

# Biomatest

Resultados de validación técnica del  
servicio

Un servicio de:  **Astrolab Bio**

**UNIVERSIDAD  
EAFIT**

Para:



## Agenda del proceso de validación

1. Antecedentes
2. Producción científica
3. Desarrollo de producto **Biomatest**
4. Diseño experimental:  
Replicabilidad y reproducibilidad
5. Variables evaluadas
6. Resultados
7. Conclusiones

# Primeros Acercamientos a Microbiota Intestinal

Proyecto: Microbiota intestinal de mujeres lactantes y gestantes



23 voluntarias



Muestra coprológica



Extracción de AND  
X2



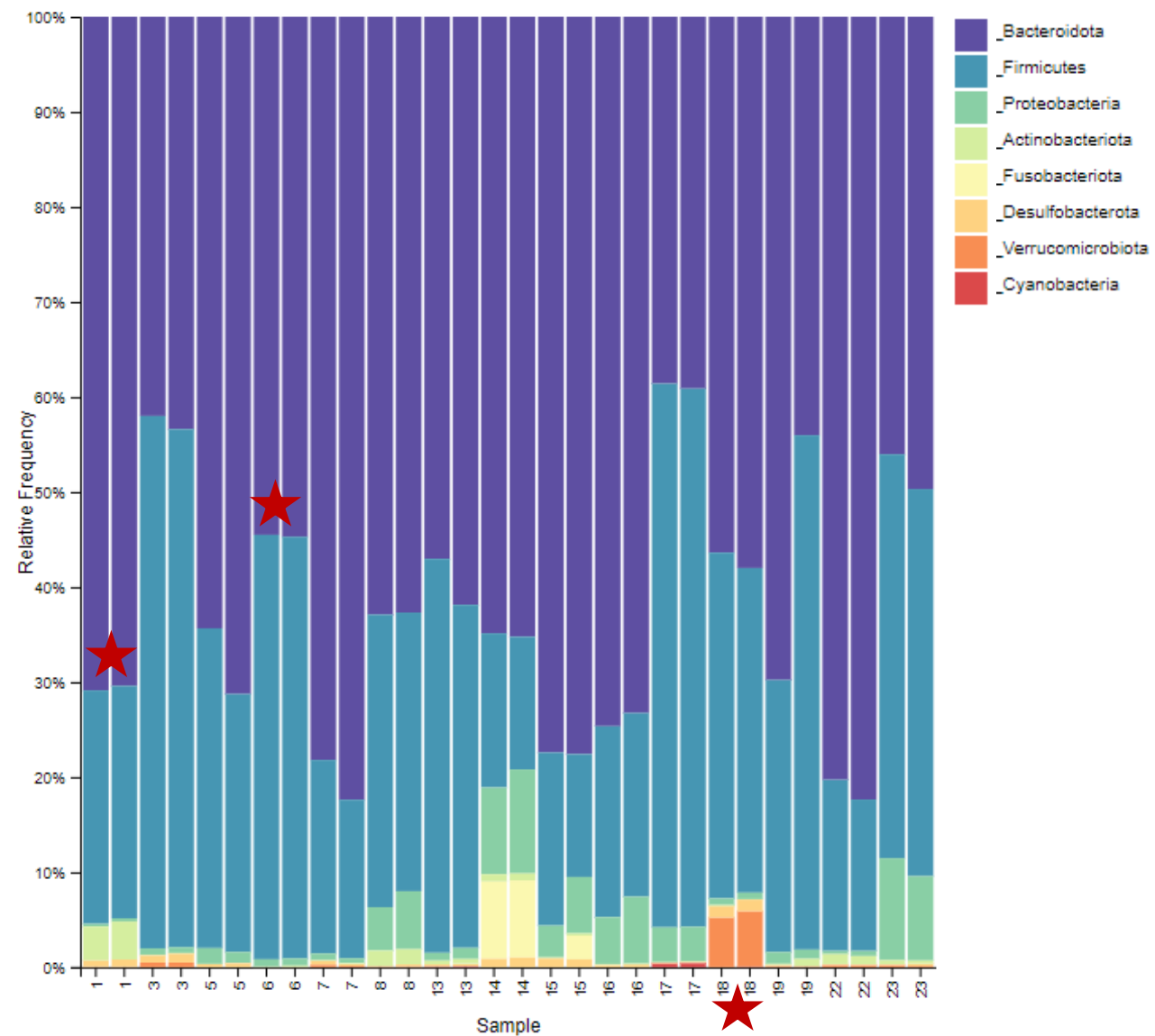
Secuenciación



Análisis de datos

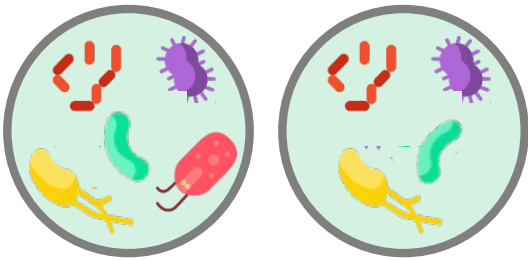
# ¿Qué observamos?

Clasificación a nivel de filo replicable

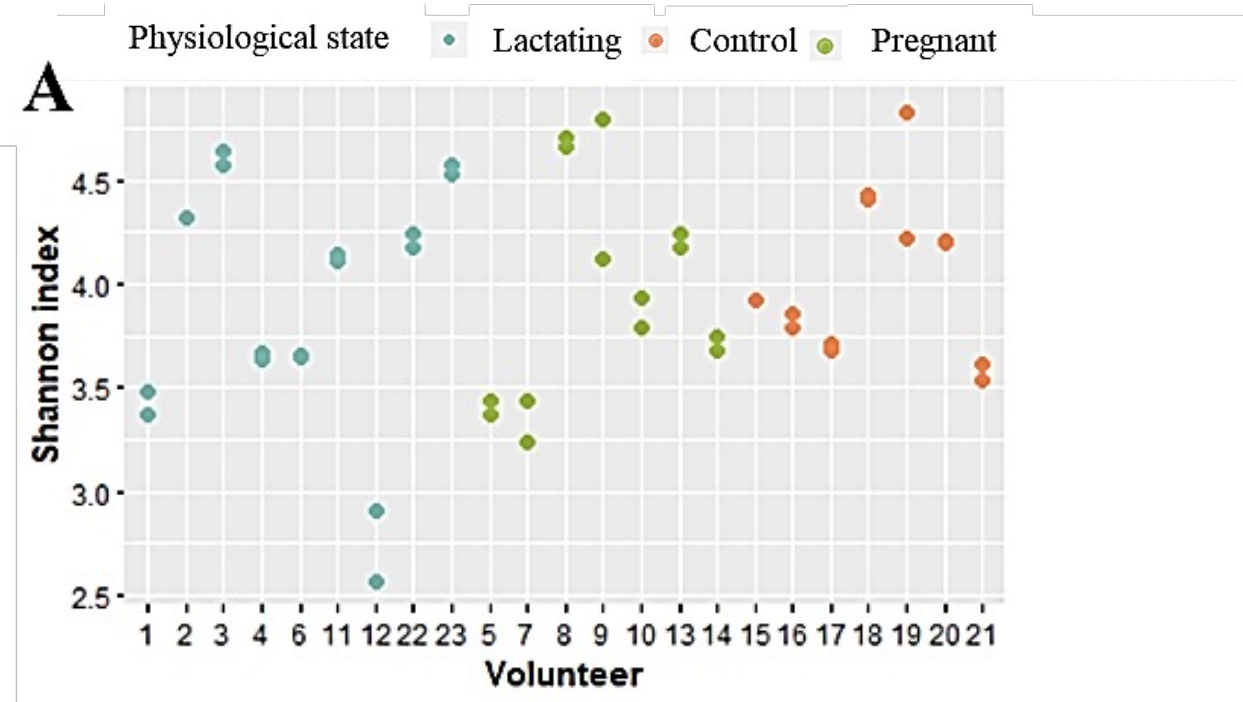


¿Cuál es la diversidad de las comunidades microbianas?

Diversidad Alpha



Diversidad Alpha entre voluntarias



**Exploring the Gut Microbiome of Pregnant and Lactating Women from Antioquia-Colombia for Potential Biotherapeutics Enhancers of Choline Metabolism**

Laura Sierra-Zapata,<sup>1</sup> Laura Gómez-Mesa,<sup>1</sup> María Cadavid-Vélez,<sup>1</sup> Sara Londoño Osorio,<sup>1</sup> and Verónica Abad Londoño<sup>2</sup>

<sup>1</sup>EAFIT University; and <sup>2</sup>Abad Laboratorio

**Objectives:** To characterize the gut microbiome and build a collection of strains capable of metabolizing a specific dietary source rich in choline, from pregnant and lactating women of the region of Antioquia, Colombia

**Methods:** Fecal and blood samples were simultaneously collected from volunteers. Microbial cells were anaerobically isolated from fecal samples in an Egg Based Selective (EBS) medium, incubating at 37°C for 7 days. Afterwards, the colony-forming units per gram of fecal sample (CFU/g) were calculated for each volunteer, as the total biomass of culturable microorganisms capable of metabolizing a nutritional source rich in choline. Each bacterial morphology purified in EBS medium and Brain Heart Infusion (BHI) medium was cryopreserved at -80°C. Additionally, blood samples were analyzed by Abad Laboratorio obtaining the lipid profile of each volunteer. Data of CFU/g were analyzed using a non-parametric test. Correlation matrices of the total

biomass and the physiological state of the volunteers, each of them with the lipid profile values, were performed in R software.

**Results:** Nineteen bacterial morphologies have been isolated, creating the first entries of the strains bank of choline metabolizing microorganisms. Total biomass values were between 1.89E + 08 and 2.10E + 10 CFU/g (± 6.96E + 09) and the Kruskal-Wallis test of total biomass in CFU/g denotes statistical significance among volunteers (P = 0,04). Besides, a significant correlation between the physiological state of volunteers and HDL was found, meaning that the lipid profile is affected during pregnancy and postpartum, as is widely recognized. Nevertheless, a non-previously reported correlation between total cholesterol, LDL and triglycerides with the total culturable choline-metabolizing microbial biomass from pregnant and lactating women was also found.

**Conclusions:** Total biomass of culturable choline-metabolizing microbiota is significantly variable among individuals and results suggest it being independent of the physiological state. Lactating and pregnancy states have an impact in the lipid profile, as has been previously reported. However, a novel finding in this study is that culturable microorganisms capable of metabolizing a nutritional source rich in choline as egg, impact the components of the lipidic profile.

