



IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS ASOCIADOS AL SÍNDROME FEBRIL
AGUDO INDIFERENCIADO EN PACIENTES DE LA CIUDAD DE CÚCUTA,
NORTE DE SANTANDER

MANUEL GONZALEZ RAMIREZ

Trabajo de grado

Asesor, docente

Laura Silvana Pérez Restrepo

UNIVERSIDAD EAFIT
ESCUELA DE CIENCIAS APLICADAS E INGENIERÍA
BIOLOGÍA
MEDELLÍN
2024

Resumen

El Síndrome Febril Agudo Indiferenciado (SFAI) es una enfermedad causada por una amplia diversidad de parásitos, virus y bacterias, debido a esto es un reto detectar la etiología de esta enfermedad con pruebas de diagnóstico convencionales (Inmunofluorescencia, Elisa, hemocultivos, entre otras), lo que puede aumentar el riesgo de transmisión hasta convertirse en una enfermedad potencialmente epidémica por la ausencia de un tratamiento apropiado y estrategias de control. Es aquí donde estrategias como la metagenómica se presentan como herramientas prometedoras para afrontar el desafío de identificar patógenos causantes del SFAI, al permitir la detección de cualquier microorganismo en una muestra biológica. En el presente trabajo identificamos los potenciales patógenos asociados al SFAI en un grupo de pacientes con este padecimiento en la ciudad de Cúcuta en el departamento de Norte de Santander en el periodo prepandémico que abarca desde febrero del 2019 a febrero del 2020. Para este estudio se utilizaron las muestras de suero de estos pacientes enrolados en el tiempo especificado, los cuales no habían tenido un diagnóstico concluyente para su enfermedad febril. Con el fin de identificar el patógeno causante de la SFAI realizamos un tamizaje inicial con diferentes PCRs para la detección de los virus Dengue, Zika, Chikunguña, Mayaro y los parásitos *Plasmodium falciparum* y *vivax* causantes de la Malaria. Las muestras negativas a estas pruebas moleculares se secuenciaron por un protocolo de análisis metagenómico. Del tamizaje inicial con pruebas moleculares se observaron 150 casos de dengue, 28 casos de malaria y 17 muestras dieron resultados negativos a todas las PCRs usadas. En el análisis

metagenómico se obtuvo lecturas para 14 especies microbianas y 2 virales que están relacionadas con el SFAI. En este estudio se observó una alta prevalencia del virus Dengue en la población de estudio, además observamos, como la metagenómica tiene un alto potencial para detectar múltiples posibles patógenos en una muestra biológica de pacientes con SFAI. Finalmente, realizamos recomendaciones que podrían ayudar a mejorar la sensibilidad de la secuenciación metagenómica, con el fin de obtener suficientes lecturas de los patógenos que nos permitan generar genomas consensos, los cuales se necesitan para realizar otros análisis confirmatorios que nos permitirían concluir si el patógeno detectado realmente puede estar relacionado con la enfermedad.

Introducción

El SFAI se define como un incremento súbito de la temperatura, acompañado de otros síntomas causados por una amplia variedad de patógenos [1]. La fiebre tiene múltiples etiologías, en donde se incluyen para el caso de Suramérica las infecciones por parásitos protozoarios como *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium vivax*, causantes de la Malaria; infecciones causadas por los arbovirus como Dengue, Zika y Chikungunya, además de infecciones por algunas especies bacterianas como *Leptospira* y *Rickettsia*, entre otros [36].

En general la persistencia y aparición de las enfermedades infecto-contagiosas con manifestación clínica asociada al SFAI son el resultado de una compleja dinámica entre procesos sociales, económicos, culturales y biológicos que genera diversos niveles de

vulnerabilidad [33]. Es el caso de las enfermedades arbovirales que se ven fuertemente influenciadas por efectos como el cambio climático que influyen en la distribución de las poblaciones de los vectores, la modificación de la frecuencia de la picadura y la reducción o aumento del periodo de incubación de los microorganismos causantes de enfermedad en humanos [34-35].

En el caso de Colombia, se estima que cerca de 12 millones de personas se encuentran expuestas a enfermedades como la Malaria [32]. En el año 2023 se registraron un total de 102.457 casos confirmados para esta enfermedad, donde predomina la infección por *P. vivax* con 63% (64.565), seguido de *P. falciparum* con 35,9% (36.814) y se notificaron 1.713 casos de malaria complicada [36]. En el caso del virus Dengue se registraron en el país en este mismo año, cerca de 131.784 casos y 355 muertes [36]. Observándose un gran impacto económico, morbilidad y la mortalidad causados por estas enfermedades. Es así como tenemos en nuestro país más de 60 enfermedades infecto-contagiosas causantes de SFAI, consideradas de interés en salud pública [2] que exhiben manifestaciones clínicas muy similares lo que representa un grave problema para la identificación del patógeno causante de la enfermedad, sobre todo en poblaciones donde no se cuenta con los recursos necesarios para el diagnóstico adecuado y preciso.

Teniendo en cuenta que existe una amplia gama de patógenos que pueden ser responsables de la enfermedad febril [3] la identificación específica de los patógenos asociados al SFAI

debe ser prioritaria y deben aplicarse medidas de control, prevención y tratamiento adecuadas, para evitar posibles brotes y disminuir la morbilidad y mortalidad [32].

Los recientes avances tecnológicos en las ciencias ómicas, como la secuenciación metagenómica, se presenta como una herramienta prometedora para afrontar el desafío de identificar etiologías de la fiebre, al permitir la detección de agentes infecciosos en una muestra biológica. Cabe resaltar que la detección de estos patógenos puede ayudar al diseño de diagnósticos dirigidos y a mejorar la vigilancia epidemiológica de los países de bajos y medianos ingresos como en el caso de Colombia [4].

