

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA BACTERIANO EM  
CÂNULAS DE TRAQUEOSTOMIA PEDIÁTRICAS EM  
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

LEONARDO PALMA KUHL

Porto Alegre, Brasil  
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE

**AVALIAÇÃO DO MICROBIOMA BACTERIANO EM  
CÂNULAS DE TRAQUEOSTOMIA PEDIÁTRICAS EM  
UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO**

LEONARDO PALMA KUHL

**ORIENTADORA: Professora Dra. Cláudia Schweiger**

“A apresentação desta dissertação é exigência do  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança  
e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, Brasil  
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO**  
**ADOLESCENTE**

ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:

13/07/2020

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

Departamento de Infectologia/PPGCM

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Melissa Ameloti Gomes Avelino

Departamento de Otorrinolaringologia

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonaccio Carvalho

Departamento de Pediatria e Puericultura/ PPGSCA

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação ao meu avô Ivo Adolpho Kuhl, o cientista.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, sou eternamente grato pela minha educação, pelo carinho (mesmo nos menores gestos), por nunca passar por carência material ou intelectual. O tempo, dedicação, responsabilidade e integridade absoluta que aplicam à vida e à medicina (e que cresci observando) serão sempre minha maior inspiração.

À minha irmã Gabriela, por sempre cuidar de mim e me ensinar muito sobre a vida.

À minha irmã Cristiana e seu esposo Ivan, pelo incentivo, pela ajuda e pelo exemplo que são a minha vida profissional.

Ao prof. Alexandre José Macedo, pela faísca que guiou este projeto, e por todas as suas colaborações desde então.

Ao prof. Paulo José Cauduro Maróstica, por seu humanitarismo e caráter sólido, exemplo de liderança e cavalheirismo, pedra angular do grupo de pesquisa de vias aéreas pediátricas. Por manter acesa as mais belas tradições da medicina.

Ao grande amigo Bruno e sua esposa Ana, por me acompanharem durante esta trajetória, e por todo seu suporte direto ou indireto nesta dissertação.

À minha orientadora, amiga e mentora, tanto de vida quanto profissão. Pela paciência, por perguntar e escutar, pelas cobranças e elogios, por uma comunicação que frequentemente dispensa palavras, pela incansável habilidade de superar expectativas.

Agradeço pela oportunidade de ficar perto da tua aura, independentemente de qualquer merecimento.

A tantos outros, colegas, professores, mestres e amigos.

## RESUMO

**Objetivos:** Avaliar o microbioma bacteriano encontrado em cânulas de traqueostomia pediátricas de um grupo de crianças com o diagnóstico de glossoptose por Sequência de Robin (SR), acompanhadas pelo Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). **Métodos:** Os pacientes foram incluídos no estudo no momento da troca de cânula de traqueostomia, realizada em ambiente hospitalar e pela equipe de otorrinolaringologia. Durante esse procedimento, o aspirado traqueal foi coletado e enviado para cultura, enquanto a própria cânula de traqueostomia foi armazenada para posterior sequenciamento de *amplicon* do gene *16s rRNA*. A extração do DNA foi realizada com o uso do kit DNeasy PowerBiofilm (QIAGEN®- Cat No. 24000-50), já o sequenciamento foi realizado seguindo o protocolo *Brazilian Microbiome Project* (BMP) e com o auxílio do equipamento S5 (Ion S5™ System, Thermo Fisher Scientific). *Principal component analysis* (PCA) foi utilizado para procurar padrões ou grupamentos entre os pacientes. **Resultados:** Todos os 12 pacientes estudados estavam em uso de cânulas de traqueostomia da mesma marca, sem balonete, traqueostomizados há mais de um ano e com tempo de uso da cânula de traqueostomia analisada de aproximadamente 3 meses. Entre as culturas realizadas a partir do aspirado traqueal, apenas cinco pacientes tiveram crescimento de, pelo menos, uma bactéria, porém todos estes tiveram a OTU (*operational taxonomic unit*) de mesmo gênero identificada em seu microbioma pela metagenômica. Foi identificado um total de 68 OTUs diferentes no nível taxonômico de gênero, sendo os encontrados com maior abundância: *Aggregatibacter*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Alloiococcus* e *Capnocytophaga*. O microbioma individual de cada paciente apresentou grande variedade, não correlacionando com nenhuma característica clínica individual. Testes de PCA foram utilizados para comparar variáveis entre os pacientes, porém não foram encontrados grupamentos. **Conclusão:** O microbioma das cânulas de

traqueostomias apresenta grande variedade, mesmo em pacientes com características clínicas semelhantes, sendo difícil atribuir um padrão estático de normalidade. Mais estudos são necessários para compreender as relações entre as redes de comunidades bacterianas e como elas interagem entre si, seu microambiente e as repercussões clínicas que podem causar.

**Palavras-chave:** Crianças, traqueostomia, metagenômica, microbioma, RNA Ribossômico 16S.



## ABSTRACT

**Objectives:** The purpose of this study was to evaluate the bacterial microbiome found in tracheostomy cannulas of a group of children diagnosed with glossoptosis secondary to Robins Sequence (RS) accompanied by the otolaryngology team of a tertiary hospital on the south of Brazil. **Methods:** Pediatric patients were enrolled in the study at the time of the cannula change, performed at the hospital by the otolaryngology team. During this procedure, tracheal aspirate was collected and sent to culture, while the removed cannula was collected and stored for amplicon sequencing of 16s rRNA. DNA extraction were performed using DNeasy PowerBiofilm Kit (QIAGEN®- Cat No. 24000-50) while sequencing was performed with the S5 (Ion S5™ System, Thermo Fisher Scientific) and following *Brazilian Microbiome Project* (BMP) protocol. Principal component analysis (PCA) were utilized to search for clusters or patters among patients. **Results:** All 12 patients within the study were using tracheostomy cannulas of the same brand, uncuffed, had tracheostomy performed for over 1 year and had used the removed cannula for approximately 3 months. Culture results shown bacterial growth in only five patients, all with corresponding genera identified in their microbiome. A total of 68 different operational taxonomic units (OTU) were sequenced at the genera taxonomic level, and most abundant were: *Aggregatibacter*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Alloiococcus* and *Capnocytophaga*. Individual microbiome of each individual was highly variable, not correlating to any particular clinical characteristic. PCA didn't find any cluster among patients. **Conclusion:** The microbiome of tracheostomy cannulas is highly variable, even within patients with similar clinical characteristics, making it challenging to determine a standard for normality. More studies are needed to comprehend the network between bacterial communities and how the interact among themselves, their microenvironment and clinical outcomes.

**Keywords:** Child, tracheostomy, metagenomics, microbiota, RNA, Ribosomal, 16S.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Cortes realizados na cânula de traqueostomia .....	39
<b>Figura 2</b> - Distribuição do comprimento das sequências (em pares de bases) .....	49
<b>Figura 3</b> - Escore de qualidade por posição dos pares de bases .....	50
<b>Figura 4</b> - Média do escore de qualidade sobre todas as sequências .....	50
<b>Figura 5</b> - Distribuição do comprimento das sequências (em pares de bases) .....	51
<b>Figura 6</b> - Escore de qualidade por posição dos pares de bases .....	51
<b>Figura 7</b> - Média do escore de qualidade sobre todas as sequências .....	52
<b>Figura 8</b> - Proporção de OTUs por amostra .....	56
<b>Figura 9</b> - Rarefação das amostras.....	58
<b>Figura 10</b> - Gráfico de PCA identificando as amostras .....	60
<b>Figura 11</b> - Gráfico de PCA identificando via de alimentação .....	61
<b>Figura 12</b> - Gráfico de PCA identificando uso de antibiótico nos últimos 3 meses.....	62
<b>Figura 13</b> - Gráfico de PCA identificando presença de granuloma.....	63
<b>Figure 1</b> - PCA plot for sample identification .....	94
<b>Figure 2</b> - PCA plot for feeding route.....	95
<b>Figure 3</b> - PCA plot for use of antibiotics during past 3 months .....	96
<b>Figure 4</b> - PCA plot for presence of peristomal granuloma.....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Dados clínicos dos 12 pacientes .....	47
<b>Tabela 2</b> - Resultados das culturas dos aspirados traqueais com crescimento bacteriano .....	48
<b>Tabela 3</b> - Resultados da espectrofotometria para a determinação da concentração de DNA nas amostras .....	49
<b>Tabela 4</b> - Concentração de DNA, inspeção da cânula e metagenômica .....	53
<b>Tabela 5</b> - Prevalência do total de leituras por gênero pela metagenômica.....	55
<b>Tabela 6</b> - Proporção dos gêneros por amostra.....	57
<b>Tabela 7</b> - Medidas de alfa-diversidade.....	59
<b>Table 1</b> - Clinical characteristics of the 12 patients .....	89
<b>Table 2</b> - Culture growth results from tracheal aspirates .....	90
<b>Table 3</b> - Results from DNA extraction, cannula inspection and metagenomics .....	91
<b>Table 4</b> - Prevalence of total reads per genus on metagenomics .....	92
<b>Table 5</b> - Genera proportion per sample .....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ACHO – Ágar chocolate

AS – Ágar sangue

ATB – *Antibiotics*

AZ – Ágar Azida

BMP – *Brazilian Microbiome Project*

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

EUA – Estados Unidos da América

G- tube – *Gastrostomy tube*

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

LRI – *Lower respiratory infection*

MAC – Ágar MacConkey

Máx. – Máximo

Mín. – Mínimo

NG- tube – *Nasogastric tube*

NGS – *Next generation sequencing*

OTU – *Operational taxonomic unit*

PCA – *Principal component analysis*

PCR – *Polymerase chain reaction*

rRNA – *Ribosomal ribonucleic acid*

RS – *Robin sequence*

SR – Sequência de Robin

Vs – *Versus*

## LISTA DE SÍMBOLOS

Atm	Atmosfera
C	Celsius
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
mL	Mililitros
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetros
V	<i>Version</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1 INDICAÇÕES DE TRAQUEOSTOMIA.....	20
<b>2.1.1 Glossoptose</b> .....	21
2.2 MICROBIOLOGIA EM TRAQUEOSTOMIA.....	22
2.3 BIOFILMES EM TRAQUEOSTOMIA .....	24
2.4 METAGENÔMICA EM VIAS AÉREAS.....	25
2.5 METAGENÔMICA EM PACIENTES COM TRAQUEOSTOMIA.....	28
2.6 ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.....	30
2.7 ASSOCIAÇÕES ENTRE CLÍNICA E MICROBIOMA BACTERIANO .....	31
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	35
4.1 OBJETIVO GERAL .....	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	37
5.1 DELINEAMENTO .....	37
5.2 AMOSTRAGEM .....	37
5.3 TAMANHO DE AMOSTRA .....	37
5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	37
5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	38
5.6 LOGÍSTICA (COLETA DE MATERIAL) .....	38
5.7 DADOS CLÍNICOS .....	40
5.8 REVISÃO DE PRONTUÁRIO ELETRÔNICO .....	40
5.9 TÉCNICA DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES BACTERIOLÓGICO E BACTERIOSCÓPICO.....	41
5.10 AVALIAÇÃO DO EXAME DE CULTURA.....	41
5.11 METAGENÔMICA.....	42
<b>5.11.1 Extração de DNA</b> .....	42
<b>5.11.2 Avaliação da concentração de DNA</b> .....	43
<b>5.11.3 Amplificação e sequenciamento de nova geração (NGS)</b> .....	43
<b>5.11.4 Bioinformática</b> .....	44
<b>5.11.5 Controle de qualidade</b> .....	44
<b>5.11.6 Alfa e beta diversidade</b> .....	44



5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	45
5.13 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	45
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
<b>9 ARTIGO.....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXO B - PROTOCOLO DE INCLUSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO C - PROTOCOLO DA EXTRAÇÃO DE DNA .....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Denomina-se traqueostomia a intervenção cirúrgica com objetivo de criar uma via alternativa para passagem de ar aos pulmões. Por meio de uma incisão cervical cria-se um acesso até a traqueia, onde é confeccionado um estoma e posicionada uma cânula de traqueostomia, que mantém o trajeto pérvio.

Antonio Muda Brassolva e Paul d'Engine, nos séculos XV e XVI, respectivamente, realizaram as primeiras descrições de traqueostomia, mas foi Armand Trousseau, no século XIX, que popularizou o procedimento em crianças como uma medida salvadora de vidas durante um surto de difteria. Já no início do século XX, Chevalier Jackson descreveu a técnica de traqueostomia que utilizamos ainda hoje (YAREMCHUK, 2003; WATTERS, 2013; DE TREY *et al.*, 2013).

As indicações para traqueostomia na população pediátrica sofreram transformações nas últimas décadas. No passado, sua indicação mais comum era a inflamação aguda das vias aéreas superiores; mas, com o advento da vacinação contra *Haemophilus influenzae* e *Corynebacterium Diphtheriae*, esta indicação praticamente desapareceu. Outro importante fator para a mudança das indicações foi a modernização e qualificação das Unidades de Tratamento Intensivo pediátricas e neonatais, que melhorou o prognóstico e a sobrevida de pacientes com patologias crônicas graves (cardiopulmonares, genéticas e neurológicas), responsáveis por afetar, direta ou indiretamente, as vias aéreas altas (DE TREY *et al.*, 2013). Para além disso, o desenvolvimento e aprimoramento das técnicas endoscópicas de diagnóstico e tratamento de patologias das vias aéreas ensejou um grande impacto na indicação e incidência das traqueostomias (AVELINO *et al.*, 2017).

Atualmente, a traqueostomia é indicada principalmente para a ventilação em pacientes com vias aéreas cronicamente obstruídas (*e.g.* estenose laríngea ou paralisia de pregas vocais),

para facilitar o manejo em ventilação mecânica e para auxiliar no tratamento de pacientes que apresentam aspiração broncopulmonar (YAREMCHUK, 2003; RODNEY *et al.*, 2016; AVELINO *et al.*, 2017). A glossoptose, por exemplo, é uma das patologias obstrutivas de via aérea com potencial necessidade de traqueostomia, sendo definida como colapso posterior da base da língua, resultando em diferentes graus de obstrução respiratória. A glossoptose pode ocorrer como consequência de hipoplasia de mandíbula (sequência de Robin), mas também em pacientes com alterações neurológicas relacionadas a hipotonia (SORIN *et al.*, 2004; SCHWEIGER *et al.*, 2016; MANICA *et al.*, 2017). Embora a traqueostomia seja muitas vezes necessária para o manejo destas doenças, sua manutenção está associada à alta morbimortalidade, especialmente em crianças, exigindo treinamento em cuidados e atenção constante dos cuidadores. O menor calibre das vias aéreas e, por consequência, das cânulas de traqueostomia, colocam as crianças em uma situação mais vulnerável para quadros de obstrução da cânula por secreção, granulomas e infecções locais e pulmonares (SHERMAN *et al.*, 2000; PERKINS *et al.*, 2004; SOLOMON *et al.*, 2009).

A traqueostomia cria um canal de comunicação entre a traqueia e a pele cervical, e, alguns dias após a abertura desse pertuito, ocorre a maturação do seu trajeto, que é mantido pérvio pela cânula de traqueostomia. Este complexo forma então um ambiente microbiológico novo. O acesso direto do ar aos pulmões, sem o filtro das vias aéreas superiores, modifica a mobilização de secreções e mecanismos fisiológicos de defesa do paciente, sendo que a própria cânula provoca um constante estado de reação de corpo estranho, capaz de acumular detritos orgânicos e colonizações bacterianas, às vezes ocasionando exacerbações de condições clínicas (YAREMCHUK, 2003; BROOK, 2004; WATTERS, 2013; SOLOMON *et al.*, 2009; BAKCMAN *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; POZZI *et al.*, 2015).

Determinar precisamente os microrganismos presentes na traqueostomia é uma tarefa complexa. A realização de culturas pode favorecer o crescimento de bactérias específicas,

ocultando a presença de outras, sendo ainda um desafio o isolamento de diversas cepas nestas amostras. O elevado número de microrganismos diferentes é outro fator que dificulta identificar relações entre bactérias potencialmente patogênicas (BPP) e colonizações probióticas, bem como mecanismos que levam a descompensação da microbiota (SCHUURMANS *et al.*, 2015; URRESTARAZU *et al.*, 2016).

Brook (2004) demonstraram colonização bacteriana em 100% nos 27 pacientes traqueostomizados que acompanhou. Já Pozzi *et al.* (2015), ao estudarem crianças traqueostomizadas em reabilitação, encontraram prevalência de colonização de 91% nas avaliações iniciais, chegando a 100% ao final do acompanhamento de seus pacientes. Ambos os estudos realizaram suas detecções através de cultura bacteriana.

Métodos de identificação filogenética, independentes de cultura, vêm sendo amplamente utilizados como modelos para estudos de comunidades de microrganismos como bactérias, fungos e vírus. A metagenômica utiliza o acesso ao material genético destes microrganismos permitindo-nos avaliar não apenas espécies individuais selecionadas pela pressão de um meio de cultura, mas toda a comunidade presente em uma amostra específica (MARTIN *et al.*, 2014; PIENKOWSKA *et al.*, 2017).

Com os avanços tecnológicos, os equipamentos de alta performance que realizam sequenciamento de nova geração (NGS- *Next Generation Sequencing*) vêm se tornando cada vez mais acessíveis. Adicionando a isso a evolução da computação e crescimento do setor de bioinformática, o sequenciamento genético tem reduzido o custo para abaixo do esperado pela lei de Moore (<https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>).

Atualmente referimo-nos à metagenômica para descrever uma análise de comunidades de microrganismos por meio de algum tipo de sequenciamento genético independente de cultura. Os métodos mais utilizados são o sequenciamento de genoma total (tipo *shotgun*) ou

sequenciamento de genes alvo (a exemplo da identificação de subunidades de RNA ribossômico), ambos métodos considerados de alto rendimento (*high throughput*), pois permitem avaliar grandes volumes de informação genética de maneira rápida e eficiente (HAMADY *et al.*, 2009; WEINSTOCK, 2012; GARRIDO- CARDENAS *et al.*, 2017).

O sequenciamento tipo *shotgun* realiza uma leitura de todo o DNA da amostra, permitindo não apenas a identificação taxonômica de microrganismos, mas também a identificação de genes funcionais, como por exemplo genes associados a resistência bacteriana (QUINCE *et al.*, 2017).

Apenas um estudo realizou metagenômica tipo *shotgun* em cânulas de traqueostomia pediátrica até o presente momento: Wang *et al.* (2018) avaliaram a composição do biofilme acumulado nas cânulas de traqueostomia de quatro pacientes, identificando alterações na comunidade bacteriana entre os casos com ou sem presença de granuloma.

Já a identificação de subunidades de RNA ribossômico, embora não permita avaliação do genoma total do microrganismo, apresenta-se como técnica rápida, de menor custo e ainda bastante eficiente na identificação taxonômica de comunidades microbióticas (PYRLO *et al.*, 2014; GARRIDO- CARDENAS *et al.*, 2017).

A subunidade alvo de RNA ribossômico pode ser diferente de acordo com o microrganismo que desejamos estudar. Especificamente em bactérias o principal alvo é o gene *16S rRNA* (HAMADY *et al.*, 2009; BUKIN *et al.*, 2019).

Sequenciando apenas uma região do gene *16S rRNA*, podemos compará-la com um catálogo filogenético de bactérias e, quando encontramos similaridade de pelo menos 97%, atribuir a sequência a uma unidade taxonômica operacional (OTU- *Operational Taxonomic Unit*) (HUSE *et al.*, 2008; WEINSTOCK, 2012; PYRLO *et al.*, 2014; GARRIDO- CARDENAS *et al.*, 2017; MINICH *et al.*, 2018).

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 INDICAÇÕES DE TRAQUEOSTOMIA

Em estudo realizado em nosso serviço, uma média de 12 traqueostomias (distância interquartil: 10 a 14,25) foram realizadas anualmente em crianças durante o período entre 2006 e 2015 (SCHWEIGER *et al.*, 2017). O estudo descreveu as características desses pacientes, e apresentou como indicação mais frequente do procedimento a obstrução da via aérea superior (83% dos casos); além disso, dentre as causas de obstrução, as mais comuns foram: glossoptose (30%), estenose subglótica (16%) e faringomalácia (11%), números justificados pelo fato de o hospital ser centro de referência no tratamento de pacientes com seqüência de Robin.

Atualmente, as principais indicações para realização de traqueostomia em pacientes pediátricos relacionam-se a alterações craniofaciais, obstrução de vias aéreas superiores e ventilação mecânica prolongada (AL-SAMRI *et al.*, 2010; CARRON *et al.*, 2010; TREY *et al.*, 2013; GRONHOJ *et al.*, 2017). Causas menos frequentes também incluem alterações neurológicas, doenças neuromusculares, higiene pulmonar, entre outras. Em estudos similares, Owsen *et al.* (2009) constataram que a obstrução das vias aéreas superiores representava 72% das indicações em uma série de 282 pacientes, enquanto Mahadevan *et al.* (2007), em série ainda maior, identificaram 70% de indicações.

Com os avanços nos cuidados dos pacientes, em especial em unidades de tratamento intensivo pediátricas e neonatais, pacientes com comorbidades complexas têm acesso a tratamentos melhores e maior sobrevida, tendo importante impacto nas indicações de traqueostomia (AL-SAMRI *et al.*, 2010; CARRON *et al.*, 2010). Os índices de decanulação podem variar entre 28-60% entre os estudos (AL-SAMRI *et al.*, 2010; TREY *et al.*, 2013;

SCHWEIGER *et al.*, 2017), sendo que o maior número de comorbidades (em especial neurológicas) tem associação com menores índices de sucesso na decanulação.

### 2.1.1 Glossoptose

A glossoptose é uma condição bastante atendida em nosso serviço, e a traqueostomia é potencialmente indicada como forma de tratamento, sendo, inclusive, um meio eficaz de estabilizar vias aéreas comprometidas por essa condição (SORIN *et al.*, 2004; RUTTER, 2006; SCHWEIGER *et al.*, 2016).

Em uma série de 80 pacientes com glossoptose por sequência de Robin (isolada ou não), a traqueostomia foi realizada em 16,9% dos casos (MANICA *et al.*, 2017). Em estudo do mesmo grupo, analisando apenas pacientes com diagnóstico isolado de Robin não-sindrômicos, 18,9% necessitaram traqueostomia (COSTA *et al.*, 2018).

Além da disfunção respiratória, distúrbios da deglutição são frequentes nestes pacientes. Sintomas de tosse, fadiga, demora durante alimentação, engasgos ou vômitos podem cursar juntos com sintomas respiratórios e, muitas vezes, impedir alimentação via oral, necessitando vias alternativas como uso de sonda nasogástrica ou gastrostomia (SCHWEIGER *et al.*, 2016). Distração osteogênica está entre os principais tratamentos da glossoptose com obstrução respiratória, quando da presença de hipoplasia de mandíbula (MILORO, 2010). Apesar de um procedimento eficaz, há casos de falha que impedem a decanulação ou até mesmo progridem para a necessidade de traqueostomia (SORIN *et al.*, 2004). Diversos fatores podem contribuir para que a traqueostomia seja realizada ou mantida, em especialmente quando presentes outras síndromes ou malformações de via aérea, dificultando o sucesso terapêutico.

## 2.2 MICROBIOLOGIA EM TRAQUEOSTOMIA

Diversos estudos tentam caracterizar os microrganismos presentes na traqueostomia por meio de cultura. Brook (2004) demonstraram colonização bacteriana em 100% dos 27 pacientes traqueostomizados que acompanharam; já Pozzi *et al.* (2015), ao estudarem crianças traqueostomizadas em uma clínica de reabilitação, encontraram prevalência de colonização em 91% dos pacientes, nas avaliações iniciais, chegando a 100% ao final do acompanhamento.

