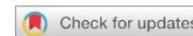


ARTIGO **ABRIR**

# Preditores microbianos de cicatrização e efeito a curto prazo do desbridamento no microbioma de feridas crônicas

Samuel Verbânico<sup>1</sup>, Yuning Shen<sup>2</sup>, Juhee Lee<sup>3</sup>, John M. Deacon<sup>4</sup>, Irene A. Chen<sup>1,2,5</sup>

As feridas crônicas representam uma grande e crescente carga de doenças. A infecção e a formação de biofilme são dois dos principais impedimentos da cicatrização de feridas, sugerindo um papel importante para o microbioma dessas feridas. O desbridamento é um tratamento comum e eficaz para feridas crônicas. Analisamos o conteúdo bacteriano da superfície da ferida de 20 pacientes ambulatoriais com feridas crônicas antes e imediatamente após o desbridamento, bem como pele saudável. Dada a grande variação observada entre diferentes feridas, introduzimos um método estatístico Bayesiano que modela a variabilidade de paciente para paciente e identifica vários gêneros que foram significativamente enriquecidos em feridas versus pele saudável. Não encontramos diferença entre o microbioma da superfície original da ferida e aquele exposto por um único episódio de desbridamento agudo, sugerindo que esse desbridamento não alterou diretamente o microbioma da ferida. No entanto, descobrimos que aeróbios e especialmente anaeróbios facultativos foram significativamente associados a feridas que não cicatrizaram em 6 meses. O gênero anaeróbio facultativo *Enterobacter* foi significativamente associado à falta de cicatrização. Os resultados sugerem que a abundância de anaeróbios facultativos é um fator prognóstico negativo no microbioma de feridas crônicas, possivelmente devido à maior robustez dessas comunidades a diferentes ambientes metabólicos. *npj Biofilms e Microbiomas*

(2020) 6:21; <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0130-5>

## INTRODUÇÃO

Feridas crônicas são feridas que não apresentam progresso de cicatrização razoável dentro de um período de tempo esperado (por exemplo, 3-6 semanas). Estima-se que apenas nos EUA, mais de 6,5 milhões de pessoas sejam afetadas, custando ao sistema de saúde pelo menos US\$ 25 bilhões anualmente. Embora a carga de feridas crônicas seja frequentemente negligenciada ou obscurecida pela carga geral da doença primária.

Essas feridas têm um impacto notável na qualidade de vida, reduzindo a mobilidade e induzindo a dor crônica. Pacientes idosos com doenças estabelecidas, particularmente diabetes, obesidade, insuficiência venosa, doença arterial periférica e imobilidade, têm maior risco de desenvolver feridas crônicas. À medida que a prevalência desses fatores de risco aumenta, espera-se que os custos econômicos e humanos das feridas crônicas cresçam.

Um dos principais impedimentos à cicatrização de feridas crônicas é a infecção e a inflamação patológica associada<sup>4</sup>. Embora as feridas crônicas nem sempre estejam infectadas, elas podem ser colonizadas por um microbioma distinto que pode levar à infecção ou afetar a cicatrização de feridas. Embora os estudos tradicionais dependentes de cultura sejam agora reconhecidos como incapazes de fornecer uma visão estendida da diversidade, estudos independentes de cultura mais recentes na última década estabeleceram que as feridas abrigam uma microbiota diversificada, com os constituintes primários sendo *Staphylococcus* spp., *Pseudo monas* spp., *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Anaerococ cus* spp. e *Enterococcus* spp., juntamente com numerosos táxons de baixa abundância. Embora as feridas crônicas sejam polimicrobianas, elas têm menor diversidade do que a pele saudável. Existe uma variabilidade substancial entre pacientes no microbioma, que não pode ser explicada por idade, raça, sexo ou etiologia da ferida e, portanto, modelos estatísticos que podem explicar a variabilidade entre pacientes são desejáveis para modelar o microbioma da ferida crônica.

Apesar do trabalho passado significativo, são necessários estudos adicionais sobre o microbioma da ferida para entender sua contribuição, se houver, para o

Fisiopatologia das feridas crônicas. Aqui, investigamos como um único episódio de desbridamento agudo afeta o microbioma da ferida, bem como quais constituintes do microbioma da ferida podem se correlacionar com a cicatrização.

Um segundo principal impedimento à cicatrização de feridas é o biofilme formação. Um dos tratamentos de feridas crônicas mais comuns e amplamente eficazes é o desbridamento, um procedimento padrão de cuidados cujo objetivo é a ruptura física e a remoção de biofilmes e tecidos necróticos ou desvitalizados. Além de estimular a reepitelização e a migração celular, o desbridamento pode reduzir a carga microbiana. No entanto, relativamente pouco se sabe sobre como o desbridamento influencia a composição da comunidade microbiana da ferida. Trabalhos anteriores descobriram que a microbiota isolada de tecidos desbridados e swabs de feridas são semelhantes, embora não correspondam exatamente. Um recente estudo longitudinal de úlcera do pé diabético descobriu que, após 2 semanas, o desbridamento diminuiu significativamente a abundância relativa de anaeróbios, mas apenas nas feridas que cicatrizaram em 12 semanas<sup>7</sup>. Para determinar se esta resposta ocorreu imediatamente versus desenvolvida ao longo do intervalo de 2 semanas, esfregamos feridas crônicas imediatamente após o desbridamento afiado na mesma visita clínica e comparamos as comunidades microbianas antes e após o desbridamento, incluindo uma comparação da abundância de táxons individuais.

Um importante foco de estudo para o microbioma de feridas crônicas é a identificação de correlações do microbioma com os resultados da cicatrização. Por exemplo, Loesche et al.<sup>6</sup> determinaram que a instabilidade temporal das comunidades, particularmente a transição entre vários tipos distintos de comunidades, está associada a resultados positivos de cura. Compreender quais organismos são benéficos ou prejudiciais pode ser importante para avaliar o prognóstico ou intervenções probióticas. No entanto, nenhum táxon específico ou tipos metabólicos foram relatados como preditivos de resultados de cicatrização. Estudamos se a presença de táxons com diferentes

<sup>1</sup>Programa em Ciência e Engenharia Biomolecular, Universidade da Califórnia, Santa Bárbara, CA, EUA. <sup>2</sup>Departamento de Química e Bioquímica, Universidade da Califórnia, Santa Bárbara, CA, EUA. <sup>3</sup>Departamento de Estatística, Universidade da Califórnia, Santa Cruz, CA, EUA. <sup>4</sup>Goleta Valley Cottage Hospital, Ridley-Tree Center for Wound Management, Santa Barbara, CA, EUA. <sup>5</sup>Departamento de Engenharia Química e Biomolecular, Universidade da Califórnia, Los Angeles, CA, EUA. <sup>✉</sup>email: ireneachen@ucla.edu Publicado em parceria com a Universidade Tecnológica de Nanyang

Tabela 1. Características do paciente e da ferida.

Paciente #	Tipo de ferida	Cicatrização resultado	Tamanho da ferida (cm <sup>2</sup> )	Nível de desbridamento	Instrumento #	Anterior desbridamento	Dias desde o último desbridamento
1	Diabético	Curado	1	Derme	Cureta	0	0
2	Diabético	Não curado	0,5	Derme	Cureta	12	14
3	Diabético	Curado	3,57	Derme	Cureta	5	8
4	Diabético	Não curado	68,7	Subcutâneo	Cureta	6	7
5	Diabético	Não curado	3,6	Subcutâneo	Cureta	7	10
6	Venoso	Não curado	2,07	Derme	Cureta	33	7
7	Venoso	Não curado	30	Derme	Cureta	1	7
8	Venoso	Curado	11,6	Derme	Cureta	4	9
9	Venoso	Curado	445	Derme	Cureta	2	7
10	Venoso	Curado	10	Subcutâneo	Cureta	3	9
11	Arterial	Curado	0,2	Derme	Cureta	6	9
12	Arterial	Não curado	307,84	Derme	Cureta	18	7
13	Arterial	Não curado	5,92	Derme	Cureta	13	7
14	Arterial	Curado	6,4	Subcutâneo	Cureta	13	7
15	Arterial	Não curado	10,85	Derme	Cureta	2	7
16	Pressão	Curado	0,2	Subcutâneo	Alicate de Tecido 3		12
17	Pressão	Não curado	8,88	Derme	Cureta 20		7
18	Pressão	Curado	0,9	Derme	Cureta	19	6
19	Pressão	Não curado	4,62	Subcutâneo	Bisturi	4	7
20	Pressão	Não curado	1,35	Derme	Cureta	3	7

necessidades de oxigênio (aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos) ou taxa específicos previram resultados de cura 6 meses após amostragem de feridas.

No presente estudo, swabs de feridas foram obtidos de 20 pacientes que se apresentam em uma clínica de feridas, com 5 pacientes de cada quatro etiologias comuns de feridas crônicas (diabética, venosa, arterial, e úlceras de pressão). Amostras de swabs foram coletadas de pacientes crônicos feridas antes e depois de um único evento de desbridamento afiado, junto com uma amostra de swab de pele de um local de controle (por exemplo, o contralateral membro). As comunidades microbianas foram caracterizadas por Illumina sequenciamento das alças V1–V3 de genes 16S rRNA. Os dados foram analisado por métricas de diversidade ecológica e análise de abundância diferencial com DESeq231, uma abundância diferencial popular método, e uma regressão linear mista Bayesiana generalizada

modelo (BGLMM) com fatores específicos do paciente para levar em conta as variabilidades entre pacientes<sup>32</sup>. Nossa análise do desbridamento indica que a superfície da ferida recém-exposta tem microbiota mínima diferença da superfície da ferida antiga, e identificamos táxons associados a resultados de cura. As implicações desses achados sobre nossa compreensão da fisiopatologia da doença crônica feridas é discutida.

## RESULTADOS

Composição bacteriana da pele e microbiomas de feridas crônicas As características do paciente e da ferida estão resumidas na Tabela 1. A

total de 18.128.419 leituras de sequenciamento de extremidade pareada foram obtidas do sequenciamento Illumina, com 14.025.888 leituras atribuídas em demultiplexação. Em média, foram 203.273 leituras em cada amostra (mínimo = 15.476 leituras, máximo = 729.495 leituras, mediana = 172.250 leituras). Análise de controle de qualidade indicada amostragem suficiente do microbioma em todas, exceto uma amostra, que foi excluído da análise (Fig. 1 suplementar).

