

PRIMER INFORME TÉCNICO TRIMESTRAL DEL PROYECTO TITULADO "FORTALECIMIENTO DE LAS CAPACIDADES INSTALADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA GOBERNACIÓN DEL HUILA Y LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA PARA ATENDER PROBLEMÁTICAS ASOCIADAS A AGENTES BIOLÓGICOS DE ALTO RIESGO PARA LA SALUD HUMANA EN EL DEPARTAMENTO DEL HUILA" PRESENTADO POR LA UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA - LABORATORIO DE INFECCIÓN E INMUNIDAD.

Fecha: 10 de noviembre del 2020.

Introducción

Este primer informe trimestral incluye las actividades realizadas por la Universidad Surcolombiana – Laboratorio de Infección e Inmunidad, durante los meses de agosto – septiembre – octubre del 2020 en el marco del proyecto colaborativo código BPIN 2020000100145. Para presentar el actual informe se tomaron como base los avances realizados que se presentan siguiendo el orden de las actividades que se adelantan con la propuesta descritas tanto en el documento técnico como en la MGA final aprobada del proyecto.

Objetivo general

Fortalecer la infraestructura para el desarrollo de investigación para atender problemáticas asociadas con agentes biológicos de alto riesgo para la salud humana del departamento del Huila.

Actividades para lograr este objetivo y avances realizados:

Compra e instalación de equipos

Para desarrollar esta actividad, se ha prestado el soporte y se ha dado respuesta a preguntas e inquietudes necesarias para que se cumpla con la adquisición de los equipos planeados y que respondan a las necesidades técnicas y de calidad de la

propuesta. Dentro de la continua comunicación con la entidad ejecutora se ha establecido que el proceso de adquisición de los equipos ha avanzado considerablemente. Como consecuencia de esto, el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Facultad de Salud recibió el primer lote de ellos que corresponde al 70% del total de equipos asignados. Se estima que como esta planeado en el documento original, la entrega total de los equipos a las dos instituciones se efectúe dentro de los primeros 3 meses desde el inicio de ejecución del proyecto.

Adquisición de insumos para laboratorio

Desde el Laboratorio de Infección e Inmunidad se ha apoyado la actualización de algunas cotizaciones de los reactivos necesarios para desarrollar la propuesta. Además, se ha verificado la calidad y especificidad de los reactivos a adquirir. También, se han verificado una a una las secuencias de primers/sondas a adquirir (Específicamente las de los *Flavivirus*). En 3 reuniones con la Coordinación del proyecto se apoyó el análisis de los reactivos que mayores ventajas presentaron para la fácil y confiable realización de los ensayos originalmente planeados. Se apoyó con proporcionar opciones de proveedores calificados, sus contactos electrónicos y telefónicos para la adquisición de los reactivos propuestos.

Apoyo a la selección y formación de personal calificado

Desde la etapa de pre-ejecución de la propuesta se ha apoyado este proceso proporcionando opciones de personal idóneo para su vinculación a la propuesta. Para esto, se realizó un anuncio público a través del Colegio de Bacteriólogas del Huila, informando a cerca de la necesidad de vinculación de personal. En total, se recibieron 8 hojas de vida de profesionales en Bacteriología, que fueron analizadas. Posteriormente se realizaron entrevistas presenciales (siguiendo las medidas de bioseguridad) o virtuales para conocer las aptitudes, capacidades técnicas, experiencia, formación, disponibilidad de tiempo y otras (ver **Anexo 1**). De las hojas de vida evaluadas y las entrevistas realizadas se seleccionaron dos profesionales basado en el cumplimiento los aspectos anteriores sumado a aquellas que tuvieran mayor experiencia o conocimientos en biología molecular y ensayos serológicos, que son los dos ejes metodológicos del proyecto. Estas opciones fueron enviadas a la entidad ejecutora para su respectivo análisis y la toma final de la decisión. Sin

embargo, una de las candidatas terminando el proceso de contratación decidió no vincularse al parecer por problemas de salud (ver **Anexo 2**). Una vez conocida esta situación, inmediatamente se procedió a buscar nuevas candidatas y se analizaron 3 hojas de vida nuevas y se realizaron las respectivas entrevistas. Basado en criterios de calidad y experiencia, se seleccionó a una nueva candidata que fue propuesta a la entidad ejecutora como una alternativa (ver **Anexo 3**). Al final del mes de septiembre se me ha hecho saber que la última profesional se vinculó oficialmente al proyecto.