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente trabajo se realizó en primer lugar una detección molecular, aplicando técnicas tradicionales de diagnóstico (PCR) y finalmente usamos una secuenciación y análisis metagenómico de los potenciales patógenos asociados al SFAI en un grupo de pacientes en la ciudad de Cúcuta, en Norte de Santander en el periodo pre-pandémico que va desde febrero del 2019 a febrero del 2020.

Resultados

Aspectos demográficos de los pacientes con SFAI

Este estudio se enrolaron 193 personas que ingresaron al Hospital Eramos Meoz en la ciudad de Cúcuta, en el Norte de Santander, con síntomas de enfermedad febril y los cuales decidieron hacer parte de este estudio firmando un consentimiento informado para a toma de muestras (protocolo aprobado por el comité de ética aval ICT-2016-1). Los pacientes

enrolados tenían edades desde los 5 a los 80 años. La edad media fue de 15 años y de estos el 49.3% eran mujeres y el 50,7% fueron hombres (Figura 1).

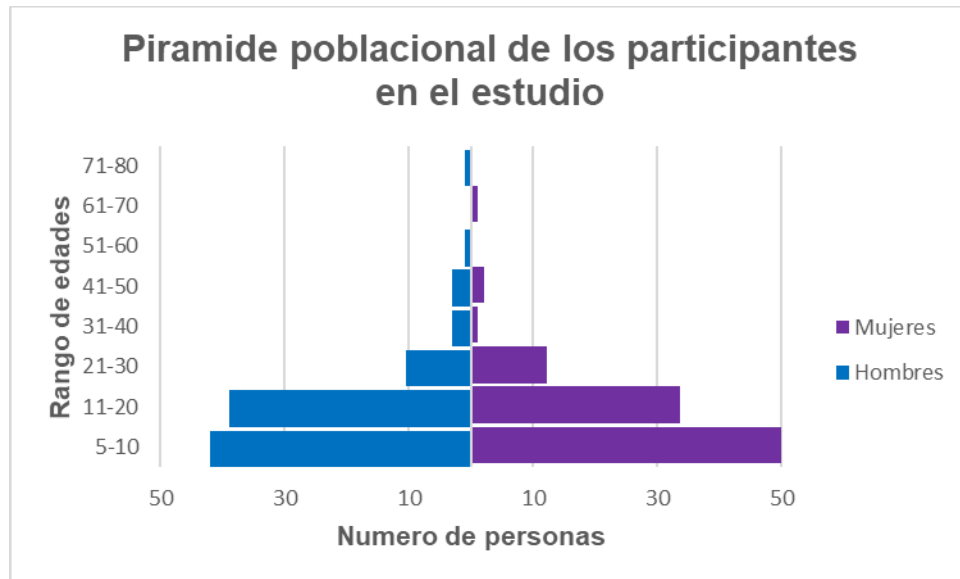


Figura 1. Pirámide poblacional de los participantes en el estudio.

Hallazgos de las pruebas de laboratorio

De las 193 muestras de suero procesadas por las PCRs, 150 muestras fueron positivas para Dengue y 26 para Malaria, y solo 17 muestras restantes fueron negativas a todos los patógenos (Figura 2A). Cabe resaltar que no se encontraron pacientes positivos para los virus Zika, Chikunguña o Mayaro. En la figura 2B y 2C se puede observar la distribución de los casos de Dengue y Malaria a lo largo del periodo de muestreo.

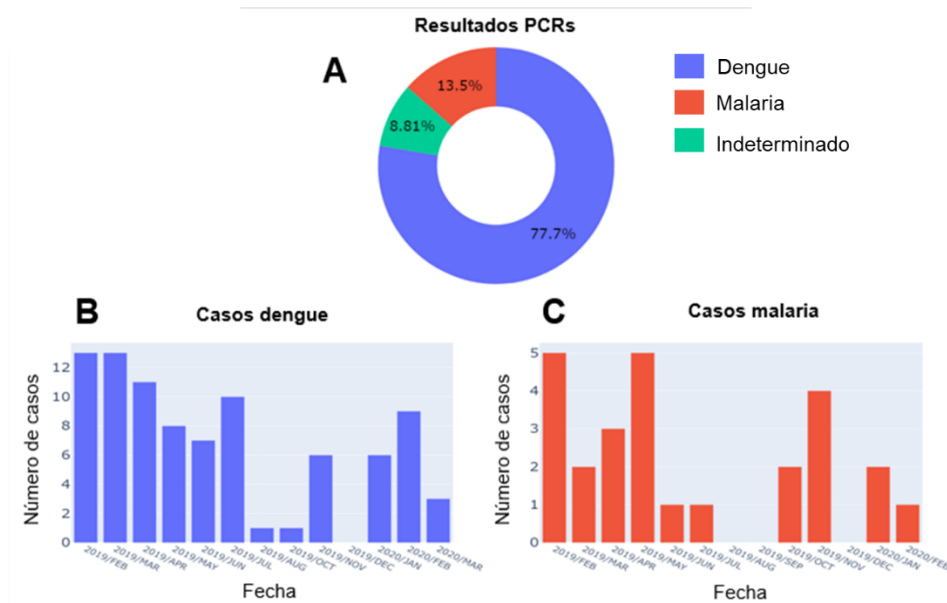


Figura 2. A. Resultados del tamiz molecular para detectar los patógenos causantes de Dengue, Malaria, Zika, Chikunguña y Mayaro. B. grafica de distribución de casos de dengue en el periodo de estudio. C. grafica de distribución de casos de malaria en el periodo de estudio.

