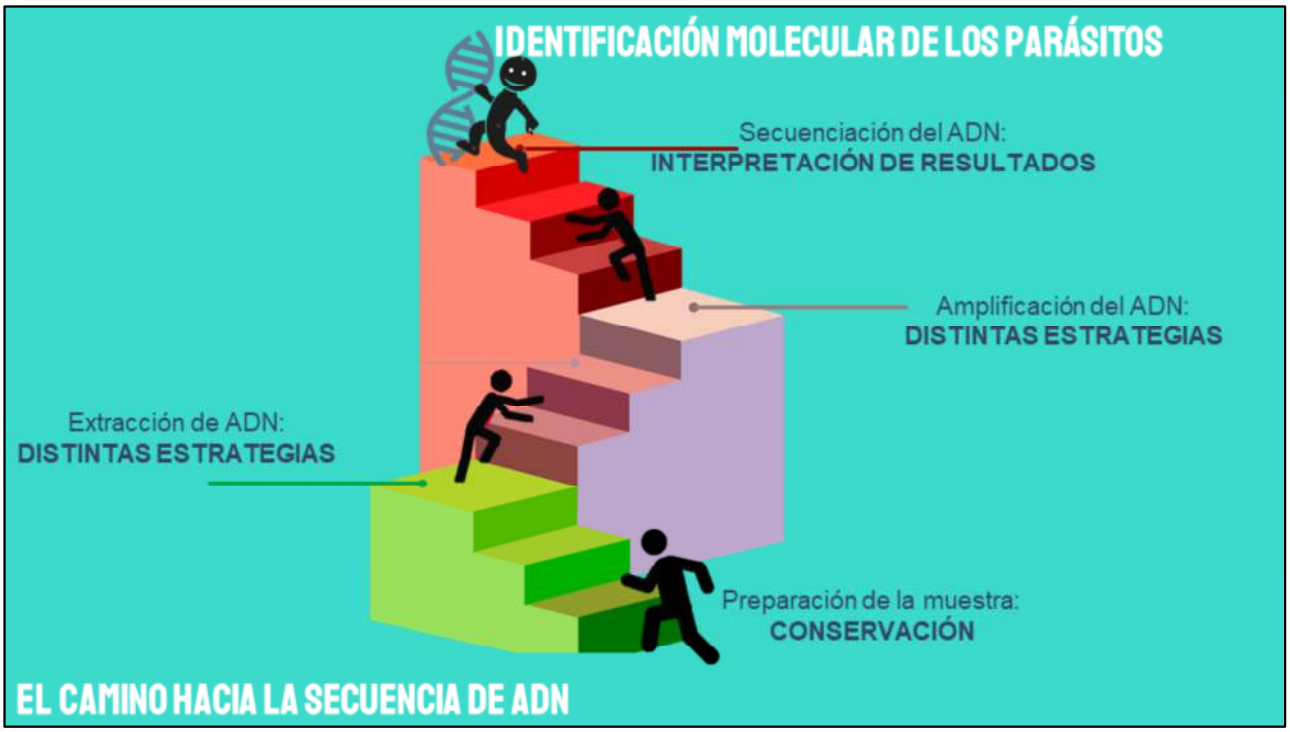
IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS: EL CAMINO HACIA LA SECUENCIA DE ADN

Lic. Andrea Servián

Laboratorio de Biodiversidad y Epidemiología Parasitaria en Animales Silvestres y el Hombre
Centro de Estudios Parasitólogicos y de Vectores (CEPAVE-CONICET-UNLP)

Lic. en Cs. Biológicas (UBA)
Tesista UNLP- Becaria CONICET


IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS
Secuenciación del ADN:
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
Amplificación del ADN:
DISTINTAS ESTRATEGIAS
Extracción de ADN:
DISTINTAS ESTRATEGIAS
Preparación de la muestra:
CONSERVACIÓN
EL CAMINO HACIA LA SECUENCIA DE ADN

Preparación de la muestra: **CONSERVACIÓN**

- ¿Cuál es el material de partida? ←→ ¿Cuál es el objetivo?