Una vez conocida las personas vinculadas a la propuesta que desarrollarán sus actividades en el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Universidad Surcolombiana, se procedió a apoyar la gestión para que las profesionales recibieran tan pronto como posible, el curso de entrenamiento teórico-práctico en el diagnóstico de enfermedades virales emergentes, actividad ya seleccionada y que ya había sido tomada por las otras dos profesionales vinculadas. Se acordó finalmente con la entidad que ofrece el entrenamiento que las últimas dos profesionales tomarán esta actividad de formación iniciando el 05 de octubre del 2020. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para enviar al total del personal vinculado al proyecto, el entrenamiento debió ser aplazado para iniciar el 09 de noviembre. La justificación es que en la víspera del viaje reprogramado varias veces las profesionales se infectaron con SARS-CoV-2 y tuvieron que aislarse y recibir el respectivo tratamiento e incapacidad. Este evento ocurrió de forma secuencial y aplazó el plan de formación con respecto al cronograma original (ver soportes de historias clínicas, incapacidades y prueba confirmatoria en **Anexo 4** y **Anexo 5**). Sin embargo, el personal vinculado ha asistido regularmente a recibir capacitación en técnicas moleculares en la Secretaría de Salud Departamental del Huila (SSDH). De notar, este riesgo específico ya estaba considerado dentro de la planeación del proyecto y fue descrito en la Tabla de análisis de riesgo-Alternativas de la MGA del proyecto como un tipo de riesgo asociado a fenómenos de origen biológico: Plagas, epidemias, además de un riesgo de tipo sanitario (Pag. 20 de la MGA). Como se demuestra en los anexos 4 y 5, a las profesionales infectadas se les realizó la confirmación virológica y el seguimiento apropiado para su patología, siguiendo los protocolos nacionales del Ministerio de Salud y las medidas de mitigación mostradas en la MGA original del proyecto.

Una de las actividades críticas en la que se ha invertido gran cantidad de esfuerzo en el Laboratorio de Infección e Inmunidad, es en la adopción y verificación de las políticas del sistema de gestión de calidad, proceso dirigido por una de las bacteriólogas vinculadas además de contar con el acompañamiento del sistema de



gestión de calidad (SGC) de la Universidad, esto con el objetivo de solicitar la visita de verificación de la SSDH para obtener el aval del INS y poder entrar a realizar la identificación viral del SARS-CoV-2 por técnicas moleculares como laboratorio de apoyo del Laboratorio de Salud Pública Departamental. Las actividades realizadas en este sentido van certificadas por el SGC de la Universidad Surcolombiana y por documentos internos (ver **anexo 6 y 7**). De notar, la solicitud de visita de verificación ya fue radicada ante la SSDH por vía electrónica y física (ver **Anexos 8 y 9**). Adicionalmente, se avanzó en la gestión del establecimiento del convenio entre la Universidad Surcolombiana y el Instituto Nacional de Salud (INS) para poder entrar en la Red de Apoyo Diagnóstico para COVID-19. De hecho, el Rector de la Universidad Surcolombiana ya firmó dicho convenio (ver **Anexo 10**) y fue remitido al INS donde actualmente esta en análisis para su próxima firma.

Mantenimiento y calibración de equipos

Para ayudar en el cumplimiento de este compromiso, se pasó el listado de los equipos originalmente planeados del inventario del Laboratorio de Infección e inmunidad – Universidad, Surcolombiana a la entidad ejecutora. El mantenimiento de los equipos del Laboratorio de Infección e inmunidad ya fue realizado y recibido a satisfacción. Aún esta pendiente la realización de la calibración de los equipos que la requieren.