Primeiro verificamos que nossos resultados na pele e na ferida microbiomas dos pacientes eram consistentes com achados<sup>7,20</sup>. Os genes de rRNA 16S sequenciados foram agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) usando o open OTU picking

método em QIIME33, com taxonomia atribuída usando o SILVA128 database<sup>34</sup> (veja a Fig. 1 suplementar para métricas de qualidade). o a precisão da recapitulação da comunidade microbiana foi confirmada por análise de uma comunidade simulada baseada em células. Todos os membros esperados da comunidade simulada foram detectados, mas alguns desvios a composição esperada foi observada (Fig. 2 suplementar). Em particular, uma diminuição relativa de organismos Gram-positivos comparado com organismos Gram-negativos sugere que lise pode causar relativa sub-representação de Gram-positivos organismos nas amostras. As amostras de controle negativo foram analisado para identificar potenciais contaminantes (Tabela Suplementar 1). Dados de composição foram obtidos (ou seja, abundância relativa dentro de cada amostra) e a abundância absoluta não foi medida especificamente. No entanto, notamos que a concentração absoluta de DNA extraído de amostras de controle negativo foi indetectável por um ensaio Qubit, mas que quase todas as amostras de pele e feridas (59/60) resultou em DNA detectável<sup>35</sup>, indicando que absoluta as abundâncias são geralmente maiores em amostras de pele e feridas comparado aos controles negativos. Os quatro filos mais abundantes detectados em média em ambas as amostras de pele e feridas foram *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* e *Bacteroides* (Fig. 2 suplementar). Na pele, os gêneros mais abundantes foram, em ordem decrescente, *Staphylococcus*, *Corynebacteria*, *Propionibacteria*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Enhydrobacter* e *Kocuria* (Fig. 1). Embora esses dados não fossem ideais para fornecer dados em nível de espécie, resolução, devido ao importante papel das espécies de *Staphylococcus* na infecções de pele, *Staphylococcus* OTUs foram ainda provisoriamente atribuídos a espécies com base no alinhamento das alças V1–V3. Pele amostras continham diversas comunidades de espécies de *Staphylococcus*, sendo *S. hominis* e *S. capitis* os membros mais abundantes média. Em amostras de feridas (pré e pós-desbridamento), *Staphylococcus* também foi o gênero mais abundante, e as bactérias *Coryne* e *Pseudomonas* também foram os principais constituintes. Outro principais constituintes das amostras de feridas incluíram *Proteus*, *Enterobacter*, *Campylobacter*, *Porphyromonas*, *Streptococcus*, *Bac teroides* e *Anaerococcus* (Fig. 1). Semelhante a amostras de pele, feridas amostras continham diversas espécies de *Staphylococcus*, incluindo *S.*

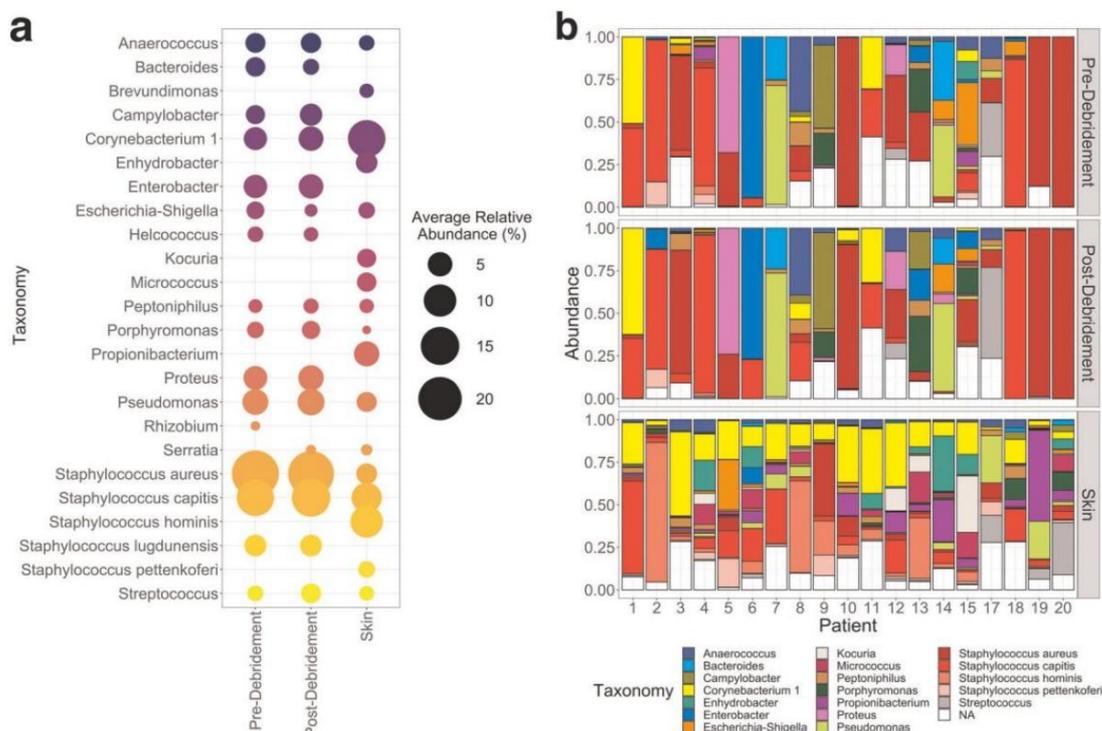


Fig. 1 Composição taxonômica de amostras de pele e feridas. a Abundância relativa média de gêneros dentro de cada tipo de amostra (apenas gêneros com abundância relativa média > 1% são mostrados). Os taxa de *Staphylococcus* são rotulados em nível de espécie. A escala de cores do gradiente é apenas para fins de visualização. b Abundância relativa de gêneros em cada amostra (gráfico de barras limitado aos 20 táxons mais abundantes em geral; "NA" indica OTUs sem classificação taxonômica; táxons de *Staphylococcus* são rotulados em nível de espécie).

*capitis*, embora *Staphylococcus aureus* tenha sido o mais abundante em média.

Esses resultados confirmam achados anteriores<sup>5–7,36</sup> e verificam a confiabilidade de nossas amostras. Ver Figs Suplementares. 3 e 4 e Nota Complementar 1 para maiores detalhes.

Diferenças na abundância de táxons bacterianos individuais na pele versus microbiomas de feridas crônicas Os táxons individuais super-representados na pele ou feridas são de interesse para identificar potenciais espécies-chave ou biomarcadores do estado saudável versus doente. Vários táxons parecem diferir em abundância entre pele e feridas (Fig. 1, Fig. Suplementar.

5). Para determinar a significância de tais observações, usamos DESeq2 e BGLMM para identificar associações estatisticamente significativas de OTUs individuais com feridas (pré-desbridamento) ou pele. O DESeq2 estima o intervalo de confiança da mudança log-fold na abundância de cada OTU entre amostras de pele e feridas, assumindo que os dados de contagem seguem uma distribuição binomial negativa com dispersão estimada pela combinação de dados entre OTUs<sup>31</sup>. Analisando uma tabela de OTU filtrada (OTUs presentes em >5 amostras com >10 contagens; Fig. 1 suplementar) usando DESeq2, 97 de 462 OTUs tiveram abundância diferencial significativa entre pele e feridas (valor de *p* ajustado < 0,05). Destas, 25 OTUs foram enriquecidas em feridas e 72 foram enriquecidas em pele.

Nós nos concentramos em OTUs "abundantes" com abundância relativa média >0,1% (11/25 de OTUs enriquecidas em feridas e 32/72 de OTUs enriquecidas em pele) (Fig. 2). Para corroborar a análise DESeq2, aplicamos o modelo Bayesiano BGLMM e utilizamos intervalos de credibilidade posteriores para identificar associações significativas.

Validamos o BGLMM usando simulações (Nota Complementar 2). Aplicado aos nossos dados, o BGLMM recapitulou razoavelmente bem as contagens de OTU observadas (coeficiente de correlação de Spearman > 0,75; Fig. 6 suplementar). O BGLMM encontrou 54 OTUs com associações significativas (ou seja, 95% de intervalos de credibilidade sem incluir zero), com 50 sendo enriquecidos em pré

amostras de desbridamento (sendo 22 abundantes) e apenas 4 sendo enriquecidas em amostras de pele (sendo 3 abundantes) (Fig. 2).

Apesar de algumas discrepâncias entre os dois modelos, várias OTUs abundantes foram identificadas por ambas as análises. Por exemplo, ambos os modelos identificaram os gêneros *S. aureus*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Helcococcus* e *Pseudomonas* como fortemente enriquecidos em amostras de feridas (pré-desbridamento), e *Paracoccus*, *Micrococcus* e *Kocuria* como significativamente enriquecidos em amostras de pele. Em comparação com a descrição qualitativa (Fig. 1), validamos que algumas OTUs de gêneros altamente abundantes (> 1% de abundância relativa) que pareciam ser exclusivas de amostras de feridas ou pele, de fato, estavam estatisticamente significativamente associadas a feridas ou pele. Em particular, *Proteus*, *Enterobacter* e *Helcococcus* foram exclusivos e significativamente enriquecidos em amostras de feridas, enquanto *Kocuria* e *Micrococcus* foram exclusivos e significativamente enriquecidos em amostras de pele. Essas associações e a variabilidade entre os pacientes podem ser validadas visualmente no mapa de calor que acompanha (Fig. 2). Em ambos os modelos, as OTUs significativas compreendem aproximadamente metade da abundância total nas amostras (Fig. 7 suplementar).

