

**Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**  
**Ciências Biomédicas - Turma V - RCB300 – Análise de Microbioma Hospitalar**

**Prof. Dr. Wilson Araújo Silva Jr. e Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes**

**Dayane Malta Silva - 10876646**

**Laura Colete Cunha - 10821356**

**Stéphanie Rosa – 9880242**

**Vitor Luís Menzani - 10749571**

**Metodologia:**

Foi utilizada a plataforma Microbiome Analyst (<https://www.microbiomeanalyst.ca/>) para analisar e predominância de certos tipos microbianos no ano de 2018. A ferramenta Marker Data Profiling (MDP) foi utilizada com o método de taxonomia SILVA para analisar a tabela de OTU, Metadata e Taxonômica, com os dados verificados para o menor tamanho da biblioteca. Em seguida foram realizadas análises de Clustering e Correlação, o que inclui Heatmaps, dendogramas, gráficos de correlação e de padrão.

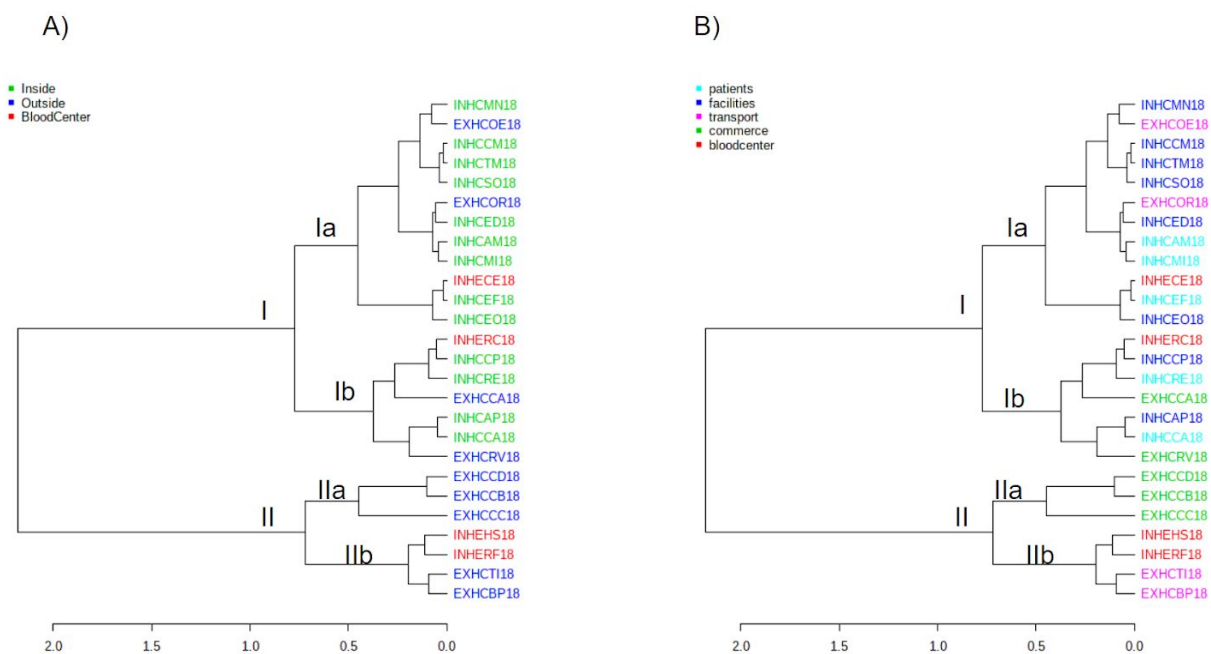
**Grupos 1 e 2: ano de 2018**

**1. Clustering e correlation (Heatmap clustering, Dendrogram analysis, correlation network (SparCC) e Pattern search) separadamente para o ano de 2018.**

