

ANÁLISIS GENÉTICOS APLICADOS A LA MICROBIOLOGÍA

Carrera: Microbiología

Plan de estudios: 2023

Área de Formación: Aplicada/Profesional

Año: Tercero

Régimen de Cursada: Cuatrimestral

Carácter: Obligatoria

Carga horaria total: 70 horas

Carga horaria teórica: 20 horas

Carga horaria práctica: 50 horas

OBJETIVO GENERAL DEL CURSO

Profundizar y aplicar los conocimientos aprendidos en los cursos de Biología Celular y Molecular, Genética General y Microbiana, Bioinformática, Bacteriología General, Virología General, Parasitología General y Micología General. Fundamentar, realizar y aplicar las metodologías de análisis genético utilizadas en microbiología. Integrar y describir las herramientas necesarias para el desarrollo y la aplicación de metodologías de análisis genético en un laboratorio de microbiología.

OBJETIVOS DE APRENDIZAJE

Se espera que al finalizar el curso el estudiante:

- Adquiera y profundice el lenguaje técnico adquirido en cursos anteriores permitiéndole la comunicación fluida con pares utilizando la terminología adecuada, a través de la participación y discusión grupal.
- Desarrolle progresivamente un aprendizaje autónomo, valorando la importancia de la construcción colectiva del conocimiento, a través de la participación y discusión grupal en las diferentes instancias de la ejercitación práctica, experimental y talleres del curso, mediante la discusión básica de cada metodología y la lectura crítica de literatura científica actualizada.
- Desarrolle habilidades metodológicas y lógicas que le permitan construir, apropiarse y aplicar los conocimientos adquiridos para el desarrollo e implementación de las diferentes metodologías de análisis genético vinculadas con la disciplina, a través de la ejercitación práctica y experimental de las técnicas descritas a lo largo del curso.
- Analice las diferentes aproximaciones para el análisis genético, en un continuo de complejidad, teniendo la capacidad de seleccionar la técnica adecuada en cada caso, a través del análisis de situación y de la discusión grupal de propuestas en las clases prácticas y experimentales.

■ Cuenta con las bases para acceder a conocimientos más complejos o especializados a través de la lectura crítica de trabajos científicos originales, así como de trabajos de revisión y meta-análisis a lo largo del curso y, particularmente, en los talleres finales.

CONTENIDOS MÍNIMOS

Laboratorio de análisis genéticos aplicados a la Microbiología. Bioseguridad. Equipamiento. Herramientas de diagnóstico microbiológico. Extracción y purificación de ADN y ARN. Hibridación. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final. PCR en tiempo real. PCR digital. Amplificación isotérmica mediada por Loop (LAMP). Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas Irregularmente e Interespaciadas (CRISPR). Metodologías de subtipificación molecular. Secuenciación capilar, pirosecuenciación, secuenciación masiva en paralelo (MPS). Microarrays. Desarrollo, estandarización y validación de técnicas moleculares. Aplicaciones biotecnológicas.

PROGRAMA ANALÍTICO

UNIDAD N° I: LABORATORIO DE ANÁLISIS GENÉTICOS APLICADOS A LA MICROBIOLOGÍA

Conceptos generales sobre instalaciones y organización edilicia. Organización y diseño del laboratorio de biología molecular. Zonas pre-analíticas, analíticas y post-analíticas. Zona analítica: laboratorios de preparación de reactivos y manejo de muestras (zona Pre-PCR), laboratorios de amplificación de muestras (zona PCR) y laboratorios de análisis de productos de amplificación (zona Post-PCR). Sentido de circulación de las muestras. Controles de contaminación. Indicadores de eficiencia. Análisis de riesgo. Programas internos y externos de control de calidad. Equipamiento básico del laboratorio de análisis genéticos. Laboratorio general para preparación de reactivos.

UNIDAD N° II: BIOSEGURIDAD

Importancia del manual de bioseguridad y manual de procedimientos en laboratorios de análisis microbiológicos. Introducción a los sistemas de gestión de calidad. Elementos de protección personal (EPPs) en el laboratorio de biología molecular. Manejo de muestras no inactivadas, de acuerdo a su nivel de riesgo. Inactivación de muestras biológicas previa extracción de ácidos nucleicos. Manejo de muestras biológicas inactivas para determinaciones de biología molecular. Cuidados para la protección de la integridad y contaminación de las muestras de ADN y ARN.