Alterações mínimas no microbioma da ferida crônica imediatamente após o desbridamento

As amostras de microbioma de feridas pré e pós-desbridamento apresentaram diversidade semelhante (Fig. 3 suplementar) e a inspeção visual da composição da comunidade (Fig. 1b) sugere um alto grau de semelhança antes e após o desbridamento. No entanto, a distância média não ponderada do UniFrac entre as amostras pré e pós-desbridamento foi substancial ( $0,42 \pm 0,09$ ) (Fig. 4 suplementar), embora a distância média ponderada do UniFrac ( $0,086 \pm 0,059$ ) tenha sido muito menor (Fig. 4 suplementar). Este padrão indica que os táxons principais permanecem praticamente inalterados pelo desbridamento, mas que pode haver mudanças nos táxons de baixa abundância. Essa característica pode ser observada na ordenação



Fig. 2 Associação de OTUs abundantes com amostras de feridas pré-desbridamento ou amostras de pele, inferidas por DESeq2 ou BGLMM. As OTUs (com abundância relativa média > 0,1%) mostraram-se significativas (critérios descritos em Métodos) em pelo menos um dos modelos com enriquecimento em amostras de feridas (vermelho) ou enriquecimento em amostras de pele (azul). As OTUs que não foram significativamente enriquecidas nesse modelo são mostradas em cinza. Para DESeq2, a mudança de  $\log_2$  na abundância estabilizada por variância é mostrada com barras de erro indicando o intervalo de confiança estimado de 95% ( $1,96 \times$  erro padrão,  $n = 19$ ). Para BGLMM, a mediana de  $\hat{y}_j$  estimado (efeito de pré-desbridamento para OTU  $j$ , consulte Métodos para detalhes) com barras de erro de intervalo de credibilidade de 95% ( $n = 19$ ). O mapa de calor mostra o  $\log_{10}$  (abundância relativa na ferida menos abundância relativa na pele) de cada OTU de cada paciente para uma comparação visual. As OTUs são rotuladas por seu nome de gênero ou atribuição de taxonomia mais baixa disponível, se aplicável; caso contrário, é usado o rótulo OTU original do picking aberto OTU QIIME. Observe que várias OTUs podem pertencer a

(Fig. 4 suplementar), em que as amostras pré e pós-desbridamento de cada paciente parecem agrupadas nas ordenações UniFrac e Bray-Curtis ponderadas, mas não na ordenação UniFrac não ponderada.

Para entender melhor a diferença entre as amostras pré e pós-desbridamento, identificamos as OTUs em cada paciente que eram exclusivas das comunidades pré ou pós-desbridamento versus presentes em ambas. Em média, um número semelhante de OTUs foi encontrado como exclusivo para amostras pré-desbridamento ( $13,8 \pm 11,4$ ) ou exclusivo para amostras pós-desbridamento ( $12,0 \pm 5,3$ ), enquanto  $19,4 \pm 9,3$  OTUs foram compartilhados entre os dois (Fig. 3a). Consistente com as métricas UniFrac, OTUs exclusivas para pré ou pós-desbridamento

as amostras constituíram uma pequena proporção da composição geral ( $2,04 \pm 5,52\%$  e  $1,17 \pm 3,66\%$  em média, respectivamente), enquanto as OTUs compartilhadas representaram a grande maioria ( $98,4 \pm 4,64\%$ ) da composição da amostra em média (Fig. 3b).

Para determinar se as OTUs individuais foram afetadas pelo desbridamento, independentemente da singularidade, usamos DESeq2 e BGLMM para identificar quais OTUs foram significativamente associadas a amostras pré ou pós-desbridamento (Fig. 3c). Para OTUs com abundância relativa > 0,1%, *Kocuria* (aeróbios estritos e mantos anae facultativos) e *Sphingopyxis* (aeróbios estritos) podem ser enriquecidos em amostras pré-desbridamento, enquanto a família *Comamonadaceae* pode ser enriquecida em amostras pós-desbridamento. No entanto,

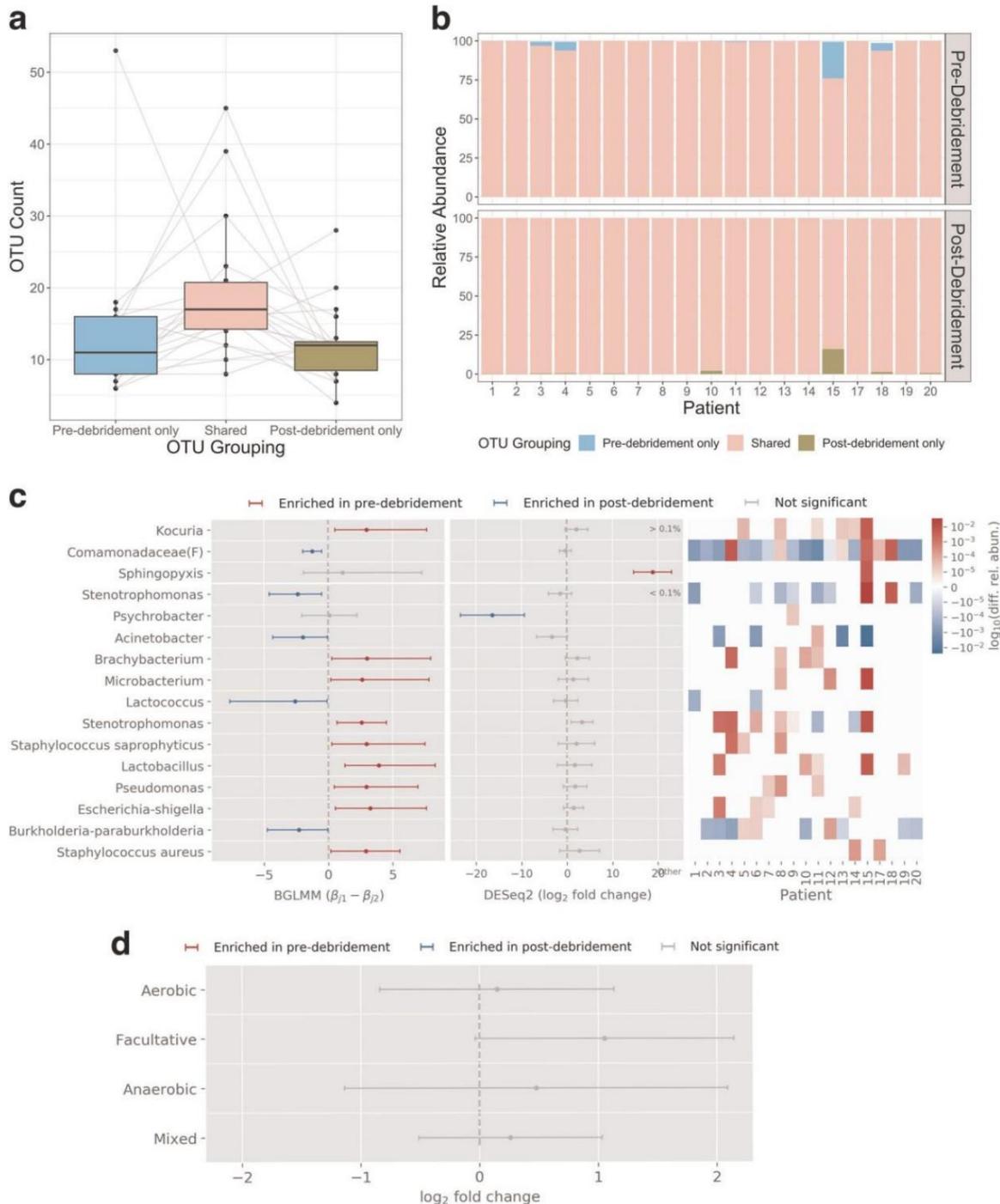


Fig. 3 Comparação das amostras pré e pós-desbridamento. As amostras pré e pós-desbridamento têm números semelhantes de OTUs exclusivas (a); os limites inferior e superior das caixas correspondem ao primeiro e terceiro quartil, as linhas centrais indicam a mediana e os bigodes se estendem até 1,5 x intervalo interquartil; quaisquer pontos além dos bigodes são discrepantes. As OTUs compartilhadas representam a grande maioria da microbiota (b). c Análise do enriquecimento estatisticamente significativo de táxons individuais em amostras pré vs. pós-desbridamento por DESeq2 e BGLMM; As OTUs são classificadas pela abundância relativa média decrescente. Observe que *Sphingopyxis* só foi encontrado em abundância no paciente 15. d A análise de abundância diferencial de granulação grossa de aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos usando DESeq2 não mostra diferença significativa imediatamente após o desbridamento. "Misto" indica táxons que não foram anotados devido a: baixa abundância relativa (<0,1% em média), nenhuma anotação taxonômica ou requisitos ambíguos de oxigênio. Para todas as inferências BGLMM e DESeq2, as barras de erro indicam intervalo de confiança de 95%, ou 1,96x erro padrão, respectivamente, e  $n = 19$ .

foi detectado por apenas um método, limitando a confiança geral nessas inferências.

Como o desbridamento foi observado anteriormente por afetar anaeróbios em particular após 2 semanas, caracterizamos ainda mais os requisitos de oxigênio das OTUs exclusivas para pré ou pós-desbridamento

amostras que também tiveram uma abundância relativa média superior a 0,1%. Observe que as amostras pós-desbridamento neste estudo foram coletadas na mesma consulta clínica que as amostras pré-desbridamento, ou seja, imediatamente após o desbridamento. OTUs exclusivas para amostras pré-desbridamento, incluíram dez aeróbios (0,99% média relativa