Analisando o dendograma podemos ter uma visão mais clara da semelhança entre as amostras. Dois grande nodos foram gerados, no nodo I se agruparam 100% das amostras vindas do interior do HC e no nodo II se agruparam 55,5% da amostras da área externa do HC e 50% do Hemocentro. As amostras do nodo II provinham de setores de comércio, como cantinas, e transporte, isto é, do terminal de ônibus próximo ao HC. Podemos observar que algumas dessas amostras vindas da área externa do HC se encontram em clusters junto à amostras da área interna. Como as amostras EXHCRV18 (Cadeiras ao lado da cantina do Valter) e EXHCCA18 (Cantina Externa I)

agrupadas no subnodo Ib onde estão amostras do C.T.I adulto (INHCCA18), Recepção HCFMRP/USP (INHCRE) Recepção do HC Criança (INHCAP), e C.T.I. Pediátrico (INHCCP), isso sugere um compartilhamento de bactérias entre os pacientes (pediátricos e adultos) as cantinas e as C.T.I's, possivelmente os visitantes dos pacientes nas C.T.I's comem nessas cantinas e então trazem as bactérias para a recepção e C.T.I's (ver figura 1).

O subnodo Ia, por sua vez, tem 2 amostras da área externa referente ao setor de transportes, a EXHCOE18 e EXHCOR18 ambos referentes ao ponto de ônibus HCFMRP-USP, onde chegam e partem pacientes e estudantes. EXHCOE18 se clusterizou com INHCMN18 (Corrimão escada dos docentes e residentes) o que mostra um compartilhamento de bactérias entre funcionários e o HC. A amostra EXHCOR18 se clusterizou com INHCED18 (Elevadores dos docentes e residentes) o que novamente reforça esse achado de compartilhamento de bactérias entre funcionários, ônibus e áreas de facilities no Hospital (ver figura 1).



**Figura 1:** Dendrograma à nível de filo, revelando em (A) grupos (HC interno e externo, e hemocentro) e em (B) setores (pacientes, facilities, transporte, comércio e hemocentro).

Em seguida realizamos dois heatmaps. Um com organização por zona e outro sem (ver figura 2), cujas observações redigimos a seguir:

No hemocentro, há uma maior abundância de Planctomycetes, Cyanobacteria\_Chloroplast, Chloroflexi e Synergistetes. As cianobactérias podem produzir neurotoxinas, citotoxinas, hepatoxinas e endotoxinas, chamadas coletivamente de cianotoxinas. Alguns casos de ALS (esclerose lateral amiotrófica) podem estar relacionados com altos níveis de cianotoxinas. As Synergistetes são anaeróbicas e são encontradas em locais como trato gastrointestinal, solo e em pacientes com doença periodontal, mas também podem ser encontradas na flora vaginal de mulheres saudáveis. Há também uma maior abundância de Planctomycetes, Cyanobacteria\_Chloroplast e Synergistetes. As que possuem menor abundância são Deinococci, Armatimonadetes, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Verrucomicrobia.

Na área interna, há maior abundância de Candidatus\_Saccharibacteria, Synergistetes. As com menor abundância são as Deinococci, Armatimonadetes e Nitrospirae.

Na área externa, as que apresentam maior abundância são as Fusobacteria, Armatimonadetes e Deinococci. As fusobactérias estão envolvidas em infecções que levam à necrose tecidual, septicemia e infecções intra-amnióticas que podem levar a parto prematuro. As com menor abundância são as Synergistetes e Spirochaetes.

Como haviam amostras externas que se clusterizavam com amostras externas resolvemos analisar seus filos predominantes utilizando o heatmap:

#### → **EXHCOR18 e INHCED18**

A amostra EXHCOR18 corresponde ao ponto de ônibus HCFMRP-USP, onde há um grande fluxo na entrada e saída de pacientes, funcionários e estudantes do hospital. A amostra INHCED18 corresponde aos elevadores utilizados pelos docentes e

residentes do HC. Essas duas amostras clusterizaram-se, mostrando que há um compartilhamento de bactérias entre funcionários, pacientes, ônibus e facilities do hospital. No caso da EXHCOR18, as bactérias mais abundantes foram as *Candidatus\_Saccharibacteria*, *Nitrospirae* e *Chloroflexi*. Na amostra INHCED18, as bactérias mais abundantes foram comum a área EXHCOR18; com a presença de *Candidatus\_Saccharibacteria*, além de apresentar as bactérias *Spirochae*.

