

Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Curso de Ciências Biomédicas

Atividade RCB300 - Microbiome Analyst

Docente:

Prof. Dr. Wilson Araújo Silva

Discentes:

Giulia Scarcella Cancelliero

Filipe Camargo Rodrigues

Jéssica Bellotto Werlang

Maria Luiza Pellicer Teixeira

Vinícius Bottura Apolloni

Ribeirão Preto - SP

Junho de 2020

OBJETIVO

- Avaliar criticamente os resultados obtidos com as análises de "Clustering & correlation" dos dados das amostras coletadas no ano 2019.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Heatmap clustering presente na figura 1 revelou uma abundância dos seguintes filos de bactérias no Hemocentro: *Armatimonadetes*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes* e *Cyanobacteria chloroplast*. No entanto, a prevalência desses filos de bactérias é heterogênea nos ambientes do Hemocentro em que as amostras foram coletadas. De fato, *Armatimonadetes*, *Cyanobacteria chloroplast* e *Planctomycetes* são mais abundantes no hall das salas de aulas, na área interna do Hemocentro (INHEHS19). Por outro lado, *Cyanobacteria chloroplast* e *Verrucomicrobia* são filos microbianos presentes principalmente no refeitório do Hemocentro (INHERF). A *Verrucomicrobia* é um filo de bactérias cujas espécies foram isoladas e identificadas em ambientes aquáticos e marinhos, bem como em fezes humanas. Por outro lado, as *Planctomycetes* podem ser isoladas de amostras de água salobra e outros ambientes aquáticos.

Os dados da figura 1 mostraram que na zona interna do hospital ocorre a prevalência dos seguintes filos de bactérias: *Candidatus saccharibacteria*, *Firmicutes*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes*, *SRI*, *Synergistetes* e *Tenericutes*. Os filos *Candidatus saccharibacteria*, *Synergistetes*, *Firmicutes* e *Fusobacterium* encontram-se abundantemente na recepção do HC criança (INHCAP). Por outro lado, os filos *Candidatus saccharibacteria*, *Synergistetes* e *Fusobacterium* podem ser encontrados no centro de terapia intensiva adulta (INHCCA). Dentre esses filos, somente *Synergistetes* estava abundantemente presente nos ambulatórios (INHCAM). Além disso, foi possível observar a prevalência de *Spirochaetes* e *SRI* no elevador dos funcionários e visitantes da zona interna do hospital (INHCEF). O filo *Tenericutes* é composto pelo gênero *Mycoplasma*, que abrange espécies de bactérias patogênicas em seres humanos, como a *Mycoplasma pneumoniae*. De fato, a *M. pneumoniae* é responsável por causar pneumonia em humanos.

Na figura 1, é possível observar que no ambiente externo existe uma maior heterogeneidade em relação às outras zonas. Desse modo, apresentam filões mais dispersos nos ramos da árvore filogenética. Essa diferença entre os padrões ocorre, provavelmente, por conta da maior circulação de pessoas nos ambientes externos, bem como pelos diferentes protocolos de higienização que estabelecidos para cada um dos ambientes. Ainda assim, é possível observar a prevalência de bactérias desconhecidas, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Proteobacterias* e *Synergistetes*. As bactérias desconhecidas são mais abundantes nos seguintes ambientes: cantina externa do hospital - Cafeteria do Valter (EXHCCC), cadeiras ao lado da cantina do Valter (EXHCRV), cantina externa do hospital - Cafeteria Caffé (EXHCCD) e Ponto de Ônibus HCFMRP/USP (EXHCOE). Proteobactérias foram prevalentes em terminais de ônibus interurbanos (EXCHCTI). Bactérias do filo Nitrospirae foram prevalentes nas cadeiras ao lado da cantina do Valter (EXHCRV) e nos terminais de ônibus interurbanos (EXCHCTI). Também foi possível observar a prevalência de *Candidatus saccharibacteria* e *Synergistetes* no ponto de ônibus HCFMRP/USP (EXHCOE), bem como de Firmicutes no ponto de ônibus HCFMRP/USP (EXHCOR). Vale mencionar que embora alguns locais se repetem os objetos de onde as amostras foram coletadas são diferentes.

