



## Servicio de Caracterización molecular de microbioma en muestras de agua.

### Nombre Genérico

Caracterización de Microbioma

### Certificación

Certificación por ente Secuenciador de Ácidos Nucleicos

### Descripción General

La caracterización de microbioma consiste en un ensayo cuantitativo seguido por un análisis bioinformático que permite identificar y contabilizar las especies bacterianas presentes en una muestra. Este ensayo detecta y contabiliza todos los microorganismos que poseen el operón 16S de ARN ribosomal como parte de su estructura genómica. Este operón consta de aproximadamente ~1,500 pares de bases que deben ser secuenciadas por lo menos en un 90%. A partir del proceso técnico, los datos son analizados con algoritmos bioinformáticos. La interpretación de estos resultados se basa en la descripción del microbioma secuenciado a nivel taxonómico, e identificación, cuantificación y seguimiento de individuos bacterianos de interés.

### Motivación de Ensayo

El ensayo debe realizarse en reservorios de agua con el objetivo de caracterizar su carga y diversidad microbiana. De esta manera identificar bacterias patógenas y persistentes que puedan tener un efecto nocivo en la salud humana y ambiental.

### Descripción Técnica

El ensayo es un proceso de secuenciación completo conformado por 5 fases: inicialmente consiste en la preparación de muestra (1), extracción de ácidos nucleicos (2), preparación de librería y generación de lecturas (3), análisis bioinformáticos (4), reporte de resultados genómicos (5). Cada punto será descrito a continuación:

- (1) Obtener una matriz donde la muestra esté debidamente presentada. En caso de microbioma acuático, los individuos de la comunidad deben ser agrupados mediante técnicas de filtrado de agua por membranas. Una disolución de amortiguador TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA y al pH de 8) y los organismos aislados debe rendir una turbidez de al menos 2 McFarland.
- (2) El proceso de extracción de ácidos nucleicos de las comunidades filtradas consiste en el aislamiento del material genético de los organismos presentes en la muestra. La extracción debe proveer ADN de alta calidad y peso molecular. Este debe ser de al menos 20 ng/ $\mu$ L con una razón 260/280 mayor a 1.8.
- (3) La preparación de librerías y generación de lecturas debe consistir en fragmentos del gen 16S rRNA con una distribución media de longitud n50 de al menos 1,300 bases. Esto garantizaría la reconstrucción del microbioma en fases posteriores de análisis. La producción de datos crudos no debe ser menor a las 18,000,000 bases por cada muestra para garantizar la mayor cobertura de datos posibles. Estos parámetros pueden ser modificados con soporte experimental y análisis de rarefacción.
- (4) La tubería de datos bioinformático que deberá ser corrida debe proveer respuestas a la biodiversidad en comparación con muestras de línea base que serán proporcionadas, la abundancia relativa y absoluta de cada organismo, en especial aquellos de interés de monitoreo.
- (5) El reporte debe comprender parámetros de calidad de datos genómicos como distribución de calidad de lecturas generadas (si aplica), total de lecturas generadas por experimento y el informe bioinformático con todos los parámetros mencionados previamente. Estos datos deben estar acompañados de los metadatos suministrados por muestra, y estar presentados de forma pertinente dentro del reporte.
- (6) Los reportes de resultados deben estar debidamente presentados mediante una plataforma web de alta disponibilidad. Esta plataforma web debe permitir el monitoreo geográfico de los análisis de microbioma, al igual que herramientas para el análisis de sus fluctuaciones, y estar abierto para incorporar otros tipos de análisis que puedan ser requeridos por el laboratorio a partir de esos mismos datos generados. La plataforma debe estar habilitada para uso del personal solicitante.

### **Resultados Esperados**

Estos ensayos deben ser concluidos con la entrega de un reporte que indique: la diversidad microbiana en cada muestra con respecto a la línea base proporcionada, la distribución de microorganismos de la muestra, los organismos con capacidad patogénica para los seres humanos, al igual que aquellos organismos persistentes, es decir, que pueden desarrollar resistencia a agentes desinfectantes.

### Entrega de Resultado

El tiempo de entrega de resultados por muestra no debe ser mayor a los 20 días laborables.

### Competencia Técnica y Analítica

El ensayo debe estar certificado por una entidad especializada de procesos de secuenciación.

### Entrega de Muestras

Inapa entregará las muestras en Frascos previamente esterilizados de 1 litro de capacidad. El proveedor se compromete a la devolución de dichos frascos. Entrega de la muestra posterior a la recolección de 24h a 72h a una temperatura de 4 grados Celsius. Hasta una semana en temperatura de -8 a -20 grados Celsius.

### Tiempo de Servicio:

El oferente adjudicado entregara resultado por muestra en un plazo no más de veinte (20) días a partir de su recepción.

  
D/O. Emilio J. Figueroa M.

Firma de Encargado de Laboratorio

### Bibliografía y Referencias

1. Tsou, A. M., Olesen, S. W., Alm, E. J., & Snapper, S. B. (2020). 16S rRNA sequencing analysis: the devil is in the details. *Gut Microbes*, *11*(5), 1139–1142. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1747336>
2. Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)02724-0)
3. Rodríguez-Pérez, H., Ciuffreda, L., & Flores, C. (2021). NanoCLUST: a species-level analysis of 16S rRNA nanopore sequencing data. *Bioinformatics*, *37*(11), 1600–1601. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa900>