**Funding Sources:** Universidad EAFIT Abad Laboratorio.

**Gut microbiota of pregnant and lactating women from Colombia: a study towards the development of novel biotherapeutics derived from choline metabolism for perinatal nutrition**

Laura Gómez-Mesa<sup>a</sup> lgomez12@eafit.edu.co

Vanesa Caro-Miranda<sup>d</sup>

Sara Londoño-Osorio<sup>a</sup>

María Cadavid-Vélez<sup>a,\*</sup>

Verónica Abad-Londoño<sup>b</sup>

Laura Sierra-Zapata<sup>a,\*\*</sup>

a. Research group CIBIOP, School of Applied Sciences and Engineering, Universidad EAFIT, Medellín, Antioquia, Colombia.

b. Abad Clinical laboratory, Medellín, Colombia.

\*Present Address: SIWA, Iluma Innovation Labs, Iluma Alliance, 1307 Person St, Durham, NC 27703, USA.

\*\*Corresponding author: lsierra3@eafit.edu.co



**Exploration of The Culturable Gut Microbiota, Involved in The Metabolism of a Dietary Source Rich in Choline, from Pregnant and Breastfeeding Women of a Pilot Cohort in Colombia: potential biotherapeutics enhancers of Choline Metabolism**

Verónica Abad-Londoño<sup>1</sup>, Laura Gómez-Mesa<sup>2</sup>, María Cadavid-Vélez<sup>3</sup>, Sara Londoño-Osorio<sup>2</sup>, Laura Sierra-Zapata<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Abad Laboratorio, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> CIBIOP research group, Department of Biological Sciences, EAFIT University, Medellín Colombia

<sup>3</sup> Iluma Alliance, North Carolina, US

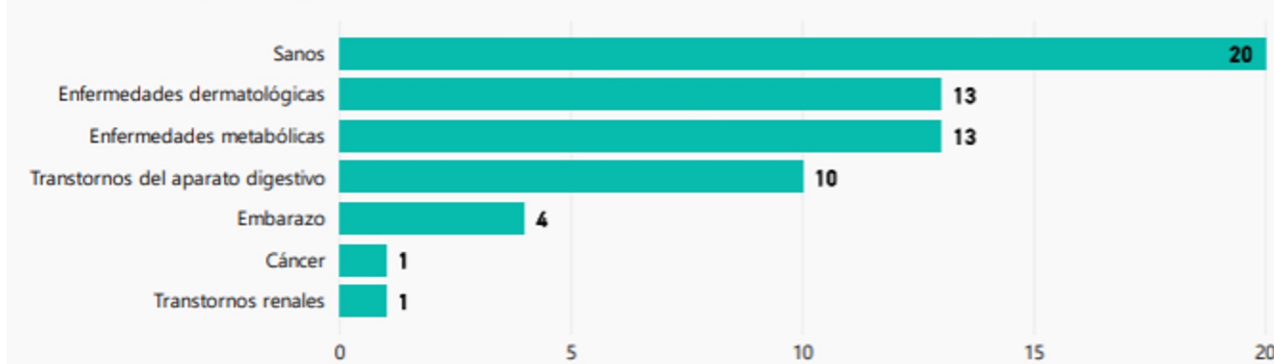
- Presentación en congresos
- Manuscrito del *paper*

## ALISTAMIENTO BIOMATEST

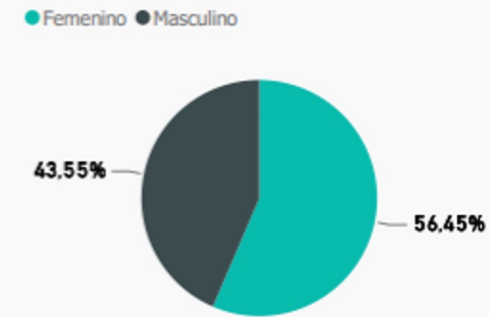
Número de voluntarios **62**

Biomatest

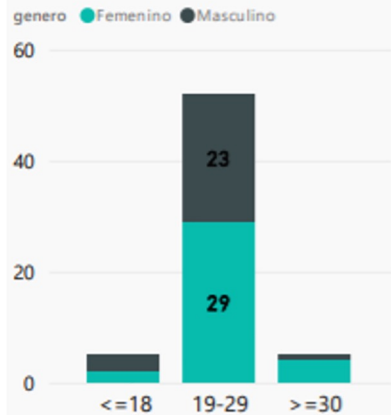
### Condiciones de inclusión



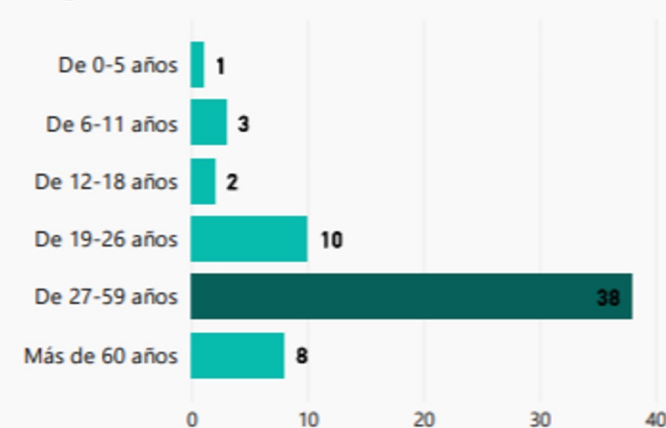
### Género



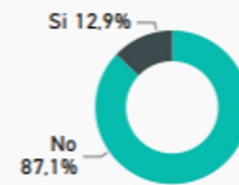
### Rango IMC



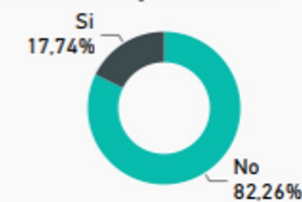
### Rango de edades



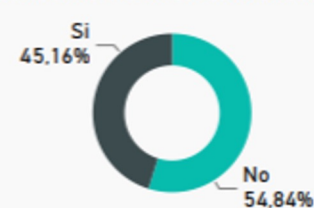
### Consumo de antibióticos



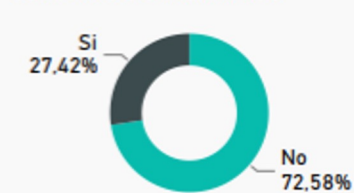
### Consumo de probióticos




### Consumo de medicamentos



### Consumo de vitaminas



- Proceso de alistamiento tecnológico
- Resultados y protección de la invención: acta del secreto
- Acuerdo de exclusividad con ABAD Lab

|  |   |   |                               |                            |
|--|---|---|-------------------------------|----------------------------|
|  | <b>ACTA DE REUNIÓN ENTREGA SECRETOS</b> |   |                               |                            |
|  | <b>LUGAR</b><br>Teams                   | <b>FECHA</b><br>16/12/2022              | <b>HORA INICIO</b><br>8:00 am | <b>HORA FIN</b><br>8:54 am |
| <b>ASISTENTES</b>  |   |   |                               |                            |
| <b>NOMBRE</b>  |   | <b>CARGO</b>                            |                               |                            |
| 1. Melissa Londoño Ávila   |   | Jefe de transferencia de tecnología (E) |                               |                            |
| 2. María Paula Pérez Gómez   |   | Abogada secretaria general              |                               |                            |
| 3. Laura Sierra Zapata   |   | Inventora                               |                               |                            |

|  |  |
|--|--|
| <b>ORDEN DEL DÍA</b>   |  |
| 1. Justificación del secreto industrial.   |  |
| 2. Entrega del secreto industrial.   |  |
| 3. Verificación del secreto industrial por parte del Líder de Transferencia.   |  |
| 4. Entrega del contrato de cesión de derechos y firma del acuerdo de confidencialidad.                                 |  |
| 5. Custodia del Secreto Industrial e ingreso al servidor interno de la Universidad por parte de la secretaria general. |  |
| <b>TEMAS TRATADOS</b>  | <b>RESULTADOS</b>  |
| 1 Justificación del Secreto Industrial   | El problema que soluciona la invención es la disponibilidad de herramientas para un diagnóstico individualizado, personalizado, o de precisión del estado de salud y metabólico de un individuo para la prevención de Enfermedades No Transmisibles (ENTs); en este caso desde la óptica de las comunidades microbianas intestinales. Es una herramienta que entrega información del metabolismo que ayuda a solucionar y llegar a la causa de uno o varios de los siguientes padecimientos que puede presentar el cliente, de origen metabólico e inclusive otros infecciosos, tales como: desbalances metabólicos. |



**ABAD**  
LABORATORIO  
EMPIEZA POR LOS RESULTADOS

**CONVENIO PARA LA ALIANZA COMERCIAL DE PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE LABORATORIO CLÍNICO DE REFERENCIA, CELEBRADO ENTRE ASTROLAB S.A.S Y LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA S.A.S.**

Entre **LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGIA S.A.S.**, identificado con NIT: 890922028-1, entidad domiciliada en la ciudad de Medellín, en la dirección Carrera 48 12 SUR 70 legalmente constituida, y quien en este convenio se denominará (“**EL CONTRATANTE**”), legalmente representado por **CAMILO ALBERTO ABAD LONDOÑO** mayor de edad y vecino de Medellín identificado con cédula de ciudadanía No. 98.546.721; y, **ASTROLAB BIOTECNOLOGÍA S.A.S.**, identificada con NIT: 901672137-1, entidad domiciliada en la ciudad de Medellín, en la dirección Carrera 29 c #16 e sur – 55 Apto 302 Código postal 050022 legalmente constituida, representada legalmente por **LAURA SIERRA ZAPATA**, identificada con cédula de ciudadanía No. 1.037.572.584 quien se denominará (“**EL CONTRATISTA**”), acordamos celebrar el siguiente Convenio para la Alianza Comercial de prestación de servicios de Laboratorio Clínico de Referencia (“**Convenio**”), regulado por las siguientes cláusulas:

**PRIMERA: OBJETO DEL CONVENIO:** EL CONTRATISTA prestará a EL CONTRATANTE el servicio de Laboratorio Clínico de Referencia denominado BiomaTest (“**Biomatest**”), o (“**Servicios**”). Las muestras serán procesadas y tratadas de acuerdo con el cronograma de montajes y procesamientos del CONTRATISTA.

**PARÁGRAFO 1º:** el servicio prestado por EL CONTRATISTA consiste en realizar un estudio exhaustivo sobre la microbiota de los pacientes del CONTRATANTE. Para el desarrollo de este análisis se aplicarán algoritmos predictivos, especialmente a los datos del microbiota intestinal segmentados o parametrizados por grupo etarios, condiciones de salud, tipo de alimentación e IMC. Finalmente, se elaborará un informe final del estudio adelantado por EL CONTRATISTA, con el fin de que un profesional de la salud dicte las recomendaciones médicas pertinentes.