UNIDAD N° III: EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN Y ARN.

Fundamentos y procedimientos generales. Métodos tradicionales con y sin solventes orgánicos. Métodos de adsorción en sílica. Métodos comerciales de extracción: manuales y automatizados. Extracción a partir de diferentes tipos de muestras y para diferentes microorganismos. Métodos de análisis y cuantificación del producto obtenido: espectrofotometría, fluorometría, electroforesis y qPCR. Nuevas tecnologías de análisis de calidad de biomoléculas.

UNIDAD N° IV: HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Conceptos generales. Condiciones para la hibridación. Concepto de sonda y secuencias blanco. Cinética de la reacción de hibridación. Síntesis y marcación de sondas. Factores que modifican la interacción de secuencias en la hibridación: temperatura, sales, agentes desnaturizantes, etc. Estrategias de hibridación: dot-blot (directo e inverso), Southern blot, Northern blot. Revelado de los diferentes tipos de marcas. Hibridación en líquido y en fase sólida. Sondas ADN y ARN.

UNIDAD N° V: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) DE PUNTO FINAL

Fundamento de la técnica. Desarrollo de una PCR: reactivos necesarios. Diseño de cebadores o *primers*. Sistemas de detección e interpretación y análisis de los resultados. Distintas variantes de PCR: PCR anidada, PCR semi-anidada, PCR múltiple, PCR asimétrica, *touchdown* PCR, *Reverse Transcription* PCR (RT-PCR), *in situ* PCR, PCR alelo específica (AS-PCR). Fundamentos y aplicaciones de cada una.

UNIDAD N° VI: PCR EN TIEMPO REAL

Fundamentos. Cinética de amplificación. Agentes intercalantes y sondas de hidrólisis: ventajas y desventajas de cada metodología. Diferentes tipos de sondas y fluoróforos. Cuantificación de ácidos nucleicos: cuantificación absoluta vs. relativa. Equipos utilizados para qPCR: funcionamiento básico, requerimientos, calibraciones, mantenimiento preventivo. Análisis de resultados: uso de softwares específicos. Aplicaciones de la qPCR. PCR convencional vs. qPCR: usos y aplicaciones de cada tecnología.

UNIDAD N° VII: PCR DIGITAL

Conceptos generales. Fundamentos de la técnica. Principios de la PCR Digital (dPCR) y de la Digital Droplet PCR (ddPCR) para la cuantificación absoluta de secuencias blanco. Rango dinámico de la dPCR. Factores que modifican o afectan los resultados de la dPCR. Aplicaciones de la dPCR: cuantificación absoluta de cargas virales, cuantificación de patrones, cuantificación de bibliotecas de NGS, detección de fracciones alélicas pequeñas, cuantificación absoluta en ensayos de expresión génica.

UNIDAD N° VIII: AMPLIFICACIÓN ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP (LAMP)

Características de los sistemas de amplificación isotérmicos del tipo LAMP (fundamento de la técnica). Diseño de los cebadores en reacciones de tipo LAMP. DNA polimerasas utilizadas en los sistemas LAMP. Ventajas y limitaciones de los sistemas LAMP frente a la qPCR. Aplicaciones de LAMP en diagnóstico, análisis de muestras ambientales y en la industria alimenticia

UNIDAD N° IX: REPETICIONES PALINDRÓMICAS CORTAS AGRUPADAS IRREGULARMENTE E INTERESPACIADAS (CRISPR)

Generalidades del funcionamiento de los sistemas CRISPR en el mundo microbiano. Sistema Cas-9: tijeras moleculares para la edición genética. Sistemas Cas-9, Cas-13 y Cas-12a: nuevas tecnologías para la detección de secuencias blanco. Ventajas de CRISPR sobre otras tecnologías de detección de secuencias: sensibilidad, costos, flexibilidad de la técnica, aplicaciones en microbiología.