Los principales síntomas que reportaban los pacientes al momento del enrolamiento, además de la fiebre, fueron, dolor de cabeza (79%), debilidad (74.6%), dolor en los huesos y articulaciones (72%), dolor abdominal (67%), vomito (58%) y dolor muscular (55,6%). Se observó que el 42% de las personas que tenían Malaria, también presentaron diarrea, mientras que solo el 24% de las personas con virus Dengue presentaron este síntoma (Figura 3).

Sintomas	Dengue	Malaria	Indeterminados
Dolor de cabeza	80%	69%	88%
Dolor muscular	64%	50%	53%
Dolor de óseo	78%	62%	76%
Dolor Retro orbital	55%	50%	53%
Ojos rojos	7%	8%	0%
Escalofrios	59%	50%	47%
Dolor Abdominal	74%	62%	65%
Debilidad	78%	69%	76%
Erupcion cutanea	50%	50%	35%
Mareo	33%	46%	59%
Vomito	59%	62%	53%
Hemorragias	20%	12%	12%
Diarrea	24%	42%	18%
Ictericia esclerotica	1%	0%	0%
Cianosis	1%	0%	0%
Petequias	16%	12%	12%

Figura 3. Mapa de calor mostrado el porcentaje de pacientes con sus síntomas reportados y la distribución de los patógenos identificados

Hallazgos de secuenciación metagenómica.

La secuenciación metagenómica solo se les realizó a las 17 muestras que fueron indeterminadas o negativas después de hacer la ronda de PCRs para identificar el patógeno. De estas 17 muestras secuenciadas se obtuvo una media de 1,32 millones de lecturas de extremos pareados por muestra. Luego de aplicar los filtros de control de calidad del programa CZid y el filtrado de las secuencias del hospedero se asignaron identidades taxonómicas en promedio de 12,88% de las lecturas de cada muestra; el porcentaje para cada una de las muestras se encuentra en la Figura 4A. Es de resaltar que en promedio el 87,12% de las lecturas obtenidas fueron del hospedero humano.

Al evaluar el porcentaje de lecturas que se mapearon a algún posible patógeno se obtuvo que, solo el 2.62% de las lecturas que pasaron los filtros de calidad se alinearon a posibles patógenos (Figura 4B). Estas lecturas fueron clasificadas en cuatro categorías taxonómicas: bacterias, eucariotas, arqueas y virus. De esta manera el 95% de las lecturas fueron asignadas a bacterias, el 4,21% a eucariotas, el 0,529% a virus y el finalmente el 0.299% a arqueas (Figura 4C), la abundancia de cada una de las categorías taxonómicas para cada muestra se puede observar en la Figura 4D.

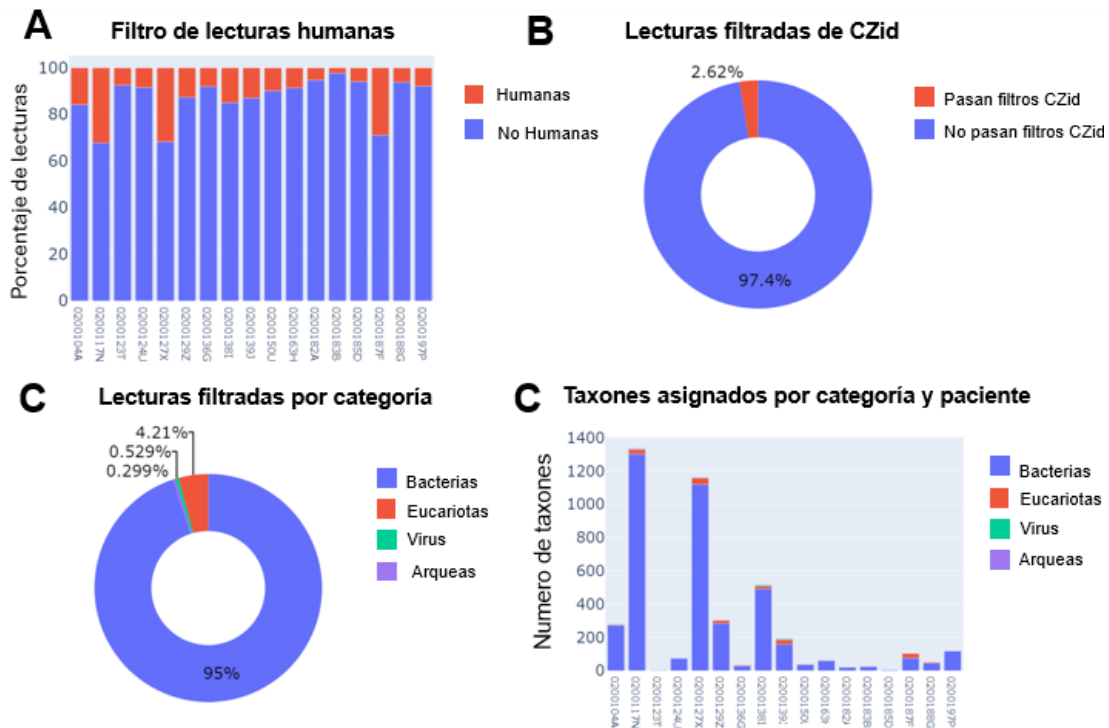


Figura 4. Reporte datos de secuenciación luego de realizar el filtrado en CZid. (A) porcentaje de lecturas que pasaron los filtros de calidad y el filtrado de las secuencias humanas. (B) porcentaje de lectura que pasaron los filtros de CZid para encontrar posibles patógenos. (C) lecturas asignadas a posibles patógenos por categorías

taxonómicas. **(D)** número de posibles patógenos que presentaron lecturas en cada de las muestras de los pacientes.

Finalmente, se filtraron los datos para obtener solo las lecturas que fueron alineadas a patógenos conocidos (Figura 5). Cabe resaltar que este análisis se centró en patógenos humanos que previamente se han relacionado con enfermedades febriles, por esto se descartaron los patógenos de plantas y animales no humanos identificados, además de eliminar microorganismos responsables de infecciones cutáneas.

