Plan Overview

A Data Management Plan created using DMP Tool

Title: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS - DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E DROGAS TERAPÊUTICAS UTILIZANDO PROTEÔMICA SUBTRATIVA

Creator: Maria cristina da silva Pranchevicius

Affiliation: Universidade Federal de São Carlos (ufscar.br)

Principal Investigator: Maria Cristina da Silva Pranchevicius

Data Manager: Anderson Ferreira da Cunha , Andrea Soares da Costa Fuentes, Caio César de Melo Freire , Emeline Boni Campanini , André Pitondo da Silva

Funder: São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

Grant: 2020/11964-4

Template: Digital Curation Centre (português)

Project abstract:

A evolução, o aumento da prevalência e a disseminação de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos, agravado pela falta de disponibilidade de novos antimicrobianos, produz um grave problema mundial para o gerenciamento e controle de infecções. Técnicas moleculares estão sendo empregadas para mitigar alguns desses problemas com a identificação de genes e elementos genéticos responsáveis pela disseminação de determinantes da resistência e virulência bacteriana. Tais abordagens também permitem a identificação de potenciais candidatos terapêuticos a serem aplicados na conduta clínica de pacientes contaminados. Deste modo, estamos propondo estudos moleculares sobre o perfil de resistência aos antimicrobianos, de virulência, análises filogenéticas, sequenciamento, e análises genômicas de bactérias oportunistas. Pretendemos também, através de técnicas de proteômica subtrativa e vacinologia reversa, encontrar potenciais alvos de drogas e candidatos a vacina que possam ser usados contra S. marcescens, um patógeno oportunista, que pode ser multidrogas resistente (MDR) e está associado à infecções graves com alta taxa de mortalidade Os dados obtidos fornecerão informações importantes sobre os reservatórios de genes de resistência e virulência, as relações genéticas entre as cepas MDR e será útil na identificação de novos compostos terapêuticos contra bactérias MDR.

Start date: 02-01-2021

End date: 01-31-2023

Last modified: 07-08-2024

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS OPORTUNISTAS - DESENVOLVIMENTO DE VACINAS E DROGAS TERAPÊUTICAS UTILIZANDO PROTEÔMICA SUBTRATIVA

Coleta de Dados

Que dados serão coletados ou criados?

O projeto possui o apoio do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Tocantins (LACEN-TO), que integra o Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, que nos disponibilizará cepas bacterianas isoladas de amostras clínicas, para realizarmos análises que permitirão uma melhor compreensão da frequência de genes responsáveis pela resistência aos antibióticos mais comumente utilizados na prática clínica, bem como do perfil de virulência dessas cepas. Os dados preliminares de isolamento referentes a identificação da espécie, teste de suscetibilidade frente aos antimicrobianos através da automação-VITEK-2 e caracterização fenotípica de carbapenemases serão realizados pelo LACEN-TO, de acordo com a rotina pré-estabelecida na Instituição e que segue as recomendações padronizadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI-USA) vigente, orientações técnicas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, obedecendo o fluxo existente pelo Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – Portaria 2031/MS/GM, 23 de setembro de 2004, inseridos no Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar – Portaria 232⁄98. Em seguida, uma parte da amostra será enviada à UFSCar-DGE para o desenvolvimento do projeto. Serão caracterizados geneticamente também cepas bacterianas isoladas de infecções de pés de pacientes diabéticos. A caracterização fenotípica, quanto a resistência aos antibióticos, estão descritas no artigo de Perim et al. (2015), (http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0146-2015). Os isolados mecA positivos dessas cepas serão também rastreados através da tipagem *Staphylococcal* cassette chromosome mec (SCCmec), todas as cepas serão analisadas com uma combinação de marcadores de genes de virulência, enquanto que a relação genética entre os isolados será avaliada por Multilocus Sequence Typing (MLST).

Como os dados serão coletados ou criados?

Os dados serão criados através de:

Análise Fenotípica: A identificação e os testes iniciais de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados bacteriano serão realizados com sistema automatizado VITEK-2 (bioMérieux Vitek, USA). O método de microdiluição em caldo será realizado para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da tigeciclina e colistina e os resultados serão interpretados com base nos critérios do Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST, 2018), disponível em https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables.pdf. . Os isolados serão testados quanto à produção de carbapenemase pelo teste de Hodge modificado, teste de sinergia e ácido etilenodiaminotetracético sob as diretrizes do CLSI (2019), e conforme descrito em outros trabalhos (Okoche et al. al., 2015; Ferreira et al., 2019). Os isolados com perfis MDR serão classificados como não suscetíveis a pelo menos um agente de três ou mais categorias antimicrobianas (Magiorakos et al., 2012).