O grupo Al-samri *et al.* (2010), previamente citado, realizou cultura da secreção de traqueostomias em pacientes com sinais de infecção traqueal, (usando como critério de infecção o aumento da secreção traqueal acompanhado de aumento neutrófilos em hemograma e/ou cultura positiva do aspirado traqueal) e, dentre os 72 pacientes revisados, 90% tiveram diagnóstico de infecção traqueal em algum momento, sendo o resultado das culturas: *Staphylococcus aureus* (60%), *Pseudomonas aeruginosa* (50%), *Stenotrophomonas maltophilia* (30%), *Serratia marcescens* (20%) e *Streptococcus pneumoniae* (20%). Já Sanders *et al.* (2018) incluíram 185 crianças com culturas no período do estudo, que durou 5 anos, sendo avaliadas um total de 1.361 culturas foram avaliadas e agrupadas em períodos de 3 meses (para ajuste de frequência). *P. aeruginosa* foi o patógeno mais identificado, sendo positivo em 49% dos pacientes em algum momento. Combinando os resultados de *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas* e outros bacilos gram negativos este resultado chegou em 63%. *S. aureus* também foi comum nas culturas, sendo isolado em 51% dos pacientes. Já patógenos entéricos (*Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Enterobacter*, e *Enterococcus*) e patógenos respiratórios comuns (incluindo *S. pneumoniae*, *H. influenzae* e *Moraxella catarrhalis*) foram menos prevalentes (34% e 31%, respectivamente). Pacientes com bacilos gram negativos em múltiplas culturas tiveram maior número de hospitalizações (P = 0,025), internações hospitalares mais longas (P < 0,001) e mais admissões em unidades de terapia intensiva (P < 0,001). Avaliando pacientes com cultura de via aérea baixa antes e após a



traqueostomia (n= 77), verificou-se aumento significativo de positividade em culturas para *P. aeruginosa* (14% vs 29%, P = 0,049) e bacilos gram negativo (30% vs 47%, P = 0,046), sugerindo que a traqueostomia aumenta o risco da presença destes patógenos. O mesmo não ocorreu em relação a *S. aureus*.

Mccaleb *et al.* (2016) avaliaram, retrospectivamente, culturas de 93 crianças com traqueostomia realizada em um período maior de um ano. Um total de 13 patógenos foram isolados nas culturas, sendo os mais comuns: *P. aeruginosa*; *S. maltophilia*; *S. marcescens*; *M. catarrhalis*; *S. aureus* resistente à meticilina; *S. aureus* sensível à meticilina; e *H. influenzae*. Em suas análises, as culturas positivas para *P. aeruginosa* não tiveram associação significativa a pacientes que usaram antibiótico durante internação (P= 0,43), ambulatorialmente (P= 0,68), ou qualquer tipo de antibiótico (P=0,36). O estudo demonstrou, também, uma tendência entre *S. aureus* sensíveis e resistentes à meticilina: até quatro anos da realização da traqueostomia ambas as cepas crescem similarmente, enquanto traqueostomias realizadas há mais de cinco anos têm uma tendência de redução de *S. aureus* sensível à meticilina e aumento de *S. aureus* resistente à meticilina. É importante destacar de que o estudo foi realizado nos EUA, onde se tem observado uma tendência ao crescimento progressivo de *S. aureus* resistente à meticilina. No estudo, mais da metade dos pacientes tiveram cultura positiva para este microrganismo em algum momento.

Cheikh *et al.* (2018) analisaram o aspirado traqueal de crianças traqueostomizadas no Brasil. Em 20 casos avaliados, foram encontrados: *S. aureus* (25%), *P. aeruginosa* (50%), *Morganella morganii* (10%), *Klebsiella pneumoniae* (5,5%), *Stenotrophomonas sp.* (5,5%) e *Proteus mirabilis* (5,5%). Nenhum caso de *S. aureus* resistente à meticilina foi encontrado, sugerindo diferenças locais em comparação com estudos realizados em outros países.

Severo (2019), em dissertação realizada em pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e com metodologia semelhante ao estudo de Cheikh *et al.* (2018), encontrou bactérias

potencialmente patológicas em 97,7% dos aspirados traqueais realizados em traqueostomias de crianças. As bactérias com maior prevalência foram *P. aeruginosa* (56,8%) e *S. aureus* (9,1%). Em concordância com o estudo de Cheikh et al. (2018), todos os casos de *S. aureus* identificados eram sensíveis à meticilina.

### 2.3 BIOFILMES EM TRAQUEOSTOMIA

Poucos estudos avaliaram presença, composição ou comportamento de biofilmes em cânulas de traqueostomia.

Perkins *et al.* (2004) realizaram corte longitudinal em cânulas de traqueostomia pediátrica com objetivo de procurar locais de acúmulo de biofilmes por microscopia confocal. Nesse estudo, foi identificada a porção interna e distal da cânula (mais próximas à traqueia) como a região com maior presença de biofilme (achado semelhante em 91% das cânulas). O estudo não realizou, porém, a identificação das bactérias.

Solomon *et al.* (2009) estudaram a formação de biofilmes em traqueostomias de adultos, observando a presença de biofilmes em 19 de 21 cânulas. Entre as bactérias identificadas por cultura, foram isolados *S. aureus*, *S. aureus* coagulase negativa, *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mitis*, *S. marcescens*, *S. maltophilia*, bactérias difteroides, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa*, *Streptococci* do grupo Beta-hemolítico e *Citrobacter koseri*. No mesmo estudo, foi também identificado um único caso de colonização fúngica por *Candida albicans*.

Em um relato de caso, Schuurmans *et al.* (2015) descreveram um paciente que permaneceu 25 anos portando um *stent* de silicone tipo T de Montgomery. O *stent* removido manteve-se intacto, porém descolorado e coberto por biofilme visível macroscopicamente. Exames culturais do material identificaram o crescimento de *S. maltophilia*, *Corynebacterium amycolatum*, *C. albicans*, *Staphylococci* coagulase-negativo e anaeróbios. Ambos *S.*

*maltophilia* e *C. amycolatum* já haviam sido isolados em culturas anteriores deste mesmo paciente.

Dois estudos avaliaram, *in vitro*, a relação entre biofilme e limpeza das cânulas de traqueostomia (SILVA *et al.*, 2013; RODNEY *et al.*, 2016). No estudo de Silva *et al.* (2013) o grupo utilizou diferentes produtos para testar suas capacidades em remover biofilme formado por *S. aureus* e *P. aeruginosa* (adicionados *in vitro* a fatias circulares de 2 milímetros de cânulas de traqueostomias). Ambos hipoclorito de sódio 0,3% e gluconato de clorexidina aquosa a 2% apresentaram os melhores resultados, removendo completamente os biofilmes formados. Já o grupo de Rodney *et al.* (2016) avaliou se limpezas repetidas do material das cânulas facilitam a aderência de biofilme em decorrência do desgaste no material. Em seus resultados, a limpeza com uso de alvejante repetidas vezes facilitou o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, embora, no caso da última, o crescimento não tenha sido significativo.

#### 2.4 METAGENÔMICA EM VIAS AÉREAS

Estudos iniciais em metagenômica pulmonar permitiram refutar a presunção histórica de que indivíduos saudáveis mantinham via aérea inferior estéril (HILTY *et al.*, 2010; CHARLSON *et al.*, 2011; MORRIS *et al.*, 2013).

Embora muito menos rica que regiões do trato gastrointestinal, a microbiota da via aérea inferior possui comunidades bacterianas estáveis, mesmo em indivíduos livres de doenças. Com efeito, microrganismos dos gêneros como *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Neisseria* e *Veillonella* são frequentemente identificados em abundância no ambiente pulmonar (MORRIS *et al.*, 2013; FEIGELMAN *et al.*, 2017; AHMED *et al.*, 2018; PIENKOWSKA *et al.*, 2018).

Existe uma relação próxima (porém não idêntica) entre a microbiota das vias aéreas superiores e inferiores. Além da microbiota pulmonar (semelhante à descrita acima), Charlson *et al.* (2011) identificaram na mucosa oral maior abundância de organismos da família *Streptococcaceae* e *Veillonellaceae*, junto de *Fusobacteriaceae*, *Neisseriaceae* e outras linhagens. Já na região anterior da cavidade nasal detectou a presença de *Staphylococcaceae*, *Propionibacteriaceae* e *Corynebacteriaceae*, organismos mais comuns em pele, enquanto na nasofaringe organismos mais característicos de cavidade oral foram encontrados (v.g. *Streptococcaceae*, *Veillonellaceae*, e *Prevotellaceae*).

Dickson *et al.* (2015) também compararam a região supraglótica com diferentes localizações pulmonares e constatou que as comunidades bacterianas pulmonares divergiram significativamente das comunidades supraglóticas ( $P = 0,006$ ). Embora diversos microrganismos tenham sido similares, muitos não o foram. O estudo demonstrou, ainda, que a região supraglótica apresenta maior riqueza em diversidade bacteriana, tendo maior semelhança com amostras coletadas do lobo pulmonar superior direito, que do lobo médio direito, sugerindo que estas regiões não têm comportamento independente, mas sim mantêm alguma relação por proximidade (o lobo superior direito tem proximidade maior em relação à supraglote do que o lobo médio).

Gronseth *et al.* (2017) estudaram a metodologia na hora de coletar amostras pulmonares por broncoscopia, descrevendo a importância de utilizar meios que evitem conduzir as comunidades bacterianas das vias superiores para as inferiores. Seu trabalho demonstra que, apesar das semelhanças taxonômicas, o microbioma pulmonar é diferente do microbioma das vias superiores: amostras coletadas da supraglote por exemplo, demonstraram aumento da fração de *Prevotella* (*Proteobacteria*) e menor fração de *Veillonella* (*Firmicutes*).

Fatores intrínsecos ou extrínsecos podem alterar a microbiota das vias aéreas. Morris *et al.* (2013) compararam as microbiotas oral e pulmonar entre pacientes tabagistas e não tabagistas e, embora não tenham notado diferenças significativas na biodiversidade da orofaringe entre os grupos, notaram diferença significativa na abundância de OTUs como *Neisseria sp.*, *Porphyromonas sp.*, *Gemella sp.* e *Porphyromonas sp.* Embora a microbiota pulmonar entre tabagistas e não tabagistas não tenha apresentado alterações significativas, microrganismos dos filos *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* tiveram menor representatividade no primeiro grupo, sugerindo que o tabagismo teve maior impacto nas comunidades de via aéreas superiores que inferiores.

Comparando pacientes asmáticos com um grupo-controle saudável, Huang *et al.* (2012) observaram maior diversidade no primeiro grupo ( $p= 0,012$ ), sugerindo que essas comunidades mantinham, além dos microrganismos usuais, populações com potencial patogênico, como *Comamonadaceae*, *Sphingomonadaceae*, *Nitrosomonadaceae*, *Oxalobacteraceae*, e *Pseudomonadaceae* (não observados no grupo-controle). Hilty *et al.* (2010) também notaram diferenças entre pacientes saudáveis, asmáticos e portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC); pacientes portadores de doenças pulmonares tiveram aumento de *Proteobacteria* patogênica enquanto pacientes asmáticos, por exemplo, tiveram aumento de *Haemophilus* e *Staphylococcus*, e a *Prevotella* foi mais frequente em indivíduos saudáveis.

Estudos em pacientes portadores de fibrose cística demonstram como as alterações do ambiente impactam no microbioma bacteriano. Rounak *et al.* (2017) utilizaram a metagenômica tipo *shotgun* para caracterizar o microbioma de pacientes saudáveis, portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) e portadores de fibrose cística e constataram que, enquanto os pacientes livres de doenças mantiveram maior abundância de organismos como *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Haemophilus* e *Neisseria*, os

pacientes com fibrose cística tiveram microbiomas colonizados em maioridade por um ou poucos organismos, como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Stenotrophomonas* e *Achromobacter*. O grupo portador de DPOC, por sua vez teve microbiota mais difícil de ser caracterizada, mantendo características intermediárias entre os dois outros grupos.

Já Lim *et al.* (2014) acompanharam três pacientes com fibrose cística em diferentes estágios da doença durante quadros de exacerbação respiratória, realizando identificação taxonômica e funcional do metagenoma bacteriano. O modelo do estudo descreveu dois tipos de comunidade: comunidade clímax, composta por bactérias e fungos estáveis e adaptados com o ambiente e que recebem resistência bacteriana com o tempo; e comunidade de ataque, composta de bactérias e vírus adquiridos, causando resposta imune intensa, exacerbações de quadros pulmonares e necessitando tratamento. O grupo também descreveu que cada paciente teve uma comunidade polimicrobiana única, que o metabolismo destas comunidades foram diferentes entre os pacientes e se alteraram com o tempo, e também detectou diversos mecanismos de resistência a antibióticos no metagenoma em todos os pacientes.

## 2.5 METAGENÔMICA EM PACIENTES COM TRAQUEOSTOMIA

Três estudos realizaram metagenômica em pacientes com traqueostomia, sendo apenas um exclusivamente em crianças.

Pérez-losada *et al.* (2017 e 2019) realizaram sequenciamento da região V4 do gene *16S rRNA* em dois estudos com pacientes adultos e crianças traqueostomizados e dependentes de ventilação mecânica. Inicialmente, o grupo estudou mudanças na comunidade bacteriana destes pacientes durante o ano, realizando coletas nas quatro estações e comparando 40 pacientes divididos em dois grupos: os que não tiveram nenhum quadro de infecção respiratória inferior e os que tiveram pelo menos um quadro de infecção respiratória inferior.

As coletas foram realizadas por aspirado traqueal via traqueostomia e sempre fora de eventos infecciosos agudos. Foram encontrados 18 gêneros com maior abundância: *Streptococcus* (16,5%), *Neisseria* (11%), *Haemophilus* (8,7%), *Moraxella* (8,1%), *Pseudomonas* (7,8%), *Corynebacterium* (6,6%), *Staphylococcus* (4,4%), *Acinetobacter* (3,3%), *Prevotella* (3%) e *Stenotrophomonas* (3%). Comparando os dois grupos, o gênero *Haemophilus* teve presença mais abundante nas amostras de pacientes com, pelo menos, um quadro de infecção respiratória inferior, enquanto *Pseudomonas*, *Corynebacterium* e *Acinetobacter* tiveram relação inversa ( $0,034 \leq P \leq 0,009$ ). Em relação à diversidade, pacientes com presença de quadros infecciosos tiveram alfa-diversidade maior quando comparados com o outro grupo. Os autores sugerem que os quadros infecciosos podem ter deixado uma assinatura microbiológica, aumentando a variabilidade de sua comunidade bacteriana, enquanto o grupo que não teve infecções manteve apenas sua microbiota estável. Embora tenham ocorrido algumas alterações em termos de abundância, não foram notadas mudanças significativas na composição da microbiota traqueal entre as estações do ano em ambos os grupos (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2017).

Em seu outro estudo, Pérez-losada *et al.* (2019), avaliaram os pacientes com coletas seriadas durante quadros de infecção respiratória aguda, desde o início dos sintomas e semanalmente, por um mês. Similarmente ao estudo anterior, os gêneros mais encontrados foram: *Streptococcus* (21%), *Haemophilus* (10%), *Corynebacterium* (9%), *Neisseria* (9%) e *Moraxella* (8%), sendo os demais gêneros correspondendo a menos de 3% das sequências restantes. Os pacientes foram testados para 18 tipos de vírus por PCR (*polymerase chain reaction*), sendo 12 dos 17 pacientes positivos para pelo menos 1 vírus. Durante os quadros de infecção, a alfa-diversidade reduziu significativamente em três dos quatro índices analisados [ $P(>F) < 0,05$ ], especialmente entre a segunda e a quarta semana após o início dos sintomas. Os gêneros *Haemophilus* e *Moraxella* tiveram aumento significativo de abundância

durantes as coletas seriadas analisadas ( $P < 0.05$ ), e o número de sequências identificadas como *Haemophilus* chegaram a aumentar em 274% e *Moraxella* 64%, sugerindo que estes microrganismos tiveram participação da exacerbação respiratória.

Wang *et al.* (2018) realizaram a metagenômica tipo *shotgun* em cânulas de traqueostomia pediátrica com objetivo de avaliar a composição do biofilme formado nestes dispositivos. Foram analisadas as próprias cânulas de traqueostomia de 4 pacientes, sendo 2 casos com presença de tecido de granulação junto a traqueostomia e 2 casos em que não havia tecido de granulação. Em seus resultados, notou diferenças na composição bacteriana entre estes pacientes: nos casos com presença de tecido de granulação, a microbiota mostrou predomínio de *H. influenzae*, *Fusobacterium nucleatum*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae*, enquanto pacientes sem tecido de granulação tiveram predomínio de *Neisseria mucosa*, *Neisseria sicca*, *Acinetobacter baumannii* e *Haemophilus parainfluenzae*, mais consistentes com microbioma respiratório típico. Ambos os pacientes sem tecido de granulação realizavam antibioticoterapia durante a coleta, enquanto os outros dois pacientes não. Os autores destacam a presença predominante de *H. influenzae* e *F. nucleatum* nestes pacientes, sugerindo um papel destas bactérias na sua formação, e antibióticos como tendo papel preventivo. É importante ressaltar que, além da pequena amostra, os pacientes possuíam diversas características diferentes como idade, comorbidades, marca e tempo que a cânula estava presente no paciente até realizada coleta.

## 2.6 ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

Uma preocupação nos estudos que utilizam a metagenômica consiste na influência que o tempo e o modo de coleta das amostras têm sobre a comunidade bacteriana.



Lauber *et al.* (2011) estudaram o efeito de tempo e temperatura sobre amostras de solo, pele humana e fezes humanas. Cópias de cada um dos três tipos de amostras foram expostas a temperaturas de 20°C, 4°C, -20°C e -80°C por três ou 14 dias antes da extração de DNA, sendo então realizada a metagenômica por amplificação das regiões V1 e V2 do gene *16S rRNA*. Embora os tipos das amostras tenham demonstrado comunidades bacterianas bastante diferentes, o estudo não identificou alterações significativas em biodiversidade causadas por tempo ou temperatura de armazenamento antes da extração de DNA.

Cuthbertson *et al.* (2014) avaliaram amostras de escarro de oito pacientes portadores de fibrose cística: as amostras de cada paciente foram divididas e armazenadas a -80°C em tempos distintos: imediatamente, 1, 3, 6, 9, 21, 18, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. O estudo identificou que amostras com grande domínio de uma única espécie têm menor probabilidade de demonstrar mudanças significativas em suas comunidades quando expostas a períodos longos antes do congelamento. Foi utilizado o índice de similaridade de Bray-Curtis (que leva em consideração o número e a abundância de espécies) para avaliar mudanças das amostras com o tempo. Após a primeira hora, já foram encontradas diferenças discretas na similaridade entre as amostras, especialmente em espécies com menor abundância; porém apenas após 12 horas foram notadas alterações realmente significativas. O grupo recomenda que estudos de metagenômica mantenham o período entre coleta e congelamento o menor possível, sendo 12 horas uma janela aceitável para o adequado armazenamento das amostras.

Utilizando a metagenômica de sequenciamento total tipo *shotgun*, Wiehlmann *et al.* (2017) avaliaram oito amostras de *swab* de orofaringe mantidas em gel de ágar que foram congeladas imediatamente ou após 24 horas. Os *swabs* mantidos sem congelamento por 24 horas tiveram redução da concentração de DNA entre 30-90% em sete dos oito pares de amostras, enquanto o número de sequências bacterianas aumentou dez vezes em todos os pares exceto um, indicando que as comunidades bacterianas cresceram no gel de ágar durante

o período prévio ao congelamento. Trinta e sete das 48 espécies mais abundantes não foram mais detectadas nas amostras após 24 horas de armazenamento em temperatura ambiente, e outras espécies como *Propionibacterium acnes*, *Alicyclophilus denitrificans* e diversos *Streptococcus*, *Neisseria* e *Haemophilus spp* proliferaram e se tornaram dominantes na comunidade.

## 2.7 ASSOCIAÇÕES ENTRE CLÍNICA E MICROBIOMA BACTERIANO

Alguns estudos realizaram culturas bacterianas com o objetivo de identificar associações com tecido de granulação, *stents* cirúrgicos ou complicações pós-operatórias.

Simoni *et al.* (2004) realizaram cultura de 23 *stents* após reconstrução de via aérea, encontrando correlação tanto de bactérias anaeróbias (*Fusobacterium spp.*, *Bacteroides fragilis*, *Actinomyces spp.*, *Prevotella melaninogenica*, *Propionibacterium*, *Eubacterium aerofaciens* e *Veillonella parvula*) como de fungos (*Candida sp.*) com maior presença de tecido de granulação.

Em estudo semelhante, Nouraei *et al.* (2006) realizaram cultura de 31 *stents* removidos de 26 pacientes após cirurgia de reconstrução de via aérea, comparando os resultados microbiológicos com a presença ou não de tecido de granulação. Em seus resultados, a presença de *S. aureus* e *P. aeruginosa* teve forte correlação com presença de tecido de granulação ( $P < 0,02$  e  $P < 0,03$ , respectivamente).

Um estudo de Cincinatti (EUA), Statham *et al.* (2015) realizaram triagem para *S. aureus* resistente à meticilina por meio de cultura em pacientes com indicação de cirurgia para reconstrução de via aérea. O grupo encontrou prevalência de *S. aureus* resistente à meticilina em 32,5% dos 197 casos avaliados, e pacientes com exame positivo receberam tratamento com antibiótico específico. Nenhum dos casos que recebeu tratamento desenvolveu infecção

ou complicações relacionadas ao enxerto cirúrgico, mas três pacientes desenvolveram infecção pós-operatória por *S. aureus* resistente à meticilina não identificado nas culturas prévias. Um caso com colonização presente de *S. aureus* resistente à meticilina não realizou a antibioticoterapia proposta e desenvolveu abscesso pós-operatório com necessidade de tratamento. Em discussão, o grupo sugere pesquisa específica para *S. aureus* resistente à meticilina para todos os pacientes indicados a cirurgias de reconstrução de via aérea, além de tratamento pré, peri e pós-operatório com antibióticos eficazes no combate deste microrganismo.

Em seu estudo, Lim *et al.* (2014) discutem sobre a viabilidade de utilizar a metagenômica como forma de seguimento de pacientes portadores de fibrose cística. Entre os três pacientes acompanhados durante quadros de infecção respiratória inferior, um deles teve crescimento em cultura de *C. albicans*, *Scedosporium apiospermum* e *E. coli*. A avaliação metagenômica desse paciente demonstrou a presença de *E. coli*, que aumentou em abundância relativa durante o início do quadro infeccioso e reduziu após o início do tratamento. Porém, a metagenômica também evidenciou que, após início do tratamento, *Streptococcus spp.* e *Rothia mucilaginosa* tiveram crescimento importante, tornando-se dominantes no microbioma do paciente. Em outro caso, a presença de *Lactobacillus spp.* foram identificadas junto da redução significativa de *Streptococcus spp.* após início do tratamento, sugerindo que *Lactobacillus spp.* podem ter um papel de proteção nesse tipo de infecção. O último paciente avaliado teve cultura com crescimento de *S. maltophilia* e *P. aeruginosa*, já a metagenômica revelou abundância baixa de *P. aeruginosa* enquanto *S. maltophilia* manteve-se alta e, mesmo após tratamento antibiótico intensivo, se tornou o microrganismo dominante nesta comunidade.

A metagenômica tipo *shotgun* fornece não apenas uma avaliação precisa do microbioma da via aérea de pacientes até o nível taxonômico de espécies, mas também o

perfil funcional do genoma desses microrganismos, podendo identificar a presença de genes relacionados à resistência a antibióticos e mutações. O estudo também demonstrou que a metagenômica foi eficaz em detectar transformações nas comunidades bacterianas dos pacientes que os exames culturais não são capazes de avaliar.

Feigelman *et al.* (2017) sugerem uso da metagenômica *16S* como forma de acompanhamento do microbioma de pacientes portadores de doenças pulmonares graves, enquanto a metagenômica tipo *shotgun* poderia ser usada quando necessária avaliação mais detalhada (*e.g.* evento de infecção respiratória).

Pérez-losada *et al.* (2019) notaram flutuação significativa da presença de *Haemophilus* e *Moraxella* em pacientes durante infecção respiratória inferior. O grupo detectou a presença de vírus por PCR em 17 dos 20 casos estudados, sugerindo que o modelo tradicional de infecção unicamente bacteriana ou viral deve ser revisitado, além de que as infecções não são causadas, necessariamente, por aquisição de patógenos (conforme postulado de Koch), mas sim pelo desequilíbrio das comunidades já existentes, em decorrência de evento descompensatório.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Diversos estudos procuram avaliar a colonização bacteriana em traqueostomias pediátricas, porém a maioria utiliza métodos de cultura bacteriológica, que tendem a selecionar crescimento de populações específicas de bactérias ou identificar apenas exacerbações. A metagenômica, por sua vez permite avaliar uma comunidade bacteriana como um todo, pois, através do sequenciamento genético conseguimos identificar o microbioma de uma amostra e estimar suas proporções em seu próprio ambiente.

Poucos estudos até hoje abordaram o microbioma ao nível da cânula de traqueostomia.