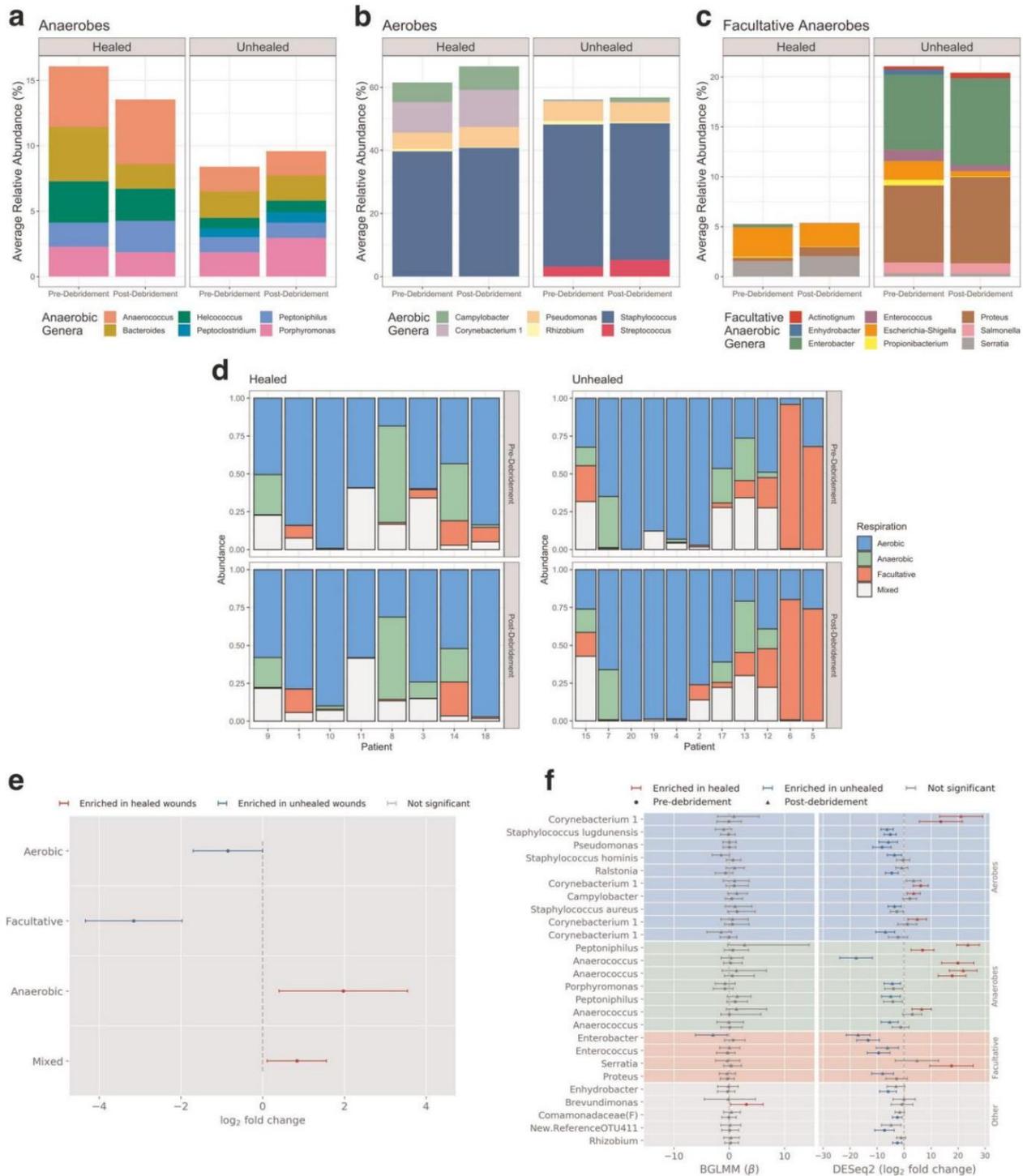


Fig. 4 Comparação de feridas cicatrizadas e não cicatrizadas. A abundância relativa média de taxa classificadas por necessidades de oxigênio (anaeróbios (a), aeróbios (b) e anaeróbios facultativos (c)) sugere que os anaeróbios facultativos podem ser preditivos do resultado da cicatrização. Os gráficos foram filtrados para mostrar táxons com abundância relativa média >0,5% dentro de cada tipo de amostra e resultado. Abundância relativa cumulativa de aeróbios, anaeróbios, anaeróbios facultativos e táxons não atribuídos em amostras de feridas que cicatrizaram ou não (d). As feridas cicatrizadas são ordenadas pela idade estimada da ferida, quando conhecida; feridas não cicatrizadas são ordenadas por tempo de tratamento até o momento da coleta de dados do prontuário. A análise de abundância diferencial de resultados de cicatrização para táxons com diferentes necessidades de oxigênio usando DESeq2 indicou enriquecimento substancial de anaeróbios facultativos em feridas que não cicatrizam (e). As barras de erro indicam intervalo de confiança estimado de 95% (1,96 × erro padrão,  $n = 19$ ). Associações taxonômicas (OTU com abundância relativa média > 0,1%) identificadas por BGLMM ou DESeq2 com feridas cicatrizadas ou não cicatrizadas, comparando amostras pré ou pós-desbridamento de cada desfecho, indicam enriquecimento significativo de *Enterobacter* em feridas não cicatrizadas (f). As barras de erro indicam intervalos de confiança de 95% para inferência BGLMM ( $n = 19$ ) e intervalo de confiança estimado de 95% (1,96 × erro padrão,  $n = 19$ ) para DESeq2.

abundância), seis anaeróbios (abundância relativa média de 0,44%) e cinco anaeróbios facultativos (abundância relativa média de 0,37%). As OTUs exclusivas para amostras pós-desbridamento continham sete aeróbios (abundância relativa média de 0,39%), dois anaeróbios (abundância relativa média de 0,28%) e dois mantos anaeróbios facultativos (abundância relativa média de 0,55%). Embora o número de táxons exclusivos para amostras pré ou pós-desbridamento fosse pequeno, os resultados sugeriram uma ligeira diminuição de anaeróbios pós-desbridamento. Para investigar ainda mais se os anaeróbios foram imediatamente esgotados pelo desbridamento, agrupamos as OTUs nas seguintes quatro categorias de acordo com as necessidades de oxigênio: aeróbios, anaeróbios, anaeróbios facultativos e taxa contendo uma mistura destes. Nenhum desses tipos apresentou diferença estatisticamente significativa entre as amostras pré e pós-desbridamento usando DESeq2 (Fig. 3d). Juntos, esses achados sugerem que o desbridamento por si só não leva a uma alteração imediata nos tipos de necessidade de oxigênio que compõem o microbioma da ferida, e as alterações, se houver, na composição taxonômica provavelmente serão pequenas.

Feridas cicatrizadas e não cicatrizadas exibem resposta imediata semelhante ao desbridamento. As feridas crônicas foram categorizadas em dois grupos com base na cicatrização das feridas em 6 meses após a amostragem (quando a extração do prontuário médico ocorreu para pacientes consentidos). Oito feridas caíram na categoria "curada" e 12 na categoria "não cicatrizante". A idade das feridas não cicatrizadas era, portanto, conhecida como > 6 meses. A idade da ferida foi estimada usando o momento da primeira apresentação como proxy para o início da ferida. Para feridas cicatrizadas, a idade da ferida era conhecida em 4 de 8 pacientes; desses, 2 cicatrizaram em <12 semanas de tratamento e 2 cicatrizaram após 6-9 meses. Um estudo anterior descobriu que feridas crônicas que cicatrizaram em 12 semanas, mas não cicatrizaram em 12 semanas, mostraram uma queda significativa na diversidade de Shannon 2 semanas após o desbridamento<sup>7</sup>. Em nossas amostras, nenhuma mudança significativa na diversidade bacteriana dos swabs de feridas pré e imediatamente pós-desbridamento foi observada para qualquer resultado de cicatrização (Fig. 8 complementar), sugerindo que a queda observada anteriormente na diversidade reflete uma mudança gradual no microbioma de Cicatrizando feridas. Da mesma forma, os microbiomas de feridas em cicatrização e não cicatrizantes não diferiram nas distâncias UniFrac à pele, indicando que os microbiomas de feridas em cicatrização não exibiram uma semelhança geral estatisticamente significativa com o microbioma da pele neste momento, em comparação com feridas não cicatrizadas (Fig. 7 suplementar).

O estudo anterior<sup>7</sup> também indicou que o desbridamento pareceu diminuir a abundância de anaeróbios, conforme avaliado 2 semanas após o desbridamento, em feridas que cicatrizaram em 12 semanas, mas não em feridas que não cicatrizaram nesse período. Era, portanto, de interesse determinar se essa resposta diferencial em anaeróbios poderia ser vista imediatamente após o desbridamento. Após o agrupamento em tipos de necessidades de oxigênio (aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos), tendências pequenas, mas qualitativamente semelhantes foram observadas aqui. Em feridas que cicatrizaram, o desbridamento causou uma pequena diminuição na abundância relativa média de anaeróbios, de  $16,1 \pm 24,1\%$  pré-desbridamento para  $13,6 \pm 18,8\%$  imediatamente após o desbridamento (Fig. 4a), e um pequeno aumento na abundância relativa média de aeróbios, de  $61,5 \pm 25,9\%$  pré-desbridamento a  $66,6 \pm 21,4\%$  imediatamente pós-desbridamento (Fig. 4b). Feridas não cicatrizadas mostraram um ligeiro aumento de anaeróbios e pouca mudança em aeróbios de desbridamento (Fig. 4a, b). O desbridamento também causou pouca mudança na abundância relativa de anaeróbios facultativos (Fig. 4c). As pequenas diferenças na resposta ao desbridamento para os diferentes tipos de necessidade de oxigênio (anaeróbios, aeróbios e anaeróbios facultativos) não foram estatisticamente significativas para feridas cicatrizadas e não cicatrizadas (Fig. 9 suplementar), apoiando

a ideia de que as diferenças observadas anteriormente desenvolvem-se gradualmente ao longo dos dias após o desbridamento.

Abundância diferencial de anaeróbios facultativos em feridas cicatrizadas versus não cicatrizadas Embora o desbridamento não pareça afetar diferencialmente a composição dos tipos de necessidade de oxigênio em feridas cicatrizadas versus não cicatrizadas entre nossas amostras, um grande contraste foi observado ao comparar a abundância relativa de anaeróbios facultativos em amostras de feridas cicatrizadas versus não cicatrizadas (pré ou pós-desbridamento). Em feridas não cicatrizadas, a abundância relativa média de anaeróbios facultativos foi de  $20,8 \pm 29,7\%$ , em comparação com  $5,32 \pm 7,21\%$  em feridas cicatrizadas (Fig. 4c). Essa diferença não foi estatisticamente significativa usando um teste de soma de classificação de Wilcoxon bilateral, indicando que não houve viés qualitativo significativo de anaeróbios facultativos em amostras curadas versus não curadas. No entanto, este teste não paramétrico é insensível à magnitude das diferenças, ou seja, o enriquecimento pesado para anaeróbios facultativos pode estar associado a uma cicatrização ruim, enquanto o enriquecimento leve tem pouco efeito. O exame dos dados sugeriu uma alta variação na abundância de anaeróbios facultativos entre os pacientes, especialmente aqueles com feridas não cicatrizadas (Fig. 4d). De fato, a distribuição de frequência de anaeróbios facultativos diferiu significativamente entre feridas cicatrizadas e não cicatrizadas (teste de Kolmogorov-Smirnov:  $p = 1,5 \times 10^{-4}$ ), e a variância nessas distribuições diferiu significativamente umas das outras (teste de Bartlett:  $p = 1,0 \times 10^{-6}$ ; teste de Fligner-Killeen:  $p = 0,01$ ). Portanto, analisamos a abundância diferencial de taxa com diferentes requisitos de oxigênio usando a transformação estabilizadora de variância de DESeq2 que pode explicar

Usando DESeq2, descobrimos que aeróbios e especialmente anaeróbios facultativos são significativamente mais abundantes em feridas que não cicatrizaram, enquanto anaeróbios são mais abundantes em feridas que cicatrizaram (Fig. 4e).