- Proceso de alistamiento tecnológico
- Resultados y protección de la invención: acta del secreto
- Acuerdo de exclusividad con ABAD Lab

# Constitución de ASTROLAB BIOTECNOLOGÍA

## Ensayos y análisis técnicos

### El Código CIU 7120 SI incluye

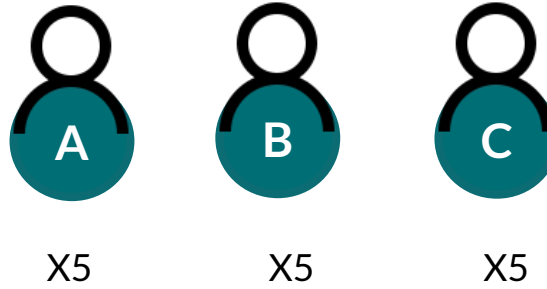
Este código, establecido por la Cámara de Comercio y la DIAN, el cual incorpora las siguientes actividades:

- ✓ Las actividades de investigaciones y desarrollo experimental en el campo de las ciencias naturales y la ingeniería en ciencias naturales, ingeniería y tecnología, ciencias médicas, biotecnología, ciencias agropecuarias y aquellas de carácter interdisciplinario, centrados especialmente en ciencias naturales e ingeniería.
- ✓ Las investigaciones para obtener nuevas variedades de semillas o modificar las existentes.
- ✓ Las actividades de investigación y desarrollo de productos farmacéuticos (incluidos los de biotecnología).

# Diseño experimental

# Proceso de Validación

Repetibilidad



A: BT0023  
B: BT0045  
C: BT0048

Reproducibilidad

Cambiamos 4 condiciones

Cambio de Operario  
x12



Cambio de Laboratorio  
x10



Cambio de Horario  
x6



Cambio de Equipo  
x6



# Variables evaluadas

1

## Taxonomía bacteriana (Dominio|Filo|Clase|Orden|Familia|Género|Especie)

Abundancia relativa de los **filos** más representativos de la microbiota intestinal: **Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota, Proteobacteria, Verrucromicrobiota.**

2

## Radio Firmicutes/Bacteroidota

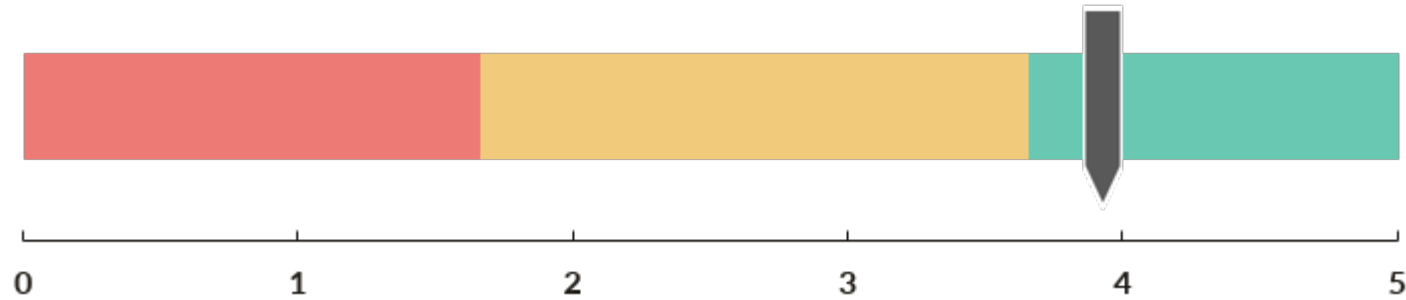
Relación de los filos más abundantes (~90%) de la microbiota intestinal humana<sup>1-2</sup>  
 Muestra la capacidad de tu microbiota para nutrirse equilibradamente de fibras, azúcares simples y proteínas

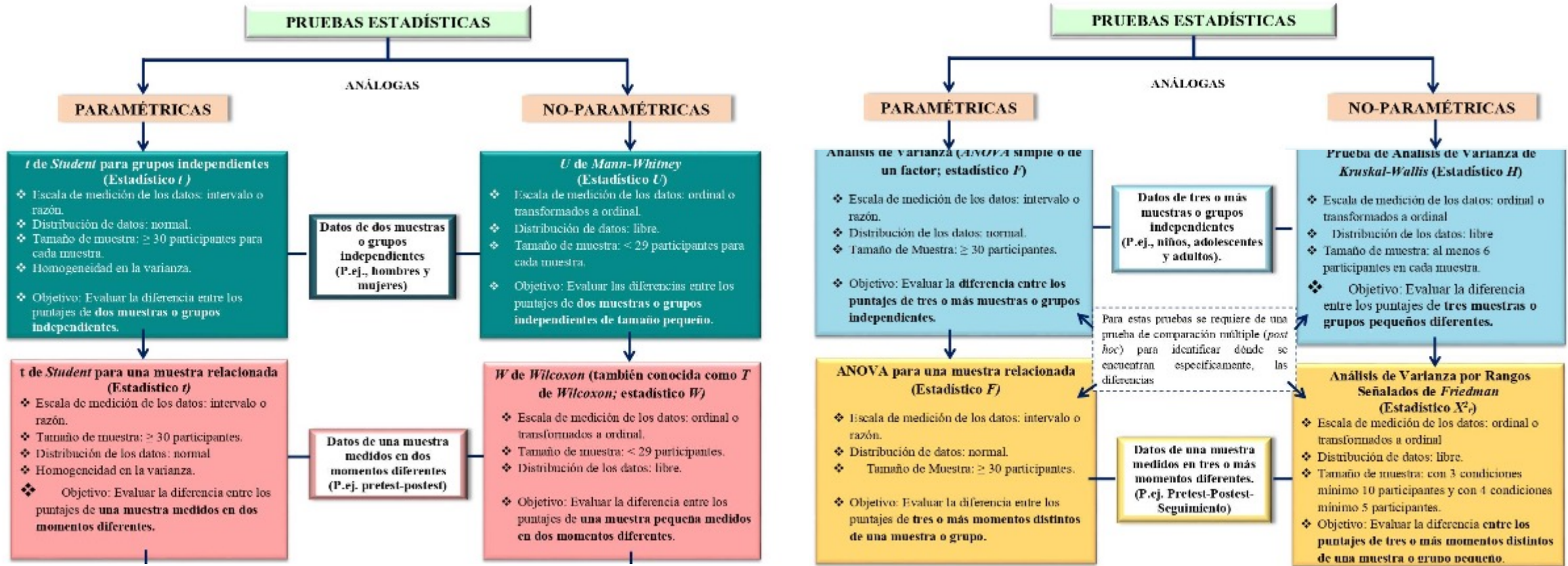
| VALOR F/B | SIGNIFICADO   |
|-----------|---|
| >5        | <b>NO DESEABLE:</b> tu microbiota se nutre principalmente de proteína y azúcares simples        |
| 1-5       | <b>DESEABLE:</b> tu microbiota se nutre equilibradamente entre degradadores de fibra y proteína |
| <1        | <b>NO DESEABLE:</b> tu microbiota se nutre principalmente de fibras                             |

3

### Índice de Shannon (Riqueza en la comunidad intestinal)

Un mayor número de comunidades de microorganismos diferentes, indican que tu intestino es más diverso, lo que permite que asimiles mejor la dieta.





Tomado de: Bautista-Díaz, et al. (2020). Pruebas estadísticas paramétricas y no paramétricas: su clasificación, objetivos y características. Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 9(17), 78-81.

Particularmente en nuestra validación empleamos la prueba T y el test de *Kruskal-Wallis*, en ambos se halló el Valor-p para el conjunto de datos analizado. Estos se comparan con los valores de referencia ( $>0.05$  para un 95% de confianza)

## Significado del Valor-p en la validación estadística\*

Es un valor entre 0-1, que significa la probabilidad de obtener, por azar, una diferencia tan grande o mayor de la observada, cumpléndose que no haya diferencia real en la población de la que proceden las muestras.

- Si  $\text{valor-p} > \text{nivel de significación (0.05)}$  => No rechazo  $H_0$ . ES ALTAMENTE PROBABLE QUE LAS DIFERENCIAS HALLADAS EN LOS RESULTADOS DE LA PRUEBA BIOMATEST AL VARIAR CONDICIONES DE PROCESO SE DEBAN AL AZAR.
- Si  $\text{valor-p} < \text{nivel de significación}$  => rechazo  $H_0$ . ES LO SUFICIENTEMENTE IMPROBABLE QUE LAS DIFERENCIAS OBSERVADAS AL VARIAR CONDICIONES DE PROCESO SE DEBAN AL AZAR, COMO PARA NO RECHAZAR CON UNA SEGURIDAD RAZONABLE LA  $H_0$ . SE AFIRMA QUE LA DIFERENCIA ES REAL.

### Hipótesis Nula ( $H_0$ )

“Los cambios hallados en las variables que mide la prueba Biomatest se deben al azar y no a un efecto de las variaciones en el proceso”