MATERIA FECAL

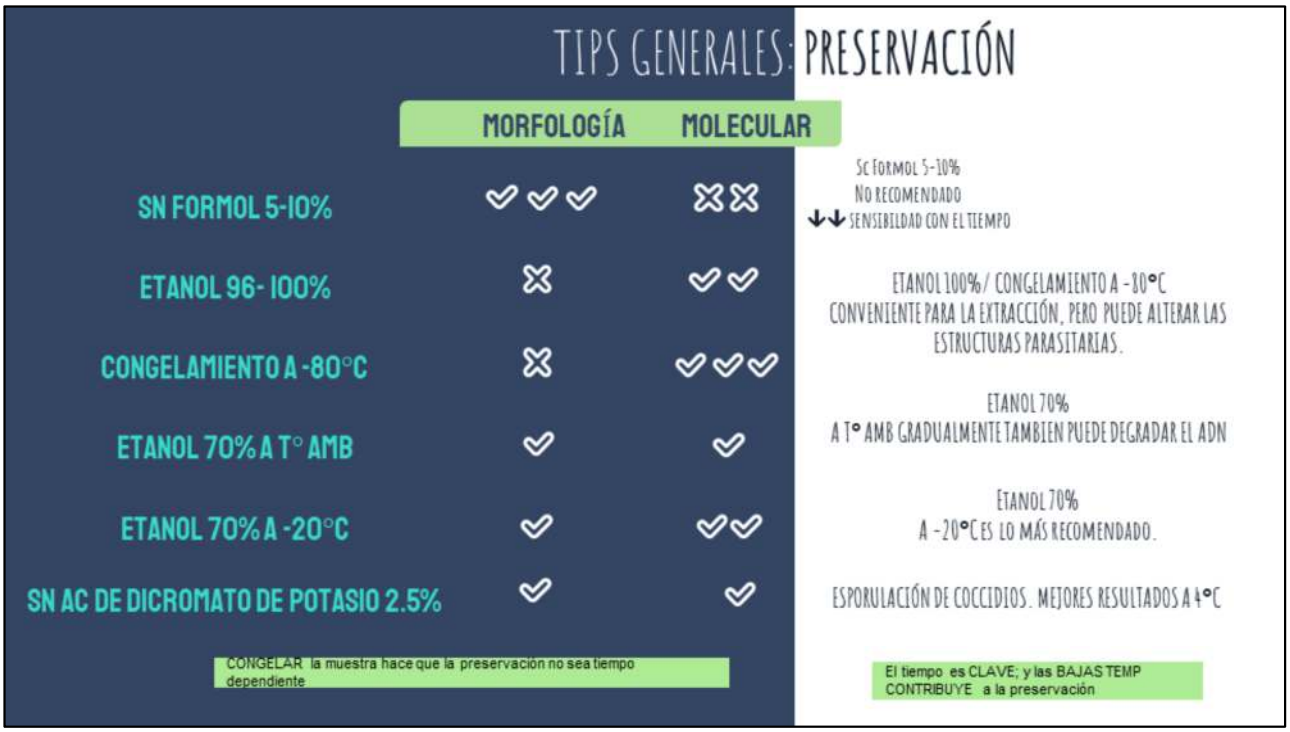
HUEVOS DE NEMATODES

HUEVOS DE CESTODES

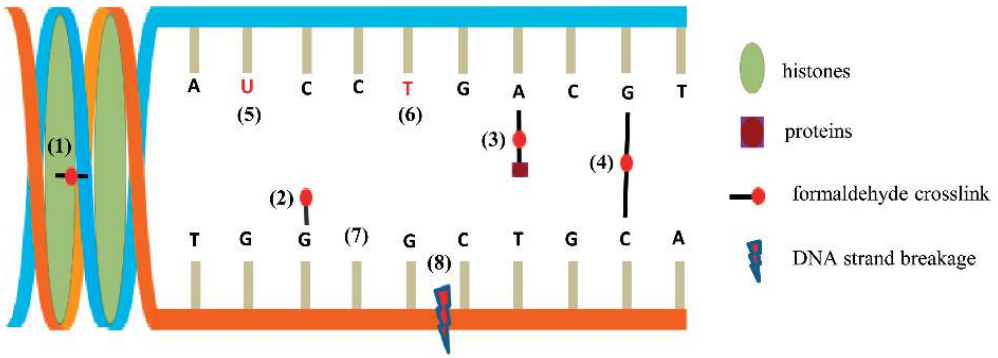
LARVAS DE NEMATODES

PROGLÓTIDES DE CESTODES

QUISTES DE PROTOZOOS

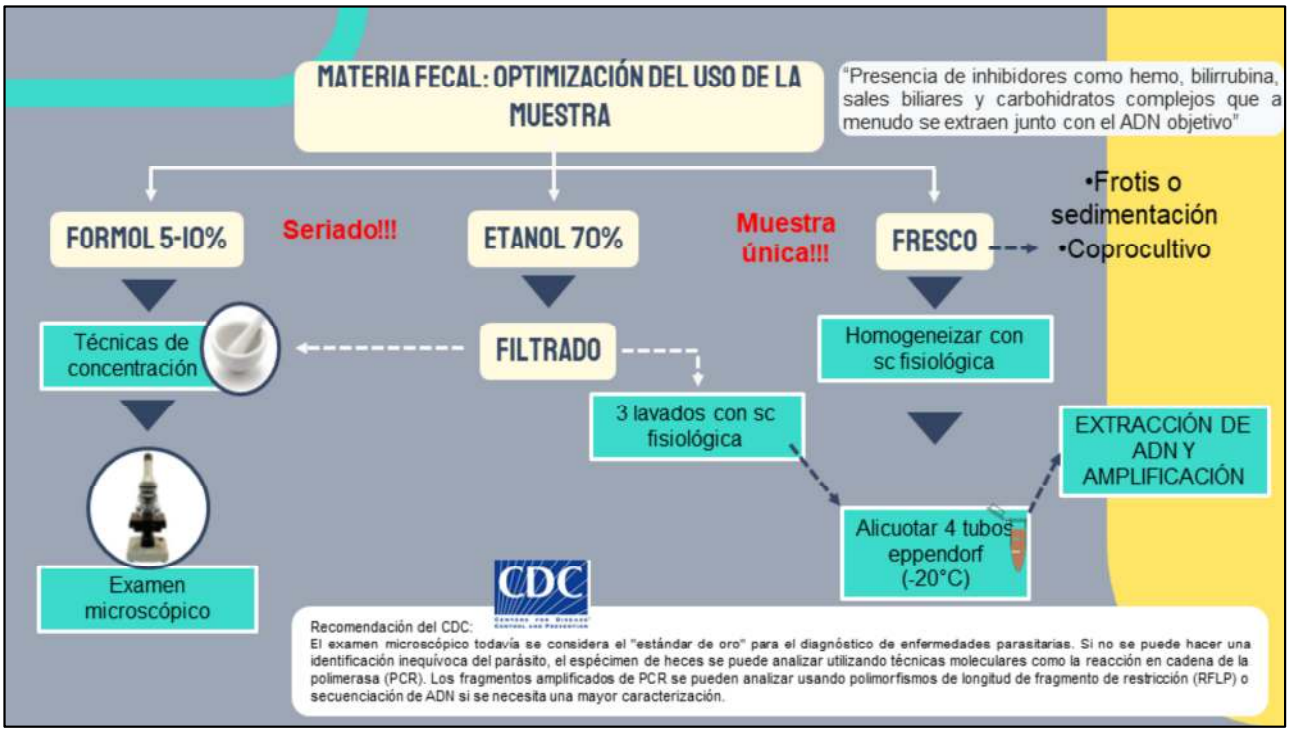


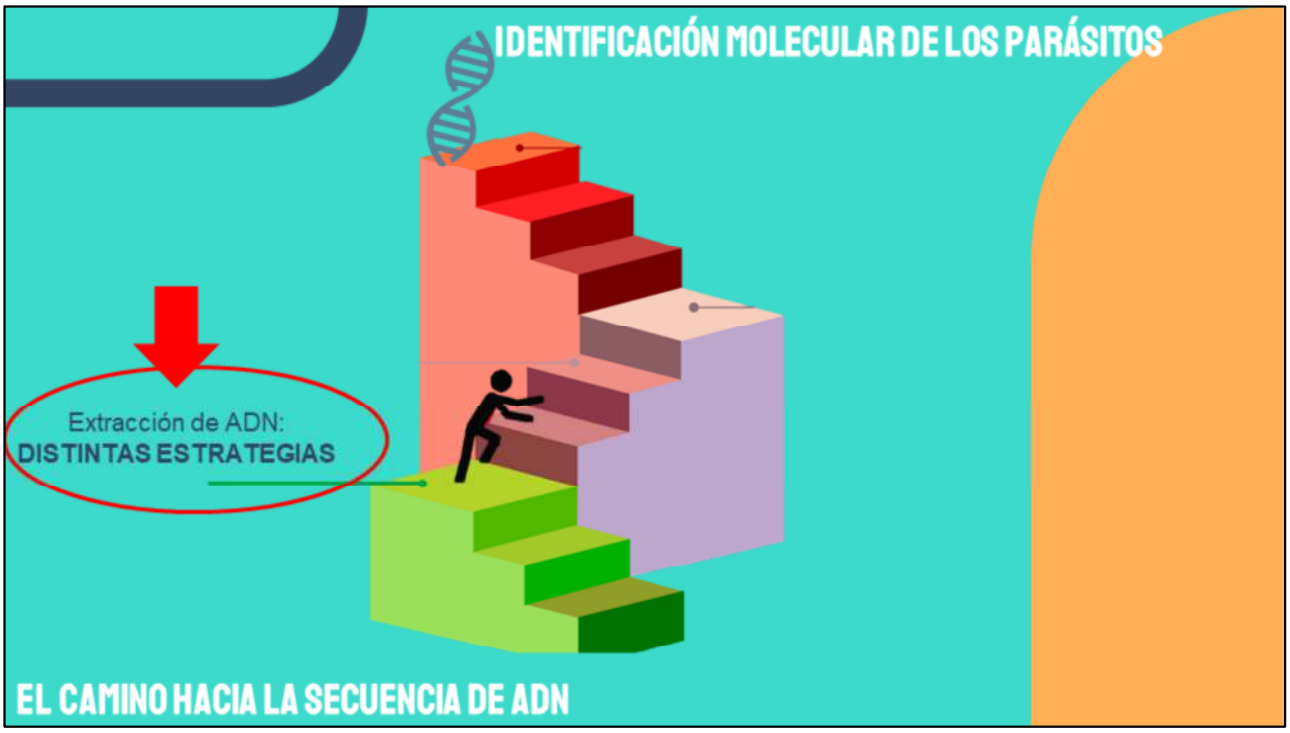
Daño del ADN presente en tejidos fijados con formalina. El ADN extraído de tejidos fijados con formalina contiene varios tipos de daños. El formaldehído, el componente principal de la formalina, es altamente reactivo con bases de ADN y proteínas, generando entrecruzamientos de histona-ADN (1), aductos de formaldehído-ADN (2), entrecruzamientos de ADN-proteína (3) y entrecruzamientos de ADN-ADN (4). El uracilo (5) y la timina (6), que resultan de la desaminación de citosina y 5-mC, respectivamente, también están presentes en el ADN de FFPE. Las bases de ADN también se pierden, lo que resulta en sitios básicos (7), y las cadenas de ADN se rompen, lo que lleva a la fragmentación del ADN.



NO APTO MOLECULAR

Whatman® FTA® card technology


MATERIA FECAL: OPTIMIZACIÓN DEL USO DE LA MUESTRA
"Presencia de inhibidores como hemo, bilirrubina, sales biliares y carbohidratos complejos que a menudo se extraen junto con el ADN objetivo"
FORMOL 5-10%
Seriado!!!
ETANOL 70%
Muestra única!!!
FRESCO
•Frotis o sedimentación
•Coprocultivo
Técnicas de concentración
FILTRADO
Homogeneizar con sc fisiológica
3 lavados con sc fisiológica
EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN
Alicuotar 4 tubos eppendorf (-20°C)
Examen microscópico
CDC
Recomendación del CDC:
El examen microscópico todavía se considera el "estándar de oro" para el diagnóstico de enfermedades parasitarias. Si no se puede hacer una identificación inequívoca del parásito, el espécimen de heces se puede analizar utilizando técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los fragmentos amplificados de PCR se pueden analizar usando polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLP) o secuenciación de ADN si se necesita una mayor caracterización.


IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS
Extracción de ADN:
DISTINTAS ESTRATEGIAS
EL CAMINO HACIA LA SECUENCIA DE ADN

Extracción de ADN: DISTINTAS ESTRATEGIAS
EXTRACCIÓN DIRECTAMENTE DESDE MATERIA FECAL
Fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1, v/v
①
QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)
Bio-Lógicos
Puro Stool Plus
Puro Stool
Quick-DNA Fecal/Soil Microbe Miniprep Kit
Stool DNA Purification Kit from BioVision
CD Stool DNA Kit (308 USD)
GenElute™ Stool DNA Isolation Kit

COPROLITOS

RESEARCH ARTICLE

Pre-Columbian zoonotic enteric parasites: An insight into Puerto Rican indigenous culture diets and life styles

Rosana Wiscovitch-Russo[1☯*], Jessica Rivera-Perez[2‡], Yvonne M. Narganes-Storde[3‡], Erileen Garcia-Roldán[4], Lucy Bunkley-Williams[5], Raul Cano[5], Gary A. Toranzos[1☯*]

1 Environmental Microbiology Laboratory, University of Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico, 2 Ecosystems & Global Change, Manaaki Whenua-Landcare Research, Lincoln, New Zealand, 3 Center for Archaeological Research, University of Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico, 4 Department of Biology, University of Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, 5 The BioCollective, Denver, Colorado, United States of America

☯ These authors contributed equally to this work.
‡ These authors also contributed equally to this work.
* rosana.wiscovitch@gmail.com (WR); gary.toranzos@upr.edu (GAT)

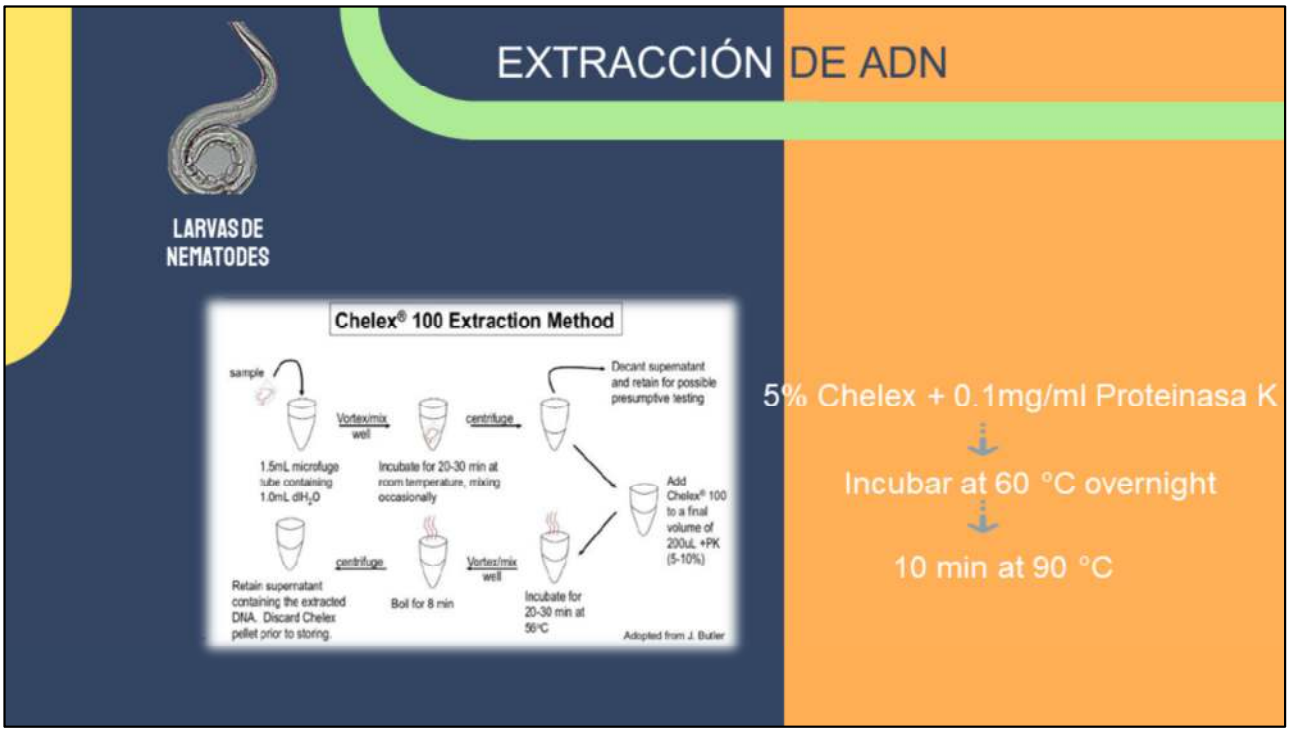
Extraídas de coprolitos de aproximadamente 1400 a 540 años (años antes del presente)

DESAFÍO: Pequeñas cantidades de ADN de parásito detectable en las heces + daño del ADN por su antigüedad = causa dificultad durante la secuenciación y posterior alineación con una secuencia de referencia existente

"Microscopy revealed *Diphyllobothrium* spp. and *Dipylidium caninum* eggs along with unidentified cestode and trematode eggs. DNA sequencing together with functional prediction and phylogenetic inference identified reads of *Cryptosporidium* spp., *Giardia intestinalis* and *Schistosoma* spp."

PAPER DE COLOR

- Alternativas de sedimentación y flotación:
- Flotación de Sheater o Willis, agregado de agua, centrifugación y lavado del pellet.
- Las muestras de heces se filtran a través de gasa doble en tubos de centrífuga de 15 mL y se concentraron por centrifugación a 12.000 xg durante 15 min. Los huevos del sedimento se lavan tres veces con PBS pH 7,4 mediante centrifugación a 1.000 xg durante 15 min
- Sedimentación de Ritchie convencional, pero utilizando agua estéril en lugar de formol.
- El shock térmico que hacemos nosotros consiste en el congelamiento de la muestra en Nitrógeno líquido durante 1 min y luego descongelamiento rápido a 95°C. Se repite este proceso 3 veces



- El Chelex-100 es una resina que preferentemente captura iones metálicos polivalentes en soluciones. El efecto de esta sustancia es prevenir a través de su acción quelante la ruptura del ADN a altas temperaturas catalizada por los iones involucrados en las muestras de trabajo.

PROGLÓTIDES DE CESTODES

EL ADN GENÓMICO PUEDE SER EXTRAÍDO DE 30 MG DE TEJIDO CESTODO UTILIZANDO COMERCIAL KITS DE EXTRACCIÓN

Fenol:cloroformo:alcohol isoamilico 25:24:1, v/v

GNOME, Easy-DNA Kit

MP Biomedicals™ FastDNA™ SPIN Kit

Qiagen
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit

DNeasy Blood and Tissue Kit

EXTRACCIÓN DE ADN

PROTOZOOS y CASOS ESPECIALES: *Blastocystis* spp. y Microsporidia

① **Pared de quistes, ooquistes y esporas → asegurarse de romper estas estructuras.**

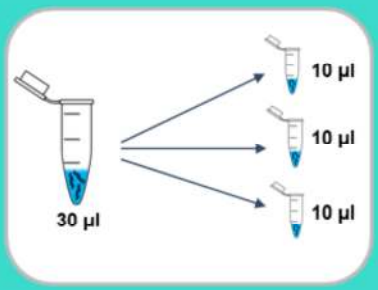
Ruptura física por shock térmico/ beads

② **Intermitencia en la emisión → Emisión discontinua. Por lo tanto, se deben analizar varias muestras de heces antes de se informa una interpretación diagnóstica negativa.**

③ **Enriquecimiento previo por flotación o cultivo.**

ALICUOTAR MATERIAL!!

