

**Título del Curso:**

"Curso teórico-práctico de introducción a la secuenciación con tecnología Oxford Nanopore Technologies para la caracterización de microorganismos"

**Docentes y colaboradores:**

Cecilia Salazar - Institut Pasteur de Montevideo.

Nadia Riera - Institut Pasteur de Montevideo.

Daniela Costa - Institut Pasteur de Montevideo.

Andrés Parada - Institut Pasteur de Montevideo y Facultad de Ciencias, UdelaR.

Pilar Moreno - Institut Pasteur de Montevideo y Facultad de Ciencias, UdelaR.

Marianoel Pereira - Institut Pasteur de Montevideo - Facultad de Veterinaria, UdelaR.

Alicia Costáble - Institut Pasteur de Montevideo y Facultad de Ciencias, UdelaR.

Florencia Díaz-Viraqué. Institut Pasteur de Montevideo.

Luisa Berná - Institut Pasteur de Montevideo y Facultad de Ciencias, UdelaR.

Pablo Fresia - Institut Pasteur de Montevideo.

**Descripción del Curso:**

La secuenciación de tercera generación (TGS por *Third Generation Sequencing*) ha revolucionado el campo de la genómica al permitir la obtención de secuencias de ADN de manera más rápida, precisa y a un costo accesible. Este curso plantea realizar una introducción a la secuenciación de tercera generación, explorando sus principios fundamentales, tecnologías disponibles y aplicaciones en la investigación científica con énfasis en la plataforma de secuenciación Oxford Nanopore Technologies. Los participantes obtendrán una introducción al funcionamiento de esta plataforma y cómo la misma puede aplicarse para abordar distintas preguntas biológicas en el contexto del estudio de microorganismos.

**Objetivos del Curso:**

1. Comprender los principios fundamentales de la secuenciación de tercera generación y sus diferencias con las tecnologías de secuenciación previas.
2. Familiarizarse con la plataforma de secuenciación portátil MinION y sus características.
3. Explorar las aplicaciones de la secuenciación de ONT en la investigación básica y aplicada.
4. Discutir los desafíos limitaciones actuales de la plataforma ONT y las áreas de desarrollo.
5. Acercamiento práctico a la preparación de bibliotecas de secuenciación genómica de bacterias.
6. Introducción al análisis de datos crudos de secuenciación, ensamblado de genomas y determinación de relaciones filogenéticas.

**Modalidad**

El curso combinará clases teóricas y prácticas y promoverá la participación activa de los estudiantes. Las clases teóricas serán en formato de introducción a través de la presentación de un docente invitado. Las mismas serán impartidas presencialmente con la posibilidad de grabarlas. El curso también tendrá un componente de laboratorio

experimental y de análisis bioinformático. Se proporcionarán recursos en línea y tutoriales para el análisis de datos de secuenciación.

### Programa

**Día 1:** Introducción a la secuenciación de tercera generación. Comparación con tecnologías de secuenciación previas.

Teóricos (3 hs):

- Presentación de estudiantes y docentes.
- Introducción a las tecnologías de secuenciación TGS. Fundamentos de la secuenciación con ONT.
- Plataformas de secuenciación de tercera generación: utilización de TGS para el ensamblado de genomas.

Prácticos (4 hs):

- Consideraciones para la extracción de ADN genómico microbiano y control de calidad del ADN.
- Tipos de plataformas de secuenciación ONT. Diseño del experimento de secuenciación. Métodos de preparación de bibliotecas de secuenciación ONT utilizando métodos libres y dependientes de amplificación.

**Día 2:** Aplicación de ONT para la generación de genomas bacterianos completos y su relevancia epidemiológica.

Teóricos (3 hs):

- Ventajas y limitaciones de ONT para estudios genómicos y filogenéticos.
- Estructura genómica, genómica de poblaciones y filogenética/filogeografía de patógenos.
- Estrategias de preparación de bibliotecas de secuenciación genómica y herramientas para la obtención de genomas completos de microorganismos.

Prácticos (4 hs):

- Preparación de biblioteca de secuenciación libre de amplificación (*ligation*) a partir de ADN purificado.
- Cargado en celda de secuenciación y manejo de software.

**Día 3:** Monitoreo basado en secuenciación de enfermedades infecciosas y resistencia a antimicrobianos.

Teóricos (3 hs):

- Monitoreo de la resistencia antimicrobiana.
- Introducción a las herramientas para la tipificación de cepas, estudio comparativo de genomas y relaciones filogenéticas.

Prácticos (4 hs):

- Control de calidad de los datos de secuenciación ONT de un dataset público. Ensamblado *de novo* y determinación de las relaciones filogenéticas con secuencias depositadas en base de datos públicas.

**Día 4:** Análisis de datos y bioinformática. Procesamiento de datos crudos. Ensamblado de genomas.

Prácticos (7 hs):

- Control de calidad de los datos generado en el práctico. Ensamblado genómico, búsqueda de genes de resistencia a antimicrobianos.
- Discusión grupal.

- Análisis filogenético de los genomas ensamblados y su relación con los genomas en la base de datos.

**Día 5:** Aplicación de ONT para la generación de genomas virales a partir de la secuenciación de amplicones solapantes. Aplicación y relevancia para el estudio de brotes epidemiológicos.

Teóricos (3 hs):

- Ejemplos de seguimiento de la evolución viral en tiempo real: SARS-CoV-2
- Estrategias y métodos para la caracterización de la evolución viral.

Prácticos (4 hs):

- Presentación y discusión de los resultados grupales.

**Público Objetivo:**

Este curso está dirigido a estudiantes de posgrado con interés en el estudio de microorganismos utilizando tecnología de secuenciación de tercera generación ONT en su investigación.

**Duración del Curso:**

El curso se llevará a cabo durante 5 días, con un total de 12 horas de clases teóricas y 23 horas de clases prácticas entre el 2 y el 6 de diciembre de 2024.

**Requisitos Previos:**

Es altamente recomendable que los participantes tengan conocimientos en biología molecular y en la utilización de la línea de comando, así como el lenguaje de programación R para el máximo aprovechamiento del curso.

**Evaluación:**

Los participantes que completen con éxito todas las tareas y evaluación final contarán con un certificado de aprobación. El estudiante deberá alcanzar como mínimo una calificación correspondiente al 65% (sesenta y cinco por ciento) del puntaje máximo.