Bactérias do filo *Spirochaetes* podem provocar doenças em humanos como leptospirose, doença de Lyme, febre recorrente e treponematoses, como sífilis, dentre outras. Os filões *Fusobacterium* e *Synergistetes* possuem espécies que compõe a microbiota humano, no entanto, podem estar associadas a infecções oportunistas. Por fim, o filo Firmicutes engloba os gêneros como *Streptococcus* e *Staphylococcus* que são conhecidos por provocarem infecções hospitalares.

Já na figura dois, podemos observar uma prevalência de bactérias ainda não identificadas (*d. bacteria*) em locais onde ocorre o manuseio de dinheiro, como nas amostras obtidas em áreas das cantinas (EXHCRV, EXHCCC, EXHCCD). A presença de microorganismos desconhecidos em zonas próximas ao hospital, pode gerar uma rota de transmissão, o que representa um grande risco, já que não se conhece o potencial patogênico destas.

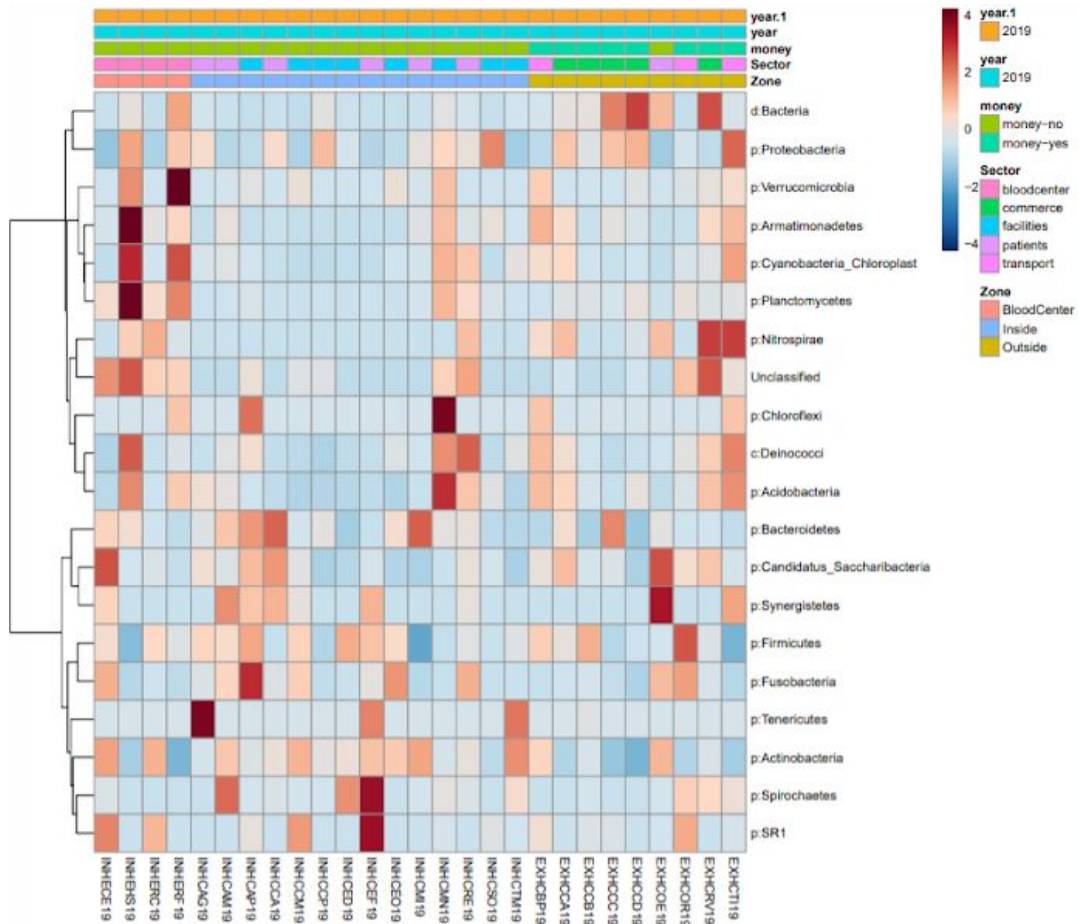


Figura 1: *Heatmap clustering* das amostras do ano de 2019 organizadas pelas respectivas zonas de coletas, Hemocentro, zona interna do hospital e zona externa do hospital. Na figura é possível observar uma abundância heterogênea dos filões de bactérias detectados.