O melhor entendimento da microbiota presente da traqueostomia pode ajudar a compreender melhor a constituição de biofilmes, formações de granulomas e quadros infecciosos, influenciando mudanças na rotina dos cuidados destas crianças.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o microbioma da população de bactérias presente em cânulas de traqueostomia de um grupo de crianças com o diagnóstico de glossoptose por Sequência de Robin (SR), acompanhadas pelo Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a população bacteriana de pacientes pediátricos traqueostomizados com SR por meio de exames bacteriológico e bacterioscópico do aspirado traqueal;
- Descrever a população bacteriológica de pacientes pediátricos traqueostomizados com SR por meio de avaliação metagenômica da cânula de traqueostomia;
- Comparar os resultados da cultura de aspirado traqueal e da avaliação metagenômica da cânula de traqueostomia; e
- Correlacionar achados clínicos (como formação de granuloma periestomal e exacerbações infecciosas) com achados de microbiologia e metagenômica desses pacientes.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 DELINEAMENTO**

Estudo transversal.

### **5.2 AMOSTRAGEM**

Foram incluídos todos os pacientes entre zero e 18 anos de idade, traqueostomizados por indicação de glossoptose secundária a SR e com acompanhamento no Serviço de Otorrinolaringologia do HCPA.

### **5.3 TAMANHO DE AMOSTRA**

Obtivemos o maior tamanho de amostra possível dentro um grupo particular de pacientes traqueostomizados entre 0-18 anos.

### **5.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Pacientes traqueostomizados entre zero e 18 anos que foram submetidos a trocas de cânulas de traqueostomia pelo Equipe de Otorrinolaringologia do HCPA, com histórico de traqueostomia realizada por indicação de glossoptose secundária a SR e cujos pais ou responsáveis legais aceitem participar da pesquisa por meio da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1). Os pacientes foram incluídos mesmo que estivessem em uso de antibioticoterapia e/ou com sinais de infecção respiratória aguda.

## 5.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos pacientes impossibilitados de realizar a técnica da coleta do aspirado traqueal ou com necessidade de cânula de traqueostomia personalizada.

## 5.6 LOGÍSTICA (COLETA DE MATERIAL)

Todas as coletas e as análises foram realizados no HCPA.

A coleta de material foi realizada durante as trocas de cânulas realizadas rotineiramente pela Equipe de Otorrinolaringologia no HCPA. Todas as coletas foram realizadas entre 22/11/2018 e 22/02/2019.

Cada paciente realizou, no mesmo momento, duas coletas de material: a secreção aspirada através da cânula de traqueostomia (aspirado traqueal) e a própria cânula de traqueostomia, após ser removida e substituída por uma nova, sendo seguido o seguinte protocolo:

Primeiro, a cânula de traqueostomia usada foi removida com uso de luvas estéreis e posicionada sobre um campo estéril a fim de evitar contaminação. Uma vez posicionada a cânula nova e assegurada a via aérea do paciente, a cânula antiga foi seccionada com uso de bisturi estéril, separando a porção interna (tubular, que tem contato direto com a traqueia e trajeto do traqueostoma) da porção externa (porção visível externamente, contendo as abas para ancoragem do fixador cervical), sendo a última descartada. A porção interna foi, ainda, seccionada longitudinalmente, de modo a gerar duas amostras que representam todo trajeto luminal e extraluminal da cânula, sendo, então, armazenada em dois tubos de fundo cônico estéreis de 15 mL distintos e previamente identificados, com a porção mais distal da cânula



(porção mais perto da carena do paciente) posicionada na porção inferior (fundo) do tubo (Figura 1).

**Figura 1 - Cortes realizados na cânula de traqueostomia**



Para a coleta do aspirado traqueal, após a troca da cânula foi instilado até 5 mL de solução fisiológica estéril pela cânula de traqueostomia, sendo a mesma aspirada com sonda estéril, de tamanho adequado, acoplada a um coletor de secreção de via aérea (“bronquinho”).

Essa técnica adiciona riscos mínimos ao paciente, já que o aspirado traqueal também é utilizado de forma assistencial tanto na rotina de pacientes com doenças crônicas pulmonares para o toailete brônquico, quanto na suspeita de infecção, pois são coletados exames de cultura com vistas a guiar o tratamento com antibiótico.

Os tubos foram encaminhados ao Centro de Pesquisa Experimental do HCPA para armazenamento a  $-80^{\circ}\text{C}$  e posterior metagenômica, cuidando para que o prazo entre a coleta e o armazenamento fosse inferior a duas horas.

O frasco coletor de via aérea foi enviado ao Setor de Microbiologia do HCPA para análise bacteriológica e bacterioscópica.

Durante a troca da cânula foi, também, observado o aspecto cervical em contato com a cânula de traqueostomia quanto a presença ou ausência de granuloma periestomal.

## 5.7 DADOS CLÍNICOS

No momento de inclusão no estudo, os cuidadores realizaram um questionário (ANEXO 2) com os seguintes itens: dados de identificação, idade do paciente, data de realização da traqueostomia, complicações tardias da traqueostomia (obstrução da cânula, fístula traqueoesofágica, sangramento, granuloma periestomal, granuloma supraestomal, granuloma traqueal, decanulação acidental, colabamento supraestomal, estenose traqueal, traqueomalácia), eventos de obstrução parcial da cânula ou decanulação acidental nos últimos três meses, data da última troca da cânula de traqueostomia, características da cânula em uso, via de alimentação atual, necessidade de auxílio ventilatório, uso de antibiótico atualmente ou nos últimos três meses, e necessidade de internação ou avaliação em emergência nos últimos três meses.

## 5.8 REVISÃO DE PRONTUÁRIO ELETRÔNICO

Todos pacientes incluídos no estudo também tiveram seus dados revisados em prontuário eletrônico buscando a data e motivo da realização da traqueostomia, patologias associadas e procedimentos realizados. Também foram pesquisadas culturas de via aérea realizadas previamente, diagnóstico de síndromes associadas, diagnóstico de aspiração e presença de infecções respiratórias de repetição.

## 5.9 TÉCNICA DE REALIZAÇÃO DOS EXAMES BACTERIOLÓGICO E BACTERIOSCÓPICO

Os exames bacterioscópico e bacteriológico foram realizados da seguinte maneira:

1. Aspirado material presente em frasco coletor de secreção de via aérea (“bronquinho”) com seringa e realizado esfregaço fino e homogêneo (exame bacterioscópico). Após, foi realizada a semeadura nos meios de cultura Ágar Chocolate (ACHO), Ágar Sangue (AS), Ágar MacConkey (MAC) e Ágar Azida (AZ), os quais foram selecionados pelo microbiologista de acordo conforme exame bacterioscópico.
2. Realizada técnica de esgotamento, com auxílio de uma alça bacteriológica.
3. As placas de ACHO, AS, COL e AZ foram incubadas em estufa, com 5% atm de CO<sub>2</sub> e a de MAC será incubada em estufa a 35°C.
4. Após 24 horas de incubação, caso não houvesse crescimento bacteriano, as placas foram incubadas por mais 24 horas. Em caso de crescimento nesse período, foi descrita a morfologia das colônias e realizadas as provas de identificação e teste de sensibilidade a antibióticos.

## 5.10 AVALIAÇÃO DO EXAME DE CULTURA

O resultado final do exame microbiológico poderia vir como: ausência de crescimento de bactérias, crescimento de uma ou duas bactérias (com suas respectivas identificações) ou crescimento de três ou mais bactérias, o qual era classificado como microbiota múltipla.

No caso da presença de elementos de via aérea superior (células epiteliais, saliva e poucos leucócitos) ao exame bacterioscópico, a amostra era classificada como contaminação de vias aéreas superiores, não sendo realizadas provas de identificação.

## 5.11 METAGENÔMICA

### 5.11.1 Extração de DNA

Todas as amostras passaram pelo mesmo processo para extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada com uso do *DNeasy PowerBiofilm Kit* (QIAGEN®- Cat No./ID: 24000-50). Para cada amostra foi utilizado o conteúdo de um tubo de fundo cônico de 15mL, contendo a metade longitudinal de uma cânula de traqueostomia plástica. A outra metade representativa da mesma cânula foi mantido em freezer -80°C para futuros projetos.

As amostras, congeladas em freezer a -80°C, foram deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos para facilitar seu manejo, sendo foi atribuído um escore subjetivo para a quantidade de secreção macroscópica observada.

Fazendo uso de material estéril, as porções das cânulas foram seccionadas em diversos fragmentos sobre uma placa de Petri.

A seguir, foram realizados os passos descritos conforme manual do kit (Quick-Start Protocol, *DNeasy® PowerBiofilm® Kit*). (ANEXO 3)

### 5.11.2 Avaliação da concentração de DNA

A concentração e a qualidade, através da análise das razões 260/280 e 260/230, das amostras de DNA foram avaliadas pelo espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific).

### 5.11.3 Amplificação e sequenciamento de nova geração (NGS)

Aproximadamente 50ng de DNA de cada amostra foram submetidos à amplificação da região V4 do gene de rRNA *16S* por PCR utilizando o seguinte par de *primers*: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Para que múltiplas amostras pudessem ser processadas na mesma reação, o método *primer-fusion* foi utilizado para que cada amostra recebesse uma sequência única de nucleotídeos (*barcodes*), ligada aos seus produtos amplificados pela PCR.

A amplificação foi realizada com uso de *Platinum™ PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen), e o produto resultante foi verificado através de eletroforese em gel de agarose, purificado com *AMPure XP PCR Purification Kit* (Beckman Coulter), quantificado por *Qubit™ dsDNA HS Assay Kit* (Invitrogen) e submetido a PCR em emulsão utilizando o *Ion 510™ & Ion 520™ & Ion 530™ Kit – Che* (Thermo Fisher Scientific).

Após, as esferas (*beads*) enriquecidas foram sequenciadas com uso do equipamento S5 (Ion S5™ System, Thermo Fisher Scientific) e *Ion 510™ Chip Kit* (Ion Torrent™, Thermo Fisher Scientific). Os dados brutos resultantes foram compactados e exportados como um único arquivo de extensão FastQ.

#### 5.11.4 Bioinformática

O arquivo bruto gerado pelo sequenciamento das amostras foi submetido ao protocolo do *Brazilian Microbiome Project* (BMP) (PYRLO *et al.*, 2014), sendo utilizados *scripts* no software QIIME e RDP para representação filogenética do gene *16S* rRNA.

As sequências foram filtradas com base em tamanho e escore de qualidade, sendo as quimeras removidas. O identificador RDP\_GOLD foi utilizado para identificação de OTUs (*Operational Taxonomic Units*), assim considerados quanto atingidos 97% de similaridade e identidade filogenética representativa, com uso da base de dados Green Genes. Sequências que não atingiram grau de similaridade de 97%, quando comparadas com catálogo filogenético, foram definidas como “não-classificadas”.

O software QIIME (versão 1.9.1) foi também utilizado para processamento dos dados e confecção de arquivo de extensão STF para realização de análises no software STAMP (v2.1.3). (CAPORASO *et al.*, 2010; PARKS *et al.*, 2014).

#### 5.11.5 Controle de qualidade

O controle de qualidade foi realizado pelo aplicativo FASTQC (v. 0.11.4). As amostras foram avaliadas antes e depois do processo bioinformático de ajuste e filtragem.

#### 5.11.6 Alfa e beta diversidade

Como medidas de alfa-diversidade foram obtidos: valores de OTUs observadas, árvore filogenética e Chao1. (QIIME v1.9.1)

Gráficos de *Principal component analysis* (PCA) foram utilizados para explorar agrupamentos entre as amostras. (STAMP v2.1.3)

## 5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados de forma descritiva (descrição da população) e em porcentagens simples (OTUs encontradas). Para a análise de variáveis contínuas, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, enquanto variáveis politômicas foram analisadas com uso do coeficiente de correlação de Spearman, através da utilização do software SPSS (v23.0).

## 5.13 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pela Plataforma Brasil, obtendo o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética número 93356618.0.000.5327. O estudo foi também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCPA, projeto número 18-0483. Para inclusão no estudo, todo paciente teve firmado termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1) por pais ou responsáveis legais.

Os pesquisadores assinaram um termo de confidencialidade para obter acesso e utilizar dados constantes no prontuário eletrônico dos pacientes.

## 6 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 12 pacientes portadores de SR e traqueostomizados, cujas características estão resumidas na tabela 1.

Todas as cânulas de traqueostomia coletadas são pertencentes a mesma marca (PORTEX<sup>®</sup> Blue Line<sup>®</sup> Tracheostomy Tube) e sem a presença do balonete. Não houve complicações.

Apenas um paciente encontrava-se em uso de antibiótico durante a coleta, o qual foi iniciado dois dias antes e por motivo de aumento de secreção pela traqueostomia, não apresentando febre ou outros sintomas. Cinco outros pacientes fizeram uso de antibiótico enquanto em uso da cânula de traqueostomia coletada.



Tabela 1 - Dados clínicos dos 12 pacientes

Amostra	Idade (anos)	Tempo de traqueostomia (anos)	Via de alimentação	Síndrome	Comorbidades	Infecção recorrente do TRI	Tempo desde última troca de cânula	Número do tamanho da cânula	Granuloma periestomal	ATB (Dia da coleta)	ATB (Últimos 3 meses)
001	8,2	8,1	Oral	Oculo-aurículo-vertebral	Sim	Não	98	5	Não	Não	Não
002	5,4	5,2	Gastro	Não	Sim	Não	98	4,5	Sim	Não	Sim
003	7,7	7,5	Oral/Gastro	Richieri-Costa-Pereira	Sim	Não	98	4,5	Não	Não	Não
004	2,1	1,9	SNG	Não	Sim	Não	98	3,5	Não	Não	Sim
005	9,2	9	Oral	Stickler	Não	Não	91	4,5	Não	Não	Não
006	2,2	2,1	Oral	Não	Sim	Não	91	3,5	Sim	Não	Não
007	4	1,4	SNG	Não	Sim	Sim	138	4	Não	Não	Sim
008	7,2	3,9	Oral	Não	Sim	Não	80	5	Não	Não	Não
009	11,7	8,3	Oral	Picnodisostose	Não	Não	98	4	Não	Não	Sim
010	5,4	5,2	Gastro	Apert	Sim	Não	119	4,5	Não	Não	Sim
011	9,1	9	Oral	Treacher-Collins	Sim	Não	98	4	Não	Não	Não
012	2,2	2,1	SNG	Não	Sim	Não	91	3,5	Sim	Sim	Não

TRI: Trato respiratório inferior; ATB: Antibiótico; Gastro: Gastrostomia; SNG: Sonda nasogástrica

### Aspirado traqueal

As culturas realizadas nos 12 aspirados traqueais identificaram o crescimento bacteriano em apenas cinco amostras (tabela 2). Em sete culturas o resultado foi “contaminação de vias aéreas superiores”, não sendo submetido à análise bacteriológica.

**Tabela 2 - Resultados das culturas dos aspirados traqueais com crescimento bacteriano**

<b>Paciente #</b>	<b>Bactéria</b>
Paciente 003	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Moraxella catarrhalis</i>
Paciente 004	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Achromobacter sp.</i>
Paciente 005	<i>Staphylococcus aureus</i>
Paciente 007	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Paciente 011	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

### Metagenômica

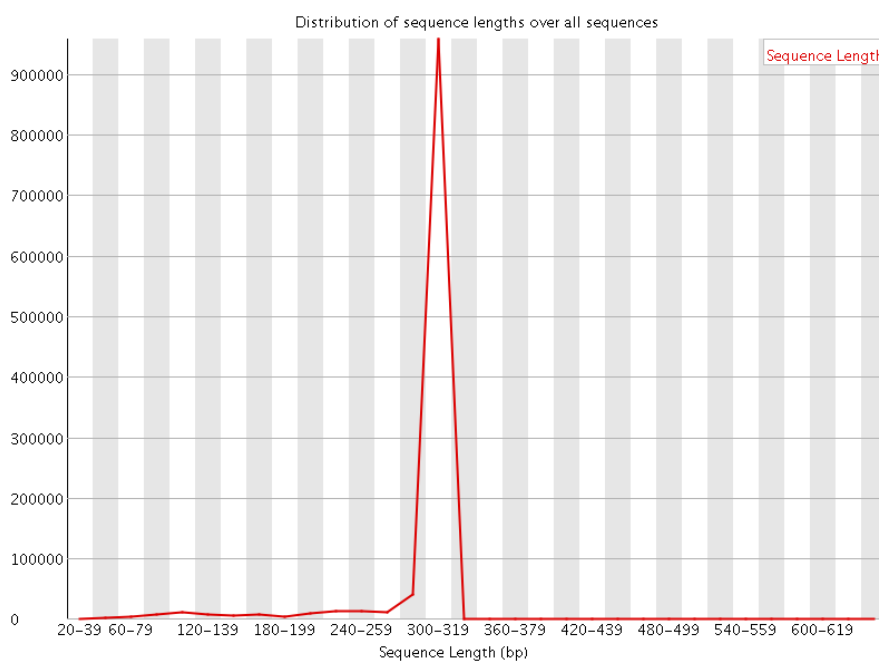
Os dados resultantes da espectrofotometria encontram-se descritos na tabela 3, sendo que a concentração de DNA, após realizada a sua extração, variou de 69,65ng/mL a 312,45ng/mL (média = 176,84ng/mL). Os resultados do controle de qualidade, realizados antes e após o processo bioinformático de filtragem e remoção de quimeras, podem ser visualizados nas figuras 2 a 4 (antes) e figuras 5 a 7 (após). A metagenômica resultou em um total de 647.256 sequências, variando de 16.850 a 137.586 por amostra (média= 53.938).

**Tabela 3 - Resultados da espectrofotometria para a determinação da concentração de DNA nas amostras**

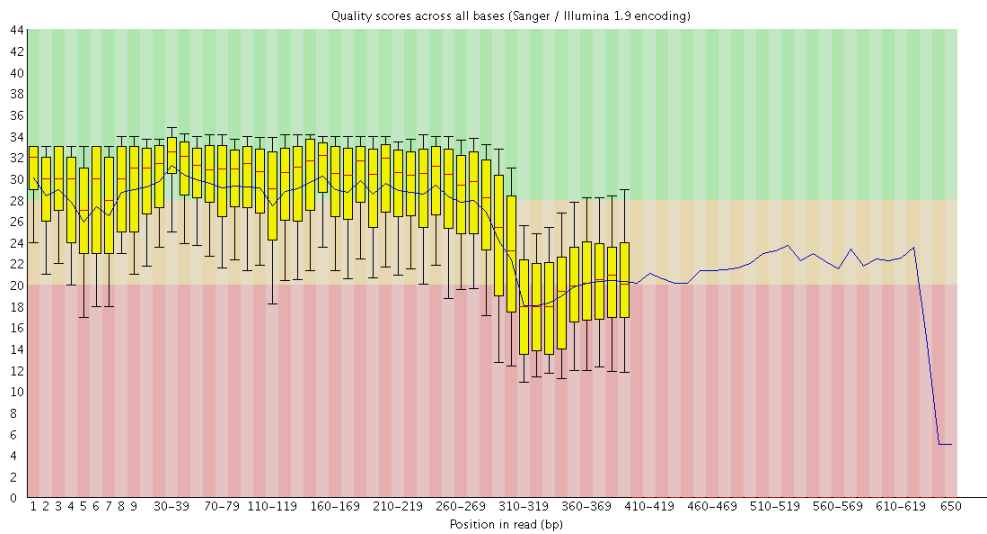
Amostra	Concentração de DNA (ng/mL)	A260/280	A260/230
001	174,34	1,89	2,22
002	254,72	1,89	2,24
003	312,45	1,89	0,93
004	157,6	1,87	2,18
005	99,15	1,89	2,22
006	159,66	1,88	2,42
007	281,42	1,87	1,97
008	135,12	1,89	2,33
009	186,21	1,89	1,82
010	69,65	1,92	1,79
011	72,64	1,92	1,49
012	219,11	1,88	1,87

A260: Absorvância em 260nm  
A280: Absorvância em 280nm  
A230: Absorvância em 230nm

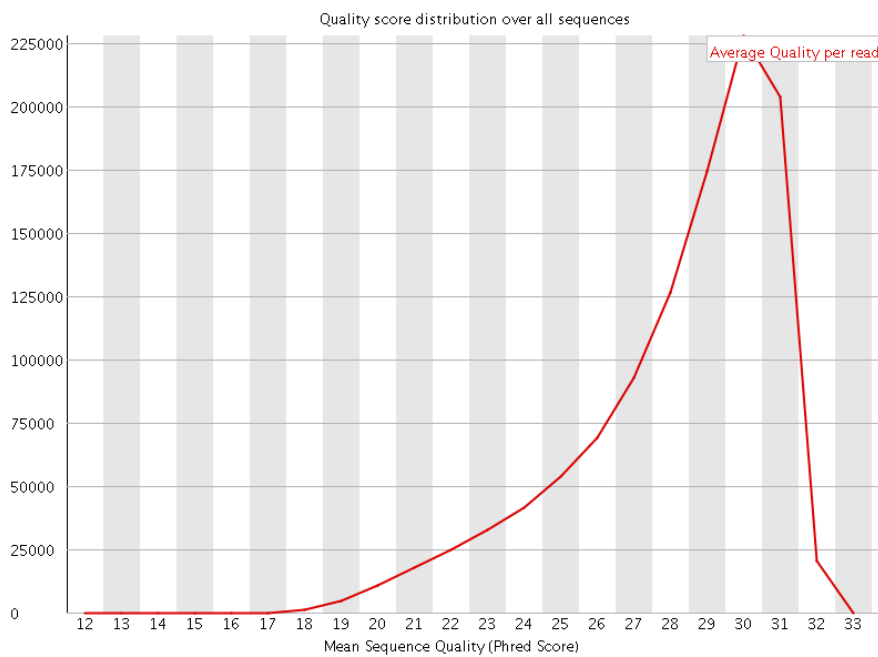
**Figura 2 - Distribuição do comprimento das seqüências (em pares de bases)**

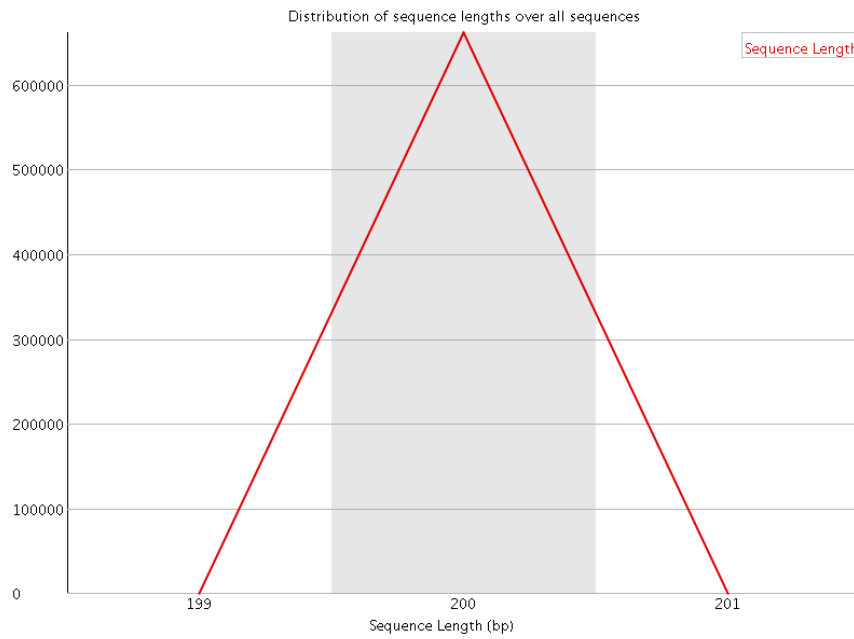
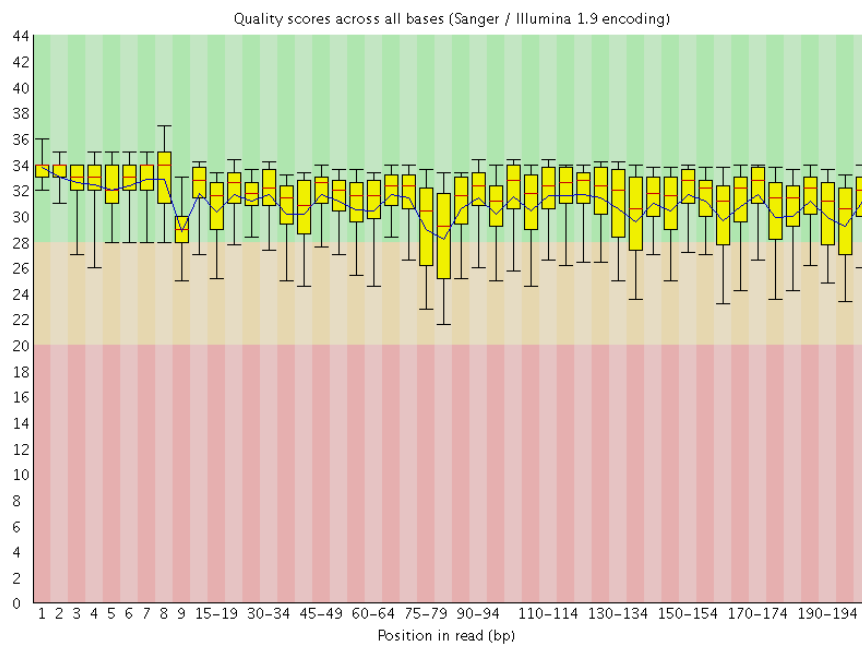