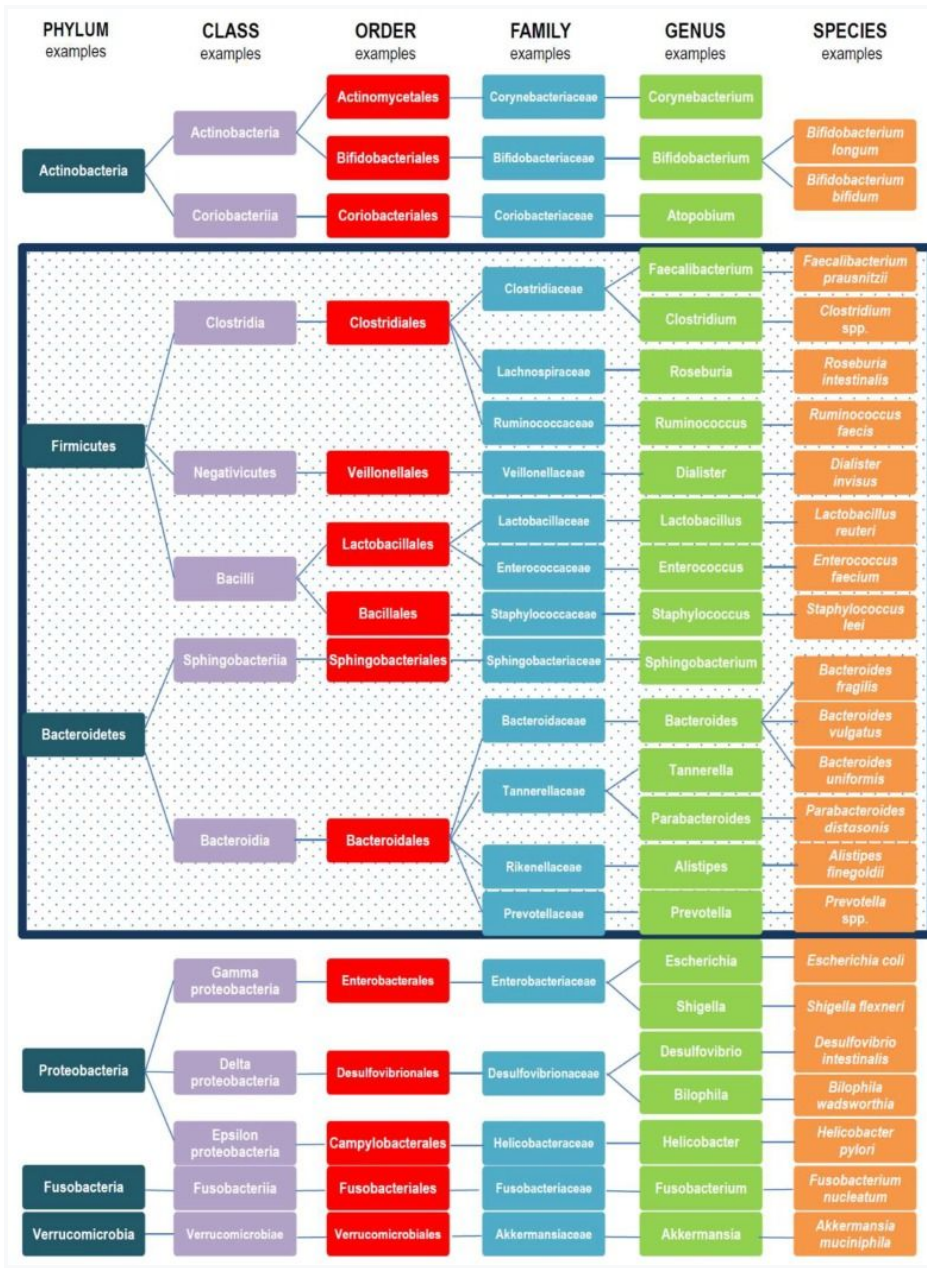
Ambas as amostras compartilham bactérias *Candidatus\_Saccharibacteria*. *Saccharibacteria*, anteriormente conhecidas como TM7, são uma linhagem de bactéria cuja existência até recentemente era conhecida apenas por sequências ambientais de 16S rRNA, pois nenhuma espécie havia sido cultivada em laboratório. Elas se apresentam em forma de coccus pequenos que variam entre 200 e 300nm e são epibiontes obrigatórios. Habitam solos, sedimentos, águas residuais, saliva bem como a pele humana, além de diversos ambientes clínicos (FERRARI et al. 2015). Pelo fato de o ponto de ônibus e os elevadores ser dois locais com um enorme fluxo de pessoas, não é incomum encontrar bactérias como a *Candidatus\_Saccharibacteria*.