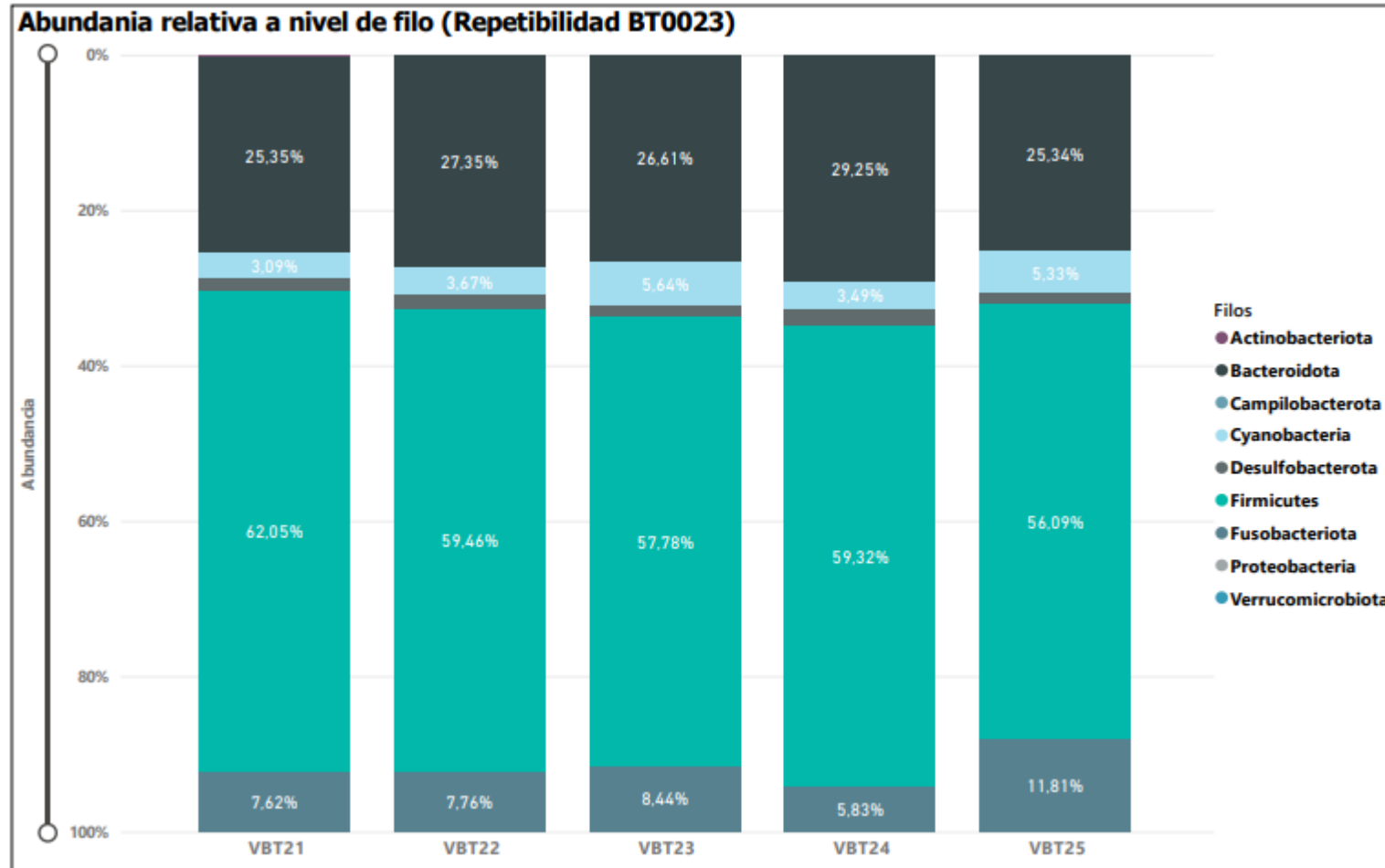
### Hipótesis Alternativa ( $H_1$ )

“Los cambios hallados en las variables que mide la prueba Biomatest NO se deben al azar y existe un efecto de las variaciones en el proceso”

# Resultados Repetibilidad

$p\text{-value} = 0.206$   
 $\ggg 0.05$

Estas pequeñas  
 variaciones no  
 cambian la  
 conclusión clínica



**Fig.1** Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo para las réplicas evaluadas del voluntario BT0023.

Se consideró para el total de los datos de cada voluntario un n=5 datos cambiando las condiciones de extracción. se realizó un análisis paramétrico Prueba T hallando cada P-valor para un 95% de confianza.

p-value = 0.463  
>>> 0.05

Estas pequeñas variaciones no cambian la conclusión clínica

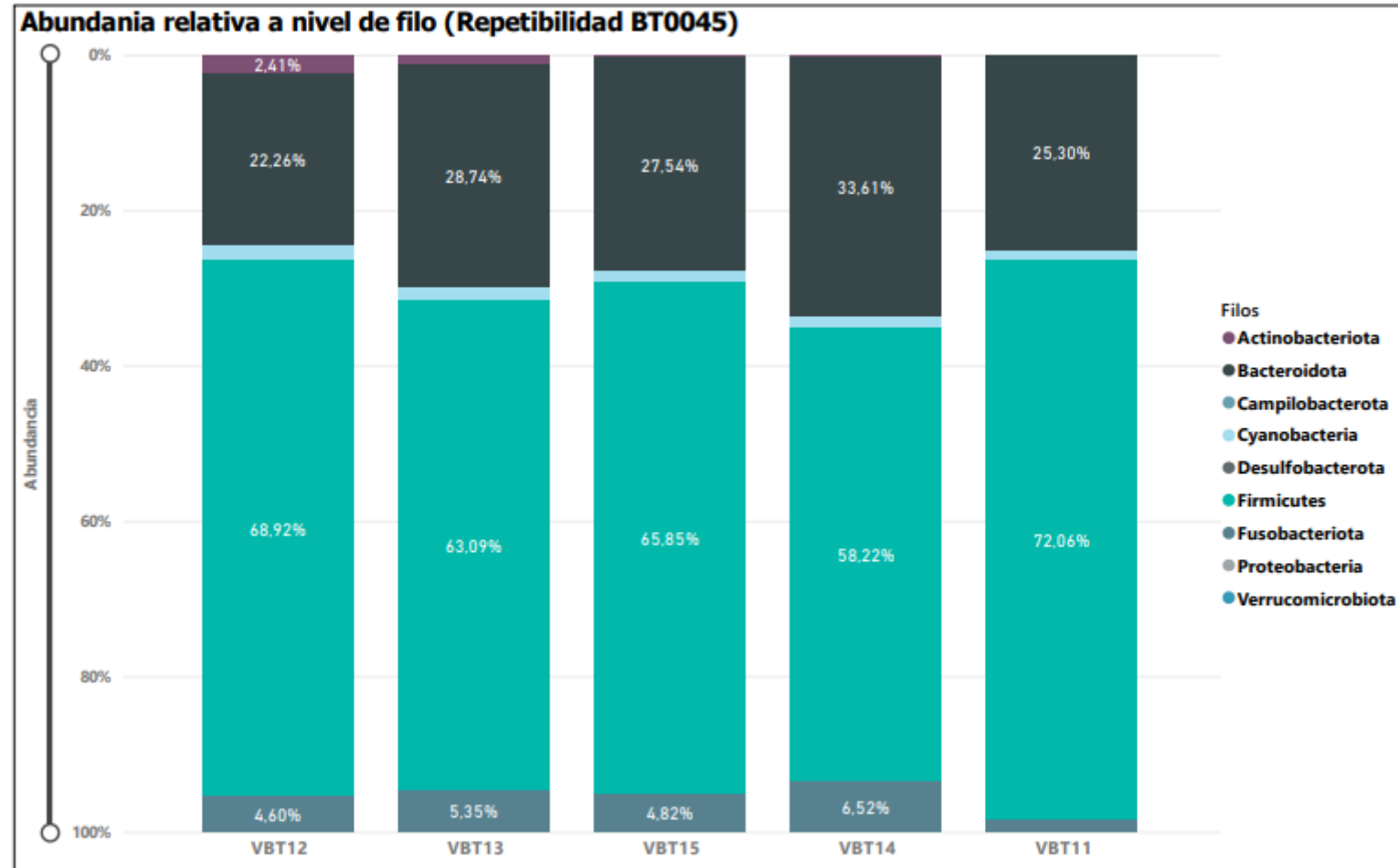


Fig.2 Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo para las réplicas evaluadas del voluntario BT0045.

Se consideró para el total de los datos de cada voluntario un n=5 datos cambiando las condiciones de extracción. se realizó un análisis paramétrico Prueba T hallando cada P-valor para un 95% de confianza.

