hacía una verificación en el equipo TapeStation (25) de electroforesis capilar, para verificar la longitud de los fragmentos.

En el proceso de purificación de librerías, después de hacer la extracción de ADN de los tejidos haciendo uso de columnas de sílice, se purificaban los extraídos haciendo una serie de lavados con alcohol después de adherir el ADN a perlas magnéticas, todo se hizo siguiendo los protocolos de Illumina: Denature and Dilute Libraries Guide (20) y Nextera XT DNA Library Prep (21). Después de terminar las librerías éstas se pasaban directamente a ser puestas en la celda y luego ingresadas al secuenciador. Todo esto hizo parte del proceso introductorio formativo del laboratorio.

7. Conclusiones

Dentro de las áreas por las que se rotó dentro del laboratorio One Health se aprendió sobre las diferentes técnicas moleculares que conlleva la secuenciación. Desde la importancia de la esterilización y cuidado de equipos hasta la extracción y secuenciación de las muestras, todas las destrezas y conocimientos adquiridos vienen transversales a unas correctas prácticas de laboratorio. Se hizo una lectura constante de artículos y protocolos para poder ejecutar adecuadamente los objetivos buscados, principalmente dentro del tamizaje de muestras del proyecto Mansonella y en la rotación por el área de secuenciación con el proyecto de cáncer.

Hablando de los resultados adquiridos dentro del proyecto Mansonella, todo lo obtenido fue concordante con lo leído en artículos y con lo esperado, sabiendo la prevalencia de la enfermedad en Brasil. Las muestras positivas a *mansonella* spp. serán secuenciadas para aprender más respecto a esta enfermedad, permitiendo un avance en su estudio y tratamiento, así mismo abriendo puertas a la posibilidad de la generación de pruebas rápidas para su fácil diagnóstico. Además, la secuenciación de las muestras, tanto del proyecto Mansonella como del proyecto de cáncer, es sumamente importante para su correcto análisis, ya que brinda información esencial para comprender su funcionamiento y consecuentemente su tratamiento.

El trabajo que está realizando laboratorio One Health es de gran importancia para los diferentes avances en tratamiento y estudio de patógenos, enfermedades febriles y condiciones variadas tanto en humanos como en animales. Se debe seguir indagando en el ámbito molecular de la biología para resolver incógnitas y seguir creciendo en investigación.

8. Recomendaciones

Durante la pasantía se aprendió sobre la gran importancia de las buenas prácticas de laboratorio, se aconseja una profunda lectura al manual del laboratorio además de escuchar y aprender de los consejos que brindan los profesionales que allí trabajan, como por ejemplo, organizar todos los materiales necesarios antes de comenzar cualquier proceso, limpiar los espacios antes y después de usarlos para prevenir contaminación, anotar constantemente el progreso en el diario de laboratorio para no perder ninguna anotación importante sobre las muestras, entre otras cosas. Principalmente, mantener un orden dentro de los procesos que se van a realizar y tener seguridad de lo que se va a ejecutar, estudiar con prioridad los procesos.

También es importante que al momento de comenzar la pasantía se sea claro con lo que se quiere hacer, no ser ambiguos al momento de comentar los intereses propios sino ser concisos y específicos respecto a lo que se quiere. El laboratorio tiene muchas áreas y hay muchos ámbitos en los que se puede profundizar, es recomendable centrarse en solo uno de ellos y enfocarse en aprender con claridad todo lo relacionado a esa área.

Se aconseja disponer de tiempo para realizar la pasantía, no solo para ejecutar la práctica sino también para estudiar y leer diferentes artículos y libros sobre los temas de interés. Da más facilidad en el aprendizaje guiarse por lo que se aprende dentro del laboratorio y adicionalmente enriquecerse con lecturas y consultas por fuera del laboratorio.

9. Anexos

Informe de progreso investigación: Caracterización epidemiológica de casos asociados a síndrome febril indiferenciado en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades transmitidas por vectores. Informe de avance del proyecto Mansonella, junio 2024.



INFORME DE PROGRESO INVESTIGACIÓN

TÍTULO INVESTIGACIÓN: Caracterización epidemiológica de casos asociados a síndrome febril indiferenciado en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades transmitidas por vectores.