#### → **EXHCRV18, EXHCCA18, INHACCA18, INHCAP18, INHCCP e INHCRE**

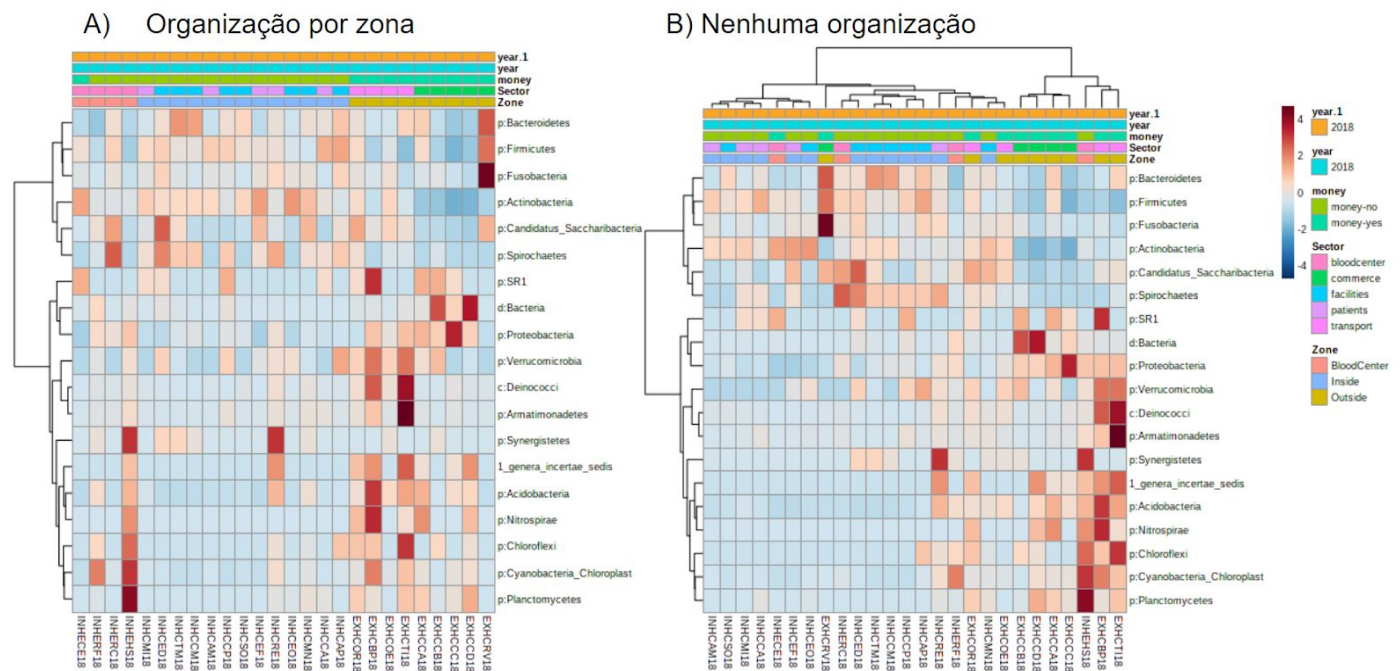
O dendrograma agrupa áreas externas como EXHCV18 e EXHCCA18 com áreas internas como o INHACCA18. A EXHCRV18 (Cadeiras do lado da cantina do Valter) demonstrou uma predominância do filo *Fusobacterium* e *Firmicutes* em relação às demais bactérias presentes. Quando analisamos a área interna do CTI adulto (INHCCA18) e a recepção do HC criança (INHCAP) pode-se observar que o filo *Firmicutes* também foi o mais abundante. O filo *Firmicutes* é um dos filios predominantes na microbiota intestinal humana, é composto por mais de 200 gêneros diferentes como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, and *Ruminococcus* (ver diagrama 1). O aumento de *Firmicutes* na microbiota é relacionado com a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II e hipertensão arterial e tem-se demonstrado cada vez um problema de saúde pública (Rinninella et al, 2019). A abundância desse filo tanto ambiente externo (EXHCRV18) como o ambiente interno do hospital