Análise genotípica por PCR: Realizaremos a detecção por PCR convencional e/ou qRT-PCR dos genes codificantes que conferem resistência aos antibióticos beta-lactamases, aminoglicosídeos, quinolonas, além de analise de bombas de efluxo e porinas. Através do PCR também analisaremos genes de virulência.

Sequenciamento genômico completo de cepas bacterianas com perfil multidrogas resistentes: O sequenciamento do genoma completo dos isolados será realizado utilizando a plataforma Illumina NextSeq 550 System Sequencing. O DNA genômico será extraído utilizando o Kit de Purificação de DNA Genômico Wizard (Promega) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração do DNA bacteriano será determinada utilizando o equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA. Para o sequenciamento será feito a preparação da biblioteca gênica com o kit Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, USA) utilizando 1 ng de DNA genômico. A biblioteca será amplificada utilizando um programa de PCR com ciclos limitados. Os passos para a PCR incluem adicionar os adaptadores Index 1 (i7) e Index 2 (i5) e sequências necessárias para formar o cluster. A purificação da biblioteca será realizada utilizando esferas

magnéticas 0.6x Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter). A quantificação e verificação dos tamanhos dos fragmentos será realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5%. A quantificação final da biblioteca será feita em fluorimetro Qubit® 3.0 e normalizada a 4 nM utilizando um método de diluição padrão. As bibliotecas serão misturadas, desnaturadas com 0,2 N NaOH e diluídas a uma concentração final de 1,8 pM. Um controle PhiX será adicionado na concentração final de 1,5pM. A corrida será de 75 ciclos para cada leitura (2x75).

Montagem do Genoma: O sequenciamento será analisado com o programa FastQC e será utilizado o programa Trigalore para fazer a trimagem de bases e melhorar a qualidade do sequenciamento. A montagem do genoma será feita com o programa SPAdes 3.2 (Bankevich et al., 2012) e as estatísticas acerca da montagem serão acessadas com o programa QUAST (Gurevich et al., 2013). O conteúdo do DNA G + C das cepas referências será calculado com base nas sequências dos respectivos genomas e o gráfico do mapa circular será obtido usando o servidor CGView (Grant & Stohard, 2008). Para a identificação e montagem de plasmídeos serão utilizados os parâmetros default do plasmidSPAdes (http://spades.bioinf.spbau.ru/plasmidSPAdes) (Antipov et al., 2016).

Anotação do Genoma: O genoma será anotado usando o programa de anotação rápida do genoma procariótico, PROKKA (Seemann T,2014) e o servidor Rapid Annotation using Subsystem Technology RAST (Aziz et al., 2008). O programa BUSCO será utilizado para a avaliação quantitativa da composição genômica e integridade da anotação (Simão FA,2015), descartando dessa forma os contigs de 200 pb ou menores.

Análises de Genes COG, eggNOG e WebMGA: As categorias funcionais COG (Clusters of Orthologous Group) serão atribuídas através de pesquisas contra bancos de dados de genes ortologos. Para a anotação funcional serão utilizados 2 servidores online o EggNOG-mapper (http://eggnog-mapper.embl.de.)(Carlos,2021) e o WebMGA (http://weizhongli-lab.org/metagenomic-analysis)(Wu,2011).

Identificação da espécie e análise filogenética: A identificação da espécie será primeiramente analisada utilizando o gene 16SrRNA. Todas as sequências curadas do gene 16S rRNA dos principais membros filogenéticos do gênero serão buscadas no banco de dados GenBank e alinhadas usando o servidor online MAFFT “multiple sequence alignment software” (Katoh et al.,2013). A construção da árvore filogenética de Máxima Verossimilhança (ML), juntamente com a seleção do melhor modelo de montagem serão feitas usando o programa MEGA7 (Kumar et al., 2016).