Las lecturas fueron alineadas a un total de 14 especies microbianas y 2 virales, de las cuales solo los microorganismos *Streptococcus oralis*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus gordonii*, *Mycobacterium abscessus* y *Human respirovirus 1* fueron registros únicos (presentes en un solo paciente). los demás microorganismos estuvieron presentes en dos o más pacientes, siendo *Serratia marcescens*, la posible bacteria más comúnmente identificada en los pacientes (6 muestras). En 7 muestras de pacientes no se detectaron patógenos, en 6 muestras se observó lecturas para varios patógenos y solo 3 muestras tenían lecturas asociadas a un solo patógeno bacteriano (Figura 5A, B).

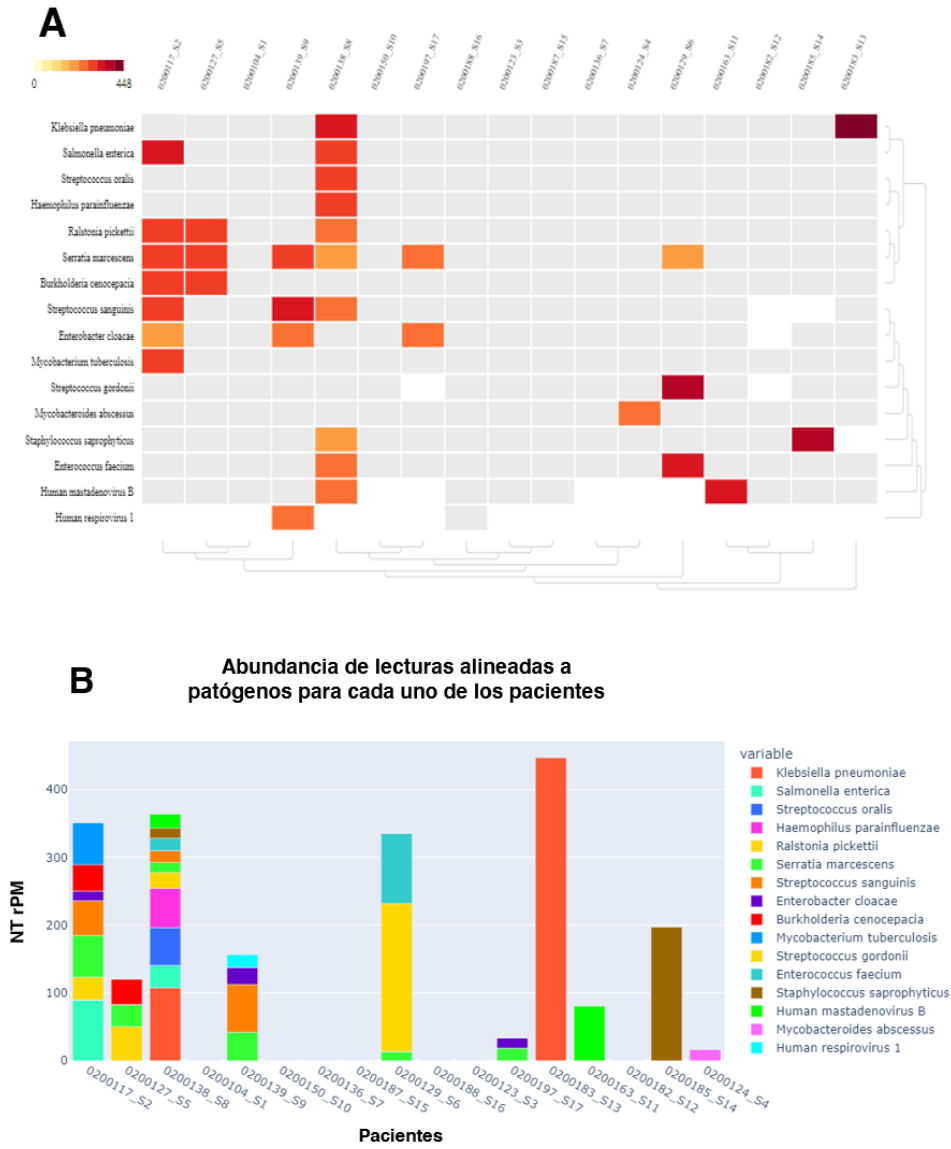


Figura 5. Abundancia de lecturas alineadas a patógenos en cada una de las muestras. **(A)** mapa de calor del recuento de lecturas por millón (NT rPM) para cada uno de los pacientes. **(B)** diagrama que muestra las lecturas por millón alineadas a patógenos asociadas a cada uno de los pacientes.

Discusión

Este estudio muestra como en el periodo prepandemico de febrero de 2019 a febrero del año 2020, se registró un total de 150 pacientes positivos para el virus Dengue, 26 positivos para Malaria y solo a 17 pacientes no se les pudo identificar el patógeno causante de la fiebre (indeterminados) por pruebas moleculares convencionales. Es de resaltar que la prevalencia del dengue sobre otras enfermedades febriles en nuestro sitio de muestreo es esperada, debido a que en reportes anteriores se afirma que el municipio de Cúcuta en el departamento del Norte de Santander es una región mega endémica para la enfermedad, presentando un promedio de casos registrados de 2.694 por año, en un periodo de 10 años y la circulación de los 4 serotipos del virus [22]. La alta incidencia de la enfermedad se explica en gran medida por una gran movilidad de población en esta región, dada por el intercambio comercial fronterizo con Venezuela; un rápido crecimiento urbano no planificado, y condiciones eco-epidemiológicas favorables para la transmisión y persistencia del dengue que también favorecen la introducción y la diseminación de los diferentes serotipos de este virus [22].