Adecuaciones e Infraestructura para la Investigación

Los planos iniciales fueron mostrados en la primera reunión de pre-instalación de la mesa técnica realizada entre la Gobernación del Huila y la Universidad Surcolombiana llevada a cabo en el mes de julio del 2020 (puede ser corroborado por videograbación, si requerido). Atendiendo apropiadas sugerencias realizadas por la SSDH, la primera de ellas relacionada con la distribución de los espacios por temas de bioseguridad y la segunda por la inclusión de estrategias que permitieran el incremento de los niveles de seguridad debido al alto costo de los equipos instalados, la distribución de espacios se modificó por parte de la Unidad de Planeación de la Universidad desde los planos inicialmente pensados. Después de la introducción de dichos cambios, los diseños que habían sido sometidos por correo electrónico, fueron adicionalmente “radicados” siguiendo las instrucciones de la SSDH para tal fin (ver **Anexos 11, 12 y 13**).

Sin embargo, asumiendo que las adecuaciones pudieran tomar más tiempo de lo planeado, se buscó un plan alternativo que permitiera realizar rápidamente los procedimientos necesarios para la búsqueda de personas infectadas con el SARS-CoV-2 en apoyo a la SSDH. Con el apoyo de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, se evaluó la opción de adecuar un espacio relativamente aislado dentro de la Facultad de Salud ubicado en el primer piso – usados originalmente como Gimnasio y Bioterio -. El espacio otorgado fue acondicionado con todas las medidas básicas de bioseguridad y diseño necesarias para que en el respectivo lugar se realice la recepción, registro y el desembalaje provisional de las muestras de pacientes COVID-19 enviadas por la SSDH. Esta área ha sido a la larga, la más importante limitante para los laboratorios que desean apoyar el diagnóstico de la infección por Coronavirus. Imágenes de dicha zona, adecuada como plan alternativo provisional se muestran como Figura 1.



Figura 1. Espacio alternativo básico, adecuado temporalmente por la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana, como zona de recepción, registro y desembalaje de las muestras de pacientes sospechosos de COVID-19. En panel A se nota la ventana abatible para la recepción de muestras, junto con un mesón de granito con servicio de agua. Red con estabilidad eléctrica. En

panel B se nota la dotación del espacio con cabina de bioseguridad A2, equipo de refrigeración, regulación de ambiente con aire acondicionado, paredes, piso y techo lavables. Panel C, muestra equipo de ultracongelación.

Con la importante mejora en los sistemas de gestión de calidad y con las adecuaciones provisionales realizadas por la Universidad, se solicitó la visita para obtención de aval por parte de la SSDH, que esta pendiente por ser realizada próximamente.

Validación de pruebas moleculares para detección de SARS-CoV-2 y *Flavivirus* localmente.

Para cumplir este objetivo, se incluyeron en el Sistema de Gestión de la Calidad los protocolos de laboratorio necesarios. Para el caso del SARS-CoV-2 se radicó el protocolo Berlín-Charité, además de protocolizar la detección del virus por el uso del estuche comercial de la empresa Certest llamado VIASURE (Ref: VS-NCO212H), uno de los estuches comerciales más usados en Colombia para el diagnóstico de COVID-19, según datos del Instituto Nacional de Salud (INS. 2020). Con el apoyo de la SSDH quien proporcionó una serie de muestras de hisopado nasofaríngeo ya caracterizadas y previamente inactivados, además del estuche comercial antes mencionado, se realizó el primer ensayo de validación de la detección de SARS-COV-2 en el Laboratorio de Infección e Inmunidad. Todos los resultados fueron obtenidos en ciego, pues el personal de la Universidad Surcolombiana no conocía los resultados de las pruebas de las muestras suministradas por la SSDH.