Para identificar quais OTUs específicas foram associadas aos resultados de cicatrização, aplicamos o método DESeq2 e BGLMM para comparar as amostras de feridas (pré e pós-desbridamento) de feridas curadas versus não cicatrizadas. No geral, a maioria das associações de OTUs individuais com status de cicatrização não foi identificada de forma consistente por ambos os métodos, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra e à diversidade de colonização de feridas entre os pacientes. Um resultado encontrado por ambos os métodos é que *Enterobacter*, um anaeróbio facultativo, está associado à não cicatrização (Fig. 4f). Também aplicamos DESeq2 para identificar OTUs da pele associados a resultados de cicatrização. Apenas uma OTU, a *bactéria Coryne*, foi significativamente associada à cicatrização de feridas; nenhum foi associado a feridas não cicatrizadas (Fig. 10 suplementar).

## DISCUSSÃO

Inscrevemos 20 pacientes com feridas crônicas para caracterizar a composição microbiana da superfície da ferida exposta por um único evento de desbridamento agudo e avaliar se os táxons microbianos poderiam ser preditivos de resultados clínicos. Embora os resultados sejam certamente influenciados por vários fatores do hospedeiro e outros fatores clínicos, nos concentramos em saber se os táxons microbianos estavam associados aos resultados. Resumos de taxonomia e métricas de diversidade de microbiomas de pele e feridas foram consistentes com relatórios anteriores<sup>5-7,36</sup>. Aplicamos um novo modelo misto linear generalizado Bayesiano, além do DESeq2, para avaliar estatisticamente as associações de OTUs individuais com tipos de amostra específicos (Nota Complementar 3).

BGLMM e DESeq2 concordaram na identificação de vários taxa que foram fortemente enriquecidos em amostras de feridas em comparação com a pele. De acordo com avaliações anteriores de pele e feridas crônicas<sup>5-7,36</sup>, os comensais comuns da pele *Micrococcus*, *Paracoccus* e *Kocuria* foram significativamente associados à pele usando ambos os métodos, e o DESeq2 identificou ainda uma série de OTUs *Corynebacterium* e *Staphylococcus* (*S. hominis*, *S. haemolyticus* e *S.*

*cohnii*) associada à pele. Os patógenos conhecidos e colonizadores de feridas *S. aureus*, *S. capitis*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Helcococcus* e *Pseudomonas* foram significativamente associados a feridas por ambos os métodos. Notavelmente, as OTUs de *Staphylococcus* foram associadas à pele e feridas, e as associações em nível de espécie só foram resolvidas após a reanotação dessas OTUs usando ferramentas fora do pipeline QIIME padrão e do banco de dados SILVA128. Essa desvantagem destaca a utilidade de métodos e anotações de análise 16S de alta resolução, como abordagens de "variante de sequência de amplicon" ou metagenômica de espingarda. Isso foi demonstrado em recente

estudo mostrando efeitos específicos de cepas e espécies no microbioma da ferida<sup>7</sup>. No entanto, a concordância entre DESeq2 e BGLMM sobre esses resultados aumenta a confiança nas associações aqui identificadas e pode levar a novos testes de associações encontradas por apenas um método.

A prática do desbridamento de feridas é baseada nos impactos esperados tanto na fisiologia do hospedeiro quanto na microbiota da ferida. Nós limpamos as superfícies da ferida antes e imediatamente após o único evento de desbridamento afiado em um ambulatório.

Nenhuma diferença significativa na composição do microbioma foi detectada, seja na abundância de OTUs ou na abundância de táxons agrupados por necessidade de oxigênio (aeróbio, anaeróbio, anaeróbio facultativo e misto/outro/NA). Portanto, inferimos que o achado prévio de depleção de anaeróbios 2 semanas após o desbridamento resulta de uma mudança gradual ao longo dos dias. Deve-se notar que o pequeno tamanho deste estudo limita seu poder de detectar pequenas mudanças na comunidade. Além disso, a técnica de Levine pode amostrar exsudato de tecidos profundos, de modo que o próprio swab pode disfarçar pequenas diferenças na ferida antes e após o desbridamento.

No entanto, a descoberta de que a composição do microbioma da superfície da ferida imediatamente exposta por desbridamento agudo não é significativamente diferente da ferida pré-desbridamento sugere que os papéis dos fatores associados ao hospedeiro, como moderação da inflamação, bem como biocarga microbiana total, justificam um estudo mais aprofundado. Além disso, esses achados apoiam o princípio de que o desbridamento deve ser utilizado com frequência e de forma agressiva para ser mais eficaz.

As feridas foram acompanhadas até ~6 meses após a amostragem, permitindo que os pacientes fossem agrupados por cicatrização versus resultado não cicatrizado após 6 meses. Neste estudo, o resultado reflete o tempo desde a amostragem em vez da idade real da ferida. O resultado "curado", portanto, incluiu tanto feridas com idade <6 meses quanto aquelas com idade >6 meses que se originaram antes do momento da coleta da amostra e cicatrizaram antes da coleta de dados do paciente. Todas as feridas "não cicatrizadas" tinham idade > 6 meses. Embora 12 semanas após a apresentação inicial tenha sido usada em outros estudos de microbioma<sup>6,7</sup> como o ponto de tempo de avaliação para distinguir feridas cicatrizadas de não cicatrizadas, 12 semanas não foi uma distinção prática em nosso estudo, no qual poucas feridas cicatrizaram dentro desse período.

Ao comparar os microbiomas (pré-desbridamento) de feridas cicatrizadas versus não cicatrizadas, um achado notável foi a super representação de anaeróbios facultativos como um grupo no microbioma de feridas não cicatrizadas. Em contraste, as feridas cicatrizadas pareciam ser enriquecidas por anaeróbios. É tentador especular que as infecções nas quais os anaeróbios estritos desempenham um papel fundamental são mais facilmente eliminadas à medida que a ferida cicatriza e o nível de oxigênio aumenta no tecido, desfavorecendo os organismos anaeróbios. Por outro lado, as infecções nas quais os anaeróbios facultativos desempenham um papel fundamental, no entanto, seriam mais tolerantes às mudanças nas condições de uma ferida em cicatrização e, portanto, podem persistir. Essa interpretação tem implicações para nossa compreensão de tratamentos baseados no aumento da tensão de oxigênio na ferida (por exemplo, oxigênio hiperbárico), para os quais existe literatura conflitante em relação à eficácia. Em particular, a presença de anaeróbios facultativos patogênicos pode tornar a ferida refratária às terapias de oxigênio, sugerindo que as terapias de oxigênio devem ser direcionadas contra feridas com baixos níveis de anaeróbios facultativos. Outra possibilidade intrigante é que os anaeróbios facultativos podem melhor npj Biofilms and Microbiomes (2020)

toleram os gradientes substanciais de oxigênio dentro do próprio biofilme, causando persistência do biofilme, pois estudos recentes indicam que a tensão variável de oxigênio é um estresse dominante no ambiente de alta densidade do biofilme<sup>42,43</sup>. Nesse caso, a associação de anaeróbios facultativos com a não cicatrização seria consequência do ambiente seletivo dentro do biofilme. Alternativamente, a associação de anaeróbios facultativos com não cicatrização pode refletir uma correlação com uma característica diferente que causa má cicatrização. Por exemplo, o metabolismo anaeróbio facultativo pode ser uma característica incidental em organismos que são particularmente problemáticos em feridas crônicas por outras razões. Além do mecanismo, níveis mais altos de anaeróbios facultativos ainda podem ser úteis como marcadores prognósticos de comunidades mais resilientes que inibem a cicatrização. Mais estudos experimentais seriam necessários para investigar a influência dos anaeróbios facultativos sugeridos aqui.

As associações taxonômicas com a cicatrização de feridas são de especial interesse, pois podem apontar para espécies que, em combinação com outros fatores relacionados ao hospedeiro e clínicos, promovem ou retardam a cicatrização ou que podem atuar como biomarcadores do estado de cicatrização. As análises de táxons individuais por ambos DESeq2 e BGLMM revelaram que o gênero *Enterobacter*, um anaeróbio facultativo, estava associado ao status de não cura. Além disso, não observamos *Enterobacter* na pele normal dos pacientes deste estudo, ou seja, *Enterobacter* foi exclusivo de feridas. Enquanto a *Enterobacter* tem sido relatado em feridas crônicas<sup>9,12</sup>, seu papel potencial tem sido pouco estudado em relação aos táxons mais abundantes de *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. Curiosamente, as espécies de *Enterobacter* são um organismo causador comum de infecções agudas; em um estudo, *Enterobacter* foi considerado um indicador prognóstico negativo para infecções de sítio cirúrgico desenvolvidas após neurocirurgia<sup>44</sup>. Sugerimos que seja necessária mais atenção ao possível papel da *Enterobacter* em feridas crônicas.

Outras associações taxonômicas com resultados de cicatrização foram detectadas por apenas um método, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra e à heterogeneidade natural das feridas entre os pacientes. A análise BGLMM indicou que as feridas cicatrizadas foram positivamente associadas com *Brevundimonas*. DESeq2 pareceu ser mais sensível a associações em geral, com feridas cicatrizadas positivamente associadas a *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Corynebacterium* e *Serra*. O DESeq2 também identificou que a cicatrização está negativamente associada a *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e *Proteus*. O anaeróbio facultativo *Proteus* é um candidato intrigante, porque, como *Enterobacter*, sua abundância geral em feridas que não cicatrizam é relativamente alta (por exemplo, Fig. 8 suplementar). Além disso, uma única OTU de *Corynebacterium* de amostras de pele foi positivamente associada à cicatrização. Os achados menos robustos representam hipóteses que podem ser testadas em estudos maiores. Os resultados também validam o BGLMM como um novo modelo estatístico complementar ao DESeq2 para futuros estudos de associação.

Este trabalho é limitado por várias limitações. O poder deste estudo para identificar correlações (ou associações) foi limitado pelo pequeno tamanho da coorte (20 pacientes), de modo que apenas associações de efeito relativamente grande seriam detectadas. Coortes maiores serão importantes para testar os achados, particularmente as correlações descobertas pelo único método estatístico. Dentro dos pacientes, a amostragem foi limitada a um swab pré e um swab pós-desbridamento por ferida, devido à possibilidade de pequenos tamanhos de feridas e preocupações levantadas em discussão com o Institutional Review Board sobre amostragem repetida. Embora a amostragem limitada seja uma preocupação potencial, a concordância entre as amostras pré e pós-desbridamento encontradas aqui sugere que o swabbing em si não é uma fonte importante de variação. Por outro lado, embora todas as feridas tenham sido submetidas a desbridamento cortante, o instrumento utilizado para o desbridamento e o grau de desbridamento não foram controlados e podem contribuir para a variabilidade de paciente para paciente nos resultados.