CICLOS DE CONGELAMIENTO/DESCONGELAMIENTO PUEDEN DAÑAR EL ADN



Análisis cuantitativo

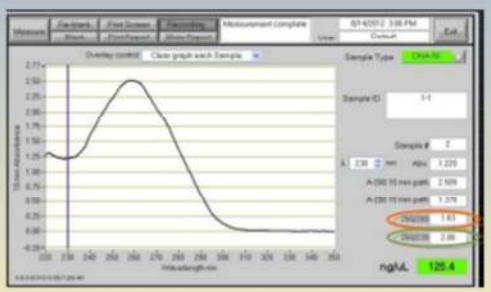
Análisis cualitativo

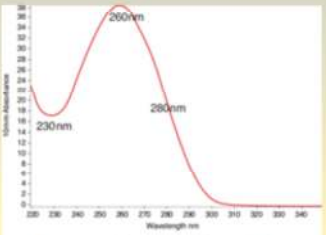
PUNTO DE CONTROL

Medición de absorbancia

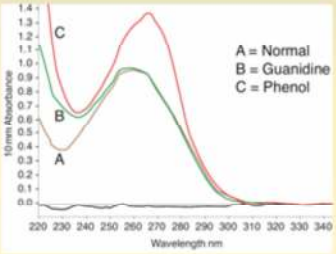
PUNTO DE CONTROL:
ANÁLISIS CUANTITATIVO

CONOCER LA CANTIDAD Y CALIDAD DEL ADN POR ESPECTROFOTOMETRÍA TAMBIEN UTIL PARA CALCULAR LA CANTIDAD DE TEMPLADO

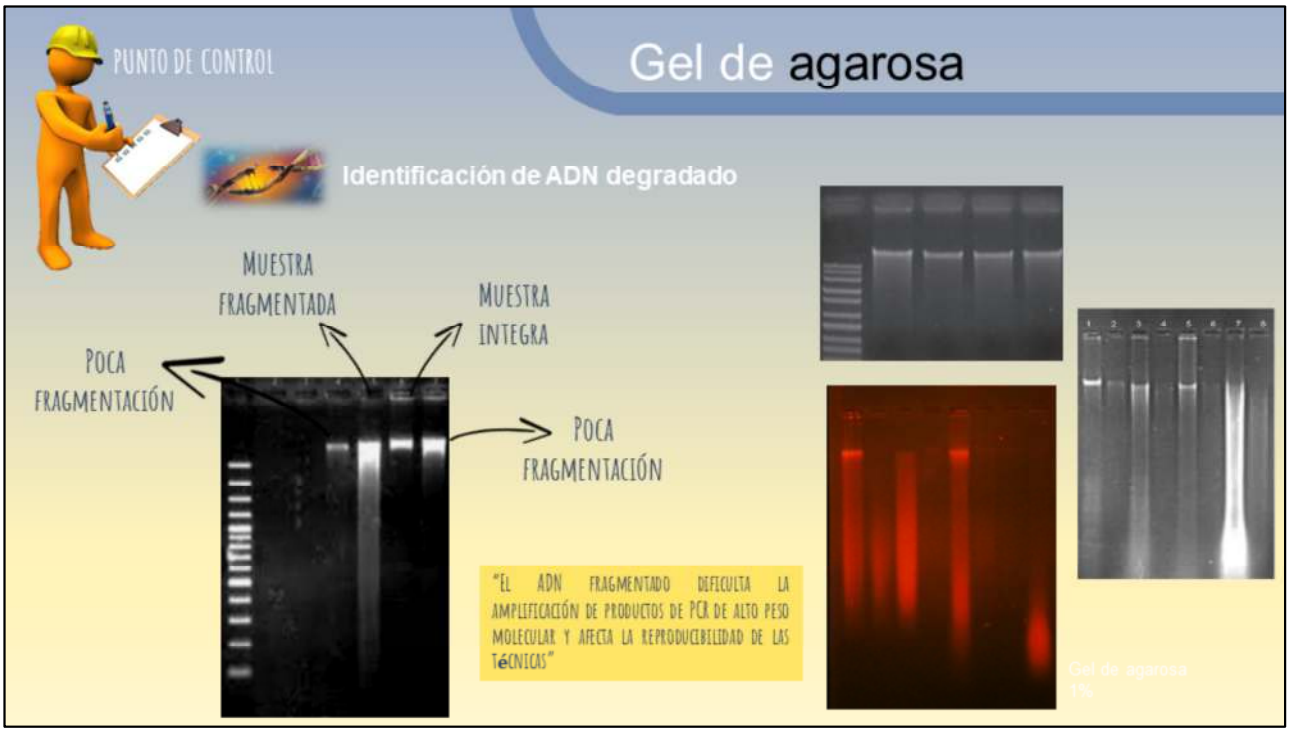




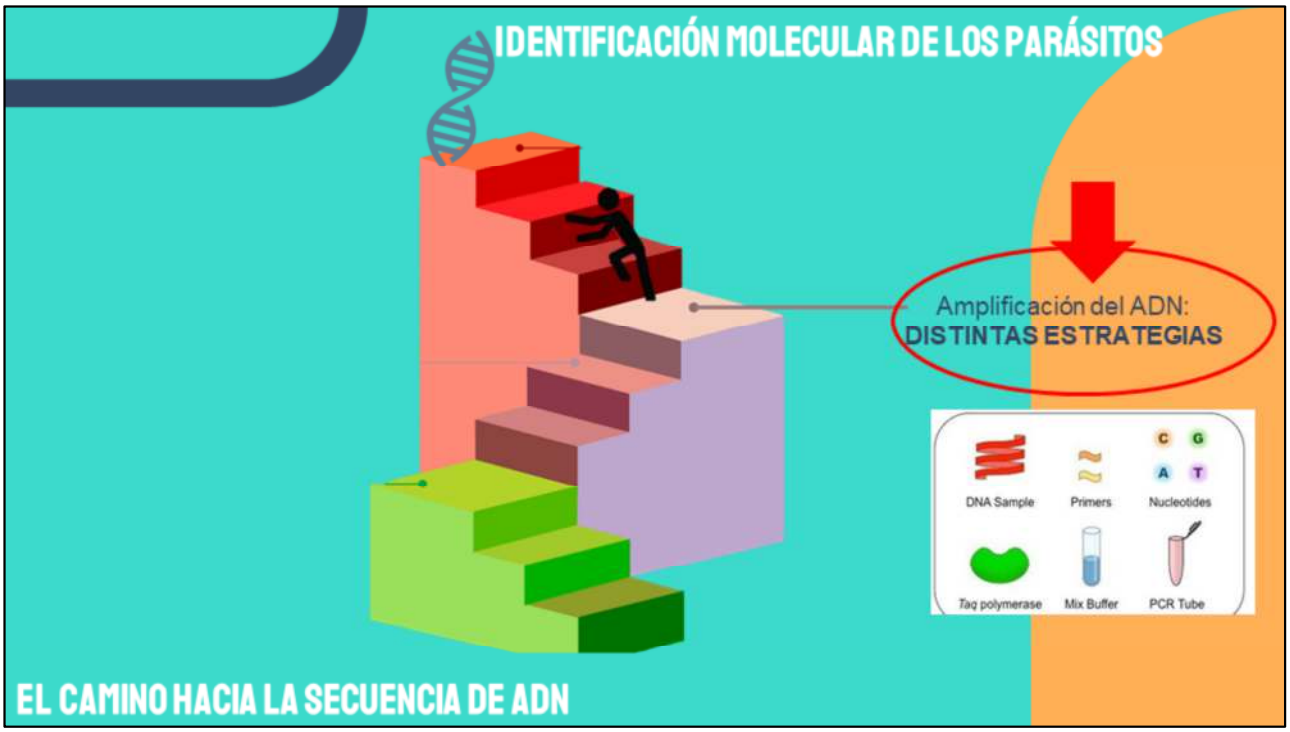
Espectro típico de ácidos nucleicos



Radio	Valor	Pureza
260/280	1,8-2	ADN de pureza óptima
	1,6-1,8	ADN pureza aceptable
	<1,6	Presencia de compuestos aromáticos
	>2,1	Contaminación con ARN
260/230	<1,5	Contaminación con sales, carbohidratos, fenoles



- Además de conocer la cantidad y calidad del ADN por espectrofotometría, es importante conocer si el ADN obtenido está integro. La integridad del ADN se puede observar mediante electroforesis en gel de agarosa Si el ADN está integro, se debe observar una banda estrecha cercana al pozo en que se colocó la mezcla de ADN. Si está fragmentado, se observará una banda de más de un cm de ancho o un sendero luminoso en el carril de la muestra. El ADN fragmentado dificulta la amplificación de productos de PCR de alto peso molecular y afecta la reproducibilidad de las técnicas.


IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS
Amplificación del ADN:
DISTINTAS ESTRATEGIAS
DNA Sample
Primers
Nucleotides
Taq polymerase
Mix Buffer
PCR Tube
EL CAMINO HACIA LA SECUENCIA DE ADN

BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

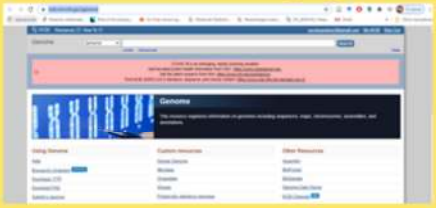
Principales bases de datos se secuencias de nucleótidos:

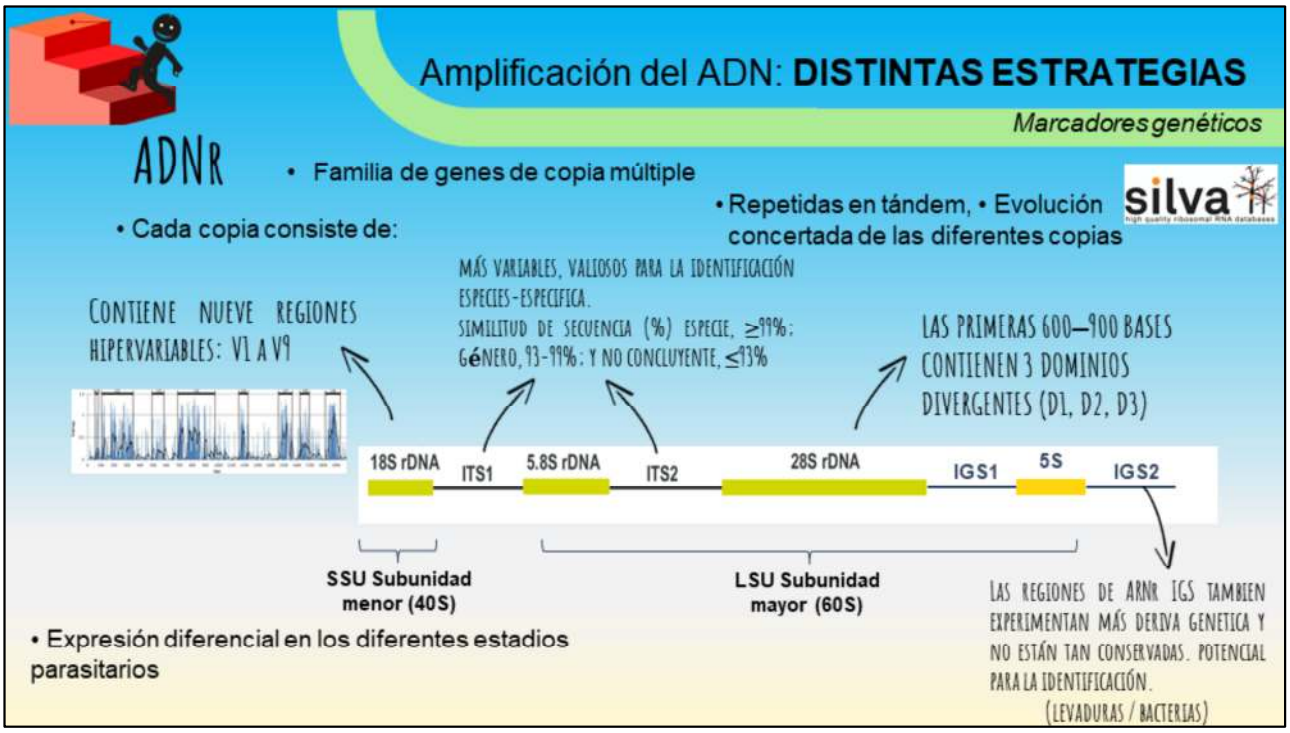
- NCBI (EEUU)
- EMBL (Europa)
- DDBJ (Japón)

silva
high quality ribosomal RNA databases

https://www.ebi.ac.uk/genomes/

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome





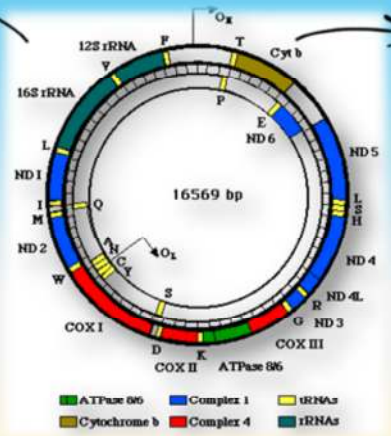
La expression diferencial de unidades de genes de 18S es muy común en Plasmodium por ejemplo, donde esta expression está regulada a nivel del desarrolo, con diferentes sets de ARNr expresados en diferentes estadíos del parásito.

Ver: Kamau, E., Tolbert, L. S., Kortepeter, L., Pratt, M., Nyakoe, N., Muringo, L., ... & Ockenhouse, C. F. (2011). Development of a highly sensitive genus-specific quantitative reverse transcriptase real-time PCR assay for detection and quantitation of Plasmodium by amplifying RNA and DNA of the 18S rRNA genes. *Journal of clinical microbiology*, *49*(8), 2946-2953.

ADN MITOCONDRIAL

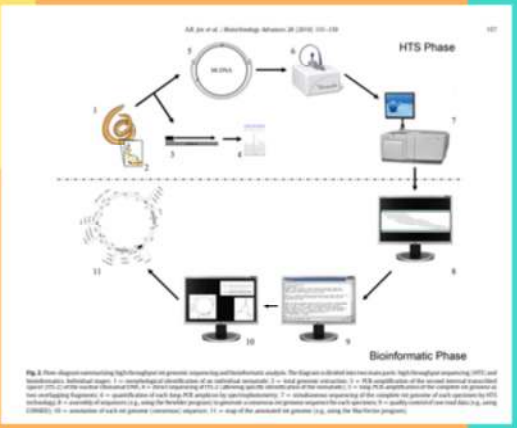
DOS GENES DE RRNA

- Alta proporción codificante
- Tasa de mutación hasta 10 veces superior a la nuclear por mecanismos de reparación mas rudimentarios
- Cuidado con PSEUDOGENES



13 PROTEINAS QUE CODIFICAN GENES (INCLUIDA LA SUBUNIDAD 1 DE LA CITOCROMO C OXIDASA (COX1), CITOCROMO B (COB) Y SUBUNIDAD 1 DE NADH DESHIDROGENASA (NAD1)) Y 22 GENES DE TRNA

NEXT GENERATION SEQUENCING



Biotechnology Advances 28 (2010) 151–159

Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Advances

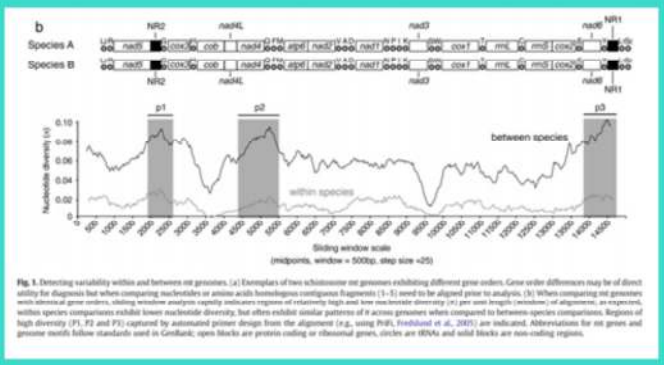
journal homepage: www.elsevier.com/locate/biotechadv

Research review paper

Toward next-generation sequencing of mitochondrial genomes — Focus on parasitic worms of animals and biotechnological implications

Aaron R. Jex [a,*], D. Timothy J. Littlewood [b], Robin B. Gasser [a,*]

[a] Department of Veterinary Science, The University of Melbourne, 250 Princes Highway, Werribee, Victoria 3030, Australia
[b] Department of Zoology, The Natural History Museum, Cromwell Road, London, United Kingdom

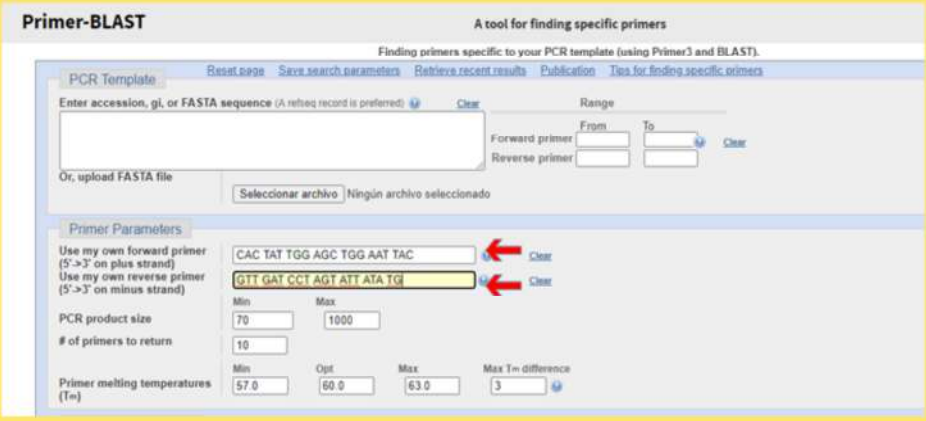


PRIMERS

No encuentro en bibliografía, diseño los propios?