FECHA DE PRESENTACIÓN INFORME: 05/2024

ELABORADO POR: Vanessa María Arciniegas Garzón, María Antonia Blandón Tinoco

RESPONSABLE: Laboratorio Genómico One Health. Colombia- Wisconsin One- Health (CCWOH)

INFORMACIÓN DE CONTACTO: Calle 75 # 79a-51 Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Facultad de minas, Bloque M15 Oficina 100-3. Teléfono: 4255000 ext. 44137. Correo Electrónico: coord_cwohc@unal.edu.co – coord_cwohc@unal.edu.co

CONTENIDO DEL INFORME

1. Introducción:

Las pruebas de diagnóstico de tamizaje desempeñan un papel fundamental al identificar factores de riesgo o establecer la presencia o ausencia de enfermedades en individuos enfermos sintomáticos. En este contexto, el tamizaje de muestras para la detección de *Mansonella spp* es crucial en la vigilancia epidemiológica y el control de infecciones transmitidas por Culicoides, conocidos por ser vectores de diversas enfermedades y parásitos, incluida la mencionada anteriormente. Esta enfermedad, que afecta a personas en regiones tropicales y subtropicales, requiere una atención para la detección temprana y un control efectivo.

Este informe tiene la finalidad de informar los progresos y resultados alcanzados hasta la fecha en cuanto al procesamiento y tamizaje de muestras para *Mansonella spp*. Las muestras seleccionadas de sangre total son procedentes del proyecto “**Caracterización epidemiológica de casos asociados a síndrome febril indiferenciado en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades transmitidas por vectores**”, adquiridas de cuatro localidades: Leticia, Villavicencio, Apartadó y Acacias.

2. Metodología:

Se procesaron muestras de sangre total de pacientes febriles, siguiendo protocolos previamente validados. Las muestras seleccionadas fueron resuspendidas en PBS al 1%, posteriormente se llevó a cabo la extracción de material genético, haciendo uso del equipo King Fisher de extracción automatizada de ácidos nucleicos y el kit MagMAXTM Viral/Pathogen Nucleid Acid Isolation, siguiendo el protocolo de “Extracción Automatizada De Ácidos Nucleicos KingFisher”.

Se crearon pools de 3 a 6 muestras extraídas, de las cuales se tomó un volumen de 10 µl obteniendo así un volumen final de entre 30-60 µl. Estos pools serían evaluados por PCR en tiempo real para determinar la presencia de *Mansonella spp*. Se individualizó a aquellos pools con resultados positivos y se sometieron a otra PCR en tiempo real para identificar cuáles muestras, dentro de cada pool, eran positivas.

Los controles positivos usados fueron las muestras AMF-118, AMF-131 y AMF-95, que habían sido procesados anteriormente por microscopía electrónica, también se verificaron por PCR en tiempo real antes de comenzar el tamizaje.

3. Avances del estudio:

- **Objetivo:** Realizar el tamizaje de muestras de pacientes febriles para la detección de *Mansonella spp*. en sangre total.

El 13 de febrero del 2024 comenzó con el procesamiento de las muestras y el 23 de mayo 2024 se realizó

la última PCR en tiempo real. Se analizaron 1964 muestras, seleccionadas aleatoriamente entre las cuatro localidades participantes: Acacias, Apartadó, Leticia y Villavicencio. Los datos se presentan en **Tabla 1**.

Localidad	Villavicencio	Leticia	Apartadó	Acacias	Total
Muestras resuspendidas	579	519	482	384	1964
Muestras extraídas	579	519	482	384	1964

Tabla 1. Muestras procesadas

De las muestras extraídas con éxito, se crearon pools siguiendo la metodología establecida, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 2**.

Localidad	Villavicencio	Leticia	Apartadó	Acacias	Total
Pools procesados	122	116	98	86	422
Pools sin procesar	1	0	0	0	1
Pools positivos	0	8	0	0	8

Tabla 2. Pools procesados

Después de crear los pools, estos fueron analizados mediante PCR en tiempo real, obteniendo los valores de CT que se encuentran en la **Tabla 3**

Código del Pool	Valor CT
SL-065	32,69
SL-066	37,29
SL-100	38,64
SL-103	38,46
SL-138	37,88
SL-164	33,89
SL-169	36,79

Tabla 3. Pools positivos y valor CT

Los pools positivos se individualizaron para identificar las muestras positivas específicas. A continuación, cuyos resultados se presentan en la **Tabla 4**.