p-value = 0.450  
>>> 0.05

Estas pequeñas variaciones no cambian la conclusión clínica

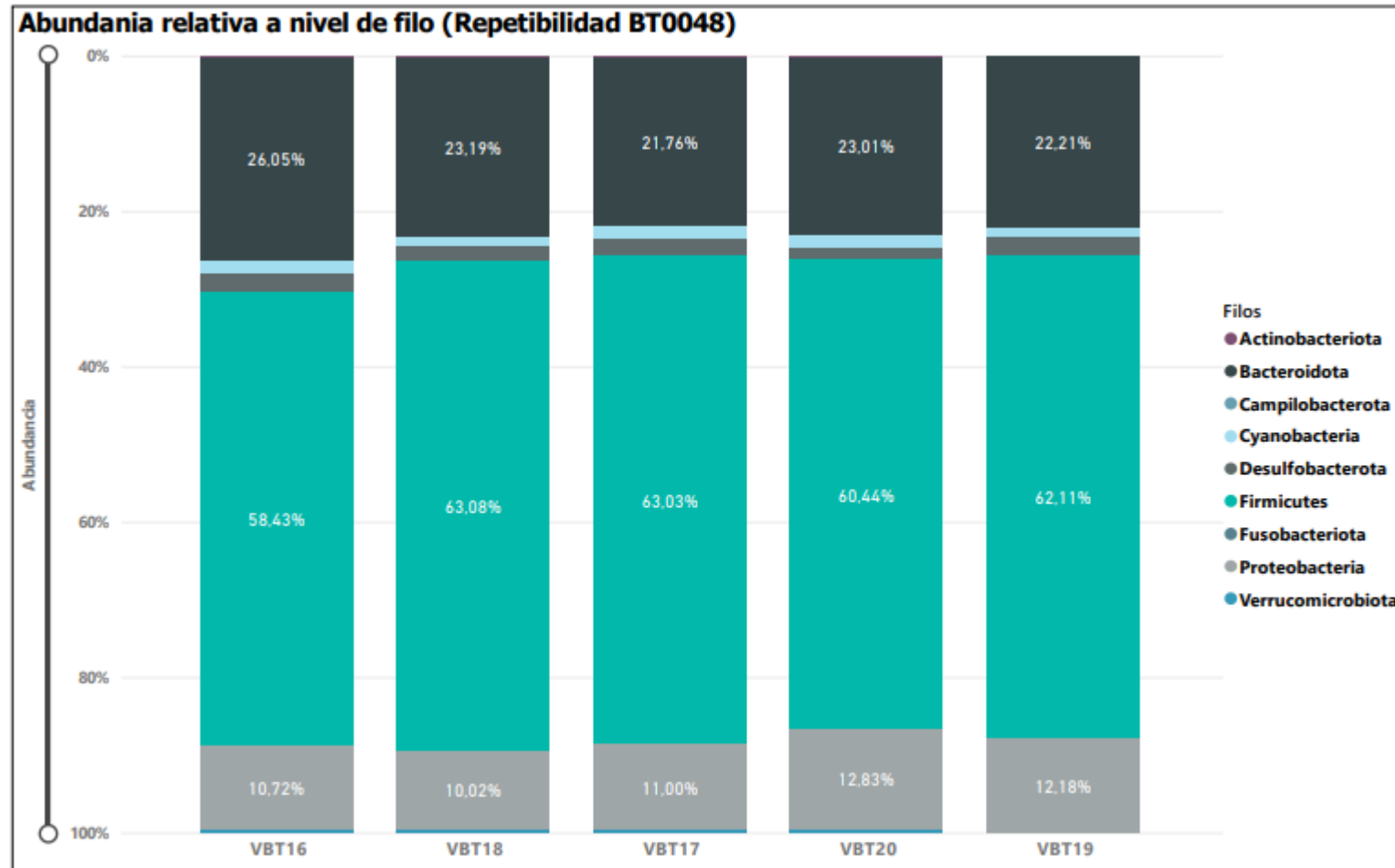
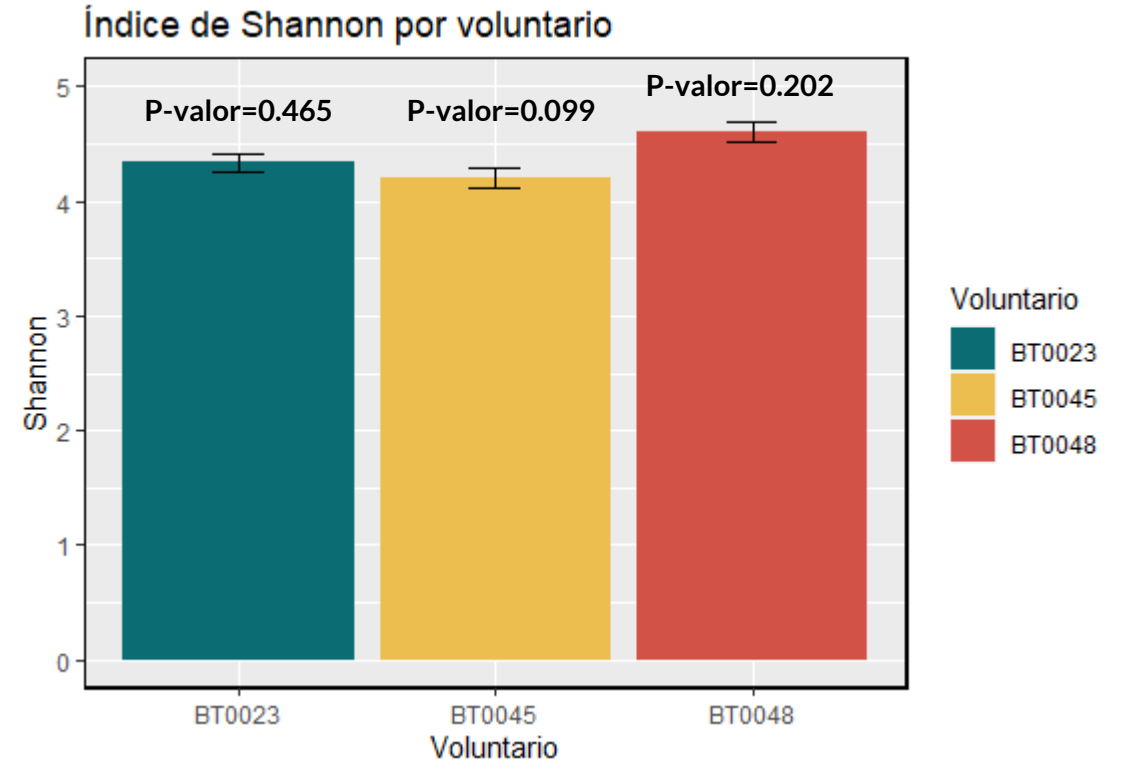
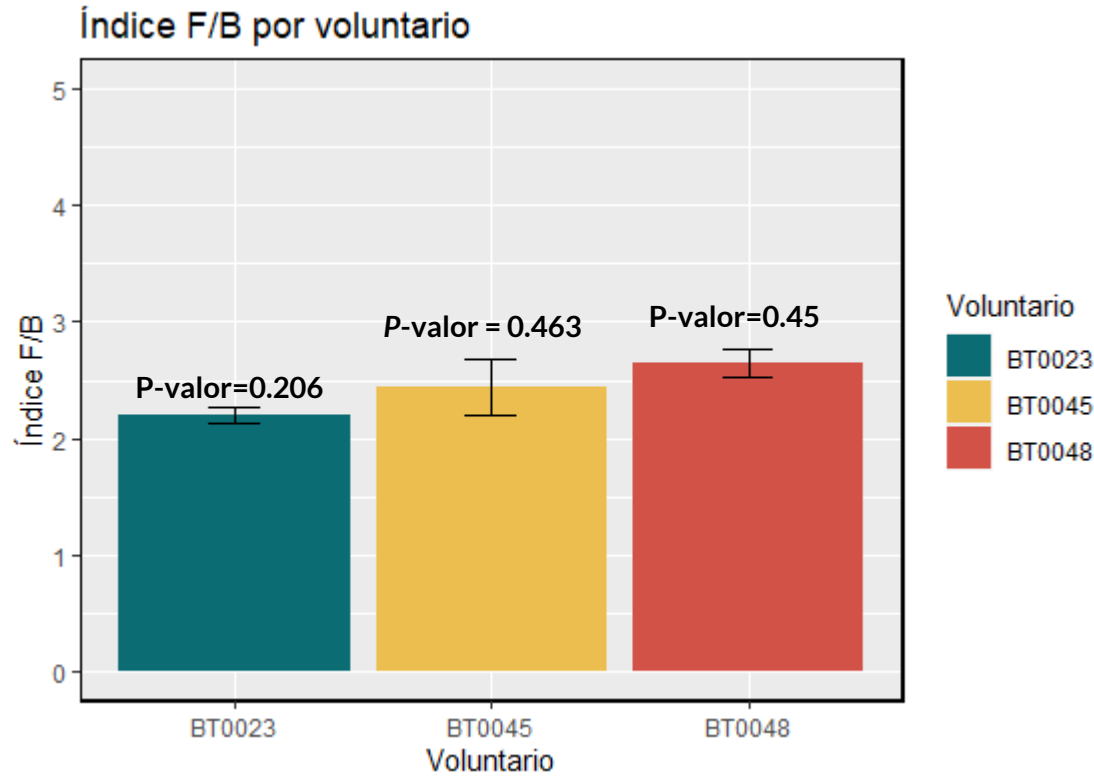


Fig.3 Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo para las réplicas evaluadas del voluntario BT0048.

Se consideró para el total de los datos de cada voluntario un n=5 datos cambiando las condiciones de extracción. se realizó un análisis paramétrico Prueba T hallando cada P-valor para un 95% de confianza.



**Fig.4** Barplot del índice Firmicutes/Bacteroidota en cada voluntario y el índice de Shannon para cada voluntario. Se calculó el *p-value* para ambas variables y es  $\gg 0.05$ , indicando que no hay diferencia estadísticamente significativa con el 95% de confianza.

**No hay diferencia estadísticamente significativa**

**Las variaciones del índice F/B y el índice de Shannon calculados para cada muestra, al extraerla cinco veces seguidas bajo las mismas condiciones, NO SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS, denotando una repetibilidad en los resultados con un 95% de confianza**

# Resultados Reproducibilidad

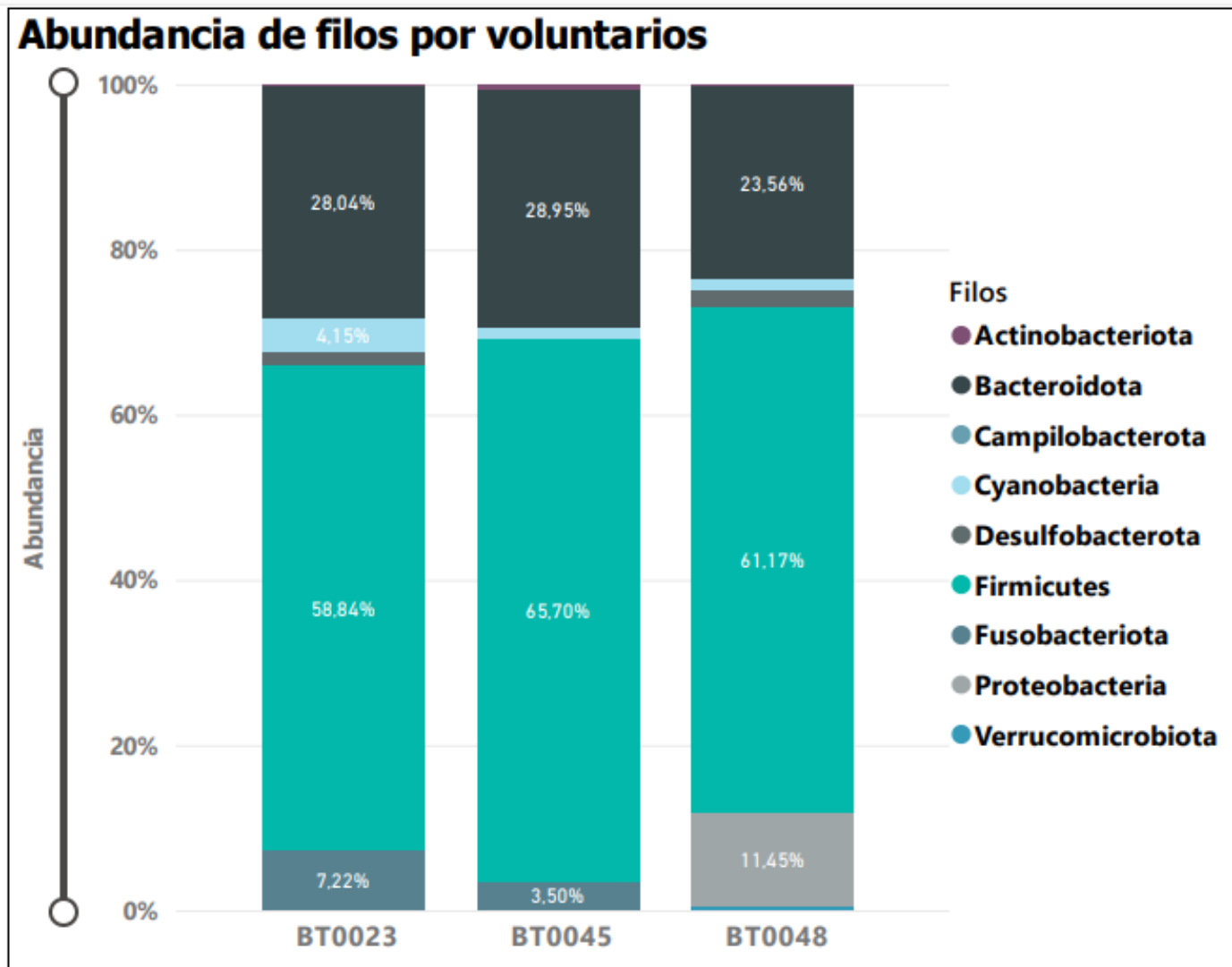


Fig.5 Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo por cada voluntario.

La abundancia relativa de los filios es **única** para cada uno de los individuos (así como una **huella dactilar**).