También ÚTIL para chequear especificidad de los primers elegidos

❶



Using Primer BLAST

How to use Primer BLAST in Sequence Viewer

NCBI

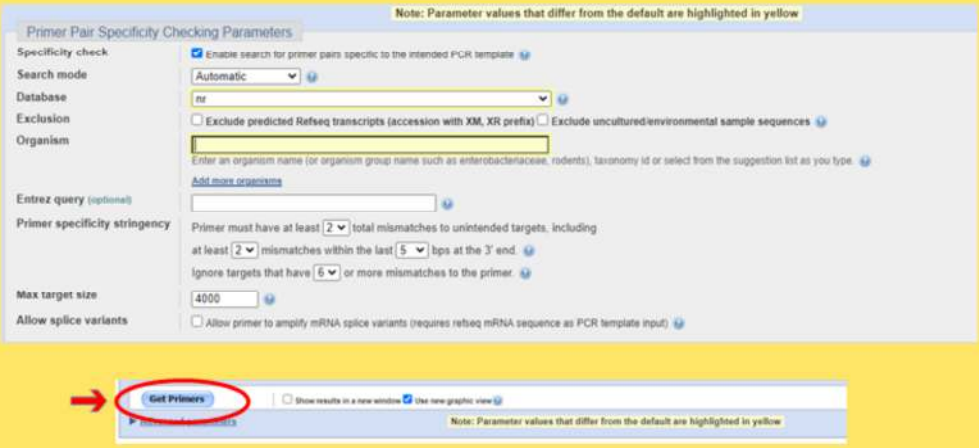
Primer3

OligoAnalyzer Tool

DISEÑO DE PRIMERS

También ÚTIL para chequear especificidad de los primers elegidos

❷



Using Primer BLAST

How to use Primer BLAST in Sequence Viewer

NCBI

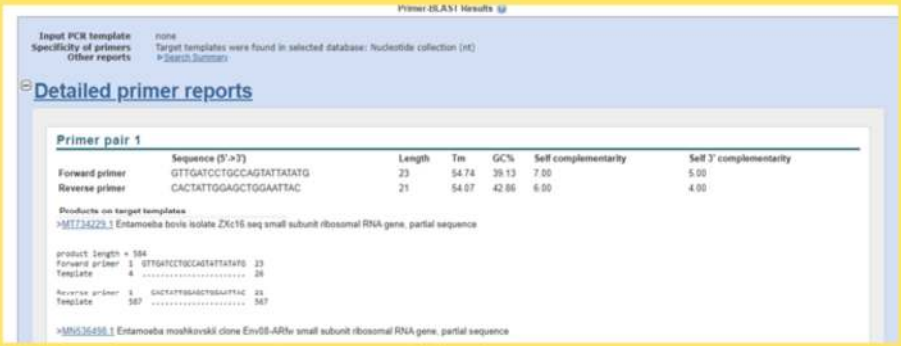
Primer3

OligoAnalyzer Tool

DISEÑO DE PRIMERS

También ÚTIL para chequear especificidad de los primers elegidos

❸



Using Primer BLAST

How to use Primer BLAST in Sequence Viewer

NCBI

Primer3

OligoAnalyzer Tool

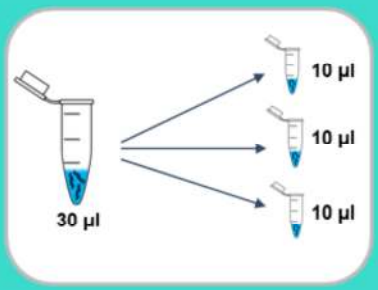
Cuando usamos primers diseñados en el laboratorio se puede empezar probando con condiciones estándares, y dependiendo del resultado, se hacen o no Modificaciones. Lo mismo se puede aplicar cuando se usan primer publicados y no obtenemos los resultados esperados.

Reactivo	Concentración final (Cf)	Concentración inicial (Co)	X1 (µL)	X1*nro de tubos
Buffer (X)	1	10	=(Cf*Co)/Vf	
Mg2+ (mM)	1,5	50	=(Cf*Co)/Vf	
dNTPs (mM)	0,2	10	=(Cf*Co)/Vf	
Primer Forward	0,5	10	=(Cf*Co)/Vf	
Primer Reverse	0,5	10	=(Cf*Co)/Vf	
Taq (U/µL)	1	5	=(Cf*Co)/Vf	
Agua	-	-	=(Cf*Co)/Vf	
ADN	500 ng	-	=(Cf*Co)/Vf	
			Vf	

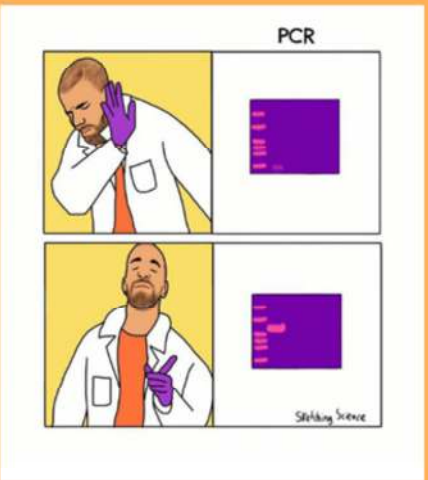
ALICUOTAR REACTIVOS!!

- De esta manera congelamos y descongelamos los reactivos pocas veces, por lo que nos duran mas (sobre todo la *taq* y los dNTPs)

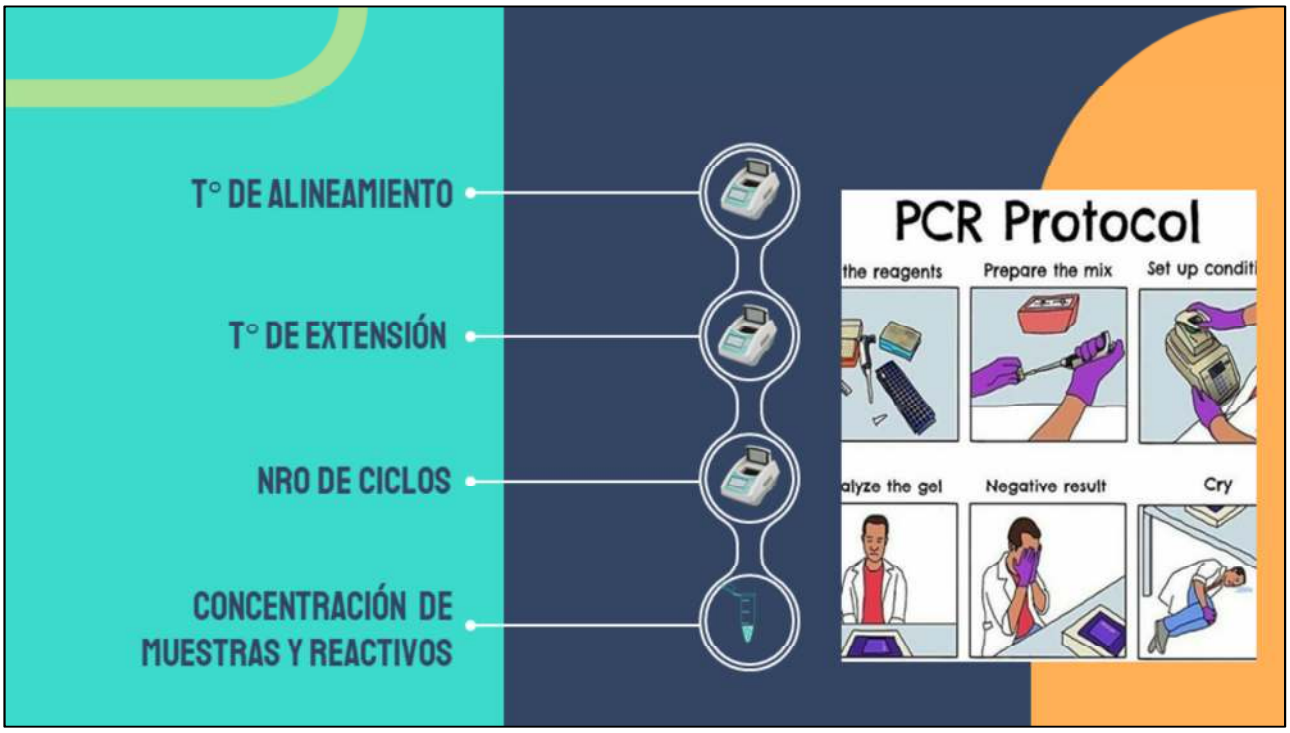
- Si tenemos algún tipo de contaminación, tiramos las alícuotas que usamos en ese momento, se descongelan nuevas, y de esta forma no tenemos que tirar todos los reactivos a la basura.