Las muestras fueron llevadas al área de desembalaje, el espacio provisionalmente adecuado por la Universidad que se describió anteriormente y allí fueron recibidas, registradas y desembaladas, siguiendo los protocolos de bioseguridad y con todos los elementos de protección personal que fueron también suministrados por la Universidad Surcolombiana. Las muestras inactivadas fueron llevadas al equipo de aislamiento automatizado de ácido nucleico y posteriormente se realizó la amplificación siguiendo las recomendaciones del fabricante. Los resultados del primer ensayo de validación de la prueba fueron buenos. Como mostrado en la Figura 2, el control positivo (2A) y negativo (2B) de la placa funcionaron adecuadamente. Además, un control negativo extra que estaba constituido por la adición de agua con calidad de biología molecular durante el paso de la extracción automatizada del

RNA, también funcionó sin contratiempos y descartó contaminación cruzada de las muestras (Figura 2C).

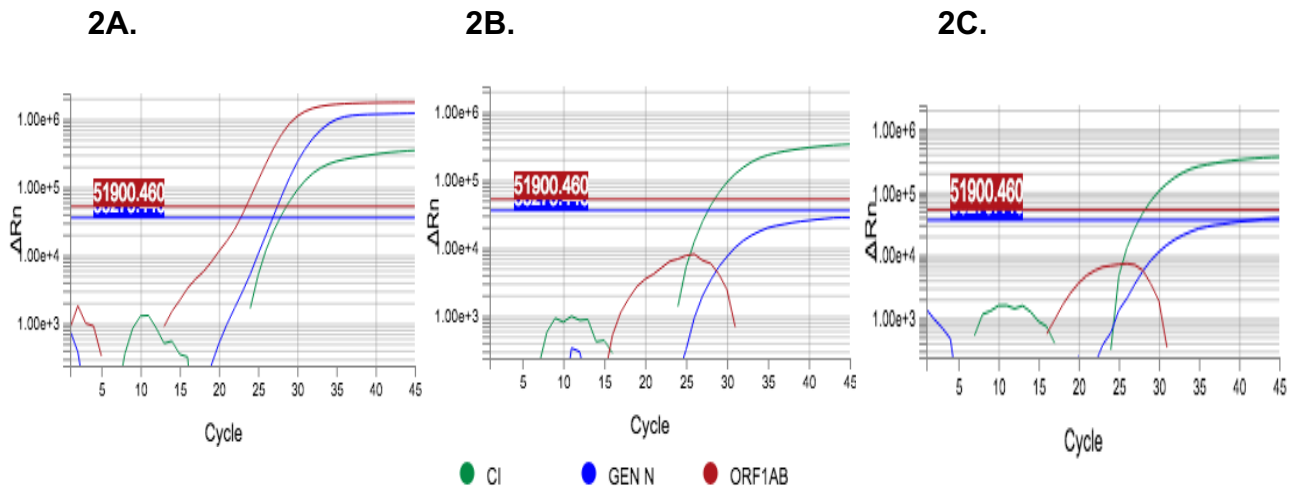


Figura 2. Curvas de amplificación de RT-qPCR obtenidas con el primer experimento de validación. Amplificación en formato multiplex de el gen N (azul), gen ORF1AB (rojo) del SARS-CoV-2 y un control de amplificación interno (verde) del estuche comercial en cada plot es mostrado. Gráficas muestran resultados obtenidos con un control positivo (1A), un control negativo del estuche (1B) y un control negativo adicional correspondiente a la adición de agua de calidad de biología molecular a un pozo al momento de la extracción automatizada del RNA. Los valores de “threshold” automático calculado para cada marcador son mostrados como una línea horizontal del respectivo color del marcador viral evaluado. Nótese que, en los dos controles negativos, las curvas de amplificación de los genes virales N y ORF1AB, no sobrepasan su valor umbral establecido automáticamente.

De las muestras enviadas por la SSDH, se lograron analizar 35. De ellas. 30 fueron completamente interpretables y claras, como mostrado en la Figura 2. Hubo 5 cuyo resultado fue dudoso teniendo en cuenta la forma de la curva de amplificación y el número de ciclo en el que los genes virales pasaron el umbral con respecto al control interno (Figura 3).