- BT0023: Dermatitis atópica severa
- BT0045: Ninguna enfermedad crónica reportada
- BT0048: Dislipidemia

El cambio de condición no afecta significativamente la composición taxonómica de una muestra a nivel de filo

p-value = 0.2828  
>>> 0.05

**Estas pequeñas variaciones no cambian la conclusión clínica**

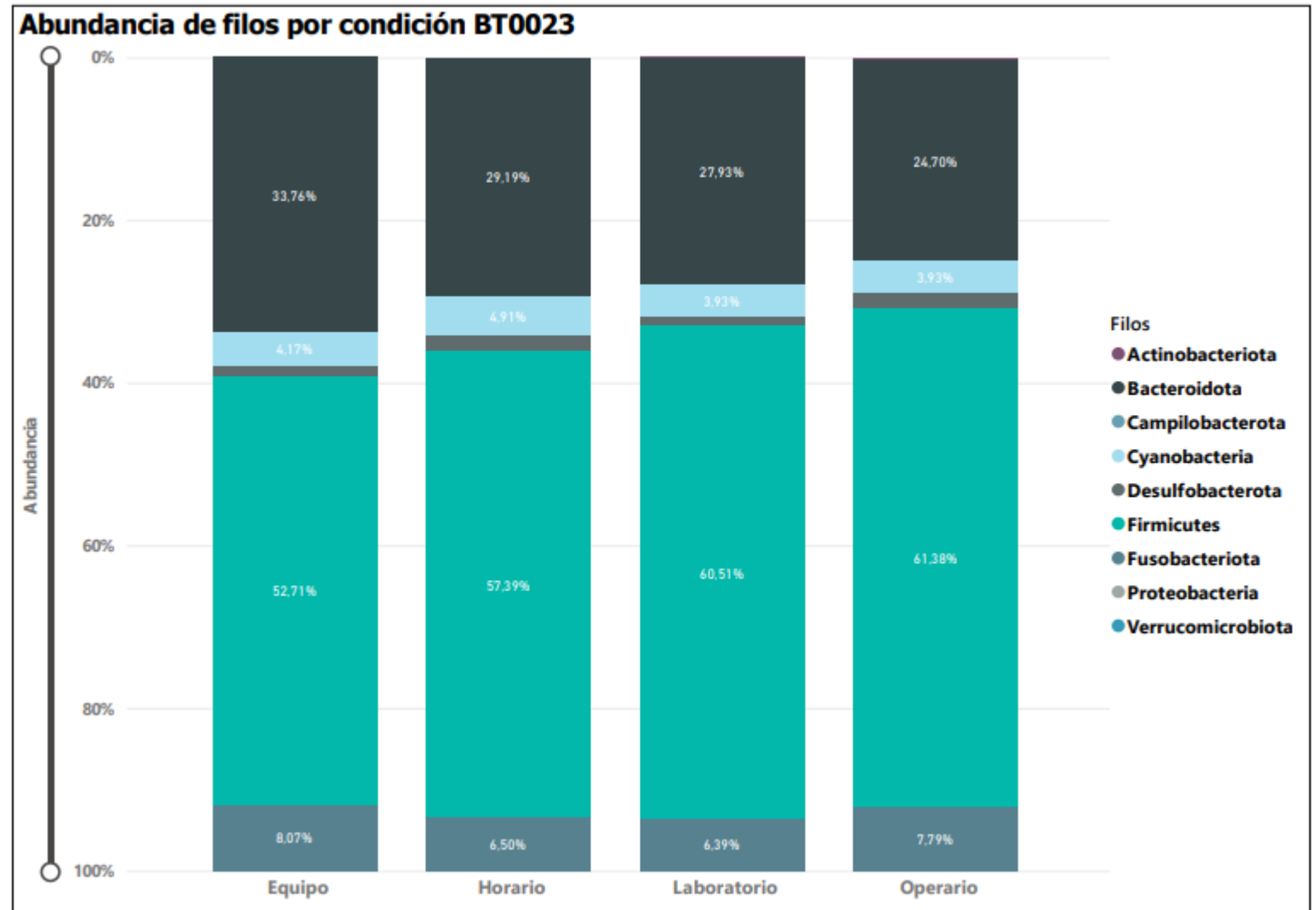


Fig.6 Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo e indicando el cambio de condición para el voluntario BT0023.

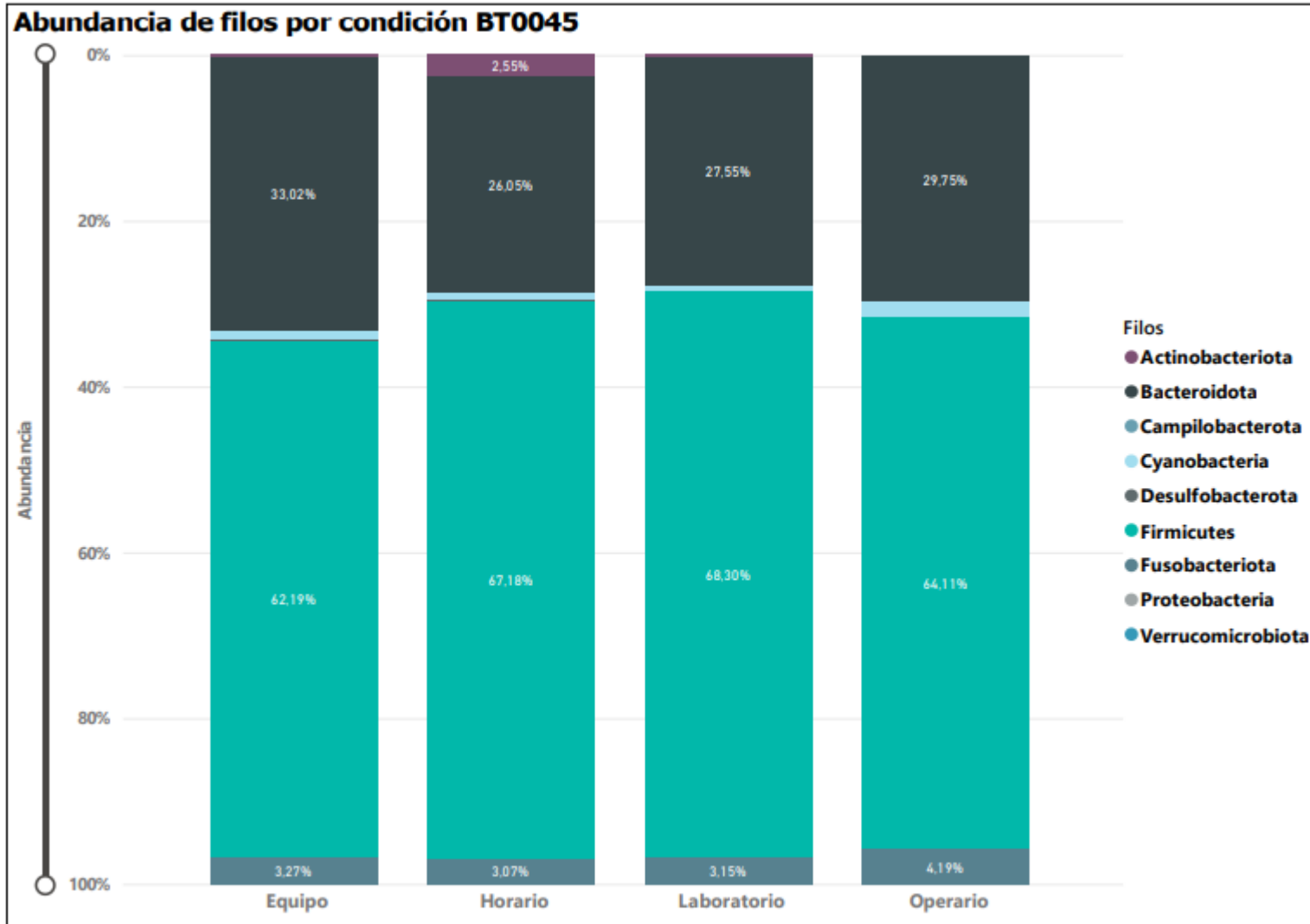


Fig.7 Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo e indicando el cambio de condición para el voluntario BT0045.

El cambio de condición no afecta significativamente la composición taxonómica de una muestra a nivel de filo

p-value = 0.3551  
>>> 0.05

**Estas pequeñas variaciones no cambian la conclusión clínica**

Hallazgo:  
el Filo Actinobacteriota (en morado) parece favorecerse del ciclo circadiano (luz solar durante el día). En nuestro análisis el cambio de horario actúa como una interferencia que puede controlarse al fijar el horario de extracción del ADN.

# 1. Abundancia relativa a nivel de filo

El cambio de condición no afecta significativamente la composición taxonómica de una muestra a nivel de filo