En nuestro estudio, se observó también, que la diarrea es un síntoma que se encuentra en mayor proporción en las personas con un diagnóstico positiva para malaria, ya que el 42% de las personas con esta enfermedad presentaron diarrea, mientras que solo el 24% de las personas con dengue y el 18% de las personas con un diagnóstico indeterminado presentaron este síntoma, sin embargo, se necesitan un muestreo más amplio para determinar si esta tendencia continua y si se puede asociar este síntoma para diagnostico diferencial de la SFAI.

El posible patógeno más comúnmente identificado por nuestra metodología de metagenómica fue la bacteria *Serratia marcescens*, la cual clínicamente se asocia con la infección intrahospitalaria con mayor frecuencia en pacientes con diabetes, neoplasias e insuficiencia renal crónica. Esta bacteria puede causar bacteremia o neumonía [14]. Pero es importante mencionar que todos los pacientes enrolados en este estudio fueron ambulatorios y ninguno estuvo hospitalizado por SFAI.

A continuación, analizaremos los patógenos bacterianos presentes en las muestras que tenían lecturas para un único patógeno, Cabe resaltar que las muestras que presentaron lecturas para más de un patógeno, no se analizaron debido a la dificultad para diferenciar y determinar el posible patógeno en la muestra.

Solo una muestra presentó lecturas para la bacteria *Klebsiella pneumoniae*. Esta es la especie más estudiada dentro del género *Klebsiella* debido a su relevancia clínica al desempeña un papel importante como agente etiológico de enfermedades infecciosas oportunistas especialmente en pacientes hospitalizados, inmunocomprometidos y los que tienen enfermedades de base, como diabetes mellitus o enfermedad pulmonar obstructiva crónica. Por ejemplo, en la ciudad de Medellín en el periodo 2007 a 2008, *K. pneumoniae* fue el tercer microorganismo más comúnmente aislado en servicios hospitalarios donde el 43,2% de los aislados se obtuvieron de orina, 12,3% en sangre, 11,4% en muestras respiratorias y 7,9% en secreciones varias [15].

De igual manera, solo una muestra presento lecturas para el patógeno *Staphylococcus saprophyticus* este un importante agente causal de infecciones agudas del tracto urinario en mujeres en edad sexual activa y se ha registrado asociado a algunos casos de bacteriemias [16-17]. Y otra muestra únicamente tenía *Mycobacteroides abscessus* el cual es responsable de un amplio espectro de enfermedades de la piel, tejidos blandos, infecciones del sistema nervioso central, bacteriemia e infecciones oculares que tiene a ocurrir en huéspedes inmunocomprometidos, incluidas las personas con VIH. Sin embargo, estas infecciones también pueden ocurrir en pacientes VIH negativos [18]

Nuestro análisis también reveló lecturas alineadas a dos virus humanos: respiravirus 1 y mastedenovirus B. El respiravirus humano es un virus que causa infecciones y enfermedades principalmente en niños [19] y es una de las principales causas de hospitalización en niños menores de 5 años por infección aguda del tracto respiratorio. La viremia y la infección más allá del epitelio respiratorio también pueden causar la muerte, aunque son poco comunes y generalmente solo se encuentran en pacientes inmunocomprometidos [20]. Por otra parte, el mastedenovirus B humano puede causar un amplio espectro de enfermedades tanto en niños como en adultos, incluidas infecciones respiratorias agudas, gastroenteritis y queratoconjuntivitis epidémica. Las poblaciones susceptibles a la infección por adenovirus incluyen niños y pacientes inmunocomprometidos [21].

Este estudio demuestra la utilidad y el potencial de una herramienta de secuenciación de próxima generación como la metagenómica para detectar múltiples potenciales patógenos en

muestras biológicas que pueden estar circulando en una población, por lo que se propone como un instrumento valioso para la vigilancia epidemiológica. Sin embargo, hay que resaltar que en la actualidad esta técnica es utilizada como una herramienta de investigación y no como una prueba diagnóstica debido a que hace falta refinar un poco más los pasos previos y la aplicación de la técnica, eliminando las lecturas del hospedero antes del proceso de secuenciación para obtener mayor número de lecturas de los patógenos de interés que nos permitan discriminar e identificar el patógeno más probable o usar estrategias de enriquecimiento de los patógenos dentro de la muestra [23]. Además, la metagenómica solo nos permite identificar organismos “potencialmente patogénicos”, debido a que la detección molecular no establece causalidad y no cumple con los postulados de Koch [24].

Cabe resaltar que nuestro estudio tuvo varias limitaciones, en primer lugar, solo se recolectó muestras de suero, por lo que no se están teniendo en cuenta otras causas potenciales de fiebre que requiere otro tipo de muestras para su detección, como muestras de heces para patógenos gastrointestinales y muestras de hisopados para enfermedades respiratorias. En segundo lugar, no se recolectaron muestras de controles sanos de la misma población, por lo que no se pudo incluir un modelo de fondo para filtrar microorganismo comensales de la microbiota de personas de Cúcuta. Para esto se propone realizar un modelo de fondo de microorganismos comensales para poder diferenciar mejor los patógenos. En tercer lugar, no pudimos realizar PCRs confirmatorias o aislamiento de los patógenos identificados por la metagenómica debido a la falta de disponibilidad de muestra y de primers disponibles. Finalmente, no se lograron realizar análisis filogenéticos para realizar una identificación más certera y

determinar si los patógenos encontrados corresponden a cepas realmente patogénicas en humanos. Esta última limitación fue debido a que no se obtuvieron las coberturas y profundidades necesarias para hacer este tipo de análisis, que según la literatura se deben realizar con coberturas del 80% y profundidades de 10X para genes consenso [3].