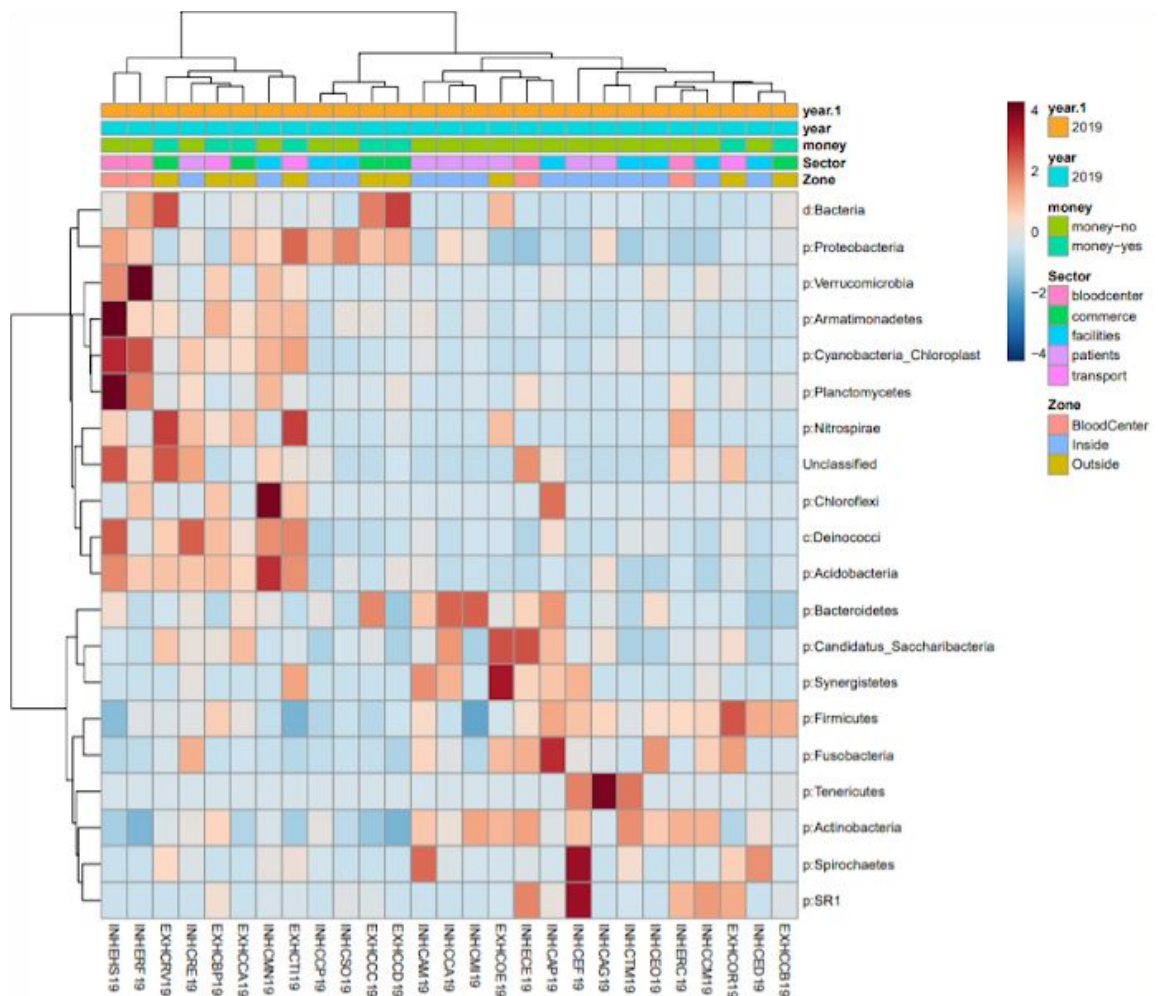


Figure 2: O *Heatmap clustering* foi feito usando geometria euclidiana para medir a distância e o agrupamento por meio do método de Ward. Os dados usados para a análise foram das amostras coletadas no ano de 2019 nas seguintes zonas, Hemocentro, zona interna do hospital e zona externa do hospital. Os dados das bactérias detectadas são classificados quanto ao seu filo.

Os estudos de correlação pode ser usados para visualizar correlações gerais entre diferentes recursos, bem como para identificar quais recursos estão correlacionados com um recurso de interesse. Além disso, o uso dessas análises permite identificar padrões específicos de certos recursos sob diferentes condições. Os resultados podem ser observados nas figuras 3 e 4. Pode-se observar através dos gráficos 3 e 4 de conectomas uma forte ligação de *Cyanobacteria Chloroplast* com praticamente todos as zonas e locais registrados. A espécie ainda se mostra amplamente presente individualmente quando focamos em apenas uma região ou zona analisada. Na figura 3 observamos a prevalência de bactérias desconhecidas no setor Comércio, enquanto *Cyanobacteria Chloroplast* estão prevalentes nos Transportes.

Na figura 4 temos forte prevalência de bactérias desconhecidas na zona externa do hospital, enquanto *Cyanobacteria Chloroplast* está fortemente presente na zona do hemocentro.

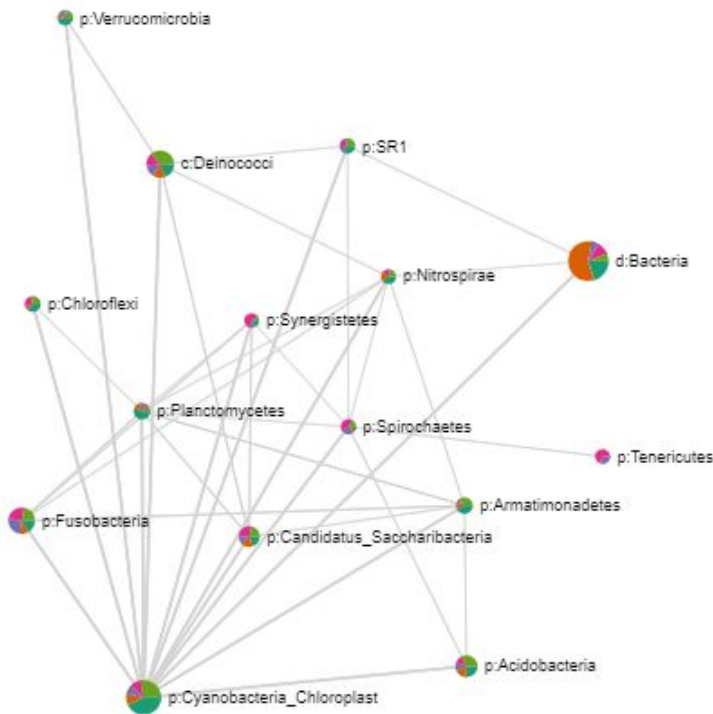


Figura 3: A figura revela a análise de Correlation Network. Os dados obtidos nas amostras coletadas no ano de 2019 foram classificados por filo e setores. Os setores são: comércio (laranja), transportes (verde), hemocentro (verde-água), rosa os pacientes (rosa) e as instalações (roxo).