Os genomas referencias de todos os membros mais próximos serão resgatados no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/) e o parentesco também será determinado com base na média Identidade de Nucleotídeo (ANIu) usando o algoritmo OrthoANIu (Yoon et al., 2017). A hibridização digital DNA-DNA (dDDH) será calculada in silico pela Calculadora de Distância Genoma a Genoma (GGDC 3.0) usando o método de BLAST (Meier-Kolthoff et al., 2013). Para melhor visualização do resultado será utilizado a ferramenta online CIMminer (https://discover.nci.nih.gov/cimminer/oneMatrix.do) do NCBI para construir um Heatmap com os resultados do orthoANI e do GGDC.

Caracterização de fatores de Resistência: Genes de resistência a antibióticos serão pesquisados usando o servidor de Rapid Annotation using Subsystem Technology, RAST (Aziz et al., 2008) com parâmetros no default. Será realizado um Blast de nucleotídeos e aminoácidos com o banco de dados abrangente de resistência a antibióticos (CARD; https://card.mcmaster.ca/) (Jia et al., 2017), e com o banco do gene da resistência a antibióticos ANNotation (banco de dados ARG-ANNOT). Para esses Blasts será seguido um padrão de evalue > 1e-5 e um bitscore > 100. No Blast de nucleotídeos do banco de dados do ARG-ANNOT e do CARD serão utilizados parâmetros de identidade e cobertura maior de 90%. Já no Blast de aminoácidos do CARD será utilizado identidade maior de 70% e cobertura maior de 90%; no ARG-ANNOT a identidade será maior de 30% e a cobertura maior de 90%. Três ferramentas on-line serao utilizadas para melhor anotação dos genes de resistência, sendo elas o CARDonline (https://card.mcmaster.ca/), o ResFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/) e o BacAnt(http://bacant.net) (Hua X et al., 2021), utilizados com parâmetros default de cada ferramenta. O programa AMRFinderPlus 3.10 (Feldgarden M et al., 2021) ferramenta desenvolvida pelo NCBI será utilizado com pipeline de Blast, com evalue > 1e-5 e bitscore > 100. A anotação dos fatores de resistência será feita também pelo Banco de dados Genômico e Genes da Enciclopédia de Kyoto (KEGG) (Kanehisa & Goto, 2000) utilizando a ferramenta online BlastKOALA (http://www.kegg.jp/blastkoala/), para caracterização funcional dos genes de resistência. Os genes de resistência a flouquinolonas serão identificados a partir da anotação do Prokka e alinhados manualmente (Giles et al., 2004) com as sequências gyrA ; gyrA ; gyrB e gyrB . Os genes que

fornecem resistência a colistina foram identificados pela anotação do Prokka e as mutações serão também identificadas manualmente.

Caracterização dos Fatores de Virulência: Os fatores de virulência da cepa serão realizados através de Blast, com evalue > 1e-5, utilizando o banco de dados Virulence Factor Database (Chen et al., 2016). A threshold de identidade será definida em 50% e será utilizada uma cobertura maior de 80%.

Documentação e Metadados

Que documentação e metadados acompanharão os dados?

Os dados coletados serão tabulados e armazenados em planilhas no formato .xlsx que podem ser lidas no MS Office Excel.

Imagens das eletroforese dos geis de agarose para análise da amplificação dos grenes de virulência e resistência aos antibióticos serão obtidas e mantidas como arquivos .tiff

A imagem de montagem do genoma completo, das análises dos genes ortólogos, árvore filogenética, identidade média dos nucleotídeos (ANI) e hibridização DNA-DNA (DDH) serão obtidas e mantidas como arquivos .tiff

Sequencias genômicas (nucleotídeos) e de aminoácidos serão mantidas com arquivos .txt

Ética e Conformidade Legal

Como você administrará qualquer questão ética?

Os estudos envolvendo participantes humanos foram revisados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de São Carlos (no. 1.595.268, no. 1.088.936) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Tocantins (no. 020/2011). Neste trabalho, os dados de arquivo anônimos relacionados à idade, sexo e tipo de amostra do paciente serão obtidos do Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN/TO, proprietário dos dados). Não será necessário o consentimento do paciente, uma vez que os dados apresentados neste estudo não se referem a nenhuma pessoa ou pessoas específicas. O consentimento informado por escrito do responsável legal/próximo dos participantes não será exigido para participar deste estudo de acordo com a legislação nacional e os requisitos institucionais. A autorização para a realização do presente estudo foi obtida da Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins (SESAU) e do LACEN/TO. O acesso ao patrimônio genético e transporte foi aprovado pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen n° AFF27ED, n° A0100B9, n° AA95496).