Debido a estas limitaciones no podemos concluir que los posibles patógenos identificados por nuestra secuenciación metagenómica son los agentes causantes de la SFAI en nuestra población de estudio, además teniendo en cuenta que la mayoría de los patógenos descritos anteriormente son patógenos oportunistas, relacionados en mayor medida con enfermedad en pacientes hospitalizados o inmunocomprometidos y como se mencionó anteriormente ninguno de los participantes en el estudio estuvieron previamente hospitalizados. Por lo cual, este estudio presenta un panorama de posibles microorganismos que pueden estar circulando en la población de estudio y que además tienen el potencial de causar SFAI. Por esto, a continuación, se realizan algunas recomendaciones para futuros estudios metagenómicos en pacientes con SFAI.

Perspectivas para futuros estudios

Con el fin de mejorar la obtención de datos de la secuenciación para realizar análisis más robustos (obtener genomas consensos y análisis filogenéticos), se propone para futuros estudios, primero, agregar un control positivo que podría ser un ARN viral aislado de células de un plasma previamente secuenciado, con el fin de probar que no hay ningún problema en la síntesis de ADNc o en la preparación de librerías [25]. Segundo, mantener en todo

momento congeladas las muestras a -20°C hasta que comience la extracción de ácidos nucleicos, evitando al máximo la descongelación de las muestras, con el fin de mantener la integridad de los ácidos nucleicos [26-27]. Cabe mencionar, que nuestras muestras fueron tomadas hace mucho tiempo y es posible que hayan sido expuestas a procesos de descongelación previos para otros análisis.

Adicionalmente, se recomienda mejorar las técnicas de depleción del genoma humano con el fin de dirigir los esfuerzos de secuenciación a los microorganismos presentes en la muestra. Para esta última recomendación se propone estandarizar una metodología para la depleción del ADN humano, específicamente en muestras de suero que han sufrido un proceso de congelación. En nuestro estudio utilizamos un reactivo llamado Benzonasa, que es una enzima que permite la escisión del ADN expuesto en 3 a 5 bases de longitud, que ha sido probada por diferentes estudios y demuestra su eficiencia para depleción del ADN del huésped [28-29-30], sin embargo, esta estrategia se podría acompañar de una lisis selectiva de las células del huésped utilizando surfactantes como saponina. Se ha evidenciado que concentraciones de saponina al 0,025 % en muestra de líquido cefalorraquídeo acompañado de Benzonasa logran una reducción de aproximadamente el 90 % del ADN humano, lo que mejora significativamente la sensibilidad para la detección de posibles patógenos [31].

Materiales y métodos

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación de la E.S.E Hospital Erasmo Meoz en la ciudad de Cúcuta código del aval ICT-2016-1. Y antes del enrolamiento de los pacientes al estudio se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

Sitio del estudio

Este estudio incluyó la población urbana residente o transeúnte del municipio de Cúcuta, capital del departamento de Norte de Santander, que haya acudido a atención médica en el Hospital Erasmo Meoz por presentar síntomas relacionados al SFAI. Esta ciudad se escogió debido a que, en el periodo del estudio, 2019, presentó un alto flujo de migrantes venezolanos, además de que el muestreo podía ser coordinado por instituciones aliadas.

Población de estudio

Se enrolaron, personas con síntomas febriles que acudieron al centro de salud en el área de estudio para recibir atención médica por presentar signos/síntomas compatibles con enfermedad febril. Los criterios de inclusión fueron: 1) personas mayores de 5 años; 2) temperatura oral, axilar, timpánica o rectal $\geq 37,5$ °C o que hayan tenido fiebre en los últimos 6 días, sin foco infeccioso identificable; 3) provisión del consentimiento informado para proveer muestras biológicas, en el momento de su incorporación voluntaria al estudio.

Colección de muestra

Se colectaron de 5 a 8 ml de sangre por venopunción de cada uno de los sujetos inscritos en el estudio. Las muestras fueron centrifugadas a 2.500 rpm, por 10 minutos para separar el suero sanguíneo y fueron al Laboratorio Genómico One Health en Medellín para almacenarlas a -80°C hasta su uso.

La información clínica se obtuvo mediante una encuesta clínico-epidemiológica realizada durante el enrolamiento de los participantes. Las variables fueron recolectadas en una base de datos diseñada para el estudio. Para todas las personas que participaron en el estudio se recogieron los datos demográficos y epidemiológicos tales como: edad, género, lugar de residencia, historial de viajes recientes, historial médico, sintomatología, ocupación, extracto socioeconómico, características de la vivienda y contacto con animales.

Pruebas de laboratorio

Para identificar el patógeno causante del síndrome febril se usaron pruebas moleculares. En primer lugar, se hizo una extracción automatizada de ácidos nucleicos totales (RNA/DNA) con el equipo KingFisher, utilizando el kit de extracción MagMAX™ Viral/Pathogen (Applied Biosystems, Thermofisher). Luego, a los extraídos se les realizaron diferentes PCRs para detectar el virus Dengue, Zika y Chikunguña, y el parásito *Plasmodium (falciparum/vivax)*, causante de la malaria. Una vez testadas las muestras por estos paneles de PCR se verificó su resultado (negativo o positivo) a los patógenos testados y si la muestra fue negativa a dichas PCRs, esta muestra era nombrada indeterminada y era candidata para la secuenciación metagenómica.