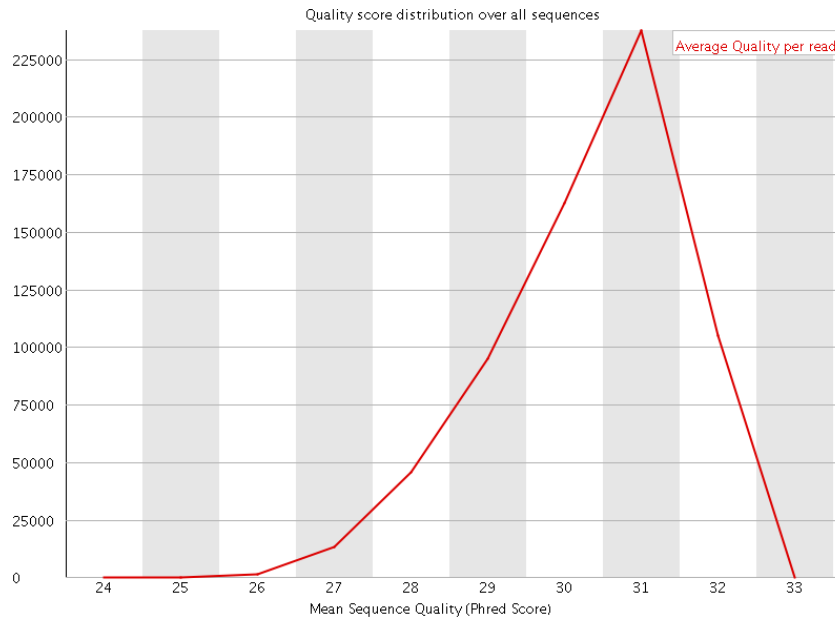
**Figura 3 - Escore de qualidade por posição dos pares de bases**



**Figura 4 - Média do escore de qualidade sobre todas as seqüências**



**Figura 5 - Distribuição do comprimento das seqüências (em pares de bases)****Figura 6 - Escore de qualidade por posição dos pares de bases**

**Figura 7 - Média do escore de qualidade sobre todas as sequências**

O coeficiente de correlação de Spearman, entre a concentração de DNA e o número de leituras por amostra, não foi significativo ( $p=0,779$ ). Também não houve significância entre a pontuação subjetiva da secreção presente nas cânulas de traqueostomia e a concentração de DNA ( $p=0,413$ ), ou entre a pontuação subjetiva e o número de leituras ( $p=0,196$ ). (tabela 4)

**Tabela 4 - Concentração de DNA, inspeção da cânula e metagenômica**

<b>Amostra</b>	<b>Concentração de DNA (ng/mL)</b>	<b>Inspeção macroscópica da cânula</b>	<b>Número de leituras</b>
001	174,34	3+	30.024
002	254,72	1+	53.984
003	312,45	3+	31.504
004	157,60	2+	137.586
005	99,15	2+	43.286
006	159,66	3+	42.032
007	281,42	3+	66.958
008	135,12	3+	56.231
009	186,21	2+	78.577
010	69,65	3+	42.614
011	72,64	3+	47.610
012	219,11	1+	16.850

Inspeção macroscópica da cânula:

1+ Pouca quantidade de secreção

2+ Quantidade considerável de secreção

3+ Grande quantidade de secreção

#### OTUs identificadas

Foram identificadas OTUs representadas em sete níveis taxonômicos diferentes: reino; filo; classe; ordem; família, gênero e espécie.

As sequências que não atingiram grau de similaridade de 97%, quando comparadas com catálogo filogenético utilizado, foram definidas como “não-classificadas”.

No nível taxonômico representativo de gênero, 3,17% de todas as sequências avaliadas foram consideradas “não-classificadas”, sendo que a média por amostra foi de 4,01% (mín.= 0,007% e máx.= 19,20%).

Já no nível taxonômico de espécies, obtivemos 95,30% das sequências com resultado “não-classificadas”, sendo a média por amostras de 93,22% (mín.= 66,20% e máx.= 99,99%).

Por esse motivo, o estudo realizou análises e descrição nas OTUs do nível taxonômico de gênero.

Foi identificado um total de 68 OTUs diferentes no nível taxonômico de gênero.

Considerando todas as sequências identificadas, as OTUs mais abundantes foram: *Aggregatibacter* (17%), *Pseudomonas* (15,9%), *Haemophilus* (12,4%), *Neisseria* (8,8%), *Staphylococcus* (8,3%), *Fusobacterium* (6,5%), *Moraxella* (5,8%), *Streptococcus* (4,6%), *Alloiococcus* (3%), *Capnocytophaga* (2,9%). Outras OTUs em menor abundância incluem: *Corynebacterium* (2,5%), *Prevotella* (2,5%), *Porphyromonas* (1,8%), *Eikenella* (1,2%), *Treponema* (0,9%), *Elizabethkingia* (0,9%), *Stenotrophomonas* (0,8%), *Mycoplasma* (0,8%), *Achromobacter* (0,5%) e *Acinetobacter* (0,5%). As 48 OTUs restantes corresponderam a menos de 3% das sequências identificadas (tabela 5) (Figura 8). A proporção relativa das OTUs encontradas separadas por paciente pode ser observada na tabela 6.

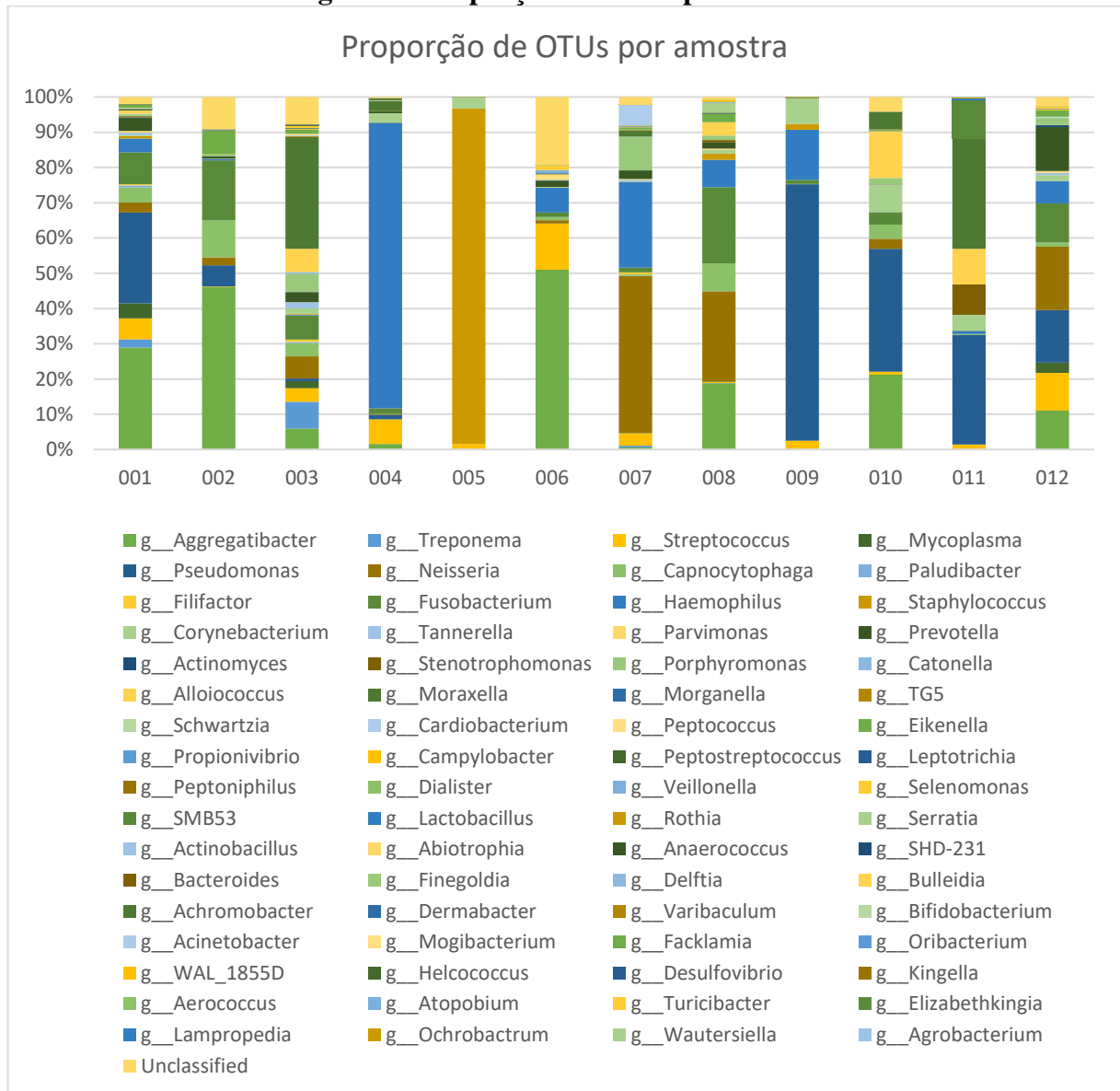
Nos pacientes em que houve identificação, na cultura do aspirado traqueal, de crescimento bacteriano, foi constatada OTU de mesmo gênero no seu microbioma.



**Tabela 5 - Prevalência do total de leituras por gênero pela metagenômica**

<b>Gênero</b>	<b>%</b>
<i>Aggregatibacter</i>	17,0%
<i>Pseudomonas</i>	15,9%
<i>Haemophilus</i>	12,4%
<i>Neisseria</i>	8,8%
<i>Staphylococcus</i>	8,3%
<i>Fusobacterium</i>	6,5%
<i>Moraxella</i>	5,8%
<i>Streptococcus</i>	4,6%
<i>Alloiococcus</i>	3,0%
<i>Capnocytophaga</i>	2,9%
<i>Corynebacterium</i>	2,5%
<i>Prevotella</i>	2,5%
<i>Porphyromonas</i>	1,8%
<i>Eikenella</i>	1,2%
<i>Treponema</i>	0,9%
<i>Elizabethkingia</i>	0,9%
<i>Stenotrophomonas</i>	0,8%
<i>Mycoplasma</i>	0,8%
<i>Achromobacter</i>	0,5%
<i>Acinetobacter</i>	0,5%
Outros	2,4%
Total	100%

Figura 8 - Proporção de OTUs por amostra



OTU: *Operational taxonomic unit*

Tabela 6 - Proporção dos gêneros por amostra

001		002		003		004	
Gênero	%	Gênero	%	Gênero	%	Gênero	%
<i>Aggregatibacter</i>	29,48	<i>Aggregatibacter</i>	50,67	<i>Moraxella</i>	34,42	<i>Haemophilus</i>	81,27
<i>Pseudomonas</i>	26,33	<i>Fusobacterium</i>	18,69	<i>Treponema</i>	8,30	<i>Streptococcus</i>	6,98
<i>Fusobacterium</i>	9,21	<i>Capnocytophaga</i>	11,62	<i>Fusobacterium</i>	7,49	<i>Moraxella</i>	2,95
<i>Streptococcus</i>	6,07	<i>Eikenella</i>	7,33	<i>Alloiococcus</i>	7,15	<i>Corynebacterium</i>	2,66
<i>Capnocytophaga</i>	4,36	<i>Pseudomonas</i>	6,69	<i>Neisseria</i>	6,75	<i>Aggregatibacter</i>	1,58
<i>Mycoplasma</i>	4,32	<i>Neisseria</i>	2,44	<i>Aggregatibacter</i>	6,42	<i>Fusobacterium</i>	1,54
<i>Haemophilus</i>	4,05	<i>Prevotella</i>	0,72	<i>Porphyromonas</i>	5,55	<i>Pseudomonas</i>	1,28
<i>Neisseria</i>	2,87	<i>Porphyromonas</i>	0,59	<i>Streptococcus</i>	4,11	<i>Achromobacter</i>	0,57
<i>Prevotella</i>	2,81	<i>Haemophilus</i>	0,40	<i>Capnocytophaga</i>	4,08	<i>Prevotella</i>	0,43
<i>Treponema</i>	2,43	<i>Leptotrichia</i>	0,31	<i>Mycoplasma</i>	2,19	<i>Neisseria</i>	0,27
Outros	8,07	Outros	0,54	Outros	13,54	Outros	0,47

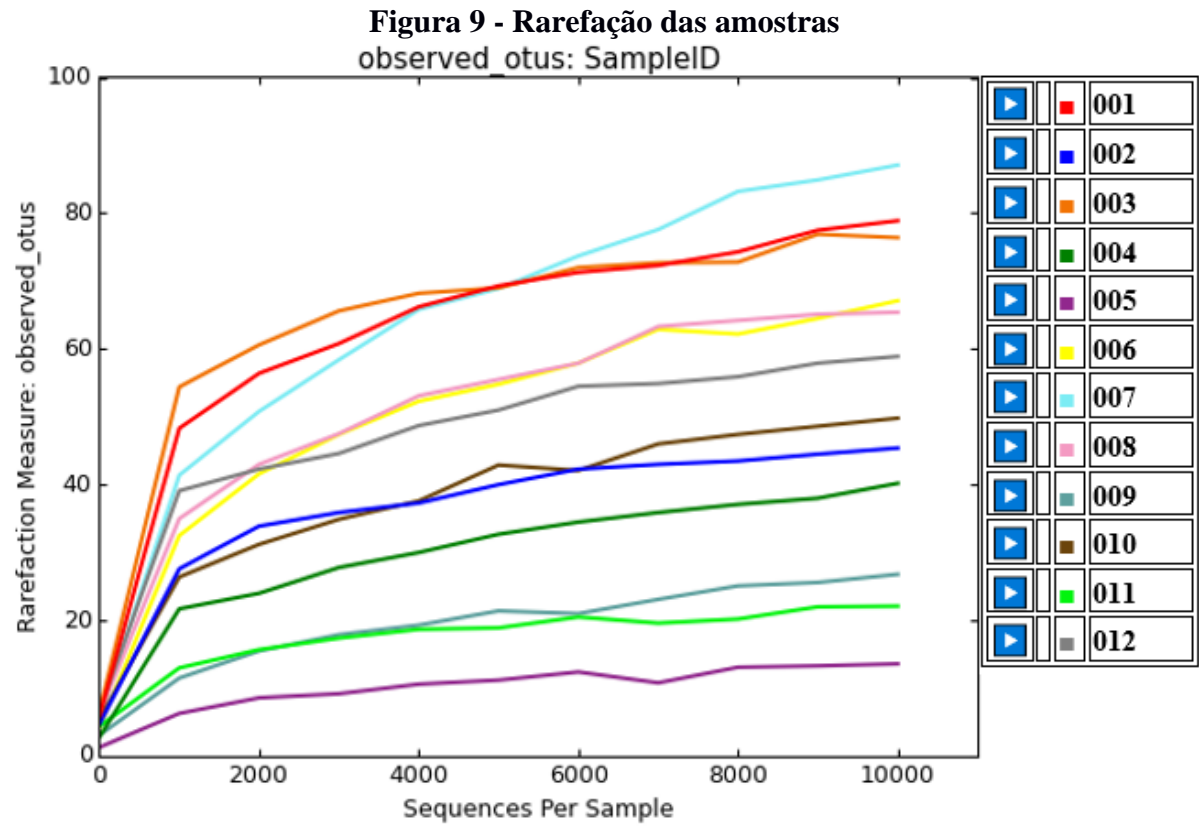
005		006		007		008	
Gênero	%	Gênero	%	Gênero	%	Gênero	%
<i>Staphylococcus</i>	95,23	<i>Aggregatibacter</i>	63,12	<i>Neisseria</i>	45,55	<i>Neisseria</i>	25,77
<i>Corynebacterium</i>	3,09	<i>Streptococcus</i>	16,15	<i>Haemophilus</i>	24,89	<i>Fusobacterium</i>	21,78
<i>Streptococcus</i>	1,54	<i>Haemophilus</i>	8,68	<i>Porphyromonas</i>	9,82	<i>Aggregatibacter</i>	18,99
<i>Anaerococcus</i>	0,05	<i>Peptococcus</i>	1,87	<i>Acinetobacter</i>	5,89	<i>Capnocytophaga</i>	7,95
<i>Finegoldia</i>	0,03	<i>Selenomonas</i>	1,78	<i>Streptococcus</i>	3,61	<i>Haemophilus</i>	7,89
<i>Alloiococcus</i>	0,01	<i>Prevotella</i>	1,66	<i>Prevotella</i>	1,90	<i>Alloiococcus</i>	3,77
<i>Facklamia</i>	0,01	<i>Fusobacterium</i>	1,55	<i>Moraxella</i>	1,78	<i>Serratia</i>	2,76
<i>Actionomyces</i>	0,01	<i>Capnocytophaga</i>	1,14	<i>Fusobacterium</i>	1,42	<i>Eikenella</i>	2,34
<i>Abiotrophia</i>	0,01	<i>Neisseria</i>	1,10	<i>Eikenella</i>	0,59	<i>Staphylococcus</i>	1,72
<i>Peptoniphilus</i>	0,01	<i>Veillonella</i>	1,08	<i>Aggregatibacter</i>	0,55	<i>Porphyromonas</i>	1,28
Outros	0,01	Outros	1,87	Outros	4,00	Outros	5,75

009		010		011		012	
Gênero	%	Gênero	%	Gênero	%	Gênero	%
<i>Pseudomonas</i>	72,83	<i>Pseudomonas</i>	36,42	<i>Pseudomonas</i>	31,18	<i>Neisseria</i>	18,44
<i>Haemophilus</i>	14,25	<i>Aggregatibacter</i>	22,11	<i>Moraxella</i>	30,10	<i>Pseudomonas</i>	15,33
<i>Corynebacterium</i>	7,25	<i>Alloiococcus</i>	13,71	<i>Elizabethkingia</i>	11,08	<i>Prevotella</i>	12,01
<i>Streptococcus</i>	2,47	<i>Corynebacterium</i>	8,20	<i>Alloiococcus</i>	10,14	<i>Fusobacterium</i>	11,36
<i>Staphylococcus</i>	1,64	<i>Achromobacter</i>	5,05	<i>Stenotrophomonas</i>	8,64	<i>Aggregatibacter</i>	11,29
<i>Fusobacterium</i>	1,19	<i>Capnocytophaga</i>	4,23	<i>Corynebacterium</i>	4,51	<i>Streptococcus</i>	11,04
<i>Anaerococcus</i>	0,10	<i>Fusobacterium</i>	3,60	<i>Streptococcus</i>	1,38	<i>Haemophilus</i>	6,55
<i>Porphyromonas</i>	0,09	<i>Neisseria</i>	2,92	<i>Achromobacter</i>	1,06	<i>Mycoplasma</i>	2,99
<i>Finegoldia</i>	0,05	<i>Porphyromonas</i>	1,81	<i>Haemophilus</i>	0,92	<i>Porphyromonas</i>	2,07
<i>Peptoniphilus</i>	0,05	<i>Streptococcus</i>	0,85	<i>Lampropedia</i>	0,36	<i>Eikenella</i>	1,89
Outros	0,02	Outros	1,10	Outros	0,63	Outros	7,03

### Rarefação e alfa-diversidade

A rarefação por diversidade filogenética evidenciou que todas as amostras atingiram um platô quando avaliadas em 10.000 leituras. (Figura 9)



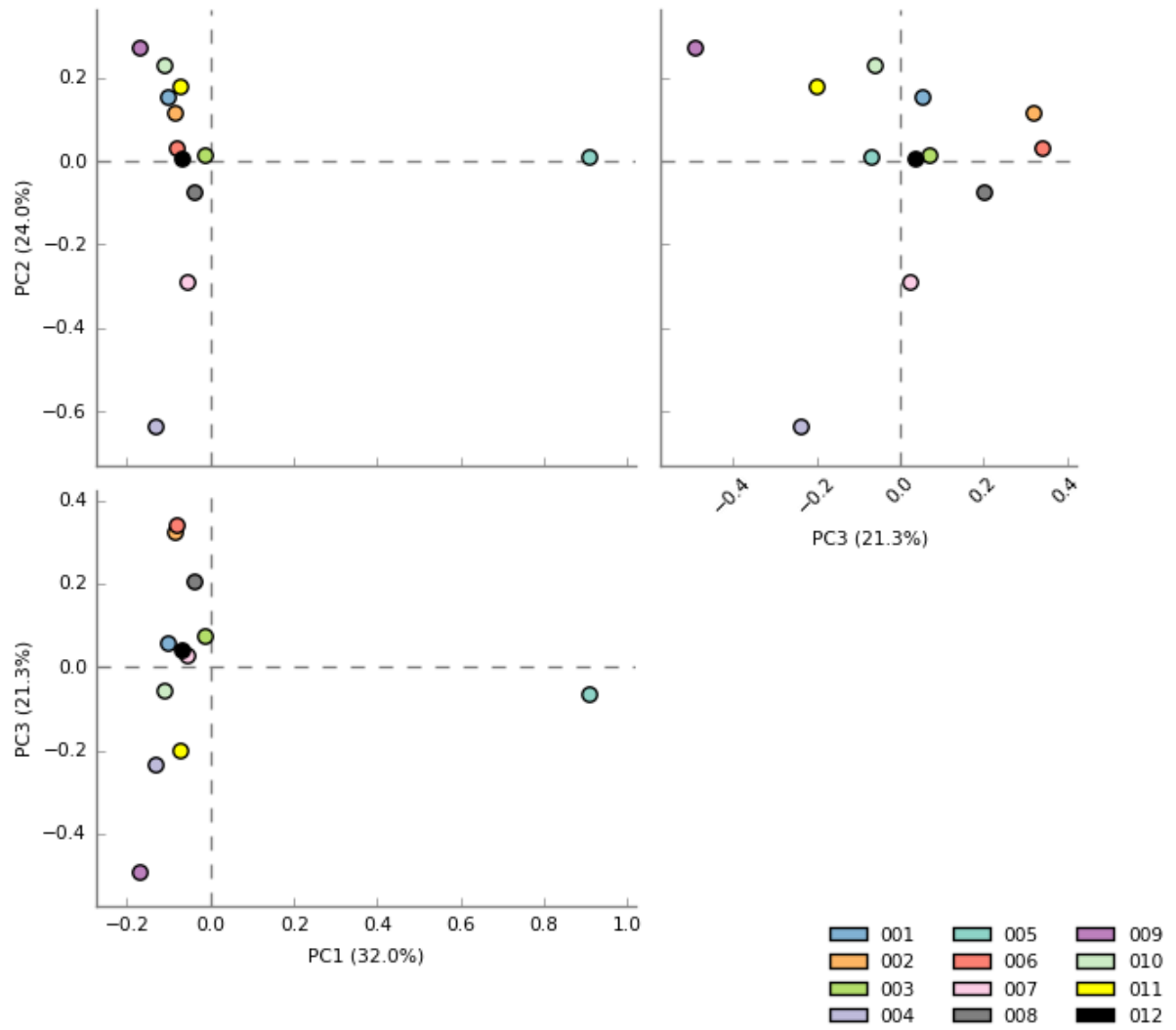
As medidas de alfa-diversidade, incluindo valores de OTUs observadas, árvore filogenética e Chao1, encontram-se descritas na tabela 7.