p-value = 0.3549  
>>> 0.05

Estas pequeñas variaciones no cambian la conclusión clínica

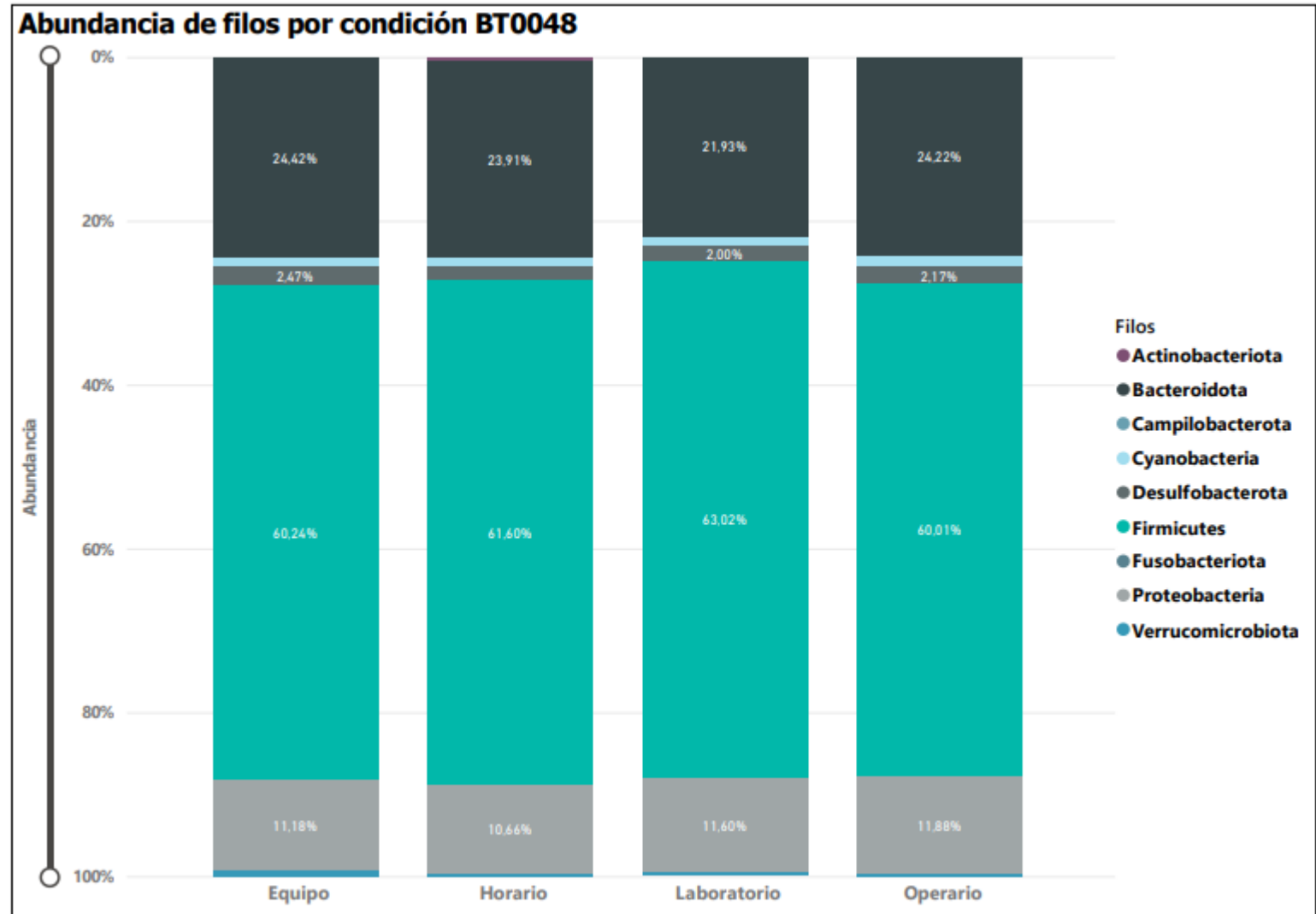
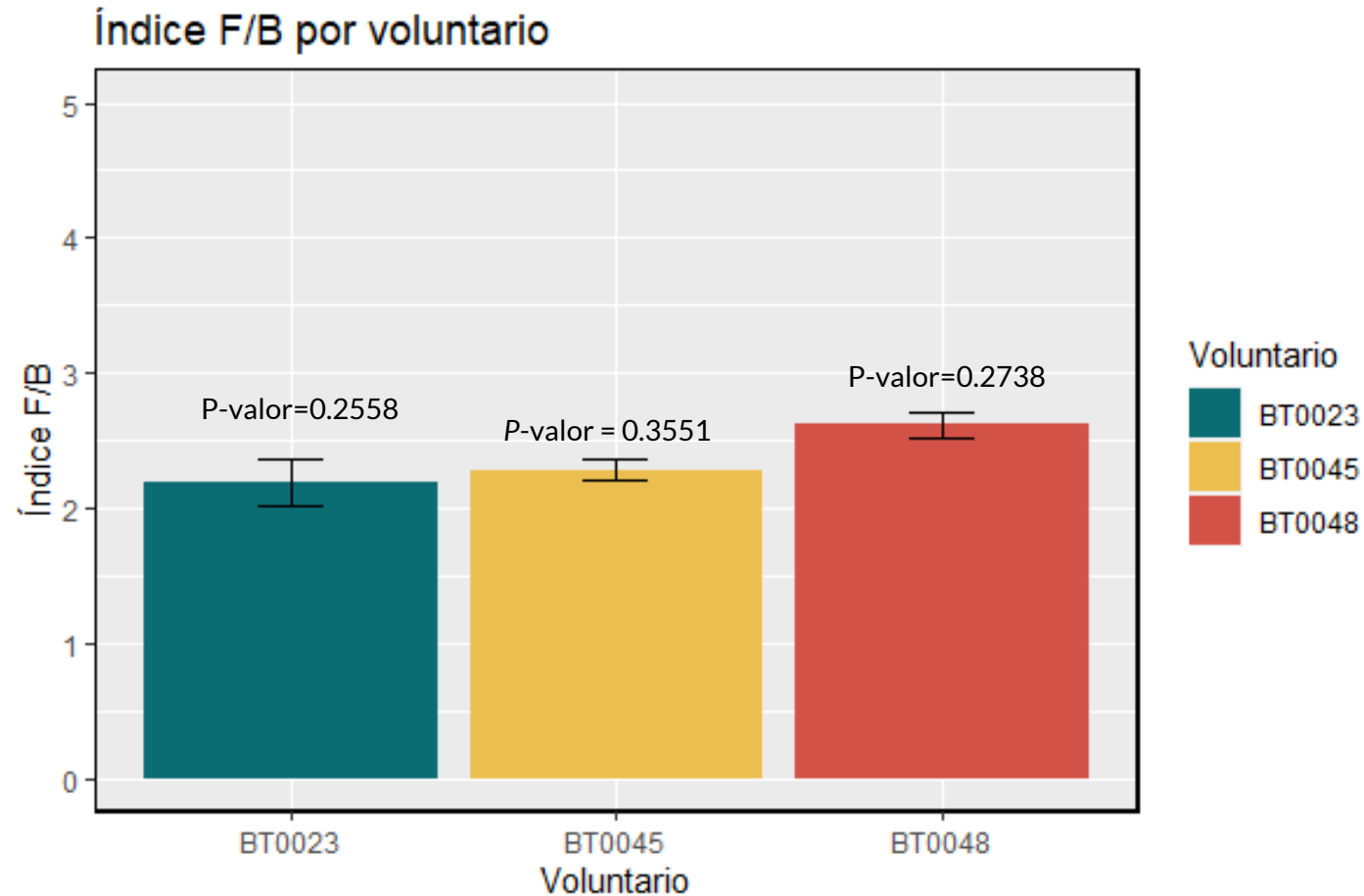


Fig.8 Barplot con la abundancia relativa a nivel de filo e indicando el cambio de condición para el voluntario BT0048.

La variabilidad individual **NO ES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA** al cambiar condiciones de procesamiento

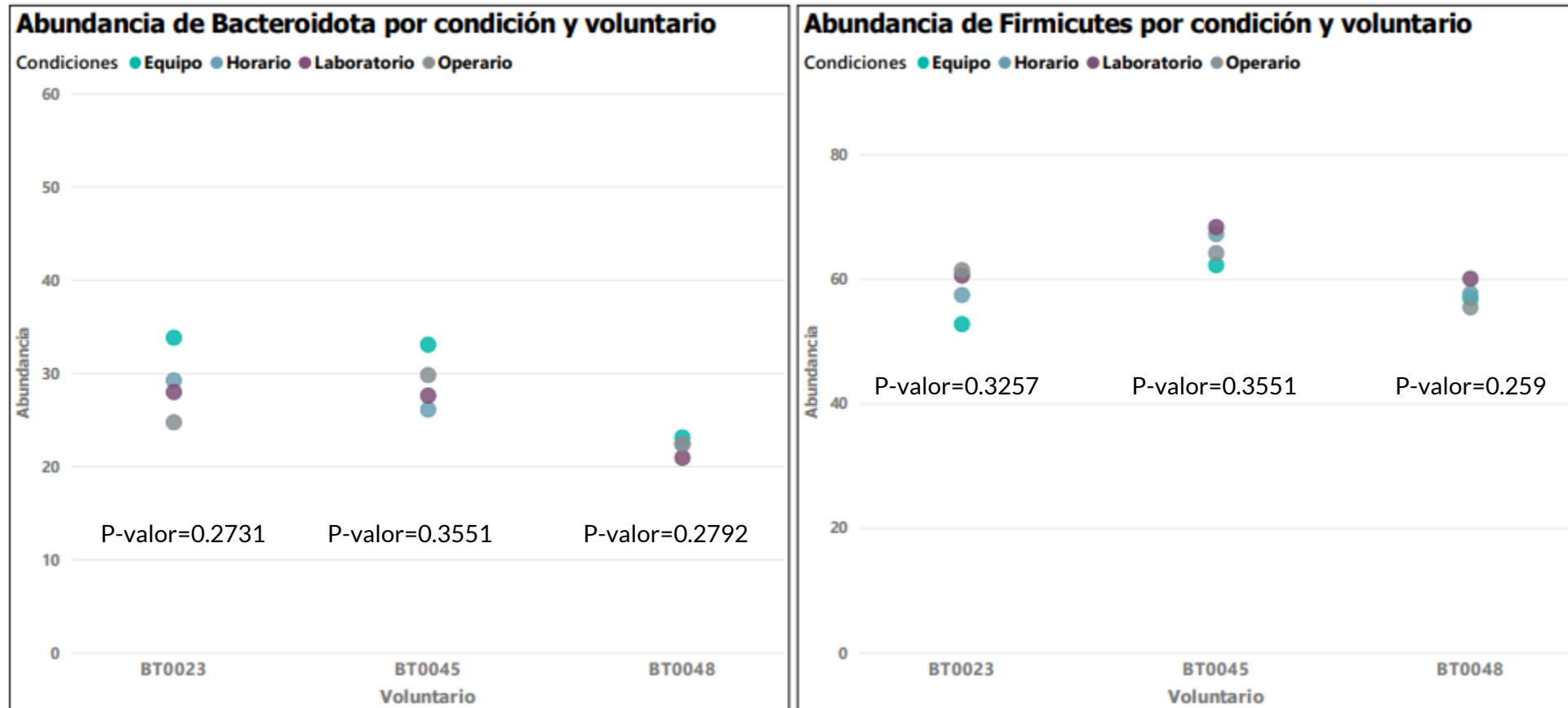
De acuerdo con los resultados de esta validación, se fijan los horarios y equipos de extracción\* para minimizar interferencias halladas (e.g aparición de Cianobacterias). Aún así las variaciones siguen siendo **NO SIGNIFICATIVAS ESTADÍSTICAMENTE** al cambiar condiciones.

\* El protocolo de extracción de ADN se fija para que siempre se realice entre 6AM-12M y en los equipos del laboratorio de Biología Molecular Investigación EAFIT.