UNIDAD N° X: METODOLOGÍAS DE GENOTIPIFICACIÓN Y SUBTIPIFICACIÓN MOLECULAR

Estrategias, fundamentos, procedimientos y aplicaciones: Perfiles plasmídicos; basados en restricción enzimática (REA/hibridación/PFGE); basados en PCR (RAPD/REP/ERIC); combinados (PCR-RFLP/PCR-hibridación/AFLP/MLST/MLVA); secuenciación

UNIDAD N° XI: SECUENCIACIÓN CAPILAR Y PIROSECUENCIACIÓN

Descripción y clasificación de las diferentes estrategias de secuenciación: secuenciación por el método de Sanger o terminación de cadena. Pirosecuenciación o Secuenciación *de novo*. Secuenciación Masiva en Paralelo (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*): secuenciación de tercera generación. Surgimiento y evolución de las tecnologías NGS. Plataformas de NGS: características. Mapeo, alineamiento y llamado de variantes. Algoritmo BLAST. Impacto de la técnica NGS en Biociencias. NGS en el estudio de microbiomas: metagenómica.

UNIDAD N° XII: MICROARRAYS

Conceptos básicos y fundamentos de la técnica. Estrategias de armado y organización de *arrays* en los diferentes tipos de análisis genéticos. Plataformas de análisis de *microarrays*. Aplicaciones del análisis de *microarrays* en microbiología. Estudios de microbiomas: alcances y limitaciones.

UNIDAD N° XIII: DESARROLLO, ESTANDARIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES: APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Alcances y limitaciones de cada herramienta en los diferentes campos de aplicación (microbiología clínica, industrial y ambiental). Ventajas y desventajas de las técnicas de análisis genético respecto de las pruebas tradicionales. Puesta en funcionamiento de las técnicas de análisis molecular. Validación de técnicas moleculares: sensibilidad analítica, límite de detección (LOD), especificidad, reproducibilidad, repetibilidad. Valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN). Programas de control externo de calidad: CAP (College of American Pathologists)

METODOLOGÍA DE ENSEÑANZA

Se tendrá un encuentro semanal, de 5 horas, de acuerdo con el cronograma de desarrollo propuesto con una modalidad teórico/taller. La introducción teórica expositiva permitirá introducir a los estudiantes en los contenidos de la unidad. Una vez concluida la actividad teórica y luego de una pausa, se procederá a la clase taller, donde se realizará la resolución de problemas, discusión de trabajos científicos y/o actividades prácticas de laboratorio, según corresponda, transformando de esta forma los contenidos vertidos en el teórico en actividades prácticas y participativas. Los trabajos prácticos de resolución de problemas, discusión de trabajos científicos, así como las prácticas experimentales serán realizadas dividiendo a la comisión en subcomisiones más pequeñas (entre 10 y 15 estudiantes), de manera tal de lograr una mayor interacción docente/estudiante y estudiante/estudiante, promoviendo la sinergia y el trabajo grupal. Bajo este esquema se pretende integrar el 100% de los contenidos.

Parte de la primera APO estará dedicada a la tracción del conocimiento generado en semestres o años anteriores, de manera tal que los estudiantes reconozcan un continuo sumativo en la adquisición de información y generación de conocimiento. El curso utilizará conocimientos adquiridos en asignaturas previas promoviendo la resignificación de los mismos para el desarrollo de las técnicas de análisis genético.

Asimismo, el curso se desarrollará de forma coordinada con los cursos de herramientas de Ingeniería Genética y Análisis Inmunológicos Aplicados a la Microbiología para lograr la integración de conocimientos de forma sinérgica. Se implementarán distintas estrategias metodológicas en el dictado del curso, que intentan ubicar al estudiante en un rol activo para la construcción del conocimiento y a los docentes como mediadores de esta construcción, con el desarrollo integral de los temas de cada APO.

Todos los materiales e información necesaria y requerida para el desarrollo del curso se encontrarán disponibles en el Aula Virtual Moodle, FCV-UNLP, con sincronización SIU-Guaraní. Los contenidos de Análisis Genéticos Aplicados a la Microbiología son elaborados y planificados por los integrantes afectados al desarrollo de la asignatura, quienes brindan información básica y complementaria para la organización del material didáctico del curso.