**Tabela 7 - Medidas de alfa-diversidade**

Paciente #	Árvore Filogenética	Chao1	OTUs observadas
001	9,99	91,39	78,9
002	6,46	51,53	45,4
003	10,31	85,69	76,4
004	5,94	61,85	40,2
005	2,11	18,63	13,6
006	8,83	82,60	67,1
007	10,09	111,82	87,1
008	8,69	80,99	65,4
009	4,49	32,42	26,8
010	6,08	66,26	49,8
011	3,17	27,35	22,1
012	7,46	74,45	58,9

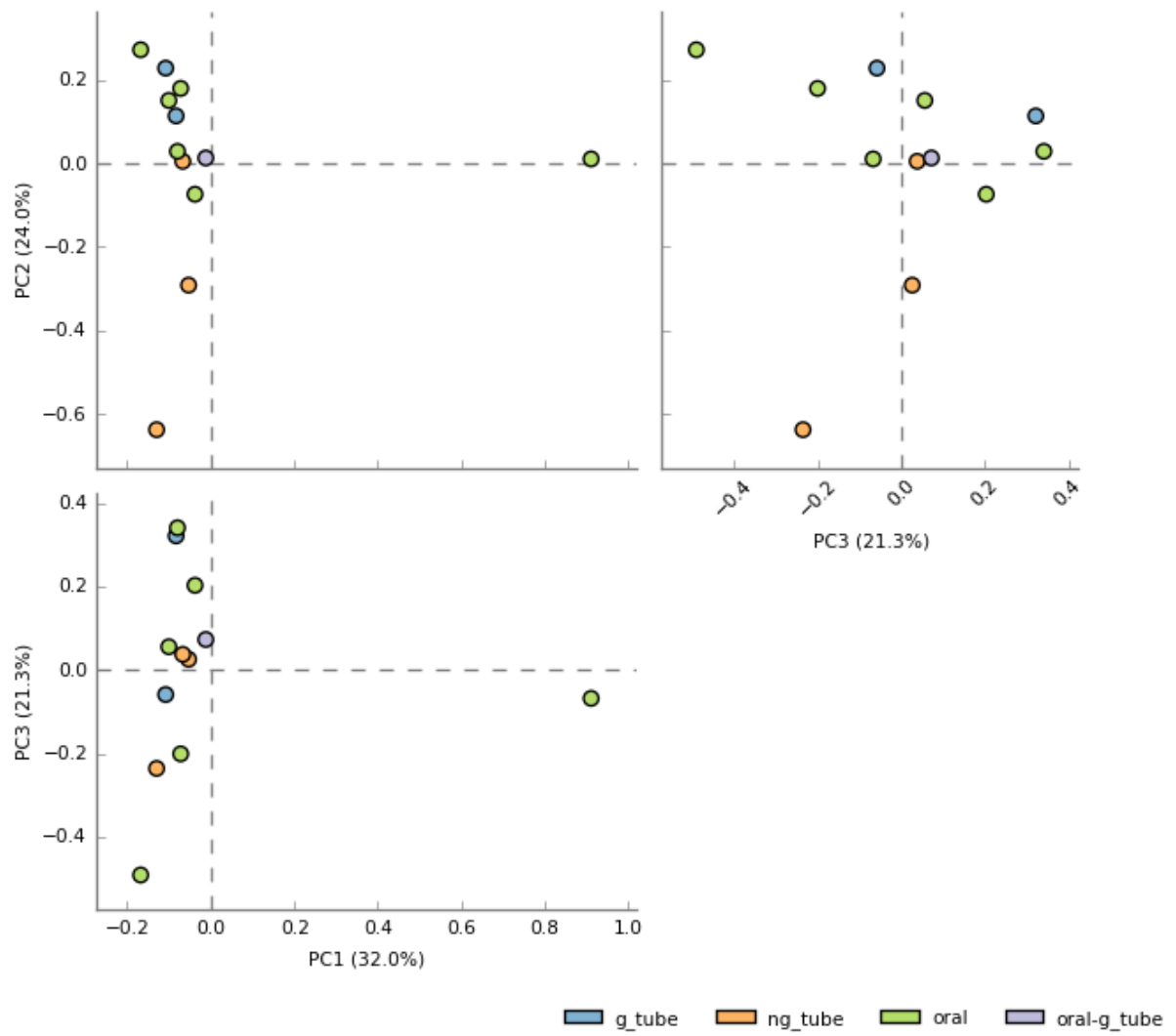
Foram realizados gráficos de PCA para avaliar as variáveis: via de alimentação, uso de antibióticos e presença de granuloma, porém não se identificaram padrões ou grupamentos (Figuras 10-13).

Figura 10 - Gráfico de PCA identificando as amostras



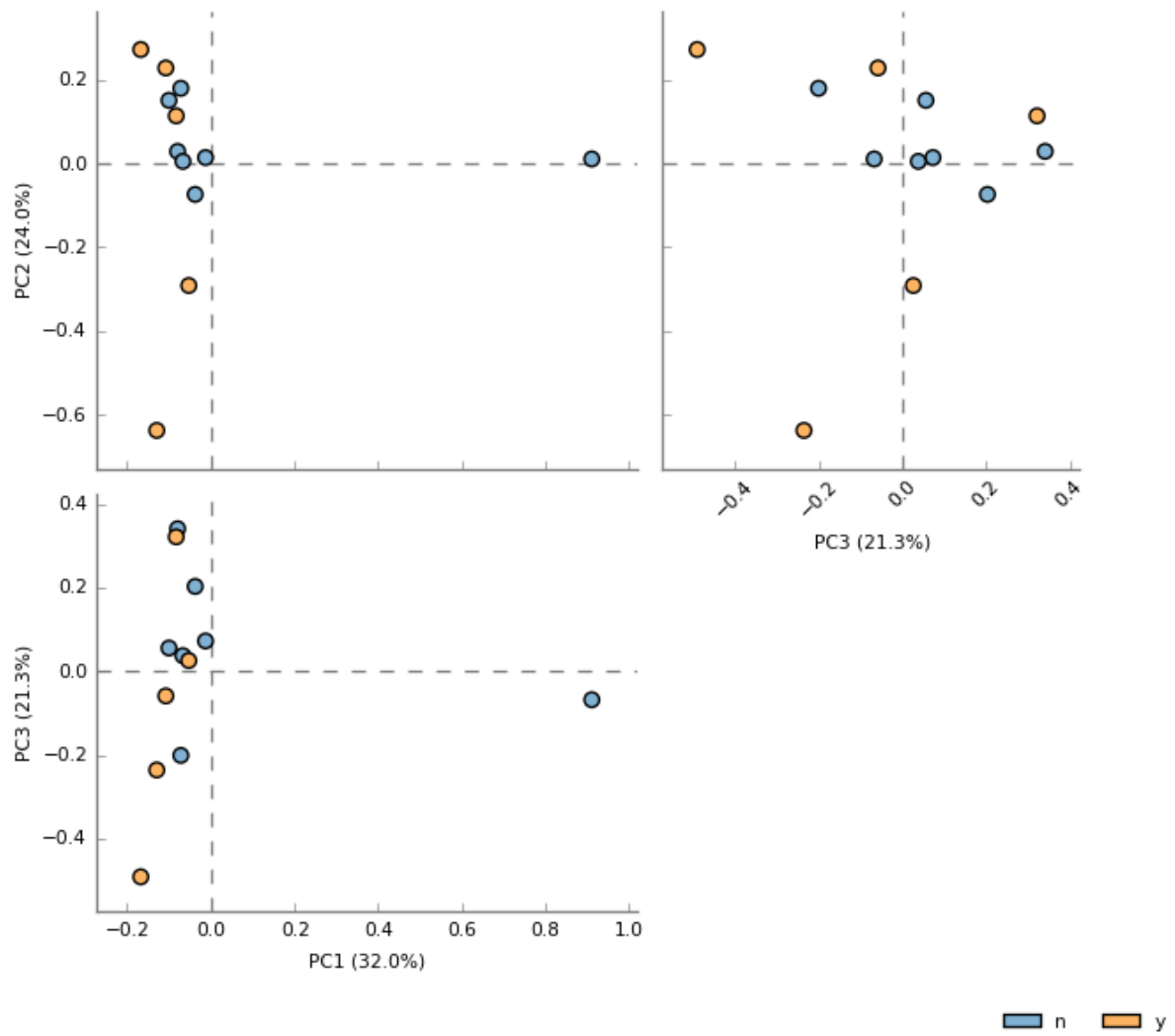
PCA: *Principal component analysis*

Figura 11 - Gráfico de PCA identificando via de alimentação



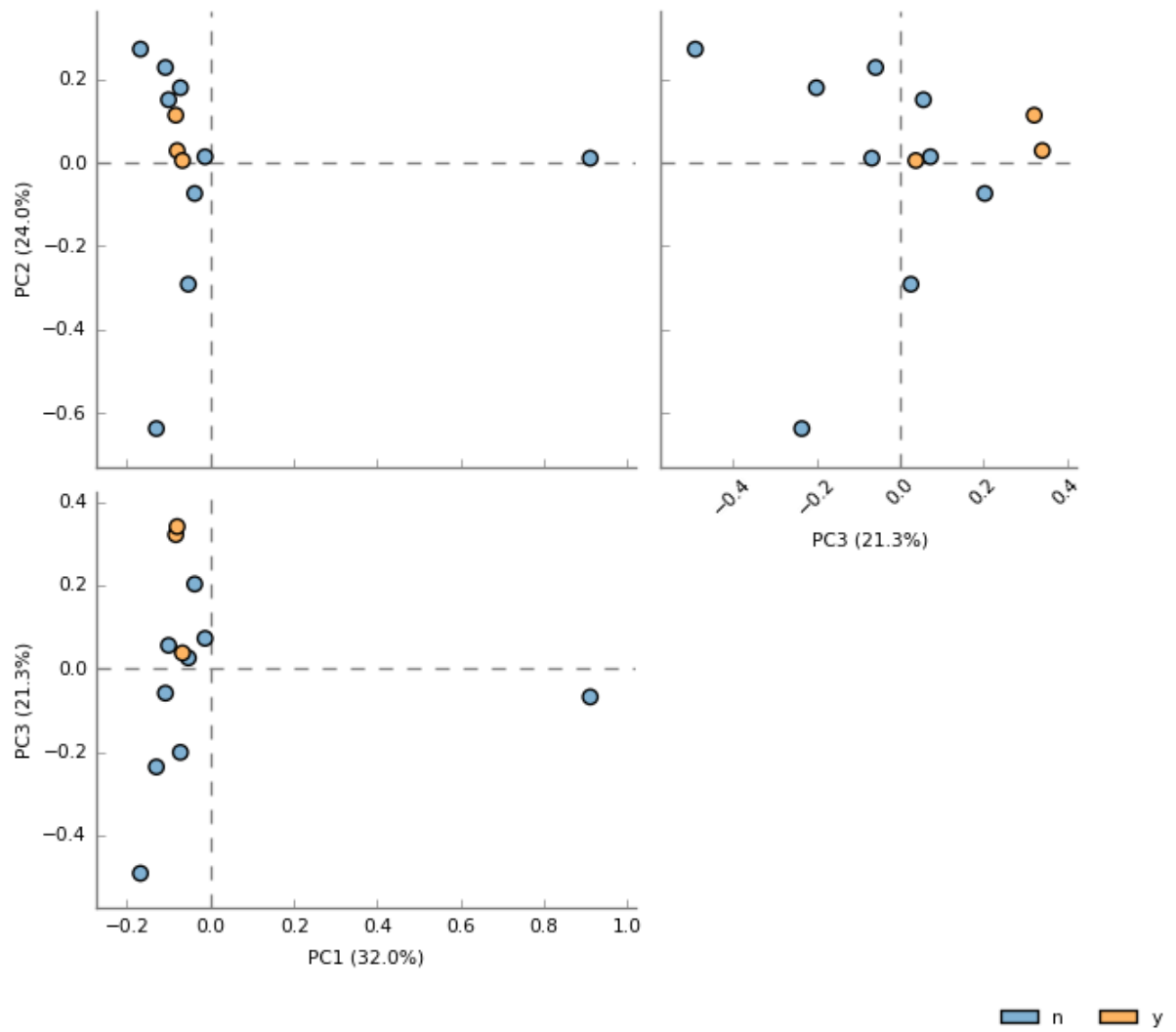
PCA: *Principal component analysis*

**Figura 12 - Gráfico de PCA identificando uso de antibiótico nos últimos 3 meses**



PCA: *Principal component analysis*



**Figura 13 - Gráfico de PCA identificando presença de granuloma**

PCA: *Principal component analysis*

## 7 DISCUSSÃO

O sequenciamento genético é um método bastante consolidado para a avaliação de comunidades bacterianas. Contudo, estudos de microbioma bacteriano em vias aéreas, ainda são escassos e fornecem informações fragmentadas, especialmente referente a crianças traqueostomizadas. Pacientes traqueostomizados costumam formar uma população heterogênia, apresentam frequentemente síndromes, alterações neurológicas e outras comorbidades, além de serem mais vulneráveis a infecções, sujeitos a internações prolongadas, a um maior uso de medicações e comumente submetidos a diversos procedimentos cirúrgicos.

Nosso estudo avaliou um grupo de 12 crianças traqueostomizadas por glossoptose secundária a hipoplasia de mandíbula, quanto ao microbioma presente em suas cânulas de traqueostomia. Além da indicação comum da traqueostomia, o grupo também apresentava diversas outras características semelhantes: todos utilizavam a mesma marca de cânula de traqueostomia (sem presença de balonete), faziam uso da mesma cânula por tempo semelhante (em torno de 3 meses) e se encontravam traqueostomizados há mais de um ano. Embora dois pacientes apresentassem comorbidade pulmonar, nenhum deles era portador de fibrose cística; tampouco, nenhum dos pacientes estudados encontrava-se em uso de suporte ventilatório ou oxigenioterapia, denotando maior homogeneidade entre os pacientes que nos estudos publicados até o momento. (WANG *et al.*, 2019; PÉREZ-LOZADA *et al.*, 2017 e 2018)

Entre as culturas do aspirado traqueal com crescimento bacteriano identificado, *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais frequente, presente em três casos (25% de todas as amostras). Outros estudos em pacientes pediátricos traqueostomizados encontraram incidência de *P. aeruginosa* entre 29-72% (CHEIKH *et al.*, 2018; MCCALEB *et al.*, 2016;

SANDERS *et al.*, 2018; AL-SAMRI *et al.*, 2010). Já a avaliação metagenômica identificou a OTU *Pseudomonas* em dez amostras (83%), sugerindo que sua prevalência seja ainda maior do que a literatura sugere, pelo menos nesta população específica.

De maneira semelhante *M. catarrhalis* foi identificada em apenas uma amostra de aspirado traqueal, enquanto oito pacientes tiveram OTU representando *Moraxella* presente na sua microbiota.

Embora o método tradicional de cultura seja amplamente disseminado, sua interpretação e eficácia em identificação de bactérias vêm sendo questionados: um crescimento bacteriano pode evidenciar apenas um microrganismo colonizador, não sendo, necessariamente, o mais abundante ou o responsável por um quadro infeccioso (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2017; LIM *et al.*, 2014; FEIGELMAN *et al.*, 2017).

*Aggregatibacter* foi a OTU com maior número de leituras pela metagenômica (17%), fazendo-se presente em dez das 12 cânulas de traqueostomia analisadas. Pertencente à família *Pasteurellaceae* (comum também ao gênero *Haemophilus*), o seu representante de maior destaque é *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uma bactéria anaeróbia facultativa gram-negativa frequentemente identificada em cavidade oral e associada à patogênese da doença periodontal. Conhecido por sua capacidade de formação de biofilmes, este microrganismo apresenta, ainda, características mutualísticas com *F. nucleatum* e *Veillonella spp.* (PERIASAMY *et al.*, 2009; NORSKOV-LAURITSEN, 2014; GHOLIZADEH *et al.*, 2017; BELIBASAKIS *et al.*, 2019). Diferentemente dos nossos resultados, este gênero não foi encontrado entre as OTUs mais observadas em outros estudos que avaliaram o microbioma de cânulas de traqueostomia pediátrica (WANG *et al.*, 2018; PEREZ-LOSADA *et al.*, 2017 e 2019). DICKSON *et al.* (2015) e CHARLSON *et al.* (2011) descreveram que, embora ambientes distintos como a cavidade oral, a via aérea alta e a baixa de um mesmo paciente formem comunidades bacterianas diferentes, elas não são isoladas. Ambientes com maior

proximidade mantêm microbiomas mais semelhantes que ambientes distantes, demonstrando que estas regiões não são completamente separadas, mas unidas por áreas de transição.

É possível que a elevada abundância de *Aggregatibacter* e outras OTUs típicas da cavidade oral (como *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella* e *Porphyromonas*), associado ao número de aspirados traqueais classificados como contaminação de via aérea superior (descritos quando há presença de células epiteliais, saliva e poucos leucócitos na amostra) pode ter relação com a alta probabilidade de disfagia e aspiração associada à doença dos pacientes estudados (SCHWEIGER *et al.*, 2016). De fato, entre os 12 pacientes, seis encontravam-se em uso de gastrostomia ou sonda nasogástrica, e mesmo os outros, com alimentação por via oral, possuem risco elevado para aspiração silente, conforme os estudos de GASPARIN *et al.* (2017) e MONASTERIO *et al.* (2004).

Bactérias como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *F. nucleatum* e *A. actinomycetemcomitans* são conhecidas por seu potencial de formação de biofilmes, podendo ainda formar complexos polimicrobianos entre si ou associados a outras bactérias como *H. Influenzae* e *Veillonella spp.* (WANG *et al.*, 2017; MARINO *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2017). Encontramos uma alta abundância destes gêneros entre os nossos pacientes, o que, acreditamos, é esperado pela presença da cânula de traqueostomia, que atua como ponto de ancoragem para formação dessas estruturas.

No que diz respeito a correlações clínicas, apenas um paciente encontrava-se em uso de antibiótico durante a coleta, indicado por uma suspeita de exacerbação de quadro respiratório baixo. O paciente apresentou aumento de secreção pela traqueostomia, sem a presença de febre ou outros sintomas; porém, encontrava-se apenas no segundo dia de uso da medicação no momento da troca de cânula, tempo que provavelmente não é o suficiente para alterações importantes na microbiota bacteriana, conforme estudo de PÉREZ-LOSADA *et al.* (2018). O microbioma desta amostra não evidenciou o predomínio de nenhum gênero

bacteriano patológico em particular, ou mesmo uma baixa alfa-diversidade, o que sugere a hipótese de um quadro viral ou não-infeccioso. O estudo de PÉREZ- LOSADA *et al.* (2018) também demonstrou que uma microbiota alterada por um quadro infeccioso costuma equilibrar suas comunidades em torno quatro semanas e, em nosso estudo, todos os cinco pacientes que haviam utilizado antibiótico nos três meses prévios às coletas terminaram o tratamento em aproximadamente um mês ou mais antes da coleta das amostras. Por esses motivos, o antibiótico provavelmente não teve grande impacto na composição dos microbiomas analisados, como demonstrado pela ausência de grupamentos deste subgrupo no PCA.

WANG *et al.* (2018) estudaram o microbioma de quatro pacientes traqueostomizados, dos quais dois pacientes apresentavam tecido de granulação supraestomal, identificado por endoscopia de via aérea. Ambos os pacientes com tecido de granulação estavam em uso de antibióticos e apresentaram crescimento de *H. influenzae* em lavado broncoalveolar. A avaliação do microbioma destes casos, por meio da metagenômica do tipo *shotgun*, identificou que, além de *H. influenzae*, as bactérias *F. nucleatum*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* tiveram presença mais abundante de leituras nestes pacientes, sugerindo uma potencial associação com a presença de granulomas.

Embora não tenhamos realizado o exame endoscópico das vias aéreas durante as coletas das cânulas, tecido de granulação periestomal foi observado em três pacientes: 002, 006 e 012.

Os resultados do sequenciamento de *amplicon* identificaram 19 OTUs comuns às três amostras. Seleccionando apenas as com maior abundância, observamos presença de: *Aggregatibacter* (50,7% vs 63,1% vs 11,3%), *Fusobacterium* (18,7% vs 1,5% vs 11,4%), *Neisseria* (2,4% vs 1,1% vs 18,4%), *Prevotella* (0,7% vs 1,6% vs 12%) e *Haemophilus* (0,4% vs 8,9% vs 6,5%). Embora o tecido de granulação provavelmente deva ter efeito sobre as condições do ambiente (oxigenação, secreção, superfície), nossos resultados demonstram que

sua ligação com microrganismos específicos ainda não é clara, podendo estes grupos de bactérias estar associados tanto à causa quanto à consequência.

Outros estudos baseados em cultura de *stents* haviam relacionado tecido de granulação com *S. aureus* e *P. aeruginosa* (NOURAEI *et al.*, 2006; SIMONI *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, a população de *Staphylococcus* e *Pseudomonas* nos pacientes com granuloma foi pouco abundante, sendo que *Staphylococcus* variou de 0% a 0,16% e *Pseudomonas* de 0,07% a 15,3%. É possível que os estudos identifiquem essas bactérias por causa da maior facilidade com que crescem em culturas, além do seu potencial de formar biofilmes.

FEIGELMAN *et al.* (2017) descreve a presença em maior abundância de *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veilonella*, *Haemophilus* e *Neisseria* em lavados broncoalveolares de indivíduos saudáveis não traqueostomizados. O nosso estudo demonstrou uma mescla destes gêneros entrelaçados com bactérias potencialmente patogênicas. Como os microbiomas dos pacientes demonstraram variadas apresentações, estes não se correlacionaram com características clínicas específicas. A literatura atual sugere que quadros infecciosos estão mais relacionados com um desequilíbrio da comunidade bacteriana, que com a introdução de uma nova bactéria; e a análise estática de um microbioma pode não ser o suficiente para compreender as correlações entre a sua rede de interações com causas e consequências.

Mais estudos são necessários para a melhor compreensão das comunidades bacterianas e como elas interagem entre si, com seu ambiente e suas repercussões clínicas. (LIM *et al.*, 2014; QUINN *et al.*, 2016)

## 8 CONCLUSÃO

Esse estudo descreve o uso da cultura do aspirado traqueal e da metagenômica na identificação do microbioma bacteriano presente nas cânulas de traqueostomias de um grupo homogêneo de crianças.

A cultura do aspirado traqueal resultou em crescimento bacteriano em apenas cinco das 12 amostras coletadas, sendo *P. aeruginosa* o microrganismo mais frequentemente encontrado.

A metagenômica evidenciou uma maior eficácia do que o exame de cultura do aspirado traqueal, demonstrando, por exemplo, uma maior prevalência de microrganismos como *Pseudomonas* e *Moraxella* nesse grupo de pacientes. Embora alguns gêneros bacterianos tiveram destaque por demonstraram maior abundância (*e.g. Aggregatibacter, Pseudomonas, Haemophilus, Neissera, Staphylococcus, Fusobacterium* e *Moraxella*), a composição do microbioma individual dos pacientes teve grande variedade e os dados clínicos não se correlacionaram com os achados bacterianos.

Apesar do caráter descritivo, este estudo cria fundações para o avanço de questões mais complexas a respeito da microbiologia desses pacientes.

## REFERÊNCIAS

- AHMED, B. *et al.* Comparison of the upper and lower airway microbiota in children with chronic lung diseases. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p 1-5, 2018.
- AL-SAMRI, M. *et al.* Tracheostomy in children: a population-based experience over 17 years. **Pediatric Pulmonology**, v. 45, n. 5, p. 487-493, 2010.
- AVELINO, M. A. G. *et al.* First clinical consensus and national recommendations on tracheostomized children of the Brazilian Academy of Pediatric Otorhinolaryngology (ABOPe) and Brazilian Society of Pediatrics (SBP). **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 83, n. 5, p. 498–506, 2017.
- BACKMAN, S. *et al.* Material wear of polymeric tracheostomy tubes: a six-month study. **Laryngoscope**, v. 119, n. 4, p. 657-664, 2009.
- BELIBASAKIS, G.N. *et al.* Virulence and pathogenicity properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Pathogens**, v. 8, n. 4, p. 1-23, 2019.
- BROOK, I. Role of anaerobic bacteria in infections following tracheostomy, intubation, or the use of ventilatory tubes in children. **Annals of Otolaryngology and Laryngology**, v. 113 n. 10, p. 830-834, 2004.
- BUKIN, Y. S. *et al.* The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. **Scientific Data**, v. 6:190007, 2019.
- CAPORASO, J. G, *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. **Nature Methods**, v. 7, n. 5, p. 335-336, 2010.
- CARRON, J. D. *et al.* Pediatric tracheotomies: changing indications and outcomes. **Laryngoscope**, v. 110, n. 7, p. 1099-1104, 2000.
- CHARLSON, E. S. *et al.* Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 184, n. 8 p. 957-963, 2011.
- CLINE, J.M. *et al.* Surveillance tracheal aspirate cultures do not reliably predict bacteria cultured at the time of an acute respiratory infection in children with tracheostomy tubes. **Chest**, v. 141, n. 3, p. 625-631, 2012.
- CUTHBERTSON, L. *et al.* Time between collection and storage significantly influences bacterial sequence composition in sputum samples from cystic fibrosis respiratory infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n.8, p. 3011-3016, 2014.
- DA COSTA, A. L. *et al.* The effect of mandibular distraction osteogenesis on airway obstruction and polysomnographic parameters in children with Robin sequence. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 8, p. 1343-1347, 2018.



