

## Raport de activitate

În cadrul proiectului Pluriseq@UMFVBT (CNFIS-FDI-2024-F-0451) au fost realizate următoarele activități (expuse în ordinea regăsită în aplicație).

### **EXTINDEREA BAZEI MATERIALE DEDICATE SECVENTIERII DE ULTIMA GENERATIE**

#### **A.1.1. Achiziția și instalarea/operationalizarea unui instrument de secvențiere Nanopore MK1B.**

A fost achiziționat un sistem de secvențiere MK1B împreună cu un set minimal de consumabile necesare operationalizării. Aparatul a fost pus în funcțiune și funcționează în parametri normali de secvențiere.

#### **A.1.2. EXTINDEREA BAZEI MATERIALE INFORMATICE DEDICATE SECVENTIERII DE ULTIMA GENERATIE**

A fost achiziționat un sistem computațional portabil Apple de 16inchi echipat cu procesor Apple M3 Max chip cu 16-core CPU, 40-core GPU, 16-core Neural Engine, 128GB unified memory și memorie SSD de 8TB. Sistemul este instalat, funcțional și operationalizat în cadrul activităților curente legate de secvențierea long reads.

### **INTRODUCEREA ȘI OPTIMIZAREA DE NOI ALGORITMI ANALITICI DE SECVENTIERE LONG READS**

#### **A.1.2.1 Ghid de proceduri de secvențiere long reads și analiza prin secvențiere a plasmidelor.**

A fost pus la punct, optimizat și verificat algoritmul analitic de secvențiere a plasmidelor. Procedura a fost verificată pe probe obținute de la colaboratori externi (Institutul de Biochimie al Academiei). A fost folosit kitul de secvențiere Rapid Barcoding Kits care permite multiplexarea probelor. Verificarea calității și cantității atât a plasmidilor purificați cât și a librărilor sintetizate (și purificate cu Agencourt AMPure XP) a fost făcută folosind fluorometre Qubit. Celulele de secvențiere au fost pregătite folosind kitul FlowCell Wash kit iar librăriile au fost încărcate pe celule R10.4 operationalizate pe dispozitive Mk1B.

#### **A.1.2.2. Ghid de proceduri de secvențiere targetată/adaptativă**

A. În vederea optimizării procedurii de secvențiere adaptativă indirectă „prin reducerea fondului genomic”) au fost testate (single sau în combinații) 4 proceduri de depleție a ADN uman dintr-un amestec biologic complex: tehnica de saponificare, tehnica NEB, tehnica HostZero, tehnica Mini. Rezultatele acestei etape au fost prezentate public în cadrul prezentării orale invitate cu ocazia Conferinței Naționale de Sănătate Publică Timișoara 16-18 mai 2024.

B. În vederea optimizării procedurii de secvențiere adaptativă directă au fost testate activitatea de real-time base-calling în comparație cu un genom de referință. Testele au fost efectuate pe sistemul Mk1C care s-a dovedit că nu a suportat din punct de vedere computațional utilizarea ca genom de referință „de excludere” genomul uman. Testele urmează a fi reluate pe un sistem Promethion (achiziționat printr-un program PNRR de digitalizare) care urmează să fie instalat până la sfârșitul acestui an; acest nou

sistem va permite abordări computaționale mult mai complexe, inclusiv celui adaptativ direct.

## **CREȘTEREA PERFORMANȚEI ÎN CERCETARE A RESURSEI UMANE A UMFVBT**

### **A.2.1 Organizarea de sesiuni de instruire practică a instrumentelor Nanopore și de analiză bioinformatică a rezultatelor de secvențiere**

Au fost efectuate patru sesiuni de instruire practică (23.05.2024, 4 participanți masteranzi; 06.06.2024, 2 participanți masterand și student; 12.06.2024, 7 participanți, 2 studenți și 5 doctoranzi asistenți universitari; 11.09.2024 (sesiune de training organizată în cadrul Scolii de Vara de Microbiologie organizată de UMFVBT, sesiune cu 18 participanți medici rezidenți/specialiști/primari, dintre care 2 cadre universitare ale UMFVBT și 2 cadre universitare UMF Craiova și Facultatea de Medicină Constanța) în care fost introduse teoretic și practic următoarele:

- recoltarea materialului biologic în vederea secvențierii long-reads;
- tehnici de izolare ADN în vederea secvențierii long-reads; adaptarea tehnicilor de purificare ADN în funcție de materialul biologic utilizat;
- metode de pregătire a librăriilor în vederea secvențierii 16S și shotgun metagenomics;
- tehnici de secvențiere adaptativă;
- metode de analiză calitativă și cantitativă a datelor de secvențiere.

În urma publicării anunțului desfășurării proiectului FDI pe site-ul universității, am fost solicitați să acordăm consiliere în vederea introducerii și/sau optimizării procedurilor de long reads pentru cadre didactice și studenți (licență, masteranzi și doctoranzi); au fost susținute până în prezent 16 sesiuni individuale de consiliere în vederea posibilei folosiri a metodologiei de secvențiere long reads, după cum urmează: 08.03.2024, 25.03.2024, 07.05.2024, 13.05.2024, 13.06.2024, 18.09.2024, 11.10.2024, 18.10.2024, 04.11.2024, 04.11.2024, 05.11.2024, 14.11.2024, 19.11.2024, 20.11.2024, 09.12.2024, 11.12.2024

Au fost susținute prin achiziție directă de materiale (consumabile, kituri, reactivi) mai multe proiecte în următoarele domenii: secvențierea long-reads în evaluarea microbiotei salivare post imunoterapie la pacienții oncologici; secvențierea long-reads în evaluarea microbiotei salivare ca indicator al stresului; secvențierea long-reads în evaluarea microbiotei intestinale asociate patologiei oftalmologice; secvențierea long-reads în evaluarea microbiotei sputei și a mutațiilor la pacienții cu patologie oncologică pulmonară; optimizarea purificării ADN bacterian din sputa în vederea analizei metagenomice prin secvențiere long-reads; analiză metagenomică a produselor lactate prin secvențiere long-reads; secvențierea ADN plasmidian folosind secvențierea long-reads; izolarea și secvențierea long-reads a bacteriofagilor specifici pentru bacteriile rezistente izolate de la pacienții din secția de arși; investigarea prin secvențiere long-reads a tulpinilor bacteriene rezistente la carbapeneme, izolate de la pacienții spitalizați în secții cu risc (terapie intensivă și secții cu profil chirurgical). Date despre unele dintre aceste proiecte în desfășurare au fost prezentate public în cadrul Conferinței Naționale de Sănătate Publică Timișoara 16-18 mai 2024.