(INHACCA18) e (INHCAP) sugere que uma possível rota de contaminação proveniente do ambiente externo como mostrado no dendograma.

Além disso, também foram agrupadas as áreas da recepção do HCMRP/USP (INHCRE) e C.T.I pediátrico (INHCCP). A área da recepção do HC (INHCRE) demonstrou um predomínio do filo Synergistes, ao passo que a área do C.T.I pediátrico apresentou maior abundância do filo SR1. Recentemente, descobriu-se que o filo SR1 abriga uma variedade de bactérias presentes no ser humano, o que surpreendeu cientistas, já que essas bactérias eram associadas a ambientes anóxicos, ou seja, água do mar com baixa presença de oxigênio, e áreas de altas temperaturas (Shaiber, 2019).



**Diagrama 1:** A filo Firmicutes e Bacteroidetes representam 90% da microbiota do trato gastrointestinal humano. O diagrama mostra alguns exemplos dos principais representantes taxonómicos de cada filo encontrado no microbioma humano. Retirado de Rinninella et al, (2019).

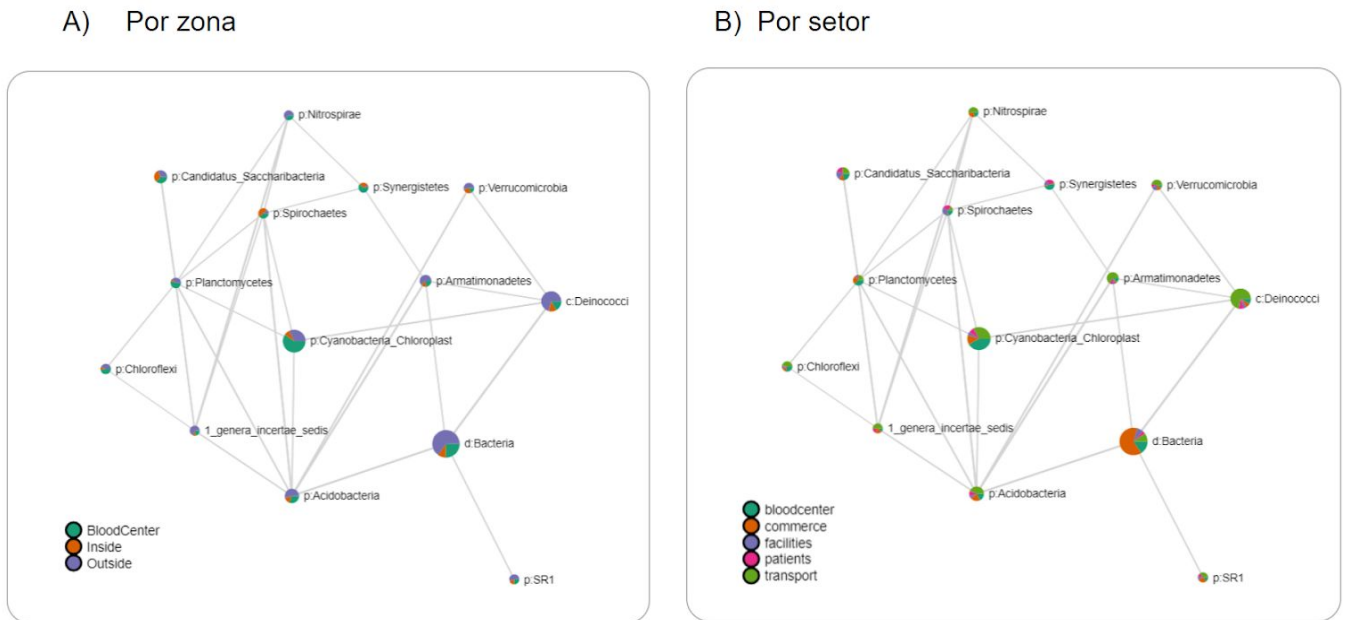


**Figura 2:** Heatmap a nível de Filo em (A) supervisionada por zona; bloodcenter, inside e outside. E em (B) sem supervisão.

Analisando a correlação entre filós (ver figura 3) percebemos que os táxons que estabelecem mais conexões (excetuando d.Bacteria, cujo gênero não é conhecido) são Cianobacteria e Deinococci que estabelecem entre si uma correlação significativa. Deinococci se