DESJARDINS, P.; CONKLIN, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. **Journal of Visualized Experiments**, v. 45, n.1, p. 1-4, 2010.

DICKSON, R. P. *et al.* Spatial variation in the healthy human lung microbiome and the adapted island model of lung biogeography. **Annals of the American Thoracic Society - ATS Journals**, v. 12, n. 6, p. 821-830, 2015.

EL CHEIKH, M. R. *et al.* Microbiology of tracheal secretions: what to expect with children and adolescents with tracheostomies. **International Archives of Otorhinolaryngology**, v. 22, n. 1, p. 50-54, 2018.

FEIGELMAN, R. *et al.* Sputum DNA sequencing in cystic fibrosis: non-invasive access to the lung microbiome and to pathogen details. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 1-14, 2017.

GARRIDO-CARDENAS, J. A. *et al.* DNA sequencing sensors: an overview. **Sensors**, v. 17, n. 3, p. 1-15, 2017.

GASPARIN, M. *et al.* Accuracy of clinical swallowing evaluation for diagnosis of dysphagia in children with laryngomalacia or glossotoposis. **Pediatric Pulmonology**, v. 52, n. 1, p. 41-47, 2017.

GHOLIZADEH, P. *et al.* Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **Microbial Pathogenesis**, v. 113, n. 1, p. 303-311, 2017.

GRØNHØJ, C. *et al.* Indications, risk of lower airway infection, and complications to pediatric tracheotomy: report from a tertiary referral center. **Acta Oto-laryngologica**, v. 137, n. 8, p. 868-871, 2017.

HAMADY, M.; KNIGHT, R. Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. **Genome Research**, v. 19, n. 7, p. 1141-1152, 2009.

HILTY, M. Disordered microbial communities in asthmatic airways. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2010.

HUANG, Y.J. *et al.* National Heart, Lung, and Blood Institute's Asthma Clinical Research Network. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 127, n. 2, p. 372-381, 2011.

HUSE, S. M. *et al.* Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing. **PLoS Genetic**, v. 4, n. 11, p. 1-10, 2008.

LAUBER, C. L. *et al.* Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, n. 1, p. 80-86, 2010.

- LIM, Y. W. *et al.* Clinical insights from metagenomic analysis of sputum samples from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 425-437, 2014.
- LIMA, B. P.; SHI, W.; LUX, R. Identification and characterization of a novel *Fusobacterium nucleatum* adhesin involved in physical interaction and biofilm formation with *Streptococcus gordonii*. **Microbiology Open**, v. 6, n. 3 p. e00444, 2017.
- MAHADEVAN, M. *et al.* Pediatric tracheotomy: 17 year review. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 71 n. 12, p. 1829-1835, 2007.
- MANICA, D. *et al.* Diagnostic accuracy of current glossoptosis classification systems: a nested cohort cross-sectional study. **Laryngoscope**, v. 128, n. 2, p. 502-508, 2018.
- MANICA, D. *et al.* The role of flexible fiberoptic laryngoscopy in Robin Sequence: a systematic review. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 2, p. 210-215, 2017.
- MARINO P. J. *et al.* Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. **Journal of Critical Care**, v. 39, n.1, p. 149-155, 2017.
- MARTÍN, R. *et al.* The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. **Virulence**, v. 5, n. 3, p. 413-423, 2014.
- MCCALEB, R. *et al.* Description of respiratory microbiology of children with long-term tracheostomies. **Respiratory Care**, v. 61, n. 4, p. 447-452, 2016.
- MILORO, M. Mandibular distraction osteogenesis for pediatric airway management. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 68, n. 7, p. 1512-1523, 2010.
- MINICH, J. J. *et al.* High-throughput miniaturized 16S rRNA amplicon library preparation reduces costs while preserving microbiome integrity. **mSystems**, v. 3, n. 6, p. 1-6, 2018.
- MONASTERIO, F. O. *et al.* Swallowing disorders in Pierre Robin sequence: its correction by distraction. **The Journal of Craniofacial Surgery**, v. 15, n. 6, p. 934-941, 2004.
- MORAR, P. *et al.* Oropharyngeal carriage and lower airway colonisation/infection in 45 tracheotomised children. **Thorax**, v. 57, n. 12, p. 1015-1020, 2002.
- MORRIS, A. *et al.* Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187 n. 10, p. 1067-1075, 2013.

NATIONAL HUMAN GENOME RESEARCH INSTITUTE. The cost of sequencing a human genome. Disponível em: <<https://www.genome.gov/about-genomics/factsheets/Sequencing-Human-Genome-cost>>. Acesso em: 14 fev. 2020.

NØRSKOV-LAURITSEN, N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 214-240, 2014.

NOURAEI, S. A. *et al.* Bacterial colonization of airway stents: a promoter of granulation tissue formation following laryngotracheal reconstruction. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 132, n. 10, p. 1086-1090, 2006.

OZMEN, S.; OZMEN, O. A.; UNAL, O. F. Pediatric tracheotomies: a 37-year experience in 282 children. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 73, n. 7, p. 959-961, 2009.

PARKS, D.H. *et al.* STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123-3124, 2014.

PÉREZ-LOSADA, M. *et al.* The temporal dynamics of the tracheal microbiome in tracheostomised patients with and without lower respiratory infections. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. 1-14, 2017.

PÉREZ-LOSADA, M. *et al.* Tracheal microbiota in patients with a tracheostomy before, during and after an acute respiratory infection. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 37, n. 11, p. 269-271, 2018.

PERIASAMY, S.; KOLENBRANDER, P. E. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 9, p. 3542-3551, 2009.

PERKINS, J. *et al.* Bacterial biofilm presence in pediatric tracheotomy tubes. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 130 n. 3, p. 339-343, 2004.

PIENKOWSKA, K.; WIEHLMANN, L.; TUMMLER, B. Airway microbial metagenomics. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 9-10, p. 536-542, 2018.

POZZI, M. *et al.* Prevention of respiratory infections in tracheostomized patients of a pediatric long-term rehabilitation setting. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 4, p. 394-396, 2015.

PYLRO, V. S. *et al.* Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 30-37, 2014.

QUINCE, C. *et al.* Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. **Nature Biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 833-844, 2017.

QUINN, R. A. *et al.* Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 2, n. 4, p. 1-11, 2016.

RODNEY, J. *et al.* Effect of repeated tracheostomy tube reprocessing on biofilm formation. **Laryngoscope**, v. 126, n. 4, p. 996-999, 2016.

RUTTER, M. J. Evaluation and management of upper airway disorders in children. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 15 n. 2, p. 116-123, 2006.

SANDERS, C. D. *et al.* Tracheostomy in children: Epidemiology and clinical outcomes. **Pediatric Pulmonology**, v. 53, n. 9, p. 1269-1275, 2018.

SCHUURMANS, M. M. *et al.* Biofilm formation in a permanent tracheal stent implanted for twenty-five years. **Respiration**, v. 90, n. 4, p. 327-328, 2015.

SCHWEIGER, C. *et al.* Tracheostomy in children: a ten-year experience from a tertiary center in southern Brazil. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 83, n. 6, p. 627-632, 2017.

SCHWEIGER, C.; MANICA, D.; KUHL, G. Glossoptosis. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 25, n. 3, p. 123-127, 2016.

SEVERO, G. V. Microbiologia de aspirado traqueal de crianças traqueostomizadas e sua relação com dados clínicos em um hospital terciário do Brasil. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

SHERMAN, J. M. *et al.* Care of the child with a chronic tracheostomy. This official statement of the American Thoracic Society was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, n. 1, p. 297-308, 2000.

SILVA, R. C.; OJANO-DIRAIN, C. P.; ANTONELLI, P. J. Effectiveness of pediatric tracheostomy tube cleaning. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 138, n. 3, p. 251-256, 2012.

SIMONI, P.; WIATRAK, B. J. Microbiology of stents in laryngotracheal reconstruction. **Laryngoscope**, v. 114, n. 2, p. 364-367, 2004.

SOLOMON, D. H. *et al.* Characterization of bacterial biofilms on tracheostomy tubes. **Laryngoscope**, v. 119, n. 8, p. 1633-1638, 2009.

SORIN, A.; MCCARTHY, J. G.; BERNSTEIN, J. M. Predicting decannulation outcomes after distraction osteogenesis for syndromic micrognathia. **Laryngoscope**, v. 114, n. 10, p. 1815-1821, 2004.

STATHAM, M. M. *et al.* Screening and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children undergoing open airway surgery. **Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 138, n. 2, p. 153-157, 2012.

DE TREY, L. *et al.* Pediatric tracheotomy: a 30-year experience. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 48, n. 7, p. 1470-1475, 2013.

URRESTARAZU, P. *et al.* [Clinical consensus statement on the care of the child with a tracheostomy]. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 114, n. 1, p. 89-95, 2016.

WANG, J. C. *et al.* Planktonic growth of *Pseudomonas aeruginosa* around a dual-species biofilm supports the growth of *Fusobacterium nucleatum* within that biofilm. **International Journal of Otolaryngology**, v. 2017, p. 1-12, 2017.

WANG, J. C. *et al.* Feasibility of shotgun metagenomics to assess microbial ecology of pediatric tracheostomy tubes. **Laryngoscope**, v. 129, n. 2, p. 317-323, 2019.

WATTERS, K. F. Tracheostomy in infants and children. **Respiratory Care**, v. 62, n. 6, p. 799-825, 2017.

WEINSTOCK, G. M. Genomic approaches to studying the human microbiota. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 250-256, 2012.

WIEHLMANN, L. *et al.* Impact of sample processing on human airways microbial metagenomes. **Journal of Biotechnology**, v. 250, p. 51-55, 2017.

YAREMCHUK, K. Regular tracheostomy tube change to prevent formation of granulation tissue. **Laryngoscope**, v. 113, n. 1, p. 1-10, 2003.

**9 ARTIGO****Characteristics of the bacterial microbiota in pediatric tracheostomy  
cannula**

Leonardo Palma Kuhl<sup>1, 2</sup> MD, Claudia Schweiger<sup>1, 2</sup> PhD, Alexandre José Macedo<sup>4</sup> PhD,  
Denise Manica<sup>1</sup> PhD, Gustavo Vasconcellos Severo<sup>1, 2</sup> MD, Paulo Jose Cauduro Marostica<sup>2,3</sup>

PhD

1 Serviço de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil.

2. Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

3. Unidade de pneumologia pediátrica from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil.

4. Faculdade de Farmácia from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

This Project was funded by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

The authors have no funding, financial relationships, or conflicts of interest to disclose.

Send correspondence to Leonardo Palma Kuhl, MD, Clinica da Criança e do Adolescente, rua Prof. Duplan 123, 90420030, Porto Alegre, Brazil E-mail: leonardokuhl@hotmail.com.

## ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate the bacterial microbiome found in tracheostomy cannulas of a group of children diagnosed with glossoptosis secondary to Robins Sequence (RS), and its clinical implications.

**Methods:** Pediatric patients were enrolled in the study at the time of the cannula change, performed at the hospital by the otolaryngology team. During this procedure, tracheal aspirate was collected and sent to culture, while the removed cannula was collected and stored for amplicon sequencing of *16S* rRNA. DNA extraction were performed using DNeasy PowerBiofilm Kit (QIAGEN®- Cat No. 24000-50) while sequencing was performed with the S5 (Ion S5™ System, Thermo Fisher Scientific) and following Brazilian Microbiome Project (BMP) protocol. Principal component analysis (PCA) were utilized to search for clusters or patterns among patients.

**Results:** All 12 enrolled patients were using uncuffed tracheostomy cannulas of the same brand, had their tracheostomy performed more than 1 year ago and had used the removed cannula for an average of 3 months. Culture results showed bacterial growth in only five patients, all with corresponding genera identified in their microbiome. A total of 68 different operational taxonomic units (OTU) were sequenced at the genera taxonomic level, and most abundant were: *Aggregatibacter*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*, *Staphylococcus*, *Fusobacterium*, *Moraxella*, *Streptococcus*, *Alloiococcus* and *Capnocytophaga*. Individual microbiome of each individual was highly variable, not correlating to any particular clinical characteristic. PCA didn't find any cluster among patients.

**Conclusion:** The microbiome of tracheostomy cannulas is highly variable, even among patients with similar clinical characteristics, making it challenging to determine a standard for normality. More studies are needed to comprehend the network between bacterial communities and how they interact among themselves, their microenvironment and the clinical outcomes.

**Keywords:** Child, tracheostomy, metagenomics, microbiota, RNA, Ribosomal, 16S.

## INTRODUCTION

Tracheostomy is a surgical procedure that creates a shortcut for the air to reach the lungs.

It establishes a communication (or tunnel) between the cervical skin and trachea, which is maintained pervious by a cannula.

Indications for tracheostomy in children nowadays are mainly related to chronic obstruction of upper airways (*e.g.* laryngeal stenosis or vocal fold paralysis), management of mechanical ventilation and treatment of bronchopulmonary aspiration (1-3). Another obstructive airway pathology with potential necessity for tracheostomy is glossoptosis. Glossoptosis is defined as the posterior collapse of the base of the tongue resulting in varying degrees of respiratory obstruction. It may occur as a consequence of mandibular hypoplasia (Robin Sequence), but it also occurs in patients with neurological disorders related to hypotonia (4-6).

A few days after a tracheostomy is performed, its pathway matures, resulting in a new microbiological environment. Air goes directly to the lungs without be filtered by the upper airways and mobilization of tracheals secretions is altered, as well as patients physiological defense systems (7-10). The cannula itself induces a constant inflammatory



(foreign body) reaction, capable of accumulating organic debris and facilitating bacterial colonization and biofilm formation, sometimes resulting in exacerbation of clinical conditions (11, 12).

Precise determination of bacteria present at the tracheostomy tube can be challenging. Culture based methods may favor specific bacteria growth over others and does not contemplate the multitude of microbials present in that environment (7, 13-15).

Recently, high performance next generation sequencing equipment is becoming more accessible and, added to computational evolution and expansion of bioinformatic sector, genetic sequencing cost have been lower (16).

Metagenomic is a culture independent method for phylogenetic identification of bacterial communities. Referred as shotgun sequencing, whole microbial genome sequencing is done, resulting in taxonomic and possibly function gene identification (17-20). Another culture independent genetic sequencing method for microbiome determination is amplicon sequencing. Targeting specific known genes, shorter sequences can be used for taxonomic identification, therefore lowering costs while keeping efficacy at the study of bacterial communities (21-24).

This study aims to evaluate pediatric tracheotomy bacterial microbiome using amplicon sequencing of *16S* rRNA gene in a specific population of children with Robin Sequence and describe our findings amidst recent literature.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Subjects and Study Design**

This study received a certificate of ethic appreciation from “Plataforma Brasil” numbered 93356618.0.000.5327. The study was also approved by the Ethics and Research Committee (CEP) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre. All patients had consent and approval forms signed by parents or legal caretakers prior to inclusion. We targeted a group of patients who performed tracheostomy due to glossoptosis associated with mandibular hypoplasia (Robin Sequence), with a history or plan for osteogenic distraction.

### **Data and Samples Collection**

Prior to the tracheostomy cannula exchange, which is performed at our hospital by the Otolaryngology team, caretakers were questioned on patient current clinical condition (fever, use of antibiotics, etc) and electronic medical chart was reviewed.

At the moment of cannula exchange, patients had two samples collected with the use of sterile techniques: a sample of the cannula and a sample of tracheal secretion. The cannula was bisected longitudinally as to include both distal (in contact to trachea) and proximal (in contact to skin) portions, and placed into 2 different 15mL conical tubes. These tubes were stored in a -80°C freezer within the first two hours of collection for future DNA extraction and sequencing (25-27). Tracheal aspirates were sent immediately to microbiology laboratory for cultural analysis.

At the moment of the cannula exchange, cervical skin was also examined for the presence or absence of peristomal granuloma.

### **Culture of tracheal aspirate**

Cultures were performed according to microbiology laboratory protocol. Possible results include: identification of one or two bacteria growth; identification of multiple microbiota (when there was growth of three or more bacteria); or identification of upper

airway contamination (when elements such as epithelial cells, saliva or leukocytes were identified).

### **DNA extraction and Amplicon Sequencing**

All samples were processed following the protocol of the Experimental Research Center of Hospital de Clinicas de Porto Alegre. DNA extraction were conducted using *DNeasy PowerBiofilm Kit* (QIAGEN®- Cat No. 24000-50). For every patient the content of one 15mL conical tube was used (half of tracheostomy tube) (Figure 1). Once removed of the -80°C freezer, samples were kept at room temperature for 10 minutes to facilitate handling. At this moment, a subjective score for macroscopic quantity of secretion was given by the main author (LPK) :1+: low amount of secretion, 2+: medium amount of secretion, 3+: high amount of secretion.

Using sterile material, tracheostomy tube was sectioned into small fragments on a Petri dish and DNA extraction was performed following *DNeasy PowerBiofilm Kit* protocol.

Once extracted, samples quality was tested using DNA spectrophotometer NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific®).

Approximately 50ng of DNA for each sample were submitted to amplification of the V4 region of rRNA 16S gene by PCR using the following pair of primers: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). In order to process multiple samples at the same reaction, primer-fusion method was used so each sample received a unique nucleotide sequence (barcode) attached to its amplified products. Sequencing was conducted using S5 (Ion S5™ System, Thermo Fisher Scientific). The resulting raw data were compacted and exported as a single FastQ file.

## **Bioinformatics**

Raw data generated from DNA sample sequencing was processed according to the *Brazilian Microbiome Project* (BMP) protocol (23), using scripts in QIIME and RDP for 16S rRNA gene phylogenetic representation.

Sequences were filtered based on size and quality score with removal of chimeras. RDP\_GOLD identifier was used for Operational Taxonomic Unit (OTU) picking based on 97% similarity, and phylogenetic identity of represented OTU was achieved using Green Genes database. Sequences which failed to achieve 97% similarity were defined as unclassified. Quality control was performed with FASTQC.

Data processing and STF extension files were also created using QIIME (v1.9.1). Analysis were performed using STAMP (v2.1.3) and SPSS (v23.0).

## **Statistical analysis**

Principal components analysis (PCA) plots were used to identify clusters while separating samples for different variables as age, feeding route, presence of granuloma, etc. Spearman's correlation coefficient and Kruskal-Wallis test were performed to compare number DNA concentration after DNA extraction, subjective score for macroscopic quantity of secretion and number of reads after sequencing.

## **RESULTS**

Twelve patients with Robin Sequence and tracheostomy were included in the study. Patients characteristics are summarized in table 1.

All tracheostomies tubes collected were of the same brand (PORTEX<sup>®</sup> Blue Line<sup>®</sup> Tracheostomy Tube) and uncuffed. No complications occurred.

Only one patient was using antibiotics during sampling, which had been started two days before because of increasing of tracheostomy secretion, without fever or any other symptoms. Five other patients used antibiotics previously while in use of the collected tracheostomy tube.

### Tracheal aspirates

Cultures from the 12 tracheal aspirates identified bacterial growth of at least one bacterium in only five samples. Data is shown on Table 2. Seven cultures resulted in upper airway contamination, not undergoing further bacteriology analysis.

### Metagenomics

DNA concentration after extraction varied between 69.65ng/mL to 312.45ng/mL (median = 176.84ng/mL). After filtering and quality control, amplicon sequencing resulted in a total of 647,256 reads, ranging from 16,850 to 137,586 per sample (median= 53,938). Spearman correlation coefficient between DNA concentration and the number of reads was not significant ( $p= 0.779$ ). No significant differences among different levels of tube secretion (by subjective score) were observed concerning DNA concentration ( $p= 0.413$ ) and the number of reads ( $p=0.196$ ). (table 3)

A total of 68 OTUs was identified at genus taxonomic level. Considering all sequences identified, most abundant OTUs included: *Aggregatibacter* (17%), *Pseudomonas* (15.9%), *Haemophilus* (12.4%), *Neisseria* (8.8%), *Staphylococcus* (8.3%), *Fusobacterium* (6.5%), *Moraxella* (5.8%), *Streptococcus* (4.6%), *Alloiococcus* (3%) and *Capnocytophaga* (2.9%). Other OTUs with lower abundance included: *Corynebacterium* (2.5%), *Prevotella* (2.5%), *Porphyromonas* (1.8%), *Eikenella* (1.2%), *Treponema* (0.9%), *Elizabethkingia* (0.9%), *Stenotrophomonas* (0.8%), *Mycoplasma* (0.8%), *Achromobacter* (0.5%) and

*Acinetobacter* (0.5%) (table 4). The 48 remaining OTUs accounted for less than 3% of all identified reads. Relative proportion of OTUs found per sample can be observed in table 5.

#### Bacteria and clinical data of the patients

Principal component analysis (PCA) plots were performed searching for clusters accounting for variables such as food intake, use of antibiotics or presence of granuloma, however no cluster patterns were found. (Figure 1 – 3)

## **DISCUSSION**

Genetic sequencing is a consolidated method for bacterial community evaluation. However, studies for airway bacterial microbiome are still sparse and provide fragmented information, especially regarding tracheostomized children, since these patients typically constitute a heterogeneous population, frequently presenting syndromic conditions and other comorbidities, besides being prone to infections, long-term hospital stays, increased use of medication, and recurrent surgical procedures.

This study evaluated the tracheostomy cannula microbiome of a group of 12 children with glossoptosis secondary to mandibular hypoplasia. Besides tracheostomy indication, this patients group presented various other common features: use of uncuffed tube, use of the same tracheostomy tube brand, similar length of time in use of the analyzed cannula (around three months), and length of tracheostomy of over a year. Although two patients had a pulmonary comorbidity, none presented cystic fibrosis or the need for ventilatory support or supplemental oxygen therapy, showing a greater homogeneity among patients if compared to populations of previously published studies (28-30).

Among the tracheal aspirate cultures with identified bacterial growth, *Pseudomonas aeruginosa* was the most frequent, presented in three cases (25% of all samples). Other studies with pediatric tracheostomized patients found an incidence of *P. aeruginosa* between 29-72% (31-34). Amplicon sequencing identified OTU *Pseudomonas* in 10 samples (83%), suggesting its prevalence is even higher than shown in literature, at least in this specific population. In similar trend, *Moraxella catarrhalis* was identified on only one sample through tracheal aspirate, while eight patients had *Moraxella* OTU presented in their microbiome.

While traditional culture methods are still widely performed, its efficiency in bacteria identification and the interpretation of its results are being questioned. The finding of a particular bacteria might just represent a small fraction of a complex airway microbiome with commensal and pathogenic microbes constant interactions (29, 35, 36).

*Aggregatibacter* was the OTU with the highest number of reads in metagenomics (17% of all samples reads), present in 10 of the 12 analyzed tracheostomies tubes. Belonging to the *Pasteurellaceae* family (also common to the *Haemophilus* genus) its most noticeable representative is, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, a gram-negative facultative anaerobe bacterium frequently identified in oral cavity and associated with periodontal disease. Its biofilm formation can have mutualistic characteristics with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella spp.* (37-40). Unlike our results *Aggregatibacter* was not found among most observed OTUs on other tracheostomy microbiome studies (28-30). DICKSON et al. (2015) and CHARLSON et al. (2011) described that, although different environments in the same patient such as oral cavity, lower and upper airway show different bacterial communities, they are not isolated from each other. Closer environments sustain microbiomes with higher resemblance than distance environments suggesting that these regions are not completely separate, but linked by transition areas (41, 42).

It is possible the abundance of *Aggregatibacter* and other oral cavity typical OTUs (as *Neisseria*, *Fusobacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella* and *Porphyromonas*), associated with the high number of tracheal aspirates classified as upper airway contamination (described when there is presence of saliva, epithelial cells and leukocytes at the sample) can be correlated with patients' disease-associated high probability of dysphagia and aspiration (5). In fact, among the 12 patients, 6 were in use of g-tube or nasogastric tube, and the others with oral feeding probably showed a high risk of silent aspiration, according to the studies of GASPARIN et al. (2017) and MONASTERIO et al. (2004) (43, 44).

Bacteria such as *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *F. nucleatum* and *A. actinomycetemcomitans* are known for development of biofilm and can create polymicrobial complexes among themselves or associated with other bacteria as *Haemophilus influenzae* and *Veillonella spp.* (45-47). We found high abundances of these genus among our patients, which is believed to be expected as tracheostomy tube serves as an anchor point for these structures.