Código de muestra	Valor CT
LET-0029	34,01
LET-0031	38,28
LET-0039	26,75
LET-0044	29,84
LET-1355	33,58
LET-1370	33,82
LET-1435	35,90
LET-1769	36,84

LET-1785	35,67
----------	-------

Tabla 4. Muestras individualizadas

En resumen, de las 1964 muestras procesadas se obtuvo un total de nueve (9) muestras positivas, todas provenientes de la localidad de Leticia, como se muestra en la **Tabla 5**.

Localidad	Villavicencio	Leticia	Apartadó	Acacias	Total
Muestras positivas	0	9	0	0	9

Tabla 5. Muestras positivas para *Mansonella* spp.

4. Análisis de datos

Todas las muestras positivas provienen de la localidad de Leticia, lo cual es un resultado esperado, dada la prevalencia de *Mansonella* spp en la región de la Amazonia. Esta región es conocida por tener condiciones ambientales y ecológicas favorables para la transmisión de *Mansonella* spp., incluyendo la presencia de vectores específicos como ciertos tipos de mosquitos que facilitan la propagación de esta parasitosis. El análisis de los valores CT (ciclo umbral) proporciona información adicional sobre la carga parasitaria presente en las muestras. La mayoría de las muestras positivas presentaron valores de CT por debajo de 36, lo que sugiere relativamente una alta carga parasitaria, y solo una muestra con un valor por encima de 38, lo que indica una carga parasitaria mucho menor.

Por último, se puede evidenciar claramente las diferencias geográficas y epidemiológicas en la distribución de *Mansonella* spp. ya que el hecho de no haber encontrado muestras positivas en las demás localidades refleja lo anterior.

5. Observaciones

- Se realizó una PCR que no dio resultados conclusivos, se supone una contaminación de las muestras por las perlas magnéticas usadas en la extracción de ácidos nucleicos, aunque también podría ser un exceso de sonda en los extraídos. Esta se repitió y se obtuvieron los resultados esperados.
- Con el procesamiento de estas muestras se dan por agotados los reactivos de extracción y PCR proporcionados para el estudio, por lo tanto, no se pudo continuar con el tamizaje de muestras. En este informe se consigna el procesamiento de 1964 muestras, que no incluyen las procesadas anteriormente.

Fin del informe

10. Bibliografía

1. National Human Genome Research Institute. Ácido desoxirribonucleico (ADN) [Internet]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/%C3%81cido-desoxirribonucleico>
2. National Human Genome Research Institute. Genómica [Internet]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Genomica>
3. Stamboulian D. Técnicas moleculares de Microbiología en la práctica diaria Revista Bioanálisis. 2006;
4. Merchán MA, Caicedo MIT, Torres AKD. Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. Rev Habanera Cienc Médicas. 3 de octubre de 2017;16(5):796-807.
5. Aguilar-Bultet L, Falquet L. Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. Rev Salud Anim. agosto de 2015;37(2):125-32.
6. Universidad Nacional de Colombia. Dirección de Laboratorios - DIRLAB - Laboratorio Genómico One Health [Internet]. Disponible en: <https://direcciondelaboratorios.medellin.unal.edu.co/index.php/nuestros-%20laboratorios/facultad-de-minas/162#>
7. Logan M, Wandiga S, Burke A. Introduction to Collecting and Reporting Adverse Events • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/introduction-collecting-and-reporting-adverse-events/>
8. Logan M, Wandiga S, Burke A. Introduction to Informed Consent • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/introduction-informed-consent/>
9. Africa C, Boggs L, Chetty P, Coler R, Demarest H, Gelderbloem S, et al. GCLP: Organisation and Personnel • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice-course/gclp-facilities-equipment-materials-reagents/>
10. Africa C, Boggs L, Chetty P, Coler R, Demarest H, Gelderbloem S, et al. GCLP: Facilities, Equipment, Materials & Reagents • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice-course/gclp-organisation-and-personnel/>
11. Conraide A, Dell H, Demarest H, Rutkowski K, Boggs L, Vahedi M, et al. GCLP: Quality Management • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice-course/quality-management/>
12. Logan M, Boggs L, Whelan L, Baka F, Wandiga S, Burke A. ICH Good Clinical Practice E6 (R2) • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/ich-good-clinical-practice/>
13. Aderiye M, Africa C, Boggs L, Chetty P, Coler R, Day T, et al. GCLP: Standard Operating Procedures & Analytical Plan • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice-course/gclp-standard-operating-procedures-analytical-plan/>
14. Aderiye M, Africa C, Boggs L, Chetty P, Coler R, Day T, et al. GCLP: Method and Systems Validation [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice-course/gclp-method-and-systems-validation/>