Como você vai gerenciar os direitos autorais e os direitos de propriedade intelectual (IP / IPR)?

Os resultados gerados pela pesquisa serão de domínio do grupo de pesquisa até a sua publicação e poderão estar em repositórios virtuais para livre acesso à terceiros. Caso parte deste projeto seja passível de patenteamento, a segurança dos dados será necessária para proteger os direitos de propriedade intelectual. Dessa maneira, alguns dados poderão ser restritos ao solicitante. Em relação ao processo de patenteamento, após uma busca para averiguar se a invenção não existe no banco de dados, um pedido de registro será feito ao INPI. Todas as questões de direitos autorais e de propriedade intelectual serão acordados seguindo a regulamentação da UFSCar e da FAPESP. UFSCar oferece o apoio da Agência de Inovação da UFSCar, o Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) da Instituição.

Armazenamento e Backup

Como os dados serão armazenados e terão backup durante a pesquisa?

Os bancos de dados em formato .xlsx . txt e .tiff estão armazenados em um drive da plataforma Google compartilhado pelos alunos que desenvolvem cada projeto e orientadora do projeto, em suas contas institucionais oferecidas pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Além disso, existe o download do banco de dados nos computadores da pesquisadora responsável pelo projeto e de seus respectivos alunos. O acesso aos sistemas de armazenamento em nuvem eletrônica é realizado por senhas pessoas que garantem a segurança dessas informações. A metodologia, as observações científicas e a lista de cepas bacterianas que possuímos para o desenvolvimento da pesquisa estão registradas e devidamente datadas em cadernos-ata, armazenado em local específico dentro do Laboratório da Universidade Federal de São Carlos Campus São Carlos.

Como você vai gerenciar o acesso e a segurança?

Os dados poderão ser acessados somente mediante as senhas de acesso ao e-mail e computador da pesquisadora responsável e de seus respectivos alunos que estão desenvolvendo os projetos, até a realização total das atividades de pesquisa previstas ou publicação de resultados parciais. Considerando que as imagens e dados produzidos não envolverão aspectos éticos ou legais, estes poderão ser utilizados em projetos de pesquisa, artigos científicos e relatórios técnicos desde que a fonte seja devidamente citada. O compartilhamento baseará apenas após a aceitação da publicação associada.

Seleção e Preservação

Quais dados são de valor a longo prazo e devem ser mantidos, compartilhados e / ou preservados?

A pretensão é que os resultados sejam publicados em revistas de alto impacto que permitem acesso aberto (open-access). Também pretendemos que os dados sejam disponibilizados no repositório institucional da universidade para livre acesso a terceiros.

Qual é o plano de preservação a longo prazo do conjunto de dados?

Será realizado o armazenamento dos dados obtidos no presente projeto por tempo indeterminado em acervo pessoal dos responsáveis e no drive (nuvem eletrônica) institucional do pesquisador .

Compartilhamento de Dados

Como você vai compartilhar os dados?

O compartilhamento dos dados será realizado através de publicação em revistas científicas internacionais de alto impacto, preferencialmente de acesso aberto (open acess). Os dados também serão compartilhados em repositórios como o Repositório Institucional UFSCar e o Catálogo de Dissertações e Teses da CAPES, além de plataformas como Publons, Researchgate, Orcid, Scholar Google, entre outros. Além das Teses de Doutorado, Dissertações de Mestrado e Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC) espera-se que a publicação dos resultados em eventos científicos nacionais e internacionais contribua para a facilitação do acesso aos dados da pesquisa.

Existem restrições ao compartilhamento de dados requeridos?

Não há nenhuma restrição de acesso aos dados.

Responsabilidades e Recursos

Quem será responsável pelo gerenciamento de dados?

O acesso, gerenciamento e segurança dos dados será de responsabilidade dos alunos de Doutorado, Mestrado e Iniciação Científica com seus respectivos projetos e da professora orientadora responsável.

Quais recursos você precisará para entregar seu plano?

Conhecimentos necessários para o manuseio de softwares e aplicativos escolhidos para elaboração e armazenamento de dados (MS Word, Adobe Acrobat, Google Drive), e para a coleta de dados (conhecimento metodológico).