Regarding clinical correlations, only one patient was receiving antibiotics during sampling, indicated for suspected lower respiratory exacerbation. Patient had increased tracheostomy secretion without fever or other symptoms. This patient, however, was taking the medication for only 2 days at the moment of the cannula change, which was probably not enough time to significantly alter tracheostomy microbiota, according to PEREZ-LOSADA (2018) (30). Amplicon sequencing of this sample evidenced no particular pathological bacterial genus, suggesting it was a viral or non-infectious condition. PEREZ-LOSADA also shown that a microbiota altered by an acute infection tends to balance itself after four weeks. All the five patients who had received previous antibiotics had their treatment concluded more than a month before sampling. For that reason, antibiotics probably did not have a



particular role in their microbiome composition, as their microbiome showed no particular characteristics or clusters on PCA.

WANG et al. (2018) (28) studied the microbiome of 4 children with tracheostomy, of whom 2 had suprastomal granuloma tissue identified by airway endoscopy. Both patients with granuloma tissue were in use of antibiotics and grew *H. influenzae* in respiratory bronchoalveolar lavage culture. Microbiome evaluation of these patients' tracheostomy tubes through shotgun metagenomics revealed that besides *H. influenzae*, *F. nucleatum*, *M. catarrhalis* and *Streptococcus pneumoniae* had higher abundances, potentially being associated with the presence of granuloma.

Although airway endoscopy was not performed during our sampling, periostomal granulation tissue was observed on three patients: 002, 006 and 012.

Amplicon sequencing observed 19 OTUs common to all three samples, highlighting only the ones with higher abundance we observe: *Aggregatibacter* (50,7% vs 63,1% vs 11,3%), *Fusobacterium* (18,7% vs 1,5% vs 11,4%), *Neisseria* (2,4% vs 1,1% vs 18,4%), *Prevotella* (0,7% vs 1,6% vs 12%) and *Haemophilus* (0,4% vs 8,9% vs 6,5%). Granulation tissue is potentially influenced by conditions of the tracheostomy tube (oxygenation, secretion, surface), but our results show that its link to specific microbes is still not clear, as these groups of bacteria may be associated either to cause or effect.

Other culture-based studies in stents have described relation of granulation tissue with *Staphylococcus aureus* and *P. aeruginosa* (48, 49). According to our results, *Staphylococcus* and *Pseudomonas* populations on the three patients with identified granulomas was not characteristic, with *Staphylococcus* varying from none to 0.16% and *Pseudomonas* from 0.07% to 15.3%. It is possible that studies tend to find these bacteria easier for their capabilities on growing in culture methods and biofilm formation.

FEIGELMAN et al. (2017) (36) describes higher prevalence of *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella*, *Haemophilus* and *Neisseria* in bronchoalveolar lavages of healthy individuals without tracheostomy.

Our samples showed a mixture of these genera intertwined with potentially pathological bacteria. As patient's microbiome had variable presentations, they did not correlate to specific clinical characteristics. Recent literature suggests that infections are more related to a shift in community balance than the introduction of a new bacteria, and a static microbiome analysis may not be sufficient to understand correlations between network patterns and its causes or consequences (35, 50).

More studies are needed in order to understand bacterial community networks and how they interact among themselves, environment and clinical repercussions.

Table 1 - Clinical characteristics of the 12 patients

Sample	Age (years)	Time from tracheostomy (years)	Feeding route	Syndrome	Comorbidities	Recurrent LRI	Time from last cannula change (days)	Cannula size	Peristomal granuloma	ATB (Day of sampling)	ATB (Last 3 months)
001	8.2	8.1	Oral	Facio-auricular-vertebral	Yes	No	98	5	No	No	No
002	5.4	5.2	G-tube	None	Yes	No	98	4.5	Yes	No	Yes
003	7.7	7.5	Oral/G-tube	Richieri-Costa-Pereira	Yes	No	98	4.5	No	No	No
004	2.1	1.9	NG-tube	None	Yes	No	98	3.5	No	No	Yes
005	9.2	9	Oral	Stickler	No	No	91	4.5	No	No	No
006	2.2	2.1	Oral	None	Yes	No	91	3.5	Yes	No	No
007	4	1.4	NG-tube	None	Yes	Yes	138	4	No	No	Yes
008	7.2	3.9	Oral	None	Yes	No	80	5	No	No	No
009	11.7	8.3	Oral	Picnoidisostosis	No	No	98	4	No	No	Yes
010	5.4	5.2	G-tube	Apert	Yes	No	119	4.5	No	No	Yes
011	9.1	9	Oral	Treacher-Collins	Yes	No	98	4	No	No	No
012	2.2	2.1	NG-tube	None	Yes	No	91	3.5	Yes	Yes	No

LRI: Lower respiratory infection; ATB: Antibiotics; G-tube: Gastrostomy; NG-tube: nasogastric tube

**Table 2 - Culture growth results from tracheal aspirates**

<b>Patient #</b>	<b>Bacteria</b>
Patient 003	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Moraxella catarrhalis</i>
Patient 004	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Achromobacter sp.</i>
Patient 005	<i>Staphylococcus aureus</i>
Patient 007	<i>Acinetobacter baumannii</i>
Patient 011	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

**Table 3 - Results from DNA extraction, cannula inspection and metagenomics**

<b>Sample</b>	<b>DNA concentration (ng/mL)</b>	<b>Cannula macroscopic inspection</b>	<b>Number of reads</b>
001	174.34	3+	30024
002	254.72	1+	53984
003	312.45	3+	31504
004	157.60	2+	137586
005	99.15	2+	43286
006	159.66	3+	42032
007	281.42	3+	66958
008	135.12	3+	56231
009	186.21	2+	78577
010	69.65	3+	42614
011	72.64	3+	47610
012	219.11	1+	16850

Cannula macroscopic inspection:

1+ Low amount of secretion

2+ Notable amount of secretion

3+ Secretion occupying intraluminal space

**Table 4 - Prevalence of total reads per genus on metagenomics**

<b>Genus</b>	<b>%</b>
<i>Aggregatibacter</i>	17%
<i>Pseudomonas</i>	15.9%
<i>Haemophilus</i>	12.4%
<i>Neisseria</i>	8.8%
<i>Staphylococcus</i>	8.3%
<i>Fusobacterium</i>	6.5%
<i>Moraxella</i>	5.8%
<i>Streptococcus</i>	4.6%
<i>Alloiococcus</i>	3.0%
<i>Capnocytophaga</i>	2.9%
<i>Corynebacterium</i>	2.5%
<i>Prevotella</i>	2.5%
<i>Porphyromonas</i>	1.8%
<i>Eikenella</i>	1.2%
<i>Treponema</i>	0.9%
<i>Elizabethkingia</i>	0.9%
<i>Stenotrophomonas</i>	0.8%
<i>Mycoplasma</i>	0.8%
<i>Achromobacter</i>	0.5%
<i>Acinetobacter</i>	0.5%
Others	2.4%
Total	100%

Table 5 - Genera proportion per sample

001		002		003		004	
Genus	%	Genus	%	Genus	%	Genus	%
<i>Aggregatibacter</i>	29.48	<i>Aggregatibacter</i>	50.67	<i>Moraxella</i>	34.42	<i>Haemophilus</i>	81.27
<i>Pseudomonas</i>	26.33	<i>Fusobacterium</i>	18.69	<i>Treponema</i>	8.30	<i>Streptococcus</i>	6.98
<i>Fusobacterium</i>	9.21	<i>Capnocytophaga</i>	11.62	<i>Fusobacterium</i>	7.49	<i>Moraxella</i>	2.95
<i>Streptococcus</i>	6.07	<i>Eikenella</i>	7.33	<i>Alloiococcus</i>	7.15	<i>Corynebacterium</i>	2.66
<i>Capnocytophaga</i>	4.36	<i>Pseudomonas</i>	6.69	<i>Neisseria</i>	6.75	<i>Aggregatibacter</i>	1.58
<i>Mycoplasma</i>	4.32	<i>Neisseria</i>	2.44	<i>Aggregatibacter</i>	6.42	<i>Fusobacterium</i>	1.54
<i>Haemophilus</i>	4.05	<i>Prevotella</i>	0.72	<i>Porphyromonas</i>	5.55	<i>Pseudomonas</i>	1.28
<i>Neisseria</i>	2.87	<i>Porphyromonas</i>	0.59	<i>Streptococcus</i>	4.11	<i>Achromobacter</i>	0.57
<i>Prevotella</i>	2.81	<i>Haemophilus</i>	0.40	<i>Capnocytophaga</i>	4.08	<i>Prevotella</i>	0.43
<i>Treponema</i>	2.43	<i>Leptotrichia</i>	0.31	<i>Mycoplasma</i>	2.19	<i>Neisseria</i>	0.27
Others	8.07	Others	0.54	Others	13.54	Others	0.47

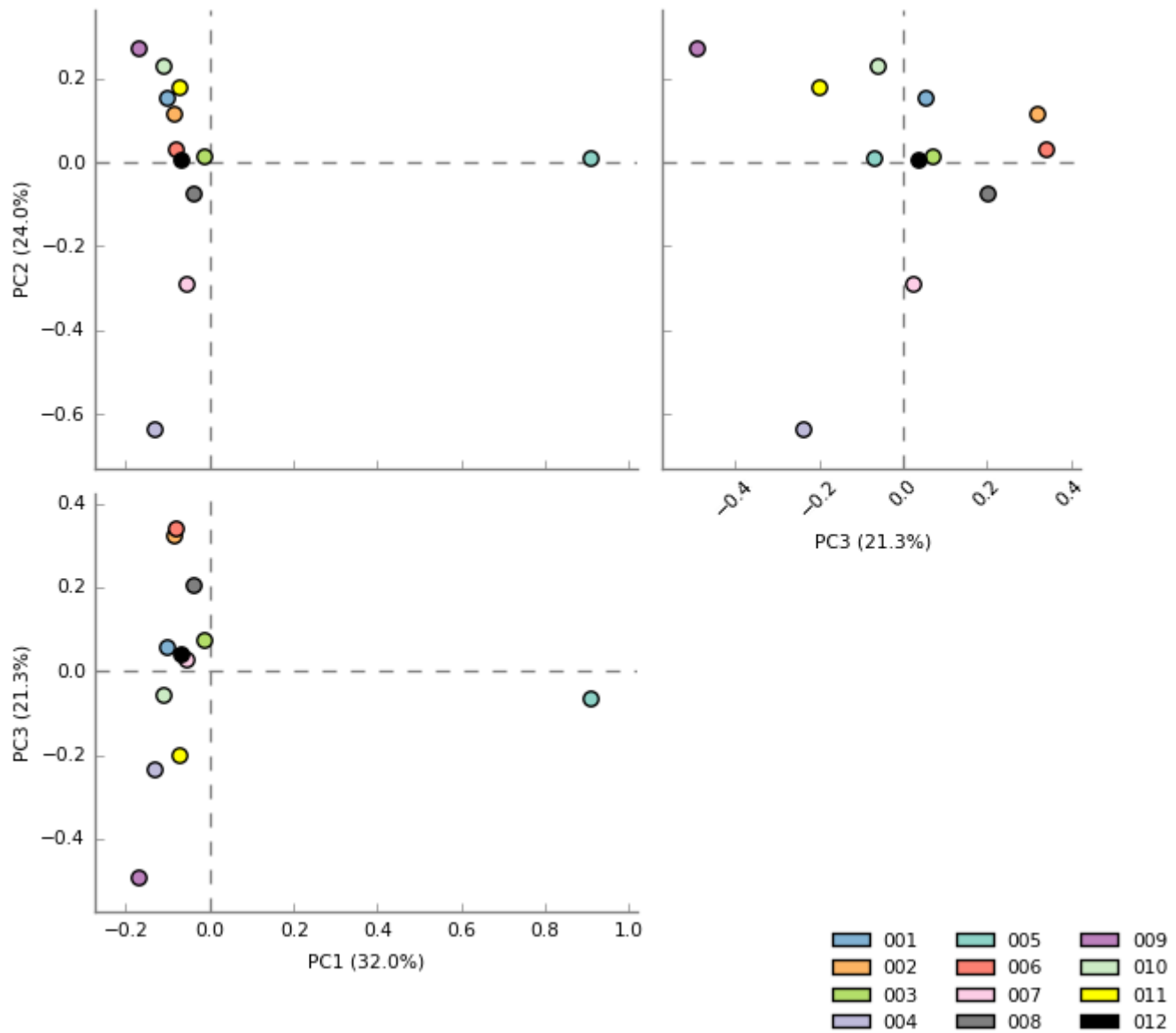
  

005		006		007		008	
Genus	%	Genus	%	Genus	%	Genus	%
<i>Staphylococcus</i>	95.23	<i>Aggregatibacter</i>	63.12	<i>Neisseria</i>	45.55	<i>Neisseria</i>	25.77
<i>Corynebacterium</i>	3.09	<i>Streptococcus</i>	16.15	<i>Haemophilus</i>	24.89	<i>Fusobacterium</i>	21.78
<i>Streptococcus</i>	1.54	<i>Haemophilus</i>	8.68	<i>Porphyromonas</i>	9.82	<i>Aggregatibacter</i>	18.99
<i>Anaerococcus</i>	0.05	<i>Peptococcus</i>	1.87	<i>Acinetobacter</i>	5.89	<i>Capnocytophaga</i>	7.95
<i>Finegoldia</i>	0.03	<i>Selenomonas</i>	1.78	<i>Streptococcus</i>	3.61	<i>Haemophilus</i>	7.89
<i>Alloiococcus</i>	0.01	<i>Prevotella</i>	1.66	<i>Prevotella</i>	1.90	<i>Alloiococcus</i>	3.77
<i>Facklamia</i>	0.01	<i>Fusobacterium</i>	1.55	<i>Moraxella</i>	1.78	<i>Serratia</i>	2.76
<i>Actinomyces</i>	0.01	<i>Capnocytophaga</i>	1.14	<i>Fusobacterium</i>	1.42	<i>Eikenella</i>	2.34
<i>Abiotrophia</i>	0.01	<i>Neisseria</i>	1.10	<i>Eikenella</i>	0.59	<i>Staphylococcus</i>	1.72
<i>Peptoniphilus</i>	0.01	<i>Veillonella</i>	1.08	<i>Aggregatibacter</i>	0.55	<i>Porphyromonas</i>	1.28
Others	0.01	Others	1.87	Others	4	Others	5.75

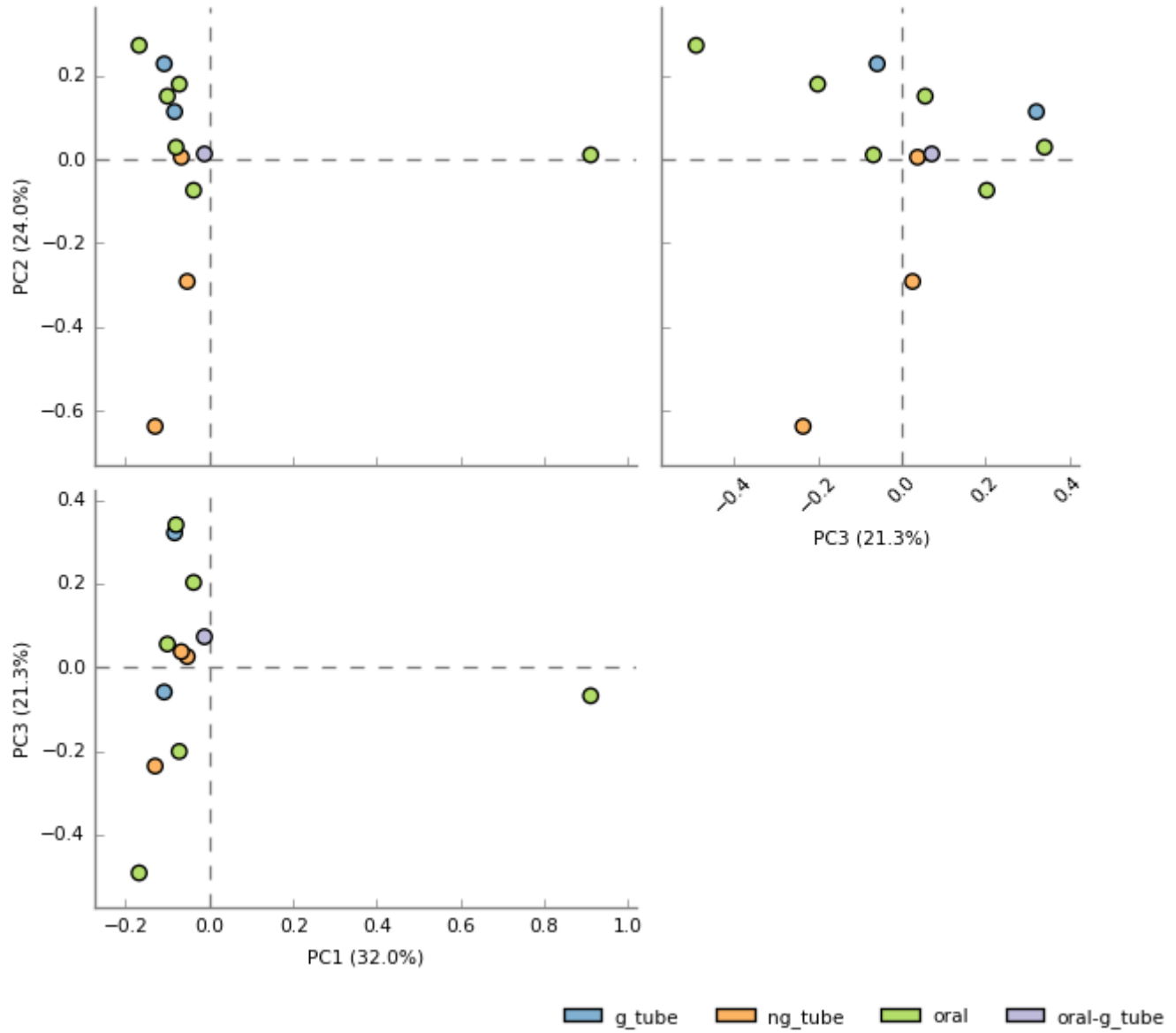
009		010		011		012	
Genus	%	Genus	%	Genus	%	Genus	%
<i>Pseudomonas</i>	72.83	<i>Pseudomonas</i>	36.42	<i>Pseudomonas</i>	31.18	<i>Neisseria</i>	18.44
<i>Haemophilus</i>	14.25	<i>Aggregatibacter</i>	22.11	<i>Moraxella</i>	30.10	<i>Pseudomonas</i>	15.33
<i>Corynebacterium</i>	7.25	<i>Alloiococcus</i>	13.71	<i>Elizabethkingia</i>	11.08	<i>Prevotella</i>	12.01
<i>Streptococcus</i>	2.47	<i>Corynebacterium</i>	8.20	<i>Alloiococcus</i>	10.14	<i>Fusobacterium</i>	11.36
<i>Staphylococcus</i>	1.64	<i>Achromobacter</i>	5.05	<i>Stenotrophomonas</i>	8.64	<i>Aggregatibacter</i>	11.29
<i>Fusobacterium</i>	1.19	<i>Capnocytophaga</i>	4.23	<i>Corynebacterium</i>	4.51	<i>Streptococcus</i>	11.04
<i>Anaerococcus</i>	0.10	<i>Fusobacterium</i>	3.60	<i>Streptococcus</i>	1.38	<i>Haemophilus</i>	6.55
<i>Porphyromonas</i>	0.09	<i>Neisseria</i>	2.92	<i>Achromobacter</i>	1.06	<i>Mycoplasma</i>	2.99
<i>Finegoldia</i>	0.05	<i>Porphyromonas</i>	1.81	<i>Haemophilus</i>	0.92	<i>Porphyromonas</i>	2.07
<i>Peptoniphilus</i>	0.05	<i>Streptococcus</i>	0.85	<i>Lampropedia</i>	0.36	<i>Eikenella</i>	1.89
Others	0.02	Others	1.1	Others	0.63	Others	7.03