Para a maioria das OTUs, enquanto sequenciamos as alças V1–V3 do gene 16S rRNA, a resolução taxonômica foi limitada ao nível de gênero. Isso provavelmente se deve ao limite de agrupamento da OTU (97%)

identidade) e base de dados de referência (SILVA128). Análises adicionais de OTUs de interesse (*Staphylococcus*) permitiram uma tentativa de anotação em nível de espécie, embora o sequenciamento metagenômico permitiria atribuições mais confiáveis.

Finalmente, os dados do microbioma coletados aqui são composicionais, ou seja, quantidades absolutas de bactérias são desconhecidas. Embora saibamos que as amostras de controle negativo produziram quantidades indetectáveis de DNA e quase todas as amostras de pele e feridas (59/60) produziram quantidades detectáveis<sup>35</sup>, informações quantitativas sobre cargas bacterianas seriam úteis para interpretar a detecção de espécies (por exemplo, contaminação de reagentes) em os controles negativos. Além disso, é provável que a carga bacteriana seja afetada pelo desbridamento, e a análise de correlação pode produzir associações mais fisiologicamente relevantes, dados dados quantitativos absolutos. Embora o swab possa não ser apropriado para quantificação absoluta, a amostragem do microbioma por outros meios (por exemplo, biópsia<sup>25</sup>) pode ser mais favorável. No entanto, a relevância dos dados microbiológicos quantitativos para os resultados clínicos e as técnicas de coleta desses dados ainda não são claras<sup>23</sup>.

Em resumo, os resultados deste estudo mostram que o desbridamento brusco não tem um grande impacto imediato na composição da microbiota da ferida. Além disso, o estudo identificou a abundância de anaeróbios facultativos in toto como um fator prognóstico negativo para cicatrização em feridas crônicas, e o anaeróbio facultativo *Enterobacter* foi especificamente associado a feridas que não cicatrizam versus cicatrizam. Compreender o mecanismo dessas associações exigirá inferência causal (por exemplo, a partir de dados de séries temporais) e/ou modelos experimentais. Trabalhos adicionais nessas direções podem ser frutíferos para entender a contribuição do microbioma para a cicatrização de feridas, bem como personalizar recomendações terapêuticas com base em microbiomas específicos de feridas.

## MÉTODOS

### Declaração de ética

A coleta de amostras clínicas foi realizada no Ridley-Tree Center for Wound Management no Goleta Valley Cottage Hospital, de acordo com os protocolos aprovados pelo Cottage Health Institutional Review Board (Protocolo de estudo 17-48u). Recrutamos uma coorte de 20 pacientes de tratamento de feridas ao longo de uma semana e meia e coletamos amostras após obter o consentimento informado e por escrito do paciente.

### Coleta de amostras clínicas Foram

amostrados quatro tipos de feridas crônicas clinicamente classificadas (úlceras diabéticas, feridas venosas, feridas arteriais e úlceras por pressão), com cinco pacientes por tipo de ferida. Os critérios de exclusão foram os seguintes: pacientes menores de 18 anos, em unidade de terapia intensiva ou com infecção não relacionada à ferida. Todos os pacientes foram submetidos a desbridamento cortante, mas a extensão e profundidade do desbridamento, bem como o tipo de instrumento (cureta, bisturi, tesoura ou pinça de tecido), não foram padronizados e foram determinados pelo médico assistente (Tabela 1). O desbridamento não foi conservador e foi realizado até que o sangramento fosse observado. Copan FLOQSwabs 520C estéril foram pré-umedecidos com PBS estéril antes de todas as coletas de amostras. Durante uma visita de um único paciente, swabs da ferida foram coletados antes do desbridamento e 1-2 min após o desbridamento, e um swab de pele saudável foi coletado do membro contralateral. Amostras de feridas foram coletadas da área de desbridamento. Todas as amostras de pele e feridas foram coletadas pela técnica de Levine; uma pressão suave foi aplicada enquanto o swab era limpo e enrolado em uma área de ~ 1 cm<sup>2</sup> de tecido de granulação saudável por aproximadamente 30 s. Os swabs clínicos foram colocados de volta no tubo de coleta seco e estéril e armazenados a 4 ° C por não mais de 4 h antes de serem processados. Amostras de controle negativo do centro da ferida foram coletadas expondo os swabs ao ar na sala de coleta pela mesma duração que a coleta de swab da ferida e da pele. As amostras de controle de processamento foram obtidas expondo swabs ao ar e reagentes no laboratório de processamento de forma análoga às amostras clínicas. Uma comunidade simulada microbiana baseada em células (Zymo) foi incluída como controle positivo.

### Processamento de amostras e extração de DNA

As amostras foram transportadas para a UCSB para processamento. As pontas dos cotonetes foram quebradas em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL estéreis e as amostras foram ressuspensas em 500 µL estéril 1× TE por vortex por 2 min em alta velocidade em um adaptador de vórtice multitubos. As células e os detritos celulares foram sedimentados por centrifugação a 16.000 × g por 2 min. Totalmente, 250 µL de sobrenadante foram transferidos para um tubo de microcentrífuga estéril para enriquecimento de partículas semelhantes a vírus e extração de DNA, enquanto a solução restante e a ponta do swab foram retidas para extração de DNA de todo o microbioma. Todas as etapas subsequentes de purificação e extração foram realizadas conforme descrito em<sup>35</sup>. Resumidamente, o DNA bacteriano foi extraído por tratamento com lisozima de alta atividade, digestão com proteinase K, lise química, batimento de esferas e purificação final do DNA com um PureLink Genomic Mini Kit, com todas as amostras eluídas em 25 µL de 1× TE. O DNA extraído foi quantificado usando um instrumento Qubit 3.0, kit dsDNA HS e 5 µL de amostra. Das 20 amostras de pele, apenas uma amostra estava abaixo do limite de detecção (40 pg); o DNA total mínimo detectado foi de 1 ng, o máximo foi de 17,3 ng e a média foi de 3,0 ng. Todas as amostras de feridas produziram DNA suficiente para quantificação de Qubit; o DNA total mínimo detectado foi de 48,3 ng, o máximo foi de 11,5 µg e a média foi de 2,92 µg. Todos os controles negativos estavam abaixo do limite de detecção e os controles positivos produziram DNA suficiente para sequenciamento.

### Preparação de biblioteca e sequenciamento

As bibliotecas de sequenciamento de 16S rRNA foram geradas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em duas etapas para cada amostra. Na primeira etapa, os loops V1–V3 foram amplificados usando primers adaptadores personalizados compostos por primers 16S universais "27F" e "534R" e sequências de adaptadores de indexação Illumina Nextera. A PCR do adaptador foi feita em reações de 25 µL contendo 11,5 µL de molde, 0,5 µL de cada primer a 10 µM e 12,5 µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix. A PCR do adaptador foi realizada nas seguintes condições: desnaturação/ativação a 95°C por 3 min, seguido por 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 55°C por 30s e extensão a 72°C por 30 s. Os produtos de PCR foram purificados com 20 µL de esferas AMPureXP e eluídos em 50 µL de Tris 10 mM pH 8,5. Na segunda etapa, os índices Illumina Nextera XT foram adicionados por PCR em reações de 50 µL contendo 5 µL de produto do adaptador PCR, 5 µL de Índice 1, 5 µL de Índice 2, 25 µL de KAPA HiFi HotStart ReadyMix e 10 µL de água. Oito ciclos de PCR foram conduzidos nas mesmas condições do adaptador PCR. As amostras indexadas foram purificadas com 56 µL de esferas AMPureXP, eluídas em 25 µL de 10 mM Tris pH 8,5, quantificadas com um kit Qubit dsDNA HS, normalizadas e agrupadas para multiplexação. Todas as amostras, incluindo controles, foram suficientemente amplificadas para sequenciamento. O QC da biblioteca final foi feito usando um kit Agilent TapeStation dsDNA 1000 bp. As bibliotecas finais foram sequenciadas em uma única corrida em um Illumina MiSeq com química PE300 V3 no núcleo de sequenciamento do Laboratório de Nanoestruturas Biológicas (BNL) da

### Análises de bioinformática de rRNA 16S

As leituras em pares foram carregadas para o QIIME AWS AMI (ID de AMI: ami-1918ff72, "qiime-191")<sup>33</sup>. A análise de qualidade inicial foi realizada com FastQC.

As leituras foram controladas por qualidade por trimming e filtragem de qualidade com trimmomatic usando configurações padrão<sup>45</sup>. A junção de leitura foi realizada com o script de junção do QIIME (join\_paired\_ends.py), usando o algoritmo fastq-join com configurações padrão. As leituras combinadas foram alimentadas no pipeline de coleta OTU aberto (pick\_open\_reference\_otus.py) usando as configurações padrão. A taxonomia foi atribuída usando o banco de dados de referência SILVA128 16S agrupado no limite de identidade de 97%<sup>34</sup>. As sequências representativas que não puderam ser alinhadas usando pyNASt foram contaminação humana putativa<sup>46</sup> e excluídas da tabela BIOM final<sup>47</sup>. A tabela BIOM final (sem falhas de alinhamento do PyNASt) continha 69 amostras (60 experimentais + 9 controles), com 22.753 OTUs representando 5.931.472 contagens totais (média) Para 608 OTUs anotadas como *Staphylococcus* em nível de gênero, as anotações em nível de espécie foram geradas usando blastn<sup>48</sup>. As sequências representativas de cada OTU foram consultadas contra a coleção de nucleotídeos NCBI nr/nt, subconjunto do grupo Bacillus/Staphylococcus (taxid: 1385). Para cada OTU, os resultados de explosão foram analisados classificando a tabela de acertos, em ordem decrescente, por bit-score, depois e-value, e o acerto mais alto para cada OTU foi retido. A ferramenta de linha de comando Entrez Direct foi usada para obter a linhagem de taxonomia correspondente a cada número de acesso da tabela de acertos analisada, e o nome da espécie foi anexado à tabela OTU em R.

Para análises de abundância diferencial, a tabela OTU foi filtrada para manter apenas OTUs com pelo menos 10 leituras em pelo menos 5 amostras (tabela filtrada continha 462 OTUs). Três amostras experimentais continham menos de 1000 contagens; análises com as amostras excluídas produziram resultados semelhantes à análise de

o conjunto de dados completo, para que sejam incluídos nas análises descritas aqui. A amostra de pele do paciente 16 continha um número anormalmente alto de OTUs e sua curva de rarefação não saturava; esta amostra e suas amostras de feridas associadas foram removidas da análise (Fig. 1 suplementar). Os resultados de DESeq2 e BGLMM foram comparados com e sem o paciente 16 (Fig. 11 suplementar) para confirmar a robustez da análise de associação taxonômica para a remoção dos dados do paciente 16.