Pretratamiento y extracción para secuenciación

A las muestras seleccionadas para el análisis metagenómico, se les realizó un tratamiento con benzonasa para degradar el ADN y ARN libre [5]. Brevemente, se realizó un mix de 360 µl de suero y 40µl de Benzonase master mix (Sigma, St. Louis MO), el cual se incubó a 37°C en baño maría durante 3 horas. Se utilizó un control negativo (agua) el cual fue sometido al mismo tratamiento que las muestras. Posteriormente, se hizo una extracción automatizada de ácidos nucleicos totales con el equipo KingFisher, utilizando el kit de extracción MagMAX™ Viral/Pathogen (Applied Biosystems, ThermoFisher). La síntesis del cDNA se realizó con el kit SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) y se siguió el protocolo del fabricante. Cabe aclarar que en este momento incluimos otro control (agua) para evaluar que los reactivos no estén contaminados. Para la síntesis de la segunda hebra se utilizaron los reactivos Sequenase v2.0 (Amersham Life Science, Cleveland, OH). Finalmente, se realizó la purificación con perlas magnéticas AMP-PURE XP (Beckman-Coulter). En este caso, se utilizaron 0.7X volúmenes de perlas con el fin de seleccionar los fragmentos de interés y eliminar los remanentes de reactivos de las PCRs.

Preparación y purificación de librerías

La preparación de librerías se realizó utilizando el kit Nextera XT (Illumina, San Diego, CA), siguiendo los protocolos del fabricante. Para el control de calidad de la librería se realizó una evaluación en el sistema de análisis de ADN TapeStation 4150 (Agilent) y para la cuantificación se usó el kit Qubit dsDNA HS Assay Kit t (Thermo Fisher, Catalog number Q32851). Finalmente, se realizó la desnaturalización de la librería para el montaje en el

equipo Illumina MiSeq System (Illumina®, USA), en una celda V3 de 600 ciclos. Una vez terminada la secuenciación, obtuvimos los archivos .fastq y se procedió a analizarlos.

Análisis bioinformáticos con CZid

Utilizamos el programa CZID v6.8 (<http://czid.org>), plataforma de código abierto establecida para el análisis de secuenciación metagenómica, que permite la identificación taxonómica de los patógenos [6]. Brevemente, se proporcionan archivos fastq, que son sometidos a una alineación STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference), de lecturas sin procesar [7], en este caso con la base de datos de referencia de huéspedes humanos HG38 (GCA_000001405.15). A continuación, se realiza una serie de pasos de control de calidad. Primero se utiliza trimmomatic [8] para remover los adaptadores de ilumina, luego las lecturas de baja calidad se eliminan utilizando PRICE [9] y se eliminan las secuencias humanas restantes utilizando Bowtie2 [10]. Finalmente, para asignar identidades taxonómicas a cada lectura, se utiliza un procedimiento de alineación basado en ensamblaje, donde las lecturas filtradas se alinean con las bases de datos de nucleótidos y proteínas no redundantes del NCBI, utilizando GSNAPL [11] y RAPsearch2 [12], respectivamente. En paralelo, las lecturas se ensamblan de *novo* en contigs utilizando SPAdes [13], de igual manera cada contig es alineado con el conjunto de posibles accesos representado por la base de datos BLAST.

Para determinar la presencia de un patógeno en una muestra se aplicaron los siguientes filtros: puntuación Z de nucleótidos (NT) ≥ 1 (calculado a partir del modelo de fondo), NT rPM \geq

10 (con el objetivo de un mínimo de al menos 10 lecturas de un mapeo de un determinado patógeno por 1 millón de lecturas), rPM de proteína no redundante (NR) ≥ 5 , alineación NT promedio ≥ 50 pares de bases y se filtró por patógenos conocidos [3]

Agradecimientos

Agradecemos a todas las personas del municipio de Cúcuta, Colombia que participaron en este estudio. Agradecemos a Valeska Villegas por sus discusiones, comentarios y consejos sobre la investigación.

Referencias

1. Yaya-Lancheros N, Polo-Terán LJ, Faccini-Martínez AA, Hidalgo-Díaz M. Sistema de vigilancia epidemiológica para el síndrome febril agudo en Villeta, Colombia. *Rev Salud Pública*. 2023;21: 340–348. doi:10.15446/rsap.v21n3.56122
2. Cortés JA, Moreno LFR, León CAA, Lozano LP, Cuervo SI. Enfoque clínico del síndrome febril agudo en Colombia. *Infectio*. 2017 [cited 1 May 2024]. doi:10.22354/in.v21i1.640
3. Mwakibete L, Takahashi S, Ahyong V, Black A, Rek J, Ssewanyana I, et al. Metagenomic next-generation sequencing to characterize potential etiologies of non-malarial fever in a cohort living in a high malaria burden area of Uganda. *PLOS Glob Public Health*. 2023;3: e0001675. doi:10.1371/journal.pgph.0001675

4. Ramesh A, Nakielny S, Hsu J, Kyohere M, Byaruhanga O, Bourcy C de, et al. Metagenomic next-generation sequencing of samples from pediatric febrile illness in Tororo, Uganda. *PLOS ONE*. 2019;14: e0218318.
doi:10.1371/journal.pone.0218318
5. Berg MG, Olivo A, Forberg K, Harris BJ, Yamaguchi J, Shirazi R, et al. Advanced molecular surveillance approaches for characterization of blood borne hepatitis viruses. *PLOS ONE*. 2020;15: e0236046. doi:10.1371/journal.pone.0236046
6. Kalantar KL, Carvalho T, de Bourcy CFA, Dimitrov B, Dingle G, Egger R, et al. IDseq—An open source cloud-based pipeline and analysis service for metagenomic pathogen detection and monitoring. *GigaScience*. 2020;9: giaa111.
doi:10.1093/gigascience/giaa111
7. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29: 15–21.
doi:10.1093/bioinformatics/bts635
8. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30: 2114–2120.
doi:10.1093/bioinformatics/btu170
9. Ruby JG, Bellare P, DeRisi JL. PRICE: Software for the Targeted Assembly of Components of (Meta) Genomic Sequence Data. *G3 GenesGenomesGenetics*. 2013;3: 865–880. doi:10.1534/g3.113.005967
10. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9: 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923