**Figure 1 - PCA plot for sample identification**

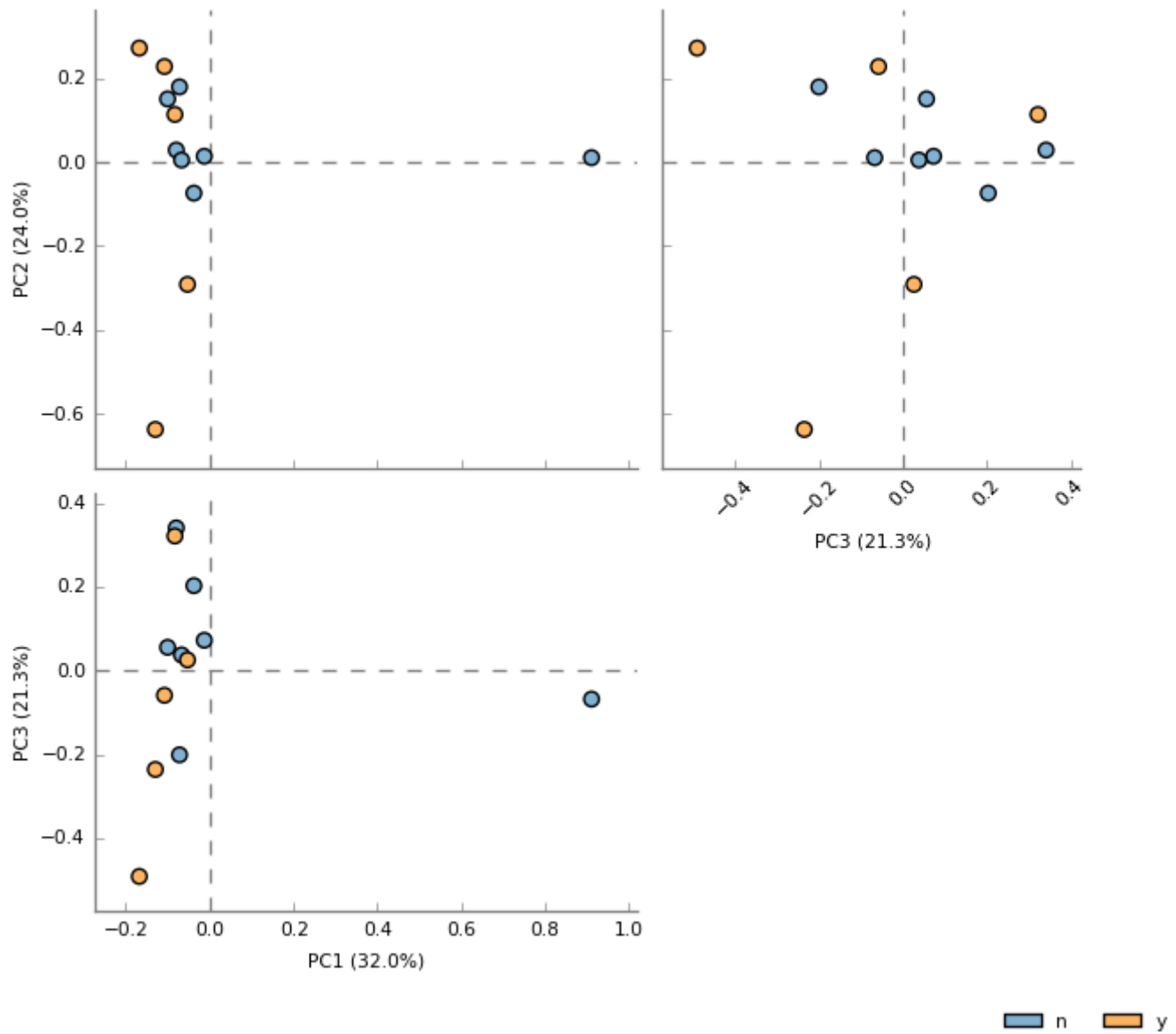


PCA: *Principal component analysis*

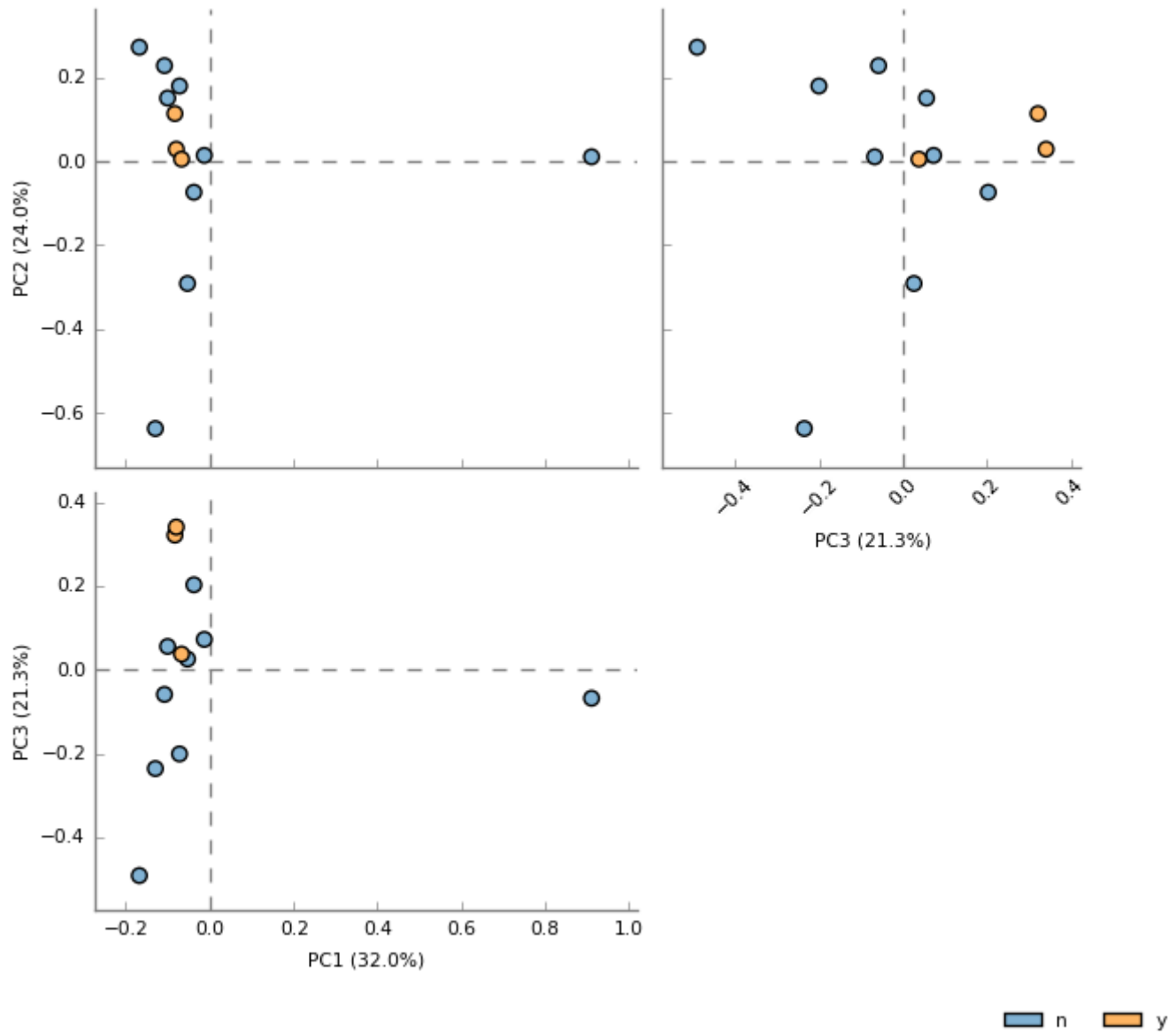


**Figure 2 - PCA plot for feeding route**

PCA: *Principal component analysis*

**Figure 3 - PCA plot for use of antibiotics during past 3 months**

PCA: *Principal component analysis*

**Figure 4 - PCA plot for presence of periostomal granuloma**

PCA: *Principal component analysis*

## REFERENCES

1. de Trey L, Niedermann E, Ghelfi D, Gerber A, Gysin C. Pediatric tracheotomy: a 30-year experience. *J Pediatr Surg*. 2013;48(7):1470-1475.
2. Watters KF. Tracheostomy in Infants and Children. *Respir Care*. 2017;62(6):799-825.
3. Yaremchuk K. Regular tracheostomy tube changes to prevent formation of granulation tissue. *Laryngoscope*. 2003;113(1):1-10.
4. Sorin A, McCarthy JG, Bernstein JM. Predicting decannulation outcomes after distraction osteogenesis for syndromic micrognathia. *Laryngoscope*. 2004;114(10):1815-1821.
5. Schweiger C, Manica D, Kuhl G. Glossoptosis. *Semin Pediatr Surg*. 2016;25(3):123-127.
6. Manica D, Schweiger C, Sekine L, et al. The role of flexible fiberoptic laryngoscopy in Robin Sequence: A systematic review. *J Craniomaxillofac Surg*. 2017;45(2):210-215.
7. Cline JM, Woods CR, Ervin SE, Rubin BK, Kirse DJ. Surveillance tracheal aspirate cultures do not reliably predict bacteria cultured at the time of an acute respiratory infection in children with tracheostomy tubes. *Chest*. 2012;141(3):625-631.

8. Brook I. Role of anaerobic bacteria in infections following tracheostomy, intubation, or the use of ventilatory tubes in children. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2004;113(10):830-834.
9. Pozzi M, Galbiati S, Locatelli F, et al. Prevention of respiratory infections in tracheostomized patients of a pediatric long-term rehabilitation setting. *Am J Infect Control.* 2015;43(4):394-396.
10. Rodney J, Ojano-Dirain CP, Antonelli PJ, Silva RC. Effect of repeated tracheostomy tube reprocessing on biofilm formation. *Laryngoscope.* 2016;126(4):996-999.
11. Backman S, Björling G, Johansson UB, et al. Material wear of polymeric tracheostomy tubes: a six-month study. *Laryngoscope.* 2009;119(4):657-664.
12. Silva RC, Ojano-Dirain CP, Antonelli PJ. Effectiveness of pediatric tracheostomy tube cleaning. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2012;138(3):251-256.
13. Schuurmans MM, Palheiros Marques M, Freitag L, Zinkernagel AS, Achermann Y. Biofilm Formation in a Permanent Tracheal Stent Implanted for Twenty-Five Years. *Respiration.* 2015;90(4):327-328.
14. Sanders CD, Guimbellot JS, Muhlebach MS, Lin FC, Gilligan P, Esther CR Jr. Tracheostomy in children: Epidemiology and clinical outcomes. *Pediatr Pulmonol.* 2018;53(9):1269-1275.

15. Morar P, Singh V, Makura Z, et al. Oropharyngeal carriage and lower airway colonisation/infection in 45 tracheotomised children. *Thorax*. 2002;57(12):1015-1020.
16. National Human Genome Research Institute. The cost of sequencing a human genome. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost>. Accessed February 14, 2020.
17. Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis [published correction appears in *Nat Biotechnol*. 2017 Dec 8;35(12 ):1211]. *Nat Biotechnol*. 2017;35(9):833-844.
18. Martín R, Miquel S, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease. *Virulence*. 2014;5(3):413-423.
19. Pienkowska K, Wiehlmann L, Tümmler B. Airway microbial metagenomics. *Microbes Infect*. 2018;20(9-10):536-542.
20. Weinstock GM. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature*. 2012;489(7415):250-256.
21. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res*. 2009;19(7):1141-1152.

22. Garrido-Cardenas JA, Garcia-Maroto F, Alvarez-Bermejo JA, Manzano-Agugliaro F. DNA Sequencing Sensors: An Overview. *Sensors (Basel)*. 2017;17(3):588.
23. Pylro VS, Roesch LF, Morais DK, Clark IM, Hirsch PR, Tótola MR. Data analysis for 16S microbial profiling from different benchtop sequencing platforms. *J Microbiol Methods*. 2014;107:30-37.
24. Bukin YS, Galachyants YP, Morozov IV, Bukin SV, Zakharenko AS, Zemskaya TI. The effect of 16S rRNA region choice on bacterial community metabarcoding results. *Sci Data*. 2019;6:190007.
25. Cuthbertson L, Rogers GB, Walker AW, et al. Time between collection and storage significantly influences bacterial sequence composition in sputum samples from cystic fibrosis respiratory infections. *J Clin Microbiol*. 2014;52(8):3011-3016.
26. Lauber CL, Zhou N, Gordon JJ, Knight R, Fierer N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;307(1):80-86.
27. Wiehlmann L, Pienkowska K, Hedtfeld S, Dorda M, Tümmler B. Impact of sample processing on human airways microbial metagenomes. *J Biotechnol*. 2017;250:51-55.
28. Wang JC, Bergeron M, Andersen H, et al. Feasibility of shotgun metagenomics to assess microbial ecology of pediatric tracheostomy tubes. *Laryngoscope*. 2019;129(2):317-323.

29. Pérez-Losada M, Graham RJ, Coquillette M, et al. The temporal dynamics of the tracheal microbiome in tracheostomised patients with and without lower respiratory infections. *PLoS One*. 2017;12(8):e0182520.
30. Pérez-Losada M, Graham RJ, Coquillette M, et al. Tracheal Microbiota in Patients With a Tracheostomy Before, During and After an Acute Respiratory Infection. *Pediatr Infect Dis J*. 2018;37(11):e269-e271.
31. El Cheikh MR, Barbosa JM, Caixêta JAS, Avelino MAG. Microbiology of Tracheal Secretions: What to Expect with Children and Adolescents with Tracheostomies. *Int Arch Otorhinolaryngol*. 2018;22(1):50-54.
32. McCaleb R, Warren RH, Willis D, Maples HD, Bai S, O'Brien CE. Description of Respiratory Microbiology of Children With Long-Term Tracheostomies. *Respir Care*. 2016;61(4):447-452.
33. Sanders CD, Guimbellot JS, Muhlebach MS, Lin FC, Gilligan P, Esther CR Jr. Tracheostomy in children: Epidemiology and clinical outcomes. *Pediatr Pulmonol*. 2018;53(9):1269-1275.
34. Al-Samri M, Mitchell I, Drummond DS, Bjornson C. Tracheostomy in children: a population-based experience over 17 years. *Pediatr Pulmonol*. 2010;45(5):487-493.



35. Lim YW, Evangelista JS 3rd, Schmieder R, et al. Clinical insights from metagenomic analysis of sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2014;52(2):425-437.
36. Feigelman R, Kahlert CR, Baty F, et al. Sputum DNA sequencing in cystic fibrosis: non-invasive access to the lung microbiome and to pathogen details. *Microbiome.* 2017;5(1):20.
37. Periasamy S, Kolenbrander PE. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infect Immun.* 2009;77(9):3542-3551.
38. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):214-240.
39. Gholizadeh P, Pormohammad A, Eslami H, Shokouhi B, Fakhrzadeh V, Kafil HS. Oral pathogenesis of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microb Pathog.* 2017;113:303-311.
40. Belibasakis GN, Maula T, Bao K, et al. Virulence and Pathogenicity Properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens.* 2019;8(4):222.

41. Dickson RP, Erb-Downward JR, Freeman CM, et al. Spatial Variation in the Healthy Human Lung Microbiome and the Adapted Island Model of Lung Biogeography. *Ann Am Thorac Soc.* 2015;12(6):821-830.
42. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184(8):957-963.
43. Gasparin M, Schweiger C, Manica D, et al. Accuracy of clinical swallowing evaluation for diagnosis of dysphagia in children with laryngomalacia or glossoptosis. *Pediatr Pulmonol.* 2017;52(1):41-47.
44. Monasterio FO, Molina F, Berlanga F, et al. Swallowing disorders in Pierre Robin sequence: its correction by distraction. *J Craniofac Surg.* 2004;15(6):934-941.
45. Wang JC, Cordero J, Sun Y, et al. Planktonic Growth of *Pseudomonas aeruginosa* around a Dual-Species Biofilm Supports the Growth of *Fusobacterium nucleatum* within That Biofilm. *Int J Otolaryngol.* 2017;2017:3037191.
46. Marino PJ, Wise MP, Smith A, et al. Community analysis of dental plaque and endotracheal tube biofilms from mechanically ventilated patients. *J Crit Care.* 2017;39:149-155.

47. Lima BP, Shi W, Lux R. Identification and characterization of a novel *Fusobacterium nucleatum* adhesin involved in physical interaction and biofilm formation with *Streptococcus gordonii*. *Microbiologyopen*. 2017;6(3):e00444.
  
48. Nouraei SA, Petrou MA, Randhawa PS, Singh A, Howard DJ, Sandhu GS. Bacterial colonization of airway stents: a promoter of granulation tissue formation following laryngotracheal reconstruction. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132(10):1086-1090.
  
49. Simoni P, Wiatrak BJ. Microbiology of stents in laryngotracheal reconstruction. *Laryngoscope*. 2004;114(2):364-367.
  
50. Quinn RA, Whiteson K, Lim YW, et al. Ecological networking of cystic fibrosis lung infections. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016;2:4.

## **ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nº do projeto GPPG ou CAAE **93356618.0.000.5327**

### **Título do Projeto: Avaliação do Microbioma em Cânulas de Traqueostomia Pediátricas em um Centro Terciário Brasileiro**

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é realizar uma descrição dos principais microorganismos encontradas na traqueostomia das crianças. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Se você concordar com a participação na pesquisa, os procedimentos envolvidos são os seguintes: durante uma consulta, no ato da troca de cânula (realizados de rotina), iremos realizar um exame em que colocamos uma pequena quantidade de soro fisiológico estéril através da traqueostomia, a aspiramos e mandamos a secreção aspirada para o laboratório com a finalidade de analisar quais as bactérias que vivem ali e quais antibióticos que podem ser usados contra elas. Esse procedimento é chamado de aspirado traqueal e, em algumas situações clínicas, já é realizado como parte do atendimento no HCPA. Caso este exame já esteja sendo realizado de forma assistencial, nós iremos acessar o resultado diretamente no prontuário. Caso ele não seja solicitado, esse exame será realizado junto com a troca da cânula de traqueostomia, por médicos pesquisadores. As condições de realização do exame, como o tipo de anestesia dependerão de como a troca da cânula será realizada na rotina.

Além do aspirado traqueal, a cânula de traqueostomia removida durante a troca será armazenada para análise, por um exame chamado metagenômica, que irá identificar presença de microorganismos presentes diretamente na cânula.

As cânulas de traqueostomia são normalmente colonizadas por bactérias e sua presença não implica necessidade de tratamento, exceto quando presentes sinais clínicos de infecção ativa, que serão avaliados pela equipe médica.

Durante o estudo iremos coletar dados clínicos da criança. Tanto na inclusão do estudo quanto nos retornos para troca de cânula iremos preencher um questionário a respeito da rotina dos cuidados da traqueostomia e condições clínicas gerais da criança.

Também iremos acessar o prontuário para ver as condições de saúde da criança (como, por exemplo, o motivo da traqueostomia, infecções e tratamentos realizados) e, se possível, comparar o exame atual com um já realizado antes na rotina.

Os possíveis riscos ou desconfortos decorrentes da participação na pesquisa relacionados ao aspirado traqueal são: se o paciente estiver acordado, pode ocasionar um desconforto temporário devido ao reflexo de tosse, uma queda temporária e rápida no oxigênio do sangue, que melhora após a aspiração, e mais raramente uma queda mais persistente do oxigênio no sangue que necessita de oxigênio inalatório por um curto período de tempo para retornar ao normal. Quando é feito com anestesia geral, não causa tosse e o restante permanece semelhante.

A avaliação da cânula de traqueostomia será realizada laboratorialmente utilizando a cânula removida, que é realizada conforme a rotina hospitalar, e portanto, não oferece nenhum risco adicional ao paciente.

Os possíveis benefícios decorrentes da participação na pesquisa são diretos, pois pode identificar mais rapidamente bactérias possivelmente causadoras de infecção. A partir dessas informações que serão encaminhadas ao médico assistente, poderão ser solicitadas consultas de rotina mais frequentes do que o normal para prevenir ou diagnosticar essas

complicações. Além disso, há benefícios indiretos, pois pode aumentar o conhecimento geral sobre as bactérias que vivem na traqueostomia e identificar aquelas que mais causam complicações.

Rubrica do responsável \_\_\_\_\_ Rubrica do  
pesquisador \_\_\_\_\_

Página 1 de 2

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – responsáveis**

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Cláudia Schweiger ou com o pesquisador Mestrando Leonardo Palma Kuhl, pelo telefone pelo telefone (51) 33598249, ou ainda com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa

\_\_\_\_\_

Assinatura (se aplicável)

\_\_\_\_\_

Nome completo do responsável

\_\_\_\_\_

Assinatura

---

Nome e assinatura do pesquisador que aplicou o Termo

---

Local e Data:

Rubrica do responsável \_\_\_\_\_ Rubrica do pesquisador

\_\_\_\_\_

Página 2 de 2

## ANEXO B – PROTOCOLO DE INCLUSÃO

### PROTOCOLO DE INCLUSÃO IDENTIFICAÇÃO

**Nome:**

\_\_\_\_\_

**Nome da mãe:**

\_\_\_\_\_

**Cuidador:**

\_\_\_\_\_

**Telefone**

**contato:** \_\_\_\_\_

**Cidade:** \_\_\_\_\_

### TRAQUEOSTOMIA

**Data Traqueostomia:** \_\_\_\_\_

**Motivo TQT:**

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**Comorbidades:**

1.  Pneumopatia
2.  Prematuridade
3.  Prematuro extremo
4.  Cardiopatia
5.  Patologia gastro-intestinal
6.  Neuropatia
7. Outras
8. Mais de um acima

**Diagnóstico de aspiração**

0.  Não
1.  Sim
2.  Não se aplica

**História Pneumonia Repetição**

1.  Sim
2.  Não

Prontuário: \_\_\_\_\_

Data Nascimento: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

**Complicações da Traqueostomia  
(últimas 12 meses)**

1.  Obstrução da cânula
2.  Fístula traqueoesofágica
3.  Sangramento
4.  Granuloma periestomal
5.  Granuloma supraestomal
6.  Granuloma traqueal
7.  Decanulação acidental
8.  Colabamento supraestomal
9.  Estenose traqueal
10.  Traqueomalácia
11.  Infecção ambulatorial
12.  Infecção hospitalar
13.  Outras
14.  Mais de uma acima
15.  Nenhuma?

**Procedimentos Realizados:**

1.  Remoção de granuloma supraestomal
2.  Remoção de granuloma periestomal
3.  Supraglotoplastia
4.  Dilatação
5.  Cirurgia de reconstrução de via aérea
6.  Aplicação toxina botulínica
7.  Tratamento cirúrgico em glândulas salivares
8.  Separação laringotraqueal
9.  Adaptação de válvula fonatória
10.  Distração osteogênica
11.  Outros
12.  Mais de um acima
13.  Nenhum

**CÂNULA DE TRAQUEOSTOMIA**

**Data Última Troca:** \_\_\_\_\_

**Número Cânula:** \_\_\_\_\_

**Presença Balonete:**

0.  Não
1.  Sim

**Marca:**

1.  Portex
2.  BCI medical

3.  CPL medical  
4.  CDI medical

**ID Amostra:** \_\_\_\_\_

**Aspecto Cervical:**

0.  Normal  
1.  Granuloma peritraqueostoma

**Endoscopia Via Aérea:**

0.  Não  
1.  Sim  
- 1.  Granuloma supraestomal  
- 2.  Laringe ativa

**Via alimentação:**

1.  Via Oral  
2.  Gastrostomia  
3.  Sonda Nasogástrica  
4.  Sonda Nasoentérica  
5.  Mais de um acima

**Auxílio Ventilatório:**

0.  Não  
1.  Sim, qual?  
- 1.  Ventilação Não Invasiva  
- 2.  Ventilação Mecânica  
- 3.  Oxigênio domiciliar  
- 4.  Não se aplica

**Culturas Prévias (últimos 12 meses)**

0.  Não  
1.  Sim  
- Data  
- Resultado

**Evento Obstrução Parcial Cânula  
(Últimos 3m):**

0.  Não  
1.  Sim  
- Quantos? \_\_\_\_\_

**Decanulação Acidental (Últimos 3 meses)**

0.  Não  
1.  Sim

**Idas a Emergência: (Últimos 3 meses)**

0.  Não  
1.  Sim  
- Motivo de infecção respiratória  
0.  Não

1.  Sim

**Internação Hospitalar: (Últimos 3 meses)**

1.  Não  
2.  Sim

Motivo:

- **Necessidade UTI**

0.  Não  
1.  Sim

**Uso antibiótico: (Últimos 3 meses)**

0.  Não  
1.  Sim

- Motivo de infecção respiratória

0.  Não  
1.  Sim

- Quantos dias: \_\_\_\_\_

- Antibiótico: \_\_\_\_\_



## ANEXO C – PROTOCOLO DA EXTRAÇÃO DE DNA

Quick-Start Protocol

November 2016

### DNeasy® PowerBiofilm® Kit

The DNeasy PowerBiofilm Kit can be stored at room temperature (15–25°C) until the expiry date printed on the box label.

#### Further information

- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: [support.qiagen.com](mailto:support@qiagen.com)

#### Notes before starting

- Warm Solution MBL at 55°C for 5–10 min to dissolve precipitates prior to each use. Solution MBL should be used while still warm.
  - If Solution MR has precipitated, warm at 55°C for 5–10 minutes.
  - Shake to mix Solution PW before use.
  - Use only PowerBiofilm Bead Tubes with this kit.
1. Weigh out 0.05–0.20 g of biofilm material and place into a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Remove excess liquid using a pipette tip. **Note:** Add less saturated samples (e.g. microbial mats) directly to the PowerBiofilm Bead Tube (for information on selecting the right amount of starting material, refer to the Troubleshooting Guide).
  2. Resuspend the biofilm material in 350 µl of Solution MBL and transfer to the PowerBiofilm Bead Tube. For less saturated samples, add 350 µl of Solution MBL to the PowerBiofilm Bead Tube already containing the biofilm material.
  3. Add 100 µl of Solution FB. Vortex briefly to mix.
  4. Incubate the PowerBiofilm Bead Tube at 65°C for 5 min.
  5. Bead beat the sample following one of the methods described below:
    - a) **PowerLyzer® 24 Homogenizer**
      1. Identify each PowerBiofilm Bead Tube on **both** the cap and on the side.
      2. Properly balance the Bead Tubes in the tube holder of the PowerLyzer 24. Homogenize for 1 cycle at 3200 rpm for 30 s.

— Sample to Insight —



---

3. Centrifuge the tube at 13,000 x g for 1 min. Transfer the supernatant to a new 2 ml collection tube (provided).

**Note:** Expect approximately 325–400 µl of supernatant depending on sample material. If the volume falls below this range, use less starting material.

**b) Vortex Adapter**

1. Secure the PowerBiofilmBead Tube horizontally to a Vortex Adapter and vortex at maximum speed for 10 min.

**Note:** If using the 24 place Vortex Adapter for ≥12 preps, increase time by 5–10 min.

2. Centrifuge the tube at 13,000 x g for 1 min at room temperature. Transfer the supernatant to a clean 2 ml collection tube (provided).

**Note:** Expect approximately 400–450 µl of supernatant depending on sample material. If the volume falls below this range, use less starting material.

6. Add 100 µl of Solution IRS and vortex briefly to mix. Incubate at 4°C for 5 min.  
**Note:** Use 200 µl of Solution IRS if the sample is known to contain excessive amounts of inhibitors or the supernatant is very darkly colored. Refer to the Troubleshooting Guide.
7. Centrifuge the tube at 13,000 x g for 1 min at room temperature.
8. Avoiding the pellet, transfer all of the supernatant to a 2 ml collection tube (provided).  
**Note:** Expect approximately 375–450 µl in volume depending on sample material.
9. Add 900 µl of Solution MR and vortex briefly to mix.
10. Load 650 µl of supernatant onto a MB Spin Column and centrifuge at 13,000 x g for 1 min. Discard the flow-through and repeat until all the supernatant has been processed
11. Place the MB Spin Column into a clean 2 ml collection tube (provided).
12. Add 650 µl of Solution PW and centrifuge at 13,000 x g for 1 min at room temperature.
13. Discard the flow-through and add 650 µl of ethanol (provided) and centrifuge at 13,000 x g for 1 min at room temperature.
14. Discard the flow-through and centrifuge again at 13,000 x g for 2 min.
15. Place the MB Spin Column basket into a clean 2 ml collection tube (provided).
16. Add 100 µl of Solution EB to the center of the white filter membrane.
17. Centrifuge at 13,000 x g for 1 min.
18. Discard the MB Spin Column. The DNA is now ready for downstream applications.

For up-to-date licensing information and product-specific disclaimers, see the respective QIAGEN kit handbook or user manual. Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, DNeasy®, PowerBiofilm®, Powerlyzer® (QIAGEN Group). 1104509 11/2016 HB-22314001 © 2016 QIAGEN, all rights reserved.