#### Análises de diversidade e abundância diferencial Todas

as análises de diversidade foram realizadas no RStudio. Resumidamente, a tabela QIIME BIOM, o arquivo de árvore e o arquivo de mapeamento foram importados e convertidos em um objeto Phyloseq49. Os dados foram pré-processados para enraizar a árvore, reformatar os níveis de taxonomia e strings, adicionar anotações de nível de espécie para OTUs de *Staphylo coccus*, transformar contagens em valores de abundância relativa, filtrar controles e amostras insuficientemente sequenciadas e pré-gerar tabelas aglomeradas de gênero para análises a jusante. Os resumos taxonômicos (dotplots, barcharts e boxplots) foram gerados utilizando as tabelas aglomeradas de gênero, com filtros indicados nas legendas das figuras. Gráficos de diversidade alfa foram gerados usando tabelas brutas, não filtradas e não rarefeitas. As distâncias de diversidade beta foram calculadas usando uma tabela aglomerada por gênero com contagens normalizadas por abundância relativa e filtradas para reter OTUs com abundância relativa média superior a 0,01%. As análises de abundância diferencial foram realizadas utilizando o pacote DESeq2 com o teste de Wald e ajuste paramétrico31. Log2(fold-change) se valores de  $p$  ajustados foram extraídos para cada comparação usando a função de contraste. OTUs com valores de  $p$  ajustados menores que 0,05 foram considerados significativamente diferentes em uma comparação diferencial. Intervalos de confiança de 95% (IC) foram estimados pelo erro padrão de 1,96x (lfcSE) relatado pelo pacote DESeq2. Observe que as OTUs cujo IC 95% não inclui zero podem não ser significativas pelo padrão de valor de  $p$  ajustado, pois os valores de  $p$  foram ajustados pela correção de Benjamini-Hochberg para taxa de falsa descoberta usando DESeq2.

Pacotes adicionais utilizados para análise e geração de figuras no RStudio incluem: ggfilter, ggplot250, ggpubr, reshape2, RColorBrewer, viridis, wesanderson, grid, gridExtra, plotly, scales, dplyr, magrittr, data, mesa e macaco. Pacotes adicionais em python incluem numpy, pandas, scipy, matplotlib e biom-pyhton.

Modelo misto linear generalizado bayesiano para avaliar ainda mais a associação de abundâncias de OTU com diferentes tipos de amostra (pré-desbridamento, pós-desbridamento ou pele) e resultados (curado ou não curado), modificamos o modelo na ref. para analisar nossos dados. Vários OTUs em amostras de paciente  $i$  no sequenciamento,  $i$  1;  $\frac{1}{4}$ ;  $n$ ,  $k$  1;  $\frac{1}{4}$ ;  $K$  e  $j$  1;  $\frac{1}{4}$ ;  $J$ . Em nosso conjunto de dados, três amostras foram retiradas de cada um dos pacientes. Temos  $n = 19$  ou  $20$ , dependendo da inclusão ou exclusão do paciente 16,  $K$  3  $\frac{1}{4}$   $J = 462$  (tabela OTU ~  $\delta$  filtrada para contagens  $> 10$  em  $> 5$  amostras). Assumimos uma distribuição binomial negativa para  $Y_{ikj}$ ,  $Y_{ikj} \sim \text{NB}(\mu_{ikj}, s_j)$ , onde  $\mu_{ikj}$  é a média de  $Y_{ikj}$   $\frac{1}{4}$   $\mu$  e  $s_j$  é o parâmetro de sobredispersão.  $s_j$  leva em conta a superdispersão de contagens  $Y_{ikj}$  e tempo que o paciente  $i$  viveu com  $rik$   $\frac{1}{4}$   $Y_{ij}$   $\frac{1}{4}$   $Y_{ij}$   $\frac{1}{4}$   $x_{ik1}$   $\frac{1}{4}$   $x_{ik2}$ , onde  $x_{ik}$  é um vetor de covariáveis  $Y_{ikj}$ . Em nosso estudo, usamos dois indicadores binários para diferenciar os tipos significam as amostras de pele, pré-desbridamento e pós-desbridamento do paciente  $i$ . Os parâmetros de regressão  $\beta_j$  e  $\beta_j$  são  $\beta_j$  e  $\beta_j$  respectivamente. A diferença nos coeficientes  $\beta_j$   $\beta_j$  1 pode ser usada para inferir o efeito do desbridamento na OTU  $j$ . Aqui,  $rik$  é o fator de amostragem que leva em conta diferentes contagens totais em amostras (por exemplo, profundidades de amostragem e sequenciamento);  $\beta_j$  é a abundância de linha de base de OTU  $j$  que explica a variabilidade nas abundâncias de linha de base de OTU;  $u_{ij}$  é um efeito aleatório de OTU  $j$  no paciente  $i$  que acomoda a heterogeneidade entre os pacientes. Como  $u_{ij}$  é comum para todas as amostras retiradas do paciente  $i$ , também induz dependência entre abundâncias de OTU  $j$  nas amostras do paciente  $i$ . Nos modelos Bayesianos, os parâmetros desconhecidos são aleatórios e é necessária a especificação de distribuições a priori para os parâmetros aleatórios (chamados de distribuições a priori). Os modelos bayesianos então atualizam as distribuições dos parâmetros aleatórios usando dados observados e produzem distribuições a posteriori (chamadas distribuições posteriores). Assumimos distribuições anteriores em nossos parâmetros desconhecidos, como  $rik$ ,  $\beta_j$  e  $\beta_j$  1, Mangus32. Em particular, assumimos distribuições de Laplace independentes para  $\beta_j$  ( $p = 1, 2$ ), resultando em laço Bayesiano. O Laplace prior é um npj esparso Biofilms and Microbiomes (2020)

semelhantes aos de Lee e Sison

induzindo a priori que melhora a estimativa de  $\beta_j$  e facilita a seleção de variáveis. Usamos intervalos de credibilidade posterior de 95% de  $\beta_j$ ,  $p$  1; 2 e  $\beta_j$   $\beta_j$  1 para identificar associações significativas para OTUs individuais. Também assumimos distribuições de Laplace para  $u_{ij}$ . Para detalhes da especificação anterior, veja Lee e Sison-Mangus32. Uma vez que a distribuição a posteriori não é de forma fechada, utilizamos um método Monte Carlo de cadeia de Markov que consiste nas etapas de Gibbs e Metropolis para avaliar a distribuição a posteriori. Mediana e intervalos de 95% de credibilidade para todos os  $\beta_j$  foram relatados.

Realizamos uma análise adicional para avaliar a associação de abundâncias de OTU com diferentes tipos de amostras em feridas cicatrizadas e não cicatrizadas. Consideramos apenas amostras pré e pós-desbridamento e usamos o BGLMM com duas covariáveis, pré e pós-desbridamento e feridas cicatrizadas e não cicatrizadas. As covariáveis formam quatro grupos diferentes: pré-desbridamento/não cicatrizado, pós-desbridamento/não cicatrizado, pré-desbridamento/não cicatrizado e pré-desbridamento/não cicatrizado. Usamos o grupo pré-desbridamento/não cicatrizado como linha de base e, em seguida, nos assemelhamos à análise anterior. Aqui,  $\beta_j$   $\beta_j$  1 e  $\beta_j$   $\beta_j$  2 são os coeficientes de OTU  $j$  em relação ao grupo de linha de base. Diferença entre um par de  $\beta_j$   $p$  1; 2; 3 pode ser usado para inferir diferenças de abundâncias de OTU  $\delta$   $\frac{1}{4}$   $p$  entre grupos.

Para todas as inferências usando BGLMM, o coeficiente de regressão ( $\beta_j$ ) cujo intervalo de credibilidade de 95% não inclui zero foi considerado como tendo efeito estatisticamente significativo. Realizamos inferência na tabela filtrada (462 OTUs) com ou sem paciente 16 para DESeq2 e BGLMM.

#### DISPONIBILIDADE DE DADOS

Todos os dados usados para realizar as análises e gerar os números correspondentes estão disponíveis publicamente no Dryad Digital Repository (<https://doi.org/10.25349/D9TS32>). As leituras brutas estão disponíveis no Sequence Read Archive do NCBI (BioProject Accession PRJNA612439).

#### DISPONIBILIDADE DE CÓDIGO

Todo o código utilizado para realizar as análises e gerar as figuras correspondentes está disponível publicamente no Dryad Digital Repository (<https://doi.org/10.25349/D9TS32>).

Recebido: 9 de outubro de 2019; Aceito: 24 de março de 2020;  
Published online: 01 May 2020

#### REFERÊNCIAS

- Olsson, M. et al. O fardo humanístico e econômico das feridas crônicas: um revisão sistemática. *Regeneração de Reparação de Feridas*. 27, 114-125 (2019).
- Martinego, L. et al. Prevalência de feridas crônicas na população geral: revisão sistemática e metanálise de estudos observacionais. *Ana Epidemiol*. 29, 8-15 (2019).
- Sen, CK et al. Feridas na pele humana: uma grande ameaça à saúde pública e à economia. *Regeneração de Reparação de Feridas*. 17, 763-771 (2009).
- Leaper, D., Assadian, O. & Edmiston, CE Abordagem para infecções crônicas de feridas. *Br. J. Dermatol*. 173, 351-358 (2015).
- Wolcott, RD et al. Análise da microbiota de feridas crônicas de 2.963 pacientes por pirosequenciamento de 16S rDNA. *Regeneração de Reparação de Feridas*. 24, 163-174 (2016).
- Loesche, M. et al. A estabilidade temporal na microbiota de feridas crônicas está associada com má cicatrização. *J. Investir. Dermatol*. 137, 237-244 (2017).
- Kalan, LR et al. A variação no nível de cepa e espécie no microbioma de feridas diabéticas está associada a resultados clínicos e eficácia terapêutica. *Cell Host Microbe* 25, 641-655 e645 (2019).
- Gardiner, M. et al. Um estudo longitudinal da pele diabética e microbioma da ferida. *PeerJ* 5, e3543 (2017).
- Dowd, SE et al. Levantamento da diversidade bacteriana em feridas crônicas usando pyr ossequencing, DGGE e sequenciamento completo de espingarda de ribossomo. *BMC Microbiol*. 8, 43 (2008).
- Scales, BS & Huffnagle, GB O microbioma no reparo de feridas e fibrose tecidual. *J. Pathol*. 229, 323-331 (2013).
- Sanchez-Sanchez, M. et al. Prevalência bacteriana e resistência a antibióticos em isolados clínicos de úlceras do pé diabético no nordeste de Tamaulipas, México. *Int J. Baixa. Extremo Feridas* 16, 129-134 (2017).
- Rahim, K. et al. Contribuição bacteriana na cronicidade de feridas. *Microb. Eco* 73, 710-721 (2017).

