

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool

Title: Metagenômica viral em pacientes pediátricos oncológicos apresentando neutropenia febril sem diagnóstico etiológico

Creator: Anielly Sarana da silva

Affiliation: Universidade de São Paulo (www5.usp.br)

Principal Investigator: Svetoslav Nanev Slavov

Contributor: Gabriel Montenegro de Campos

Funder: São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

Funding opportunity number: 2022/10278-5

Template: Digital Curation Centre (português)

Project abstract:

Viral metagenomics is one of the most powerful tools for characterizing emerging or unsuspected infections in patients with an unconfirmed diagnosis. Using metagenomics, multiple viral agents have been identified so far, some with high pathogenic potential, thus enabling early clinical intervention and adequate treatment of affected patients. Febrile neutropenia is one of the most frequent life-threatening complications in cancer patients undergoing oncologic treatment: the adequate management is of paramount importance for the survival of these patients. As neutropenia is a clinical emergency, treatment is empirical with broad-spectrum antibiotics, and in fact, their application has dramatically increased survival rates. It is believed that in most cases the causative agent of neutropenia is bacteria, however, the bacterial pathogen is isolated in culture in only one third of all cases. In order to evaluate possible viral causes for febrile neutropenia, the objective of this project is to apply viral metagenomics in patients with oncological diseases undergoing treatment and with clinical diagnosis of febrile neutropenia. Blood and oropharyngeal swab samples will be collected from 40 pediatric patients with oncological diseases and febrile neutropenia from the pediatric oncological diseases outpatient clinic of the Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo. As control we will use a group formed by 40 pediatric patients with oncological diseases in remission who are sporadically returning to the hospital for follow-up. In this project, we will try to identify possible viral causes of neutropenia in pediatric cancer patients. This would have a significant clinical impact as it can shape the treatment procedures for these patients and detail the virome present in this emergency clinical condition.

Start date: 09-01-2022

End date: 08-01-2024

Last modified: 08-07-2023

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

Metagenômica viral em pacientes pediátricos oncológicos apresentando neutropenia febril sem diagnóstico etiológico

Serão coletados plasma e swab orofaríngeo de pacientes pediátricos oncológicos com neutropenia febril (grupo experimental) e de pacientes pediátricos em tratamento e/ou remissão.

Serão criados dados do metaviroma destes pacientes por sequenciamento de nova geração e análise estabelecida pelo grupo de pesquisa.

Plasma obtido do Laboratório de Patologia Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP). Estes pacientes realizam hemogramas recorrentemente, portanto utilizaremos o restante do tubo cedido pelo setor de Hematologia deste laboratório. O swab é coletado diretamente com os pacientes, pela pesquisadora em questão. Ambos só serão concedidos perante assinatura e concordância com os termos de consentimento e assentimento.

Para o sequenciamento, seguiremos o seguinte protocolo:

Inicialmente, 600 µL de plasma ou de swab diluído em PBS são pré-tratados com Turbo DNase (ThermoFisher Scientific) para remoção do DNA do hospedeiro ou de origem bacteriana, com inativação da DNase por meio de beads. Os ácidos nucleicos virais estão sendo extraídos utilizando o kit High Pure Viral Nucleic Acid Large Volume (Roche) com pequenas modificações: uso do carrier GenElute Linear Polyacrylamide (LPA) (Merck) para concentração de ácidos nucleicos e isopropanol para precipitação. Após a extração, os ácidos nucleicos são recuperados em 50 µl de água livre de nucleases, pré-aquecida a 70°C. São submetidos a transcrição reversa 5 µl dos ácidos nucleicos extraídos, utilizando o Superscript III First-Strand Synthesis System (ThermoFisher Scientific). A amplificação do cDNA está sendo feita utilizando o kit QuantiTect Whole Transcriptome (QIAGEN). A biblioteca de seqüências está sendo preparada utilizando o kit DNA Prep Library Preparation (Illumina) e Nextera DNA CD Indexes, utilizando 500 ng do transcrito amplificado para a tagmentação. O sequenciamento das bibliotecas de dupla indexação será realizado pela plataforma de sequenciamento Illumina NextSeq 2000, utilizando o kit NextSeq P3 (300 ciclos) (Illumina), seguindo as instruções do fabricante.

O processamento dos dados brutos e classificação taxonômica será realizado utilizando pipeline de metagenômica viral. Inicialmente, os dados brutos de sequenciamento que forem obtidos serão submetidos a análise de controle de qualidade utilizando o software FastQC v.0.11.8. Trimming e remoção do adaptador serão realizados pela aplicação dos softwares TrimGalore v.0.6.6 and Fastp v.0.23.1, a fim de selecionar seqüências com a melhor qualidade e livre de adaptadores. Para análise metagenômica, apenas aquelas com score de qualidade >30 serão consideradas. Para inferir a classificação taxonômica do viroma, será utilizado o Kraken2 v.2.0.8 com aplicação do banco genômico minikraken2. Kraken2 também será utilizado para subtrair as reads humanas, bacterianas e parasitárias, a serem excluídas de análises posteriores. Vírus que não causam infecções humanas, fagos e artefatos serão removidos manualmente dos resultados de Kraken2, já que não constituem um objetivo de interesse deste estudo. Montagem “de novo” será realizada utilizando SPAdes v.3.13.0 para gerar contigs virais. Por fim, a classificação taxonômica baseada em identidade de proteína será feita por Blastx, pelo software Diamond v.0.9.29. Esta pipeline também será aplicada para screening de contaminantes e artefatos, os quais serão removidos após o BlastX.

Termos de assentimento/consentimento

Mediante aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Segundo a legislação local.

Caderno de laboratório (acesso pessoal) e nuvem institucional.

Acesso pessoal e mediante identificação.

Dados do sequenciamento e dos pacientes (identificação, diagnóstico, desfecho clínico)

Publicação e preservação em nuvem institucional.

Publicações em revistas científicas e na publicação da tese.

Dados serão visualizados/acessados somente após publicações. Ao que se refere aos dados pessoais dos pacientes, estes serão renomeados com uma identificação interna e o nome não será compartilhado sob hipótese alguma.

Anielly Sarana da Silva e Svetoslav Nanev Slavov

Turbo DNase 2U/ μ l (Thermo Fisher) X2

QuantiTect Whole Transcriptome (QIAGEN) x1

High Pure Large Viral Nucleic Acids Kit (Roche) X2

GenElute LPA 5 μ g/ μ l (Merck) x1

Qubit dsDNA High Sensitivity Kit (Thermo Fisher) x1

DNA Prep Library Preparation (Illumina) X1

SuperScript III First-Strand Synthesis System (Thermo Fisher) x1

High Sensitivity DNA Kit – Chips & Reagents (Agilent Technologies) x1

NextSeq P3 (300 ciclos) (Illumina) X1