15. Conraide A, Dell H, Demarest H, Rutkowski K, Boggs L, Vahedi M, et al. GCLP: Sample Management, Conduct of The Work, Data Recording, and Data Reporting • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice-course/gclp-sample-management-conduct-work-data-recording-and-data-reporting/>
16. Africa C, Boggs L, Chetty P, Coler R, Engelrecht A, Gelderbloem S, et al. Introduction to Good Clinical Laboratory Practice • Global Health Training Centre [Internet]. Disponible en: <https://globalhealthtrainingcentre.tghn.org/good-clinical-laboratory-practice/>
17. Abbott. Descripción general de ARCHITECT | Core Laboratory at Abbott [Internet]. Disponible en: <https://www.corelaboratory.abbott/int/es/offeriSPG/brands/architect.html>
18. Abbott. m2000 RealTime System | Abbott Molecular [Internet]. Disponible en: <https://www.molecular.abbott/us/en/products/instrumentation/m2000-realttime-system>
19. Oxford Nanopore Technologies. MinION portable nanopore sequencing device | Oxford Nanopore Technologies [Internet]. Disponible en: <https://nanoporetech.com/es/products/sequence/minion>
20. Illumina. Denature and Dilute Libraries for the MiSeq system [Internet]. Disponible en: https://support-docs.illumina.com/IN/MiSeq_DnD/Content/MiSeq/DnD-MiSeq.htm?protocol=standard
21. Illumina. Nextera DNA Library Prep Reference Guide. Disponible en: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nextera_dna/nextera-dna-library-prep-reference-guide-15027987-01.pdf
22. Illumina. Illumina DNA Prep with Enrichment [Internet]. Disponible en: https://support-docs.illumina.com/LP/IlluminaDNAPrepEnrich/Content/LP/Illumina_DNA/Enrichment/Protocol.htm
23. ThermoFisher Scientific. NanoDrop™ One/One^c Microvolume UV-Vis Spectrophotometer [Internet]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-ONE-W>
24. ThermoFisher Scientific. Qubit Fluorometric Quantification - CO [Internet]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/ht/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit.html>
25. Agilent. TapeStation Automated Electrophoresis for DNA & RNA Quality Control | Agilent [Internet]. Disponible en: <https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/tapestation-systems>
26. Illumina. MiSeq System | Rapid and cost-effective sequencing [Internet]. Disponible en: <https://www.illumina.com/systems/sequencing-platforms/miseq.html>
27. Illumina. NextSeq 1000 & NextSeq 2000 Systems | Flexible, versatile sequencing [Internet]. Disponible en: https://emea.illumina.com/systems/sequencing-platforms/nextseq-1000-2000.html?gad_source=1&gclid=Cj0KCQjw7Py4BhCbARIsAMMx-_Lh6SOBT8DzaObw3kPxsZ5hYEMs-1mcP9SDmo6R7tJXGxV5Xv9YaT8aAvaREALw_wcB
28. Bassene H, Sambou M, Fenollar F, Clarke S, Djiba S, Mourembou G, et al. High Prevalence of Mansonella perstans Filariasis in Rural Senegal. *Am J Trop Med Hyg.* 2 de septiembre de 2015;93(3):601.
29. Tang THT, López-Vélez R, Lanza M, Shelley AJ, Rubio JM, Luz SLB. Nested PCR to detect and distinguish the sympatric filarial species *Onchocerca volvulus*, *Mansonella ozzardi* and *Mansonella perstans* in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* septiembre de 2010;105(6):823-8.
30. MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit [Internet]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A42352?gclid=Cj0KCQjw1Yy5BhD->

ARIsAIORbXY_ppunzN4Qua2RkiCbklX2mx_4ZYJYKVv43eZKuWSAWe14bmNHQqMaAti2EALw_wcB&ef_id=Cj0KCCQjw1Yy5BhD-

ARIsAIORbXY_ppunzN4Qua2RkiCbklX2mx_4ZYJYKVv43eZKuWSAWe14bmNHQqMaAti2EALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!606641595287!!!g!!!16893189578!135494422782&cid=bid_sap_cdx_r01_co_cp1362_pjt0000_bid00000_0se_gaw_dy_awa_con&gad_source=1