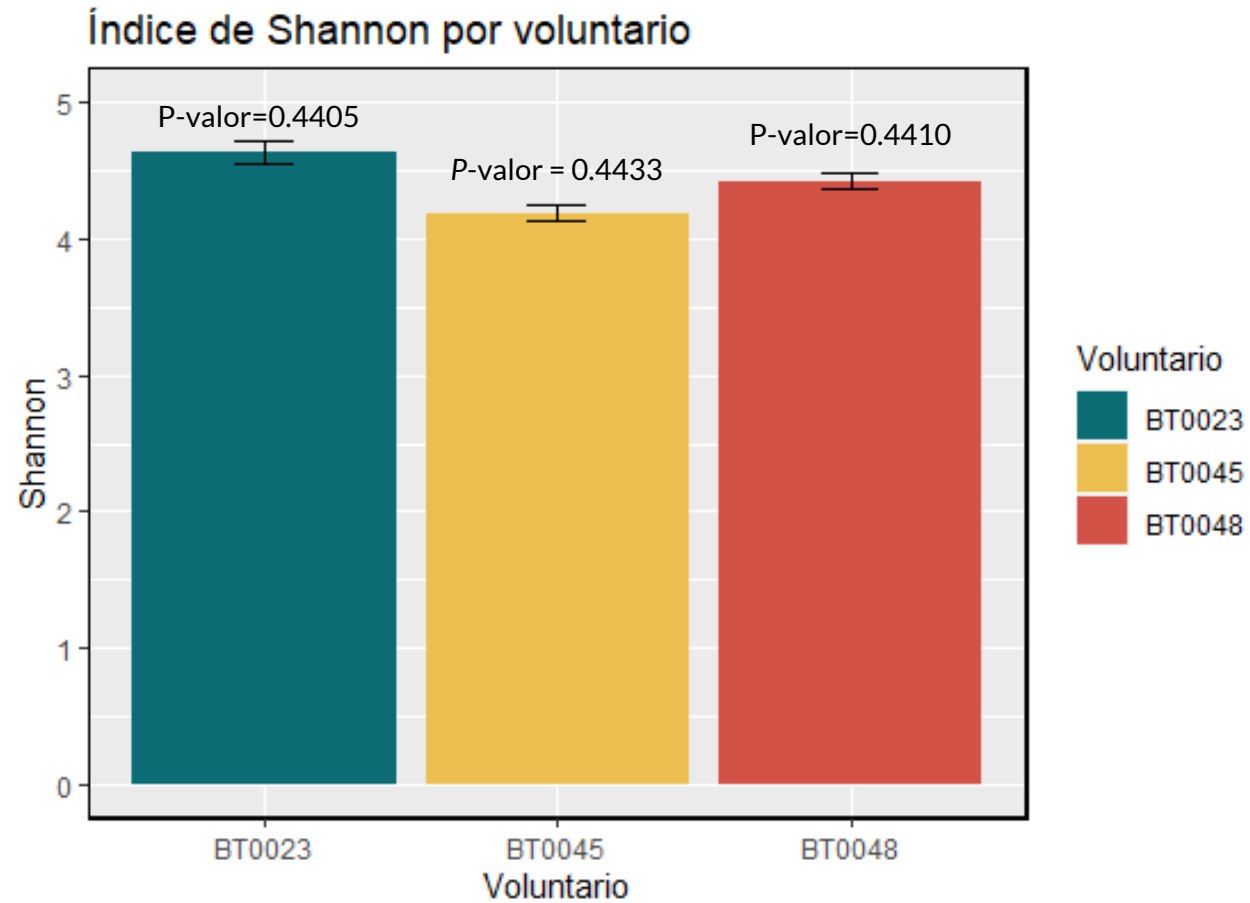
**Fig.9** Promedio del índice Firmicutes/Bacteroidota para cada voluntario. Se consideró para el total de los datos de cada voluntario el siguiente  $n$  poblacional (BT0023  $n=11$ , BT0045  $n=12$ , BT0048  $n=11$ ) se realizó un análisis no-paramétrico *Kruskal-wallis* hallando cada  $P$ -valor para un 95% de confianza.

## 2. Radio Firmicutes/Bacteroidota por condición y por voluntario

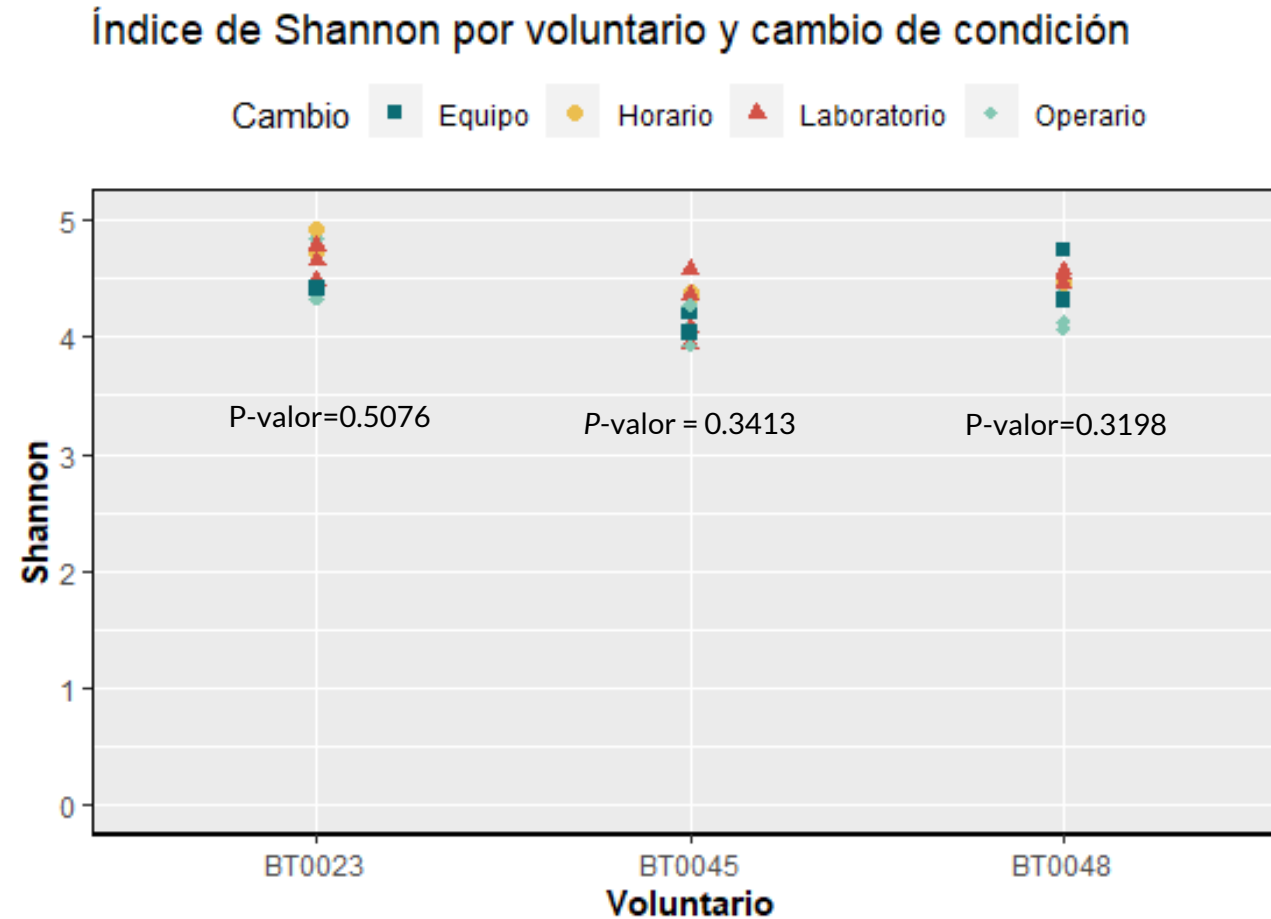


**Fig.10** Stripplot de la abundancia relativa del filo Bacteroidota y el filo Firmicutes para cada voluntario, teniendo en cuenta su cambio de condición. Se calculó su P-valor y tal como se muestra no hay diferencia estadísticamente significativa.

La variabilidad del cambio de condición en cada voluntario NO  
ES ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA para el Índice F/B



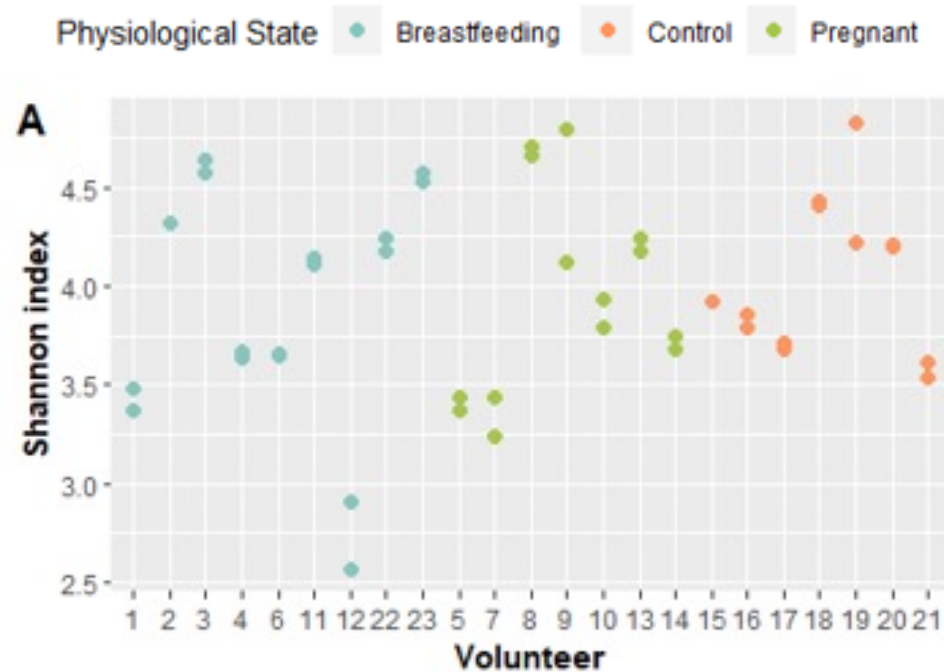
**Fig.11** Promedio del índice de Shannon para cada voluntario. Se consideró para el total de los datos de cada voluntario el siguiente  $n$  poblacional (BT0023  $n=11$ , BT0045  $n=12$ , BT0048  $n=11$ ) se realizó un análisis no-paramétrico *Kruskal-wallis* hallando cada  $P$ -valor para un 95% de confianza.



**Fig.12** Stripplot del índice de Shannon para cada voluntario, teniendo en cuenta su cambio de condición. Se calculó su P-valor y tal como se muestra no hay diferencia estadísticamente significativa.

# Individualidad del resultado clínico (biológico) de la prueba BIOMATEST

## Diversidad Alpha entre voluntarias



## Diversidad Beta entre voluntarias



p-value=0.0063 <<< 0.05 (Esta diferencia estadística, refleja que la microbiota de cada persona es tan única como una huella dactilar)

**Conclusión:** las variaciones individuales de la microbiota hacen que sea una medida clínica **ÚNICA** para cada Usuario. Las variaciones técnicas NO INTERFIEREN EN ESA MEDIDA CLÍNICA de acuerdo con lo que se muestra en esta validación

# Conclusiones

- Las variaciones en las **cuatro** condiciones de obtención de índices de los voluntarios BT0023, BT0045 y BT0048, **NO PRESENTAN CAMBIOS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS**
- Las variables que medimos en el informe de Biomatest **SON REPLICABLES** para cada uno de los usuarios evaluados lo cual cumple apropiadamente con el proceso de validación.



**Gracias**