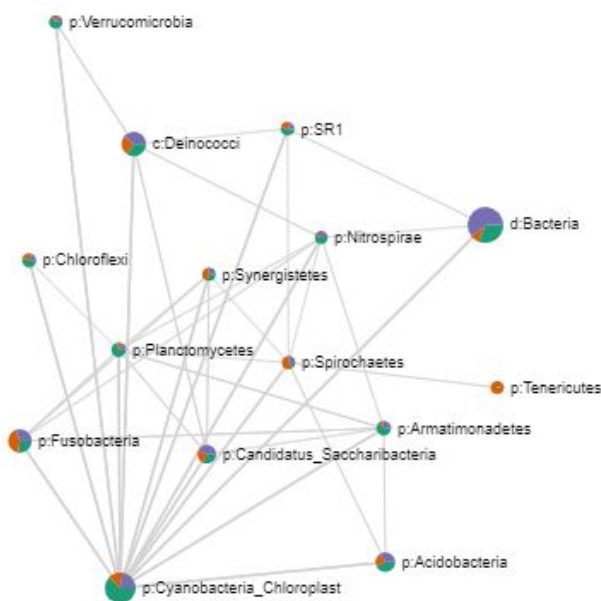


Figura 4: A figura revela a análise de Correlation Network. Os dados obtidos nas amostras coletadas no ano de 2019 foram classificados por filo e zonas, sendo elas hemocentro (verde), zona interna do hospital (laranja) e zona externa do hospital (roxo).

De fato, o dendrograma representa uma relação hierárquica entre dados de uma determinada amostra. Na figura 5, observa-se no dendrograma uma linha de escala que representa a distância entre os grupos de bactérias detectadas nas amostras coletadas nos respectivos locais. O dendrograma revelou um cluster entre as seguintes amostras coletadas na zona interna do hospital: recepção HCFMRP/USP (INHCRE), corrimão escada (ao lado docentes e residentes) (INHCMN), ambulatório geriatria (INHCAG), C.T.I. pediátrico (INHCCP) e C.T.I. adulto (INHCCA). Um cluster revelou que microrganismos presentes nos elevadores dos docentes e residentes (INHCED) e da cantina externa II (EXHCCB) possuem proximidade. Esse resultado pode indicar uma possível rota para que patógenos do ambiente externo ganhem acesso ao interior do hospital. Além disso, foi observado a formação de um cluster entre microrganismos do refeitório (INHERF), bem como das cafeterias externas (EXHCCA), (EXHCCD) e (EXHCCC). Outra relação significativa foi o cluster formado entre os microrganismos presentes no terminal de ônibus interurbanos (EXHCTI), o hall das salas de aulas (INHEH) e o serviço de oncologia (INHCSO). Esse resultado pode corroborar com uma possível rota de transmissão de microrganismos de zonas externa para áreas interna das instituições de saúde. Além disso, observamos também que as amostras externas estão presentes de forma mais dispersa nos ramos da árvore, indicando a maior presença de populações de diferentes filos nestes ambientes, indicando certa heterogeneidade.