- Ya preparados, los tubos deben mantenerse en hielo o a 4°C hasta meterlos al termociclador, para evitar que la polimerasa sintetice fragmentos inespecificos.



QUÉ SE PUEDE MEJORAR CUANDO NO VEMOS AMPLICÓN?



En cuanto al tiempo, existe una regla que puede aplicarse a casi todas las PCRs: la temperatura de desnaturalización y de alineamiento es suficiente de 30 a 60 s. Si es una buena máquina que llega rápidamente a la temperatura programada, con 30 s es suficiente. Para la extensión, dependiendo del tamaño que esperemos se utiliza más o menos tiempo para permitir que la polimerasa trabaje adecuadamente, si se espera un producto de 1 kb, con 1 min es suficiente, si es de 2 kb, 2 minutos, y si es menos, se hace la conversión equivalente. Casi todos las PCRs funcionan bien con 30 ciclos. Reducir el número de ciclos puede ayudar a eliminar bandas inespecíficas o aumentar el número si partimos de baja concentración de ADN. Para tener una idea de la temperatura de alineamiento que podría ser la mejor para nuestros primers podemos calcular la Tm de cada primer que utilizamos. Tm se refiere a la temperatura a la que se hibridan o se pegan los oligonucleótidos en los sitios que son complementarios. En función de esto la temperatura de annealing debería estar 5°C por debajo de la menor Tm entre los primers.

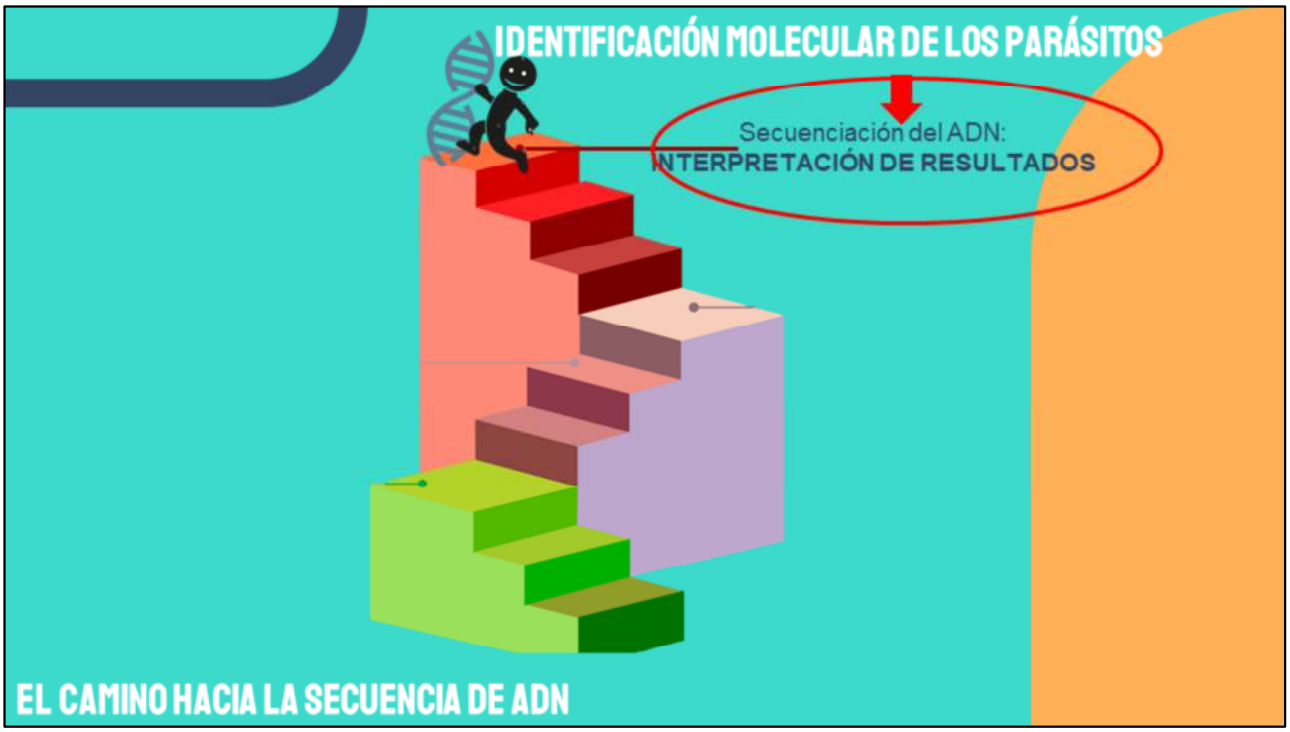
CONTROLES DE LA PCR PARA EL DIAGNÓSTICO

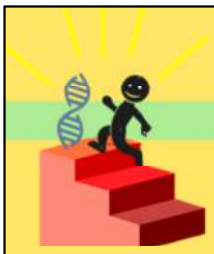
Control interno de extracción y amplificación (CIA):

Control positivo de la amplificación (CPA)

Control negativo de la amplificación (CNA)
ADN proveniente de individuos sanos, con estudios parasitológicos negativos y sin antecedentes de área endémica

Control negativo (CN)
Reacción de PCR en presencia de agua y ausencia de ADN


IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS PARÁSITOS
Secuenciación del ADN:
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS
EL CAMINO HACIA LA SECUENCIA DE ADN



Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

SERVICIO DE SECUENCIACIÓN Y GENOTIPIFICADO
(FCEyN,UBA)

INDEAR
NGS

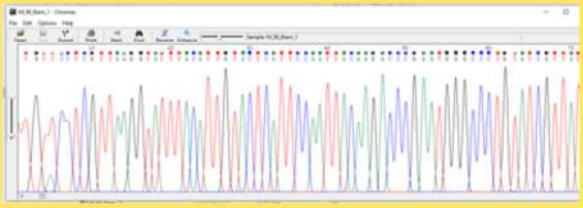
CONICET
CERELA
Servicio de secuenciación

El precio por reacción era de US$10, y la purificación de la muestra $150 (pesos argentinos).

Humanizing Genomics
macrogen

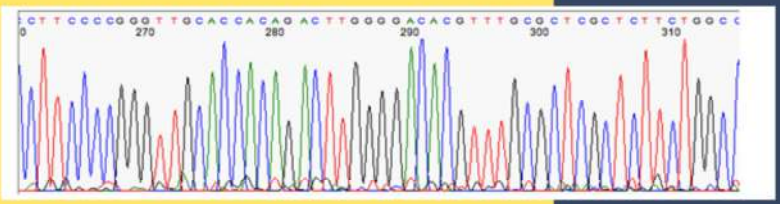
Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Chromas



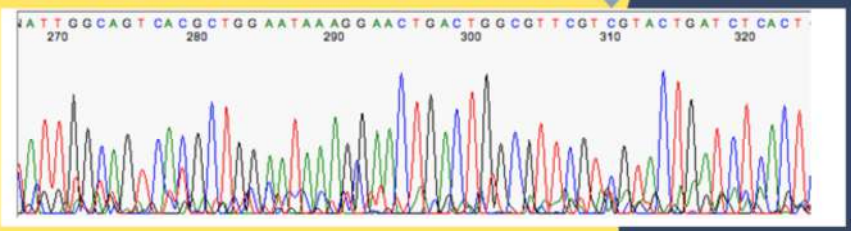
Un cromatograma de buena calidad muestra picos únicos, bien separados entre sí y con poco ruido de fondo

El siguiente ejemplo tiene un poco de ruido de referencia, pero los picos "reales" aún son fáciles de leer, por lo que no hay ningún problema con esta muestra



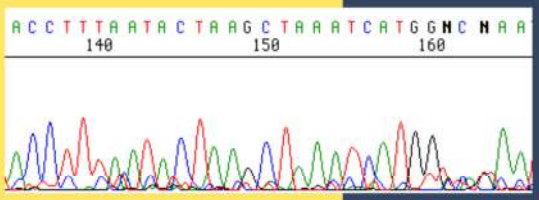
Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Demasiado ruido de fondo, pero señal/ruido alta.