correlaciona também com Verrucomicrobia e Armatimonadetes enquanto que a Cianobactéria se correlaciona com Spirochaetes, Planctomycetes e Acidobacteria. A Deinococci é mais presente na área externa, no setor de transportes enquanto que a Cianobactéria é mais presente no Hemocentro, e também está presente na área externa no setor de transporte. O filo Spirochaetes é a única em contato com a Cianobactéria que é predominante no ambiente Interno do HC em especial no setor dos pacientes. O filo Spirochaetes é composto por bactérias de forma helicoidal ou espiral, os espécimes do gênero Spirochaeta são de vida livre e de Cristispira são comensais. Porém, alguns representantes dos gêneros Treponema, Borrelia, e Leptospira são considerados patogênicos. O gênero leptospira está



associado a leptospirose, o *Treponema pallidum* é o agente da sífilis e *Borrélia burgdorferi* da Borreliose ou doença de Lyme, cuja transmissão se dá pelo carrapato, essa última espécie é incomum no Brasil (Cole, 1990).



**Figura 3:** Gráfico de correlação a nível de filo supervisionado por (A) zona e (B) setor. Cada nodo representa um gênero e seu tamanho é baseado no número de conexões para esse gênero. Dois gêneros são conectados por uma linha se a correlação entre eles é significativa ( $p < 0.05$ ). Os nodos também mostram relação de abundância do gênero em questão em cada zona (A) ou setor (B).