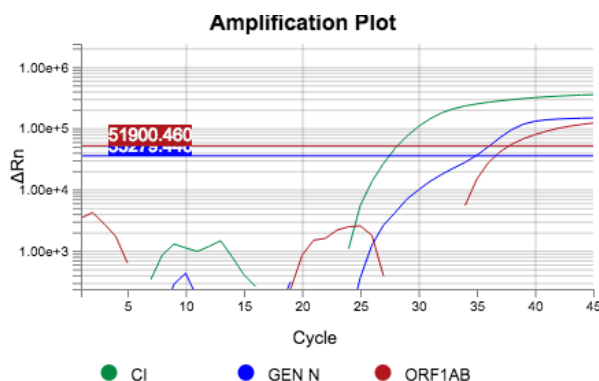


Figura 3. Gráfica de resultado de una muestra clínica de hisopado nasofaríngeo evaluada en el Laboratorio de Infección e Inmunidad de la Universidad Surcolombiana para la identificación de SARS-CoV-2 por RT-qPCR. Debido los valores del Ct de los genes N y ORF1AB con respecto al control interno y a la forma de la curva de amplificación generada, esta muestra fue repetida.

Estas dudas fueron resueltas en el curso de capacitación en Biología Molecular que el personal adscrito al proyecto tomó en el Instituto de Virología de la Universidad El Bosque. Un completo informe de este primer ensayo de validación de prueba de RT-qPCR para SARS-CoV-2 puede ser encontrado junto al presente documento (ver Anexo 14). Este informe de validación fue también remitido a la SSDH para su análisis y actualmente estamos en espera de conclusiones para realizar otros ensayos de validación lo antes posible.

En cuanto a la validación de pruebas moleculares para detección de *Flavivirus* (Dengue virus [DENV] y Zika virus [ZIKV]), se apoyó a la SSDH en el análisis de los materiales necesarios para iniciar esta actividad. Esto incluyó la revisión de las secuencias de sondas y primers para la detección de DENV y ZIKV, cuando la SSDH lo requirió. Planeando las actividades necesarias para la validación de la RT-qPCR para DENV y ZIKV, se consolidó la búsqueda de pacientes con infección sospechosa por *Flavivirus*, que tuvieran al menos un test microbiológico directo o indirecto, ya sea la presencia de antígeno viral circulante (NS1 viral) o la presencia de IgM-virus específica en plasma, además, que el número de días de síntomas hasta el momento de la toma de la muestra no superaran los 5 días (fase aguda de la infección). Todo esto es necesario para iniciar la validación de la detección molecular de los *Flavivirus*, cuando los reactivos para tal fin lleguen a las dos instituciones. A la fecha, se ha consolidado un grupo caracterizado de muestras clínicas de plasma (confirmadas positivas y negativas), de n=150 de infección por DENV. Para incluir los plasmas agudos de pacientes con infección confirmada de ZIKV se solicitó ayuda a la SSDH quienes confirmaron que tienen especímenes que cumplen los anteriores criterios.

Validación de ensayos serológicos para SARS-CoV-2 y Flavivirus.

Para la validación de los test serológicos para SARS-CoV-2, DENV y ZIKV, se avanzó en el diseño de estrategias para obtener muestras clínicas caracterizadas que tuvieran evidencia de infección confirmada con estos patógenos. Estas muestras son críticamente requeridas para la validación de los test serológicos de los 3 virus. Debido a que la SSDH no colecta muestras de plasma o suero de