DESCRIPCIÓN DE LAS ACTIVIDADES TEÓRICAS Y PRÁCTICAS

■ Actividades teóricas

Para el desarrollo de cada APO se brindarán los contenidos teóricos, mediante clases expositivas, que tendrán entre 1 y 2 horas de duración, utilizando como apoyo audiovisual presentaciones en Powerpoint o programa similar, como marco de referencia para el posterior desarrollo de actividades prácticas y talleres.

■ Actividades prácticas

Las actividades prácticas se desarrollarán luego de la clase teórica y se llevarán a cabo utilizando guías de ejercitación que contemplan situaciones reales, donde se solicita la diagramación, desarrollo e implementación de herramientas de análisis genético para la resolución de problemas particulares.

Además, las guías incorporarán ejercicios que presenten resultados de laboratorio, para que los estudiantes puedan realizar una evaluación crítica e interpretación de los mismos.

Para la realización de los talleres se procederá a la lectura, interpretación y discusión de trabajos científicos, aplicados a cada uno de los temas dictados en el curso, estimulando el estudio comparativo y el pensamiento crítico. El curso contempla la realización de actividades experimentales, utilizando herramientas genéticas que permitan desarrollar en el estudiante destrezas específicas en el ámbito del análisis microbiológico.

Se realizarán actividades experimentales en el laboratorio que podrían incluir entre otras:

- A. Extracción de ácidos nucleicos: Para el desarrollo de esta actividad práctica se ensayarán diferentes protocolos de extracción de ácidos nucleicos (columnas de adsorción, buffer tritón, buffer PK), luego se cuantificará el material obtenido y se verificará la pureza del mismo mediante técnicas espectrofotométricas.
- B. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Para esta actividad práctica se procederá a la amplificación de un fragmento de ADN de la muestra purificada en la práctica anterior. La correcta amplificación se verificará por electroforesis en gel de agarosa.

En todos los casos, se contará con guías de actividades para orientar al estudiante en la organización del conocimiento. De esta manera se fomentará la actividad participativa y abierta a la discusión grupal de los contenidos, integrando los aportes que brindan los docentes y alumnos en la resolución de ejercicios.

METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN

Evaluación conceptual continua

Se realizará una evaluación conceptual de cada APO de carácter sumativo, con el objeto de llevar adelante un proceso de enseñanza - aprendizaje participativo con evaluación continua. Cuando las notas conceptuales de los cuestionarios califiquen en el rango de siete (7) a diez (10) puntos, se le otorgará un punto adicional al promedio de la evaluación formal sumativa. Esta evaluación no es de carácter obligatorio.

Evaluación formal sumativa

La acreditación de conocimiento será escrita y presencial, mediante dos parciales, con un tiempo para resolución de entre 1 y 2 horas, con tres instancias reglamentarias cada uno, que tienen como requisito la condición regular (75% del presentismo). Las evaluaciones consistirán en preguntas de fundamentos teóricos y su aplicación mediante ejercicios prácticos, de manera que nos permitan evidenciar la comprensión de las técnicas dictadas y sus posibles aplicaciones. Las evaluaciones podrán contener preguntas a desarrollar, problemas para resolver y/o preguntas de opciones múltiples. En el encabezado de la evaluación se consignará el número de preguntas de la evaluación, el valor de cada una y el tiempo para la resolución del mismo.

La calificación de cada evaluación se hará por el sistema de puntaje de 0 a 10 (cero a diez) puntos, logrando la aprobación con 4 (cuatro) puntos. La calificación final del curso se obtendrá del promedio de las 2 notas obtenidas en los parciales (última instancia acreditada), ajustada hasta en 1 (un) punto de acuerdo a la evaluación sumativa conceptual. Finalizado el curso, los alumnos que hayan obtenido una calificación promedio de 7 (siete) puntos o superior, reunirán las condiciones para aprobar el curso por promoción. Si el promedio es superior a 4 puntos, pero no logró obtener un promedio de 7 puntos o más, el estudiante deberá rendir una evaluación final integradora (EFI), la cual se aprobará con una nota de 4 puntos. La EFI constará de dos partes, una escrita con una metodología similar al parcial y otra oral.