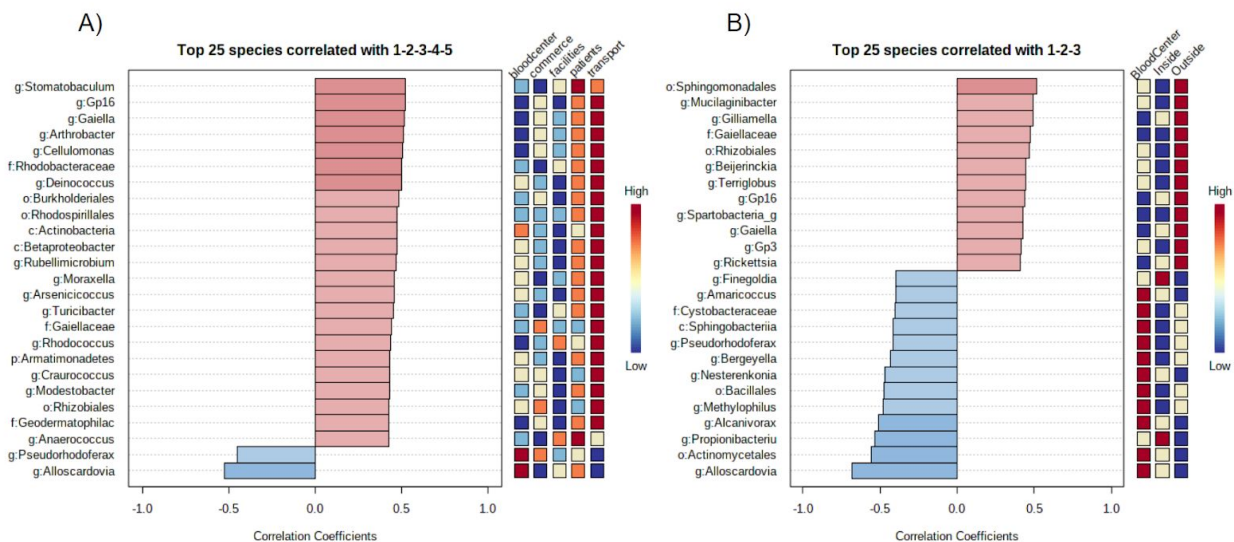
Depois analisamos a correlação entre os gêneros. Os gêneros com maior coeficiente de correlação entre HC interno, externo e hemocentro, são também os mais presentes na área externa do HC, são eles: Sphingomonadales, Mucilaginibacter, Giliamella, Beijerinckia, Terriglobus, Gp16, Spartobacteria, Gaiella, Gp3, Rickettsia, Gaiellaceae (família) e Rhizobiales (ordem). Enquanto que na área interna prevalecem gêneros com menor coeficiente de correlação são eles; Finegoldia e Propionibacterium, e no Hemocentro; Amaricoccus, Cystobacteracea (família), Sphingobactéria, Pseudorhodoferas, Bergeyella, Nesterenkonia, Bacillales, Methylophilus, Alcanivorax,



Actinomycetales e Alloscardovia (ver figura 4B). É curioso o aparecimento do gênero *Rickettsia* nessa análise, visto que se trata de bactérias presentes em artrópodes como carrapatos, pulgas e piolhos, e que causam doenças nos seres humanos tais como tifo epidêmico e a febre escarionodular ou botonosa. Como o hospital se localiza dentro do Campus Ribeirão Preto (USP) que contém muita vegetação nativa além de aves e animais pode ser que artrópodes que habitam essa fauna e flora tenham trazido essas bactérias para o ambiente hospitalar, naturalmente elas são mais abundantes na área externa do HC.

Já os gêneros com maior coeficiente de correlação entre os setores ( Hemocentro, comércio, facilities, pacientes e transporte) tiveram maior abundância no setor de transporte e dos pacientes, esses táxons são; *Stomatobaculum*, *Gp16*, *Gaiella*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas*, *Rhodobactereaceae*, *Deinococcus*, *Burkholderiales*, *Actinobacteria*, *Betaproteobacter*, *Rubellimicrobium*, *Moraxella*, *Arsenicococcus*, *Turicibacter*, *Gaiellaceae*, *Rhodococcus*, *Armatimonadetes*, *Craurococcus*, *Modestobacter*, *Rhizobiales*, *Geodermatophilac* e *Anaerococcus*. Sendo que somente os taxons *Actinobacteria*, *Gaiellaceae*, *Rhodococcus* e *Rhizobiales* não foram abundantes no setor de pacientes ( ver figura 4A).

O fato dos gêneros com maior coeficiente de correlação terem também maior abundância nos setores de transporte e pacientes reforça os achados de uma rota microbiana entre os terminais rodoviários e o hospital.