Relación señal/ruido es baja

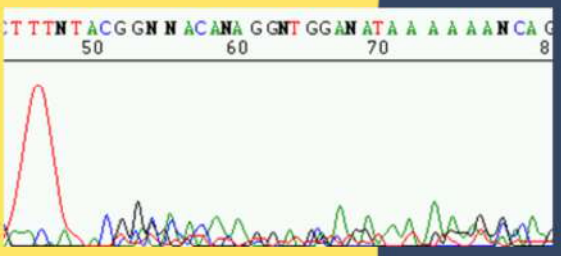
- Concentración del ADN es baja o a la presencia de cantidades importantes de contaminantes.
- Primers de secuenciación tienen un sitio de unión secundario de menor afinidad que el sitio principal
- Falla en la purificación del ADN

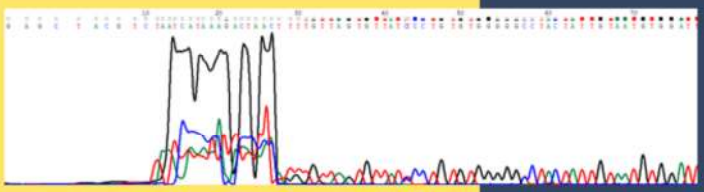


Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Alta señal inicial que después decae rápidamente.

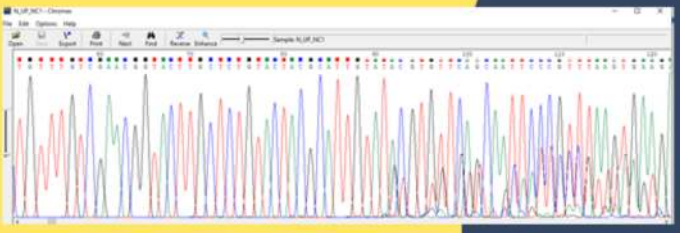
- Hay poco ADN en la muestra o las concentraciones de los primers de la reacción de secuenciación son muy bajas.
- También se observan cromatogramas con este perfil en presencia de contaminantes o cuando los primers son poco especificos.



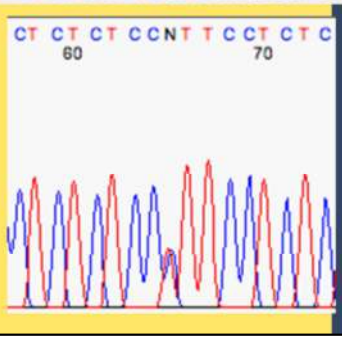


Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Primer se pega en dos sitios diferentes, más de un clon/ individuo



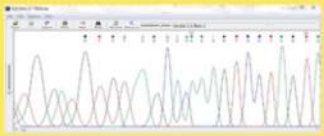
Polimorfismos



Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

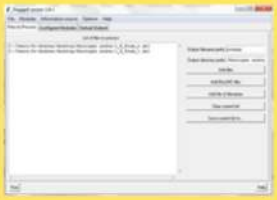
Chromas

a) CHROMAS



Edición de extremos 5´y 3´de las secuencias **FORWARD** y **REVERSE**

b) STADEN PACKAGE



Alineamiento de secuencias **FORWARD** y **REVERSE** para generar secuencia **CONSENSO**

Secuenciación del ADN: INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Ingresar como **INPUT** la secuencia consenso en formato **FASTA**.

Description	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Ident	Accession
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853448853, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001864840.1
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853448411, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001864620.1
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853448277, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001864553.1
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853448063, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001864447.1
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853447981, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001864407.1
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853447159, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001863997.1
Entamoeba dispar SAW760 scf 1108853446647, whole genome shotgun sequence	1029	1029	94%	0.0	100%	NW_001863744.1

DESVENTAJAS DE ESTOS MéTODOS:

Costo del equipo

Imposible de llevar a trabajo de campo

"Nuestra aspiración es seguir bajando las barreras para que la gente innove, experimente, y se acerque a la ciencia con las manos".
minipcr
JOIN THE DNA REVOLUT
Nerds
Ezequiel (Zeke) Alvarez-Saavedra, Ph.D. Co-Founder.
Sebastian Kraves, Ph.D. Co-Founder.
miniPCR™ mini8 thermal cycler (Rainbow)
Sale!
1650.00 - $615.00

Esto No es un chivo

RECOMENDADO

PB-L
Productos
Bio-Lógicos®

BONUS
TRACK

ESTUDIO DEL MICROBIOMA HUMANO Y TRASPLANTE DE MATERIA FECAL

RESEARCH ARTICLE

Recovery of the Gut Microbiome following Fecal Microbiota Transplantation

Anna M. Seekatz,[a] Johannes Aas,[b] Charles E. Gessert,[c] Timothy A. Rubin,[b] Daniel M. Saman,[c] Johan S. Bakken,[d] Vincent B. Young[a]
Department of Internal Medicine, Division of Infectious Diseases, Department of Microbiology and Immunology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA; Essentia Health, Department of Gastroenterology, Duluth, Minnesota, USA; Essentia Institute of Rural Health, Duluth, Minnesota, USA; St. Luke's Hospital, Section of Infectious Diseases, Duluth, Minnesota, USA[d]

Microbiota = conjunto total de microorganismos (virus, bacterias, hongos y arqueas) en una comunidad.

Metagenoma = conjunto de genes o genomas dentro de estos organismos dentro de esta comunidad.

Microbioma = conjunto de microorganismos y su ambiente biomolecular: los microorganismos en sí, su ADN, su genoma, pero también otras biomléculas (ARN, proteínas), su ecología y su interacción

12 participantes, 86% de tasa de éxito
Observaron diferencias significativas en el microbioma post trasplante que apoyan la restauración de la diversidad y estructura de la comunidad a nivel individual.
Nuestros datos sugieren que la microbiota fecal en las muestras post-FMT se asemeja a la comunidad de cada donante respectivo más que a la comunidad observada antes.

DONANTE: (PACIENTE SANO)
- S/ ANTECENDENTES DE INFECCIONES O AFECCIONES GASTROINTESTINALES (AGUDAS O CRÓNICAS).
- S/ TRATAMIENTO PREVIO CON ANTIBIÓTICOS
- TEST DE C. DIFFICILE, HEPATITIS A, B, Y, PARÁSITOS INTESTINLAES., ENTRE OTROS
- 30 G O 3 CMS EN VOLUMEN <6 H ANTES DEL PROCEDIMIENTO
- SOLUCIÓN FISIOLÓGICA + FILTRADO

RECEPTOR: (PACIENTE C/ *C. DIFFICILE*)

Organización sin fines de lucro
https://www.openbiome.org/

REFERENCIAS

- Sugiyama, H., Singh, T. S., & Rangsiruji, A. (2013). Molecular Detection of Human Parasitic Pathogens.
- Da Silva, A. J., Bornay-Llinares, F. J., Moura, I. N., Slemenda, S. B., Tuttle, J. L., & Pieniazek, N. J. (1999). Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. Molecular Diagnosis, 4(1), 57-64.
- Valencakova, A., Balent, P., Ravaszova, P., Horak, A., Obornik, M., Halanova, M., & Goldova, M. (2012). Molecular identification and genotyping of Microsporidia in selected hosts. Parasitology research, 110(2), 689-693.
- https://brcf.medicine.umich.edu/cores/advanced-genomics/faqs/sanger-sequencing-faqs/my-samples-produced-only-blank-lanes-why/

MUCHAS GRACIAS