pacientes COVID-19 ni realiza ensayos serológicos de este virus, se escribió una propuesta de investigación titulada “ANÁLISIS DE LA RESPUESTA DE ANTICUERPOS SARS-CoV-2 ESPECÍFICOS Y CITOQUINAS CIRCULANTES Y SU ASOCIACIÓN A DISFUNCIÓN ORGÁNICA: ESTUDIO MULTICÉNTRICO DEL SUR DE COLOMBIA”, que esta adscrita al proyecto macro original y que tiene como uno de sus objetivos identificar anticuerpos de isotipo IgM e IgG específicos contra SARS-CoV-2 en plasma en una etapa temprana (3-7 días) y otra posterior (8-20 días) desde el inicio de los síntomas. Esta propuesta incluye a otras dos importantes instituciones de salud del Departamento del Huila como son el Hospital Universitario de Neiva y el Hospital Departamental San Vicente de Paúl de Garzón Huila, lo que aumenta y fortalece significativamente la red pública de departamental de investigación en torno al COVID-19. Los Comités de Bioética de ambas instituciones analizaron y aprobaron el respectivo estudio, se adjuntas actas de aprobación por parte de los Comités de Bioética (ver **Anexos 15 y 16**). Usando esta estrategia, a la fecha se han logrado incluir 70 muestras de plasmas de pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2, 20 de ellas pareadas en etapas tempranas y tardías, desde el mismo paciente.

Con respecto a DENV, como mostrado en el documento técnico original de la propuesta, la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana tiene un grupo de muestras de plasma de pacientes pediátricos con infección sospechosa o confirmada por DENV colectadas en el Hospital Universitario de Neiva que cubre epidemias de algunos años atrás, así que los especímenes caracterizados que permiten la validación de la detección de anticuerpos específicos de los dos isotipos para DENV están disponible y en espera de la recepción de los reactivos necesarios para tal fin. Por otro lado, la validación de tests serológicos para ZIKV tiene un mayor grado de dificultad debido a la baja frecuencia de casos que se reportan en el departamento desde que la epidemia 2015-2016 pasó. De hecho, el acumulado esperado de casos para el 2020 en el departamento es de 20, aunque a la fecha, sólo 1 ha sido reportado a nivel departamental (Boletín Epidemiológico Semanal – BES. Semana 44. INS). Para sortear esta dificultad, se solicitó apoyo a la SSDH quien confirmó que tiene especímenes criopreservados de infección confirmada por ZIKV tomados durante la epidemia 2016.

Conclusiones

Como entidad aliada de la SSDH, la Universidad Surcolombiana ha cumplido con las actividades originalmente descritas según el cronograma aprobado en la



propuesta. El personal ha sido vinculado a la propuesta y se encuentra trabajando en ella. Este personal fue formado en dichas técnicas según lo planeado. El mantenimiento de equipos fue ya realizado. Los nuevos equipos fueron también recibidos en su gran mayoría. En el caso de las adecuaciones, se prevé que esta actividad tomará más tiempo de lo esperado, por lo tanto, la Universidad Surcolombiana ha buscado alternativas que permiten el avance de las actividades planeadas, minimizando así retraso en la obtención de los resultados esperados. Esto se logró acondicionando provisionalmente un espacio que cumpliría con los aspectos mínimos de bioseguridad y dotación técnica para el recibido, registro y desembalaje de las muestras de pacientes sospechosos de infección con SARS-CoV-2. Basados en esto además de mejoras implementadas por el Sistema de gestión de Calidad, actualmente se está en espera de recibir la visita de verificación de las condiciones de Laboratorio por parte de la SSDH para obtener su aval. Se tramitó por parte de la Universidad el convenio con el INS que permite la realización de pruebas de detección molecular de COVID-19 y esta en estudio por parte del INS. Se están recolectando las muestras clínicas de plasma de infección por DENV, ZIKV y SARS-CoV-2 en fases agudas y convalecientes que permitan la ágil validación de los tests tanto moleculares como serológicos originalmente planeados.

Referencias

- Instituto Nacional de Salud. Pruebas para la detección molecular de SARS-CoV-2 por RT-PCR usadas en Colombia. 2020.

Boletín Epidemiológico Semanal – BES. Semana 44. INS

CARLOS FERNANDO NARVÁEZ MD., Ph.D.

Jefe División de Inmunología
Departamento de Pediatría y Básicas
Facultad de Salud
Universidad Surcolombiana
cfnarvaez@usco.edu.co