**Figura 4:** Gráficos de padrões pelo método de Pearson. Mostra os 25 gêneros mais correlacionados com os setores (A) e com as zonas (B). Os gêneros estão ranqueados pela correlação, sendo que as barras vermelhas representam um coeficiente de correlação positiva e as barras azuis, um coeficiente de correlação negativa. Na direita de cada gráfico, há um pequeno heatmap indicando a abundância do gênero em cada grupo.

### Conclusões:

As análises realizadas revelaram possíveis rotas microbianas entre o sistema de transporte e áreas de facilities (como escadas e elevadores dos funcionários), mostrando que os funcionários, residentes e alunos servem como um vetor para entrada de bactérias no hospital. Há também uma possível rota entre as cantinas, sistema de transporte, recepções e C.T.I's adultas e pediátricas, sendo que na recepção do HC criança e C.T.I adulto havia uma predominância especial do filo Firmicutes, seria necessário investigar quais são as espécies deste filo mais presentes nesses ambientes para concluir se essa abundância pode significar um problema. Ademais, a predominância do gênero Rickettsia, cujos vetores são artrópodes, especialmente na área externa do HC ressalta a influência do local em que hospital está localizado, isto é, um ambiente com muita vegetação.

## Referências

Cole, J. R. (1990). ***Spirochetes***. *Diagnostic Procedure in Veterinary Bacteriology and Mycology*, 41–60. doi:10.1016/b978-0-12-161775-2.50009-8

Ferrari, B., Winsley, T., Ji, M. *et al.* **Insights into the distribution and abundance of the ubiquitous Candidatus Saccharibacteria phylum following tag pyrosequencing.** *Sci Rep* 4, 3957 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep03957>

Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, *et al.* **What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases.** *Microorganisms*. 2019;7(1):14. Published 2019 Jan 10. doi:10.3390/microorganisms7010014

Shaiber, A., & Eren, A. M. (2019). **Composite Metagenome-Assembled Genomes Reduce the Quality of Public Genome Repositories.** *mBio*, 10(3), e00725-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00725-19>

## Anexos:

**Amostras:**

ID Oficial	Área	Local de coleta
INHCFM18	Interna	UETDI
INHCEO18	Interna	Enfermaria de Oncologia - Quimioterapia
INHCMI18	Interna	Corrimão escada (ao lado docentes e residentes)
INHCCA18	Interna	C.T.I. Adulto
INHCAF18	Interna	Recepção do HC Criança
INHCED18	Interna	Elevadores dos docentes e residentes
INHCTM18	Interna	Enfermaria TMO 5o Andar
INHCCM18	Interna	Enfermaria Clínica Médica 5o Andar
INHCAM18	Interna	Ambulatórios - pelo menos 5 Corredores
INHCCP18	Interna	C.T.I. Pediátrico
INHCAG18	Interna	Ambulatório Geriatria
INHCSO18	Interna	Serviço de oncologia (7o andar)
INHCEF18	Interna	Elevadores dos funcionários e visitantes
INHCRE18	Externa	Recepção HCFMRP/USP
EXHCOR18	Externa	Ponto de Ônibus HCFMRP/USP
EXHCBP18	Externa	Ponto de Ônibus HCFMRP/USP
EXHCOE18	Externa	Ponto de Ônibus HCFMRP/USP
EXHCTI18	Externa	Terminal de ônibus interurbanos
EXHCCA18	Externa	Cantina Externa I
EXHCCB18	Externa	Cantina Externa II
EXHCCC18	Externa	Cantina HC Externa - Cafeteria do Valter
EXHCCD18	Externa	Cantina HC Externa - Cafeteria Caffé
EXHCRV18	Externa	Cadeiras ao lado da cantina do Valter
INHECE18	Interna	Celular dos Alunos
INHERF18	Interna	Refeitório
INHERC18	Interna	Recepção

INHEHS18	Interna	Hall das salas de aulas
----------	---------	-------------------------