11. Wu TD, Nacu S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics*. 2010;26: 873–881.
doi:10.1093/bioinformatics/btq057
12. Ye Y, Choi J-H, Tang H. RAPSearch: a fast protein similarity search tool for short reads. *BMC Bioinformatics*. 2011;12: 159. doi:10.1186/1471-2105-12-159
13. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19: 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
14. Dossi C. MT, Escalona U. M, Serrano A. C, Silva D. MA, Juliet L. C, Fernández V. A, et al. *Serratia marcescens*: Descripción de un brote de infección intrahospitalaria. *Rev Chil Infectol*. 2002;19: 262–266. doi:10.4067/S0716-10182002000400007
15. Echeverri Toro LM, Cataño Correa JC. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Iatreia*. 2010;23: 240–249.
16. Fariña N, Sanabria R, Figueredo L, Ramos L, Samudio M. *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinario. *Mem Inst Investig En Cienc Salud*. 2005;3: 31–33.
17. Hirzel W. Implicancias del *Staphylococcus saprophyticus* en la patología infecciosa urinaria de la mujer. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam*. 2004;38: 217–220.
18. Lee M-R, Sheng W-H, Hung C-C, Yu C-J, Lee L-N, Hsueh P-R. *Mycobacterium abscessus* Complex Infections in Humans. *Emerg Infect Dis*. 2015;21: 1638–1646.
doi:10.3201/2109.141634

19. Scotch M, Halden RU, Denton A, Sandrolini H, Fontenele RS, Varsani A. Coding-Complete Genome Sequence of a Human Respirovirus 1 Strain from a Clinical Sample in Arizona. *Microbiol Resour Announc.* 2020;9: e00465-20.
doi:10.1128/MRA.00465-20
20. Elboukari H, Ashraf M. Parainfluenza Virus. *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560719/>
21. Chen S, Tian X. Vaccine development for human mastadenovirus. *J Thorac Dis.* 2018;10: S2280–S2294. doi:10.21037/jtd.2018.03.168
22. Quintero Espinosa J. Dengue en Colombia: epidemiología de la reemergencia a la hiperendemia. *Rev Salud Bosque.* 2015;5: 81. doi:10.18270/rsb.v5i1.186
23. Molina Arias M. Características de las pruebas diagnósticas. *Pediatría Aten Primaria.* 2013;15: 169–173. doi:10.4321/S1139-76322013000200013
24. Oguzie JU, Petros BA, Oluniyi PE, Mehta SB, Eromon PE, Nair P, et al. Metagenomic surveillance uncovers diverse and novel viral taxa in febrile patients from Nigeria. *Nat Commun.* 2023;14: 4693. doi:10.1038/s41467-023-40247-4
25. Castellot A, Camacho J, Fernández-García MD, Tarragó D. Shotgun metagenomics to investigate unknown viral etiologies of pediatric meningoencephalitis. *PLOS ONE.* 2023;18: e0296036. doi:10.1371/journal.pone.0296036
26. Hickl O, Heintz-Buschart A, Trautwein-Schult A, Hercog R, Bork P, Wilmes P, et al. Sample Preservation and Storage Significantly Impact Taxonomic and

- Functional Profiles in Metaproteomics Studies of the Human Gut Microbiome. *Microorganisms*. 2019;7: 367. doi:10.3390/microorganisms7090367
27. Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, et al. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol*. 2012;12: 158. doi:10.1186/1471-2180-12-158
28. Shi Y, Wang G, Lau HC-H, Yu J. Metagenomic Sequencing for Microbial DNA in Human Samples: Emerging Technological Advances. *Int J Mol Sci*. 2022;23: 2181. doi:10.3390/ijms23042181
29. Nelson MT, Pope CE, Marsh RL, Wolter DJ, Weiss EJ, Hager KR, et al. Human and Extracellular DNA Depletion for Metagenomic Analysis of Complex Clinical Infection Samples Yields Optimized Viable Microbiome Profiles. *Cell Rep*. 2019;26: 2227-2240.e5. doi:10.1016/j.celrep.2019.01.091
30. Marotz CA, Sanders JG, Zuniga C, Zaramela LS, Knight R, Zengler K. Improving saliva shotgun metagenomics by chemical host DNA depletion. *Microbiome*. 2018;6: 42. doi:10.1186/s40168-018-0426-3
31. Hasan MR, Rawat A, Tang P, Jithesh PV, Thomas E, Tan R, et al. Depletion of Human DNA in Spiked Clinical Specimens for Improvement of Sensitivity of Pathogen Detection by Next-Generation Sequencing. *J Clin Microbiol*. 2016;54: 919–927. doi:10.1128/jcm.03050-15
32. Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ, et al. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en

Colombia, 1990-2016. *Biomédica*. 2017;37: 27–40.

doi:10.7705/biomedica.v34i2.3769

33. Piñeros JG. Malaria and social health determinants: a new heuristic framework from the perspective of Latin American social medicine. *Biomédica*. 2010;30: 178–87.
doi:10.7705/biomedica.v30i2.181
34. Tsheten T, Clements ACA, Gray DJ, Adhikary RK, Furuya-Kanamori L, Wangdi K. Clinical predictors of severe dengue: a systematic review and meta-analysis. *Infectious Diseases of Poverty*. 2021;10: 123. doi:10.1186/s40249-021-00908-2
35. Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2: 1–25. doi:10.1038/nrdp.2016.55
36. 2023_Boletín_epidemiologico_semana_52.pdf. Available:
[https://www.ins.gov.co/buscador-
eventos/BoletinEpidemiologico/2023_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_52.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2023_Bolet%C3%ADn_epidemiologico_semana_52.pdf)