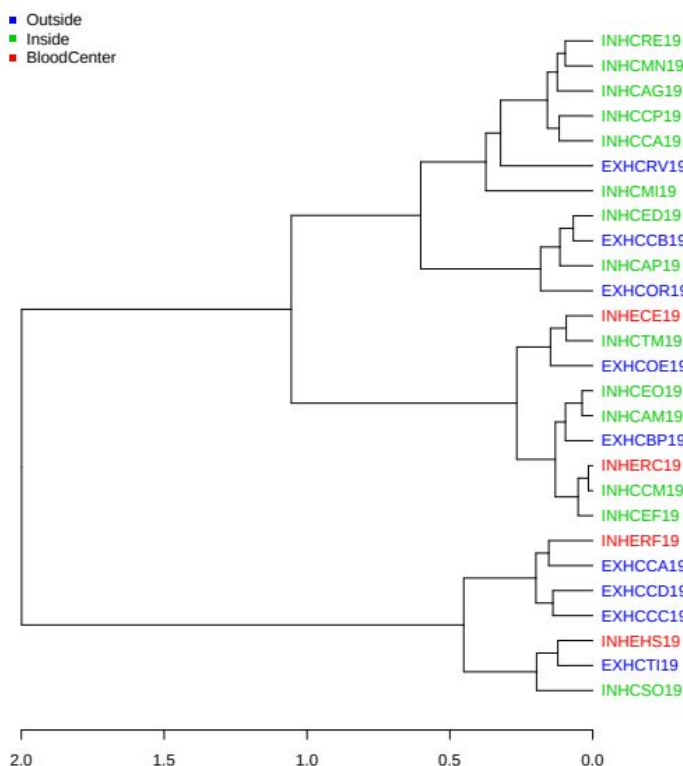


Figura 5: O dendrograma exibido mostra uma relação hierárquica entre os microrganismos da amostra e os locais de coletas. Portanto, o diagrama revelam uma relação entre os filos de bactérias e o Hemocentro, zona interna do hospital e zona externa do hospital.

A pesquisa de parentesco é um método de análise usado para identificar quais recursos estão correlacionados com o recurso de interesse. Tendo isso em vista, a análise identifica padrões particulares de características sob diferentes condições. De fato, a análise mostrou correlações positiva ou negativa da abundância de determinadas bactérias e a prevalência nos seguintes locais, Hemocentro, zona interna e externa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Na figura 6, é mostrado um gráfico de coeficiente de correlação que estabelece uma correlação positiva dos filos *Firmicutes*, *Nitrospirae* e *Proteobacterias*, bem como bactérias desconhecidas na zona externa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Além disso, também é mostrado uma correlação negativa de Actinobactérias na zona interna do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. Essa observação é importante porque determinados gêneros, como *Mycobacterium*, são patogênicos para os seres humanos. Assim, a menor prevalência dessas bactérias reflete em melhores condições para pacientes internados, principalmente aqueles em estado de vulnerabilidade.

O gráfico de coeficiente de correlação mostrado na figura 7 estabelece uma correlação positiva entre os gêneros de bactérias associadas com a pele humana na zona externa do hospital, como *Arsenicococcus*, *Rudaeicoccus*, *Kocuria* e de bactérias desconhecidas. A *Kocuria* é um gênero de bactérias gram positivas pertencente ao filo das *Actinobacterias* presente na pele humana e na cavidade oral. A *Kocuria* não é patogênica, mas eventualmente pode estar associada a infecções no trato urinário, colecistite e peritonite. A correlação positiva de bactérias associada a pele poderia estar relacionada com o elevado fluxo de pessoas nesses locais, bem como a menor frequência de limpeza das áreas externas, quando comparado com os ambientes internos do hospital e do Hemocentro. Além disso, na figura 7 é possível observar uma correlação negativa de *Microbacterium* e *Proteobacteria* na zona interna do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. As espécies do gênero *Microbacterium* são conhecidas por causar infecções em humanos, assim como as *Proteobacterias*. Assim, a menor correlação entre essas bactérias e a zona interna do hospital pode trazer benefícios para os pacientes internando, tornando-os menos sujeitos a infecções hospitalares.