Condición regular y Metodología para la Recuperación de APO

Asistencia para cada bloque (antes del primer parcial y antes del segundo parcial): para mantener la regularidad los estudiantes deberán estar presentes en el 75% de las APO. Si no alcanzó el 75%, pero asistió hasta el 60% de las APO, deberá recuperar las APO necesarias. Aquellos estudiantes que no alcancen el 60% de los presentes en las APO perderán la condición de regular.

La recuperación de APO se realizará mediante la resolución de un cuestionario de evaluación conceptual. Para la recuperación de las actividades prácticas de laboratorio deberán responder un cuestionario de preguntas específicas de la actividad experimental correspondiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Biología celular y molecular. Lodish H, y col. Ed. Médica Panamericana, 7a ed. 2017. 1 ejemplar disponible en la Biblioteca Conjunta.
- CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. Hryhorowicz M, Lipiński D, Zeyland J, Słomski R. (2017). Arch Immunol Ther Exp (Warsz). Jun;65(3):233-240. doi: 10.1007/s00005-016-0427-5. Epub 2016 Oct 3. PMID: 27699445; PMCID: PMC5434172.
- CRISPR-cas System as a Genome Engineering Platform: Applications in Biomedicine and Biotechnology. Hashemi A. Curr Gene Ther. 2018;18(2):115-124. doi: 10.2174/1566523218666180221110627. PMID: 29473500.
- CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. Sander JD, Joung JK. Nat Biotechnol. 2014 Apr;32(4):347-55. doi: 10.1038/nbt.2842. Epub 2014 Mar 2. PMID: 24584096; PMCID: PMC4022601.
- Introducción a la Biología Celular. Alberts B et al. Editorial Panamericana. Segunda edición y posteriores. 11 ejemplares disponibles en biblioteca.
- Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H. J Microbiol. 2015. 53(1):1-5. doi: 10.1007/s12275-015-4656-9. Epub 2015 Jan 4. PMID: 25557475.

- Molecular Cloning. Sambrook, J. & Russell D. Cold Spring Harbor (ed.). 3ra. edición. 2001. Disponible en la cátedra.
 - Microbiología Veterinaria. Stanchi N, y col. Ed. Intermédica, 2ª ed. 2019. Disponible en la cátedra.
 - Molecular diagnostic PCR handbook. Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J. R. (Eds.). Springer science & business media. 2005. Disponible en la cátedra.
 - Molecular diagnostic PCR handbook. Chapter 2: PCR the basic reaction. Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J. R. (Eds.). 2005. Springer science & business media. https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0_2.
 - Molecular diagnostic PCR handbook. Chapter 5: specific types of PCR assays. Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J. R. (Eds.). 2005. Springer science & business media. https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0_5
 - Molecular diagnostic PCR handbook. Chapter 3: amplicon detection, analysis, and PCR evaluation. Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J. R. (Eds.). 2005. Springer science & business media. https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0_3
 - Molecular diagnostic PCR handbook. Chapter 6: the PCR laboratory. Viljoen, G. J., Nel, L. H., & Crowther, J. R. (Eds.). 2005. Springer science & business media. https://doi.org/10.1007/1-4020-3404-0_6
 - Quantitative real-time PCR: Methods and protocols. Hellemans, J., & Vandesompele, J. (2014). Methods in Molecular Biology, 1160, 19-27. Disponible en la cátedra.
 - Real-time PCR handbook. Biosystems, A. Life Technologies: Carlsbad, CA, USA. 2015. Disponible en la cátedra.
 - Setting up a PCR laboratory. Mifflin, T. E. Cold Spring Harbor Protocols, 2007(7), pdb-top14. Disponible en la cátedra.
 - An introduction to Next Generation Sequencing Technology. Illumina Inc. 2017. https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf
 - Next Generation Sequencing Handbook. GenoHub. 2019. <https://genohub.com/next-generation-sequencing-handbook/>
 - Chapter 4: Microarrays: An Introduction and Guide to Their Use. Park FD, Sasik R & Reya T. 2017. In Basic Science Methods for Clinical Researchers, Pages 57-76. Academic Press. Disponible en la cátedra.
-