13. Price, LB et al. Análise da comunidade de bactérias de feridas crônicas usando pirosequenciamento baseado no gene 16S rRNA: impacto do diabetes e antibióticos na microbiota de feridas crônicas. *PLoS ONE* 4, e6462 (2009).
14. Price, LB et al. Variação espacial em macroescala na microbiota de feridas crônicas: um estudo transversal. *Regeneração de Reparação de Feridas*. 19, 80-88 (2011).
15. Phalak, P. & Henson, MA A modelagem metabólica da microbiota de feridas crônicas prevê interações mutualísticas que impulsionam a composição da comunidade. *J. Appl. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/jam.14421> (2019).
16. Misisic, AM, Gardner, SE & Grice, EA O microbioma da ferida: abordagens modernas para examinar o papel dos microrganismos na cicatrização de feridas crônicas prejudicadas. *Av. Cuidados com Feridas* 3, 502-510 (2014).
17. Liu, SH et al. O microbioma da pele de cicatrizes de feridas e pele não afetada em pacientes com queimaduras moderadas a graves na fase subaguda. *Regeneração de Reparação de Feridas*. 26, 182-191 (2018).
18. Kalan, L. et al. Redefinindo o microbioma de feridas crônicas: as comunidades fúngicas são prevalentes, dinâmicas e associadas à cicatrização tardia. *MBio* <https://doi.org/10.1128/mBio.01058-16> (2016).
19. Kalan, L. & Grice, EA Fungos no microbioma da ferida. *Av. Cuidados com Feridas* 7, 247-255 (2018).
20. Johnson, TR et al. O microbioma cutâneo e as feridas: novos alvos moleculares para promover a cicatrização de feridas. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms19092699> (2018).
21. Jneid, J. et al. Explorando a microbiota das infecções do pé diabético com cultivo mics. *Frente. Infecção Celular. Microbiol.* 8,282 (2018).
22. Holmes, CJ, Plichta, JK, Gamelli, RL & Radek, KA Papel dinâmico das respostas ao estresse do hospedeiro na modulação do microbioma cutâneo: implicações para cicatrização de feridas e infecção. *Av. Cuidados com Feridas* 4, 24-37 (2015).
23. Halstead, FD et al. Uma revisão sistemática da microbiologia quantitativa de feridas por queimadura no manejo de pacientes queimados. *Queimaduras* 44, 39-56 (2018).
24. Grice, EA et al. O deslocamento longitudinal na microbiota da ferida diabética se correlaciona com a resposta prolongada de defesa da pele. *Proc. Natl Acad. Sci. EUA* 107, 14799-14804 (2010).
25. Gjodsbol, K. et al. Não há necessidade de biópsias: comparação de três técnicas de amostra para determinação da microbiota de feridas. *Int. Ferida J.* 9, 295-302 (2012).
26. Canessa, MC et al. A cicatrização de feridas na pele é acelerada e sem cicatrizes na ausência de microbiota comensal. *J. Immunol.* 193, 5171-5180 (2014).
27. Ammons, MC et al. Associação bioquímica do perfil metabólico e microbioma em feridas de úlcera por pressão crônica. *PLoS ONE* 10, e0126735 (2015).
28. Wolcott, R., Costerton, JW, Raouf, D. & Cutler, SJ A natureza polimicrobiana de infecção por biofilme. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 107-112 (2013).
29. Hoppe, IC & Granick, MS Desbridamento de feridas crônicas: uma revisão sistemática qualitativa de ensaios clínicos randomizados. *Clin. Plástico. Surg.* 39, 221-228 (2012).
30. Han, G. & Ceilley, R. Cicatrização de feridas crônicas: uma revisão da gestão atual e tratamentos. *Av. Ter.* 34, 599-610 (2017).
31. Love, MI, Huber, W. & Anders, S. Estimativa moderada de mudança de dobra e dispersão para dados de RNA-seq com DESeq2. *Genoma Biol.* 15,550 (2014).
32. Lee, J. & Sison-Mangus, M. Um modelo de regressão semiparamétrica Bayesiana para análise conjunta de dados de microbioma. *Frente. Microbiol.* 9,522 (2018).
33. Caporaso, JG et al. QIIME permite a análise da comunidade de alto rendimento dados de sequenciamento. *Nat. Métodos* 7, 335-336 (2010).
34. Quast, C. et al. O projeto de banco de dados de genes de RNA ribossomal da SILVA: processamento de dados aprimorado e ferramentas baseadas na web. *Res. de Ácidos Nucleicos*. 41, D590-596 (2013).
35. Verbanic, S., Kim, CY, Deacon, JM & Chen, IA Preparação aprimorada de amostra de swab único para recuperar DNA bacteriano e fágico da pele humana e microbiomas de feridas. *BMC Microbiol.* 19, 214 (2019).
36. Grice, EA et al. Diversidade topográfica e temporal da pele humana microbioma. *Ciência* 324, 1190-1192 (2009).
37. Callahan, BJ et al. DADA2: Inferência de amostra de alta resolução a partir de dados de amplificação da Illumina. *Nat. Métodos* 13, 581-583 (2016).
38. Levine, NS, Lindberg, RB, Mason, AD Jr. & Pruitt, BA Jr. A cultura quantitativa de swab e esfregaço: um método rápido e simples para determinar o número de bactérias aeróbicas viáveis em feridas abertas. *J. Trauma* 16, 89-94 (1976).
39. Wilcox, JR, Carter, MJ & Covington, S. Frequência de desbridamento e tempo de cicatrização: um estudo de coorte retrospectivo de 312.744 feridas. *JAMA Dermatol.* 149, 1050-1058 (2013).
40. Rodrigues, M., Kosaric, N., Bonham, CA & Gurtner, GC Cicatrização de feridas: uma perspectiva celular. *Fisiol. Rev.* 99, 665-706 (2019).
41. Londaal, M., Katzman, P., Nilsson, A. & Hammartund, C. A oxigenoterapia hiperbárica facilita a cicatrização de úlceras crônicas nos pés em pacientes com diabetes. *Diabetes Care* 33, 998-1003 (2010).
42. James, GA et al. Microsensores e assinaturas transcriptômicas de depleção de oxigênio em biofilmes associados a feridas crônicas. *Regeneração de Reparação de Feridas*. 24, 373-383 (2016).
43. Morgan, SJ et al. A aptidão bacteriana em feridas crônicas parece ser mediada pela capacidade de crescimento de alta densidade, não pela virulência ou pelas funções do biofilme. *PLoS Pathog.* 15, e1007511 (2019).
44. Yoon, JW et al. Infecção por *Enterobacter* após cirurgia de coluna: uma experiência institucional. *Neurocirurgia Mundial*. 123, e330-e337 (2019).
45. Bolger, AM, Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: um aparador flexível para dados de sequência Illumina. *Bioinformática* 30, 2114-2120 (2014).
46. Caporaso, JG et al. PyNAST: uma ferramenta flexível para alinhar sequências a um alinhamento de modelo. *Bioinformática* 26, 266-267 (2010).
47. McDonald, D. et al. O formato da Matriz de Observação Biológica (BIOM) ou: como aprendi a parar de me preocupar e amar o ome-ome. *Gigascience* 1, 7 (2012).
48. Altschul, SF, Gish, W., Miller, W., Myers, EW & Lipman, DJ Basic alinhamento local ferramenta de busca. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410 (1990).
49. McMurdie, PJ & Holmes, S. phyloseq: um pacote R para análise interativa reproduzível e gráficos de dados de censo de microbioma. *PLoS ONE* 8, e61217 (2013).
50. Wickham, H. ggplot2: Gráficos elegantes para análise de dados. *Use R*, 1-212 (2009).

## RECONHECIMENTOS

O Laboratório de Nanoestruturas Biológicas da UCSB é reconhecido pelo serviço de sequenciamento. Melinda Littlefield, coordenadora de pesquisa do GVCH, é reconhecida por auxiliar na coleta de amostras. O National Institutes of Health é reconhecido por financiar este trabalho por meio do NIH New Innovator Award (DP2 GM123457-01 para IAC). Financiamento adicional foi fornecido pela National Science Foundation (DMS-1662427 para JL).

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

IAC, SV e JMD conceberam os experimentos. JMD recolheu as amostras. SV processou as amostras e sequenciou os dados. SV, YS e JL analisaram os dados. Todos os autores contribuíram para a redação e edição do artigo.

## INTERESSES COMPETITIVOS

Os autores declaram não haver interesses conflitantes.

## INFORMAÇÃO ADICIONAL

Informações suplementares estão disponíveis para este artigo em <https://doi.org/10.1038/s41522-020-0130-5>.

Correspondências e solicitações de materiais devem ser endereçadas ao IAC

Reimpressões e informações de permissão estão disponíveis em <http://www.nature.com/reprints>

Nota do editor Springer Nature permanece neutro em relação a reivindicações jurisdicionais em mapas publicados e afiliações institucionais.



Acesso Aberto Este artigo está licenciado sob uma Licença Creative Commons Atribuição Internacional, que permite o uso, compartilhamento, adaptação, distribuição e reprodução em qualquer meio ou formato, desde que você dê os devidos créditos ao(s) autor(es) original(is) e à fonte, fornecer um link para a licença Creative Commons e indicar se foram feitas alterações. As imagens ou outros materiais de terceiros neste artigo estão incluídos na licença Creative Commons do artigo, a menos que indicado de outra forma em uma linha de crédito para o material. Se o material não estiver incluído na licença Creative Commons do artigo e seu uso pretendido não for permitido por regulamentação legal ou exceder o uso permitido, você precisará obter permissão diretamente do detentor dos direitos autorais. Para ver uma cópia desta licença, visite <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Este é um trabalho do governo dos EUA e não está sob proteção de direitos autorais nos EUA; proteção de direitos autorais estrangeira pode ser aplicada em 2020