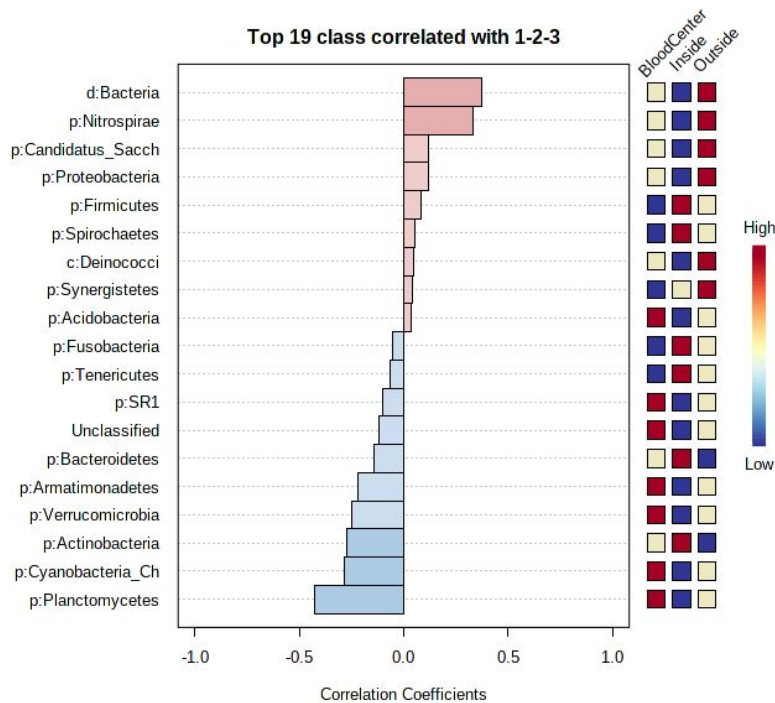


Figura 6: O gráfico de coeficiente de correlação estabelece uma associação positiva ou negativa da abundância de determinados filos de bactérias e a prevalência nos seguintes locais, Hemocentro, zona interna e externa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

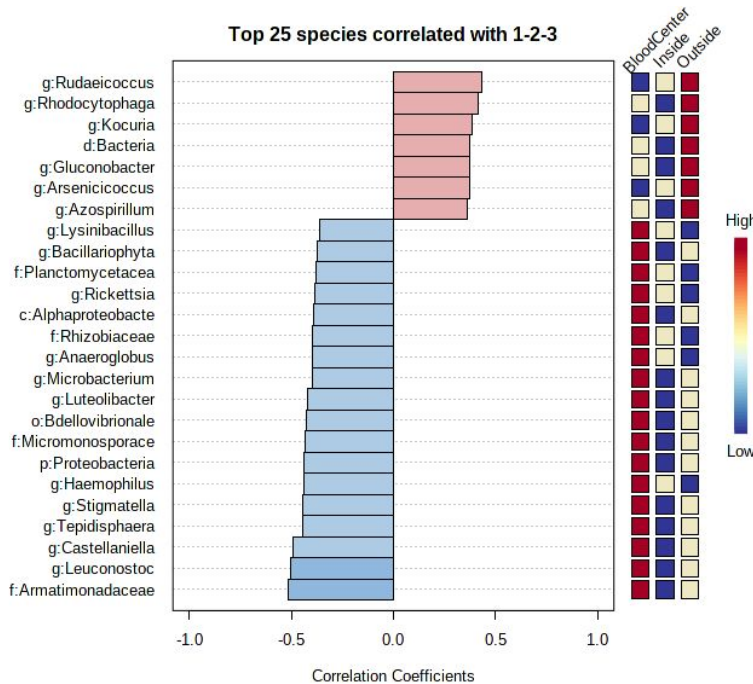


Figura 7: O gráfico de coeficiente de correlação estabelece uma associação positiva ou negativa da abundância de determinados gêneros de bactérias e a prevalência nos seguintes locais, Hemocentro, zona interna e externa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto.

CONCLUSÃO

A compreensão da dinâmica de migração dos microrganismos é importante, visto que o contato e a transmissão para pacientes vulneráveis podem causar infecções hospitalares. Tendo isso em vista, as metodologias e os resultados apresentados são capazes de auxiliar na implementação de mudanças que visem ao aprimoramento das condições de assepsia e de higiene hospitalar.