

**Relatório de Atividades
RCB0300 - Biotecnologia III
2020**

Projeto Microbioma Hospitalar

Grupo 1

Dayane Malta da Silva	10876646
Laura Colete Cunha	10821356
Stéphanie Rosa	9880242
Vitor Menzani	10749571

Ribeirão Preto, 03 de fevereiro de 2021

1. Descrição do objetivo geral do projeto.

Nesse projeto foi analisado o microbioma de locais de alta circulação nas áreas internas e externas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC). No caso desse grupo, focou-se em seis áreas internas. O objetivo era verificar diferenças de abundância (quantidade) e tipos de bactérias (qualidade) entre os filotes e identificar os focos de infecção. Através dessa análise foi possível verificar o fluxo de bactérias e identificar quais poderiam estar relacionadas com alguma infecção hospitalar. O estudo da interação dessas bactérias com o ambiente é essencial para desenvolver procedimentos profiláticos adequados e descobrir possíveis rotas de contaminação hospitalar.

2. Perguntas definidas pelo grupo.

- Quais são as bactérias predominantes na área interna do HC nos anos de 2018 e 2019? Há variação dos filotes de bactérias entre os anos e locais?
- Quais as bactérias associadas a um maior risco à saúde? Essas bactérias estão presentes nas amostras?
- Qual a diversidade de bactérias nos diferentes ambientes hospitalares? Qual a alfa e beta diversidade?
- Os funcionários podem ser considerados vetores de microrganismos? O que queremos saber sobre estes funcionários que pode influenciar a probabilidade que eles contaminam o quarto ou os pacientes com bactérias ?

3. Descrição dos locais de coleta escolhidos pelo grupo

O grupo planejou coletar 12 tubos de amostras, no entanto só foi possível coletar amostra para apenas dez tubos devido a falta de material no momento da coleta. As amostras foram coletadas de seis locais diferentes na área interna do HC. Os locais são:

- UETDI (Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas)
 - *Tubo 1*: bancada, maçaneta da porta corta-fogo, botão do elevador e telefone
 - *Tubo 2*: para cadeira de espera, corrimão da rampa e bancada da recepção (não recebeu material pois faltou swab)

- Enfermaria de Oncologia - Quimioterapia
 - *Tubo 3*: balcão da recepção, lixo e braço da cadeira de rodas
 - *Tubo 4*: teclado, mouse e cadeiras da sala de serviço social (não recebeu material pois faltou swab)

- Corrimão das escadas dos docentes e residentes
 - *Tubos 5 e 6*: andares 5, 4, 3, 2 e 1

- CTI Adulto (Centro de Tratamento Intensivo)
 - *Tubo 7*: botões e apoio do aparelho de ECG, botões e visor da balança, apoio e braço da maca
 - *Tubo 8*: teclado, mouse, telefone, braço da cadeira, suporte móveis de lençóis, maçaneta

- HC Criança
 - *Tubo 9*: superfície de brinquedos e cadeiras da recepção
 - *Tubo 10*: balcão da recepção, brinquedos, braço da cadeira de rodas, cadeiras da sala de espera

- Elevadores dos docentes e residentes
 - *Tubo 11*: botão de chamada do 1° andar e botões internos
 - *Tubo 12*: botões de chamada dos demais andares (12 andares)

★ *Dificuldades e facilidades*

Uma das dificuldades que o grupo teve foi a falta de material para coleta. Seria interessante nos próximos anos preparar material extra a fim de prevenir situações como essa.

Apesar de terem sido coletadas amostras de diversos locais, o tipo de transporte que os usuários do HC utilizam, sejam eles funcionários ou pacientes, também precisa ser analisado. Além disso, é necessário investigar de maneira detalhada a rotina de limpeza, assim como quais produtos estão sendo utilizados, uma vez que eles podem não ser tão eficientes e permitir a propagação de bactérias patogênicas, selecionando assim as mais resistentes.

4. Descrição da extração de DNA das amostras coletadas

I. Solução estabilizadora

- TRIS - 10mM - 1M
- EDTA 10 mM-0,5M
- NaCl 100 mM- 5M
- SDS 0,5%- 10%
- Proteinase K 0,1 mg/ml - 20mg/ul
- Água (completar com água)
- Solução final= 10 ml

II. Retirar da solução-mãe (1 ml)

❖ $C_i.V_i = C_f.V_f$

- *TRIS*
 $1.V_i = 10.10^{-3}.10$
 $V_i = 0,1 \text{ ml ou } 100 \text{ ul}$

- *EDTA*
 $0,5.V_i = 10.10^{-3}.10$
 $V_i = 0,2 \text{ ml ou } 200 \text{ ul}$

- *NaCl*
 $5.V_i = 100.10^{-3}.1$
 $V_i = 0,2 \text{ ml ou } 200 \text{ ul}$

- *SDS*
 $10.V_i = 0.5.10$
 $V_i = 0,5 \text{ ml ou } 500 \text{ ul}$

- *Proteinase K*
 $20.V_i = 0.1.10$
 $V_i = 0,05 \text{ ml ou } 50 \text{ ul}$

- *Água*
 $8,95 \text{ ul}$

III. PROCOLO DE EXTRAÇÃO (KIT POWER SOIL)

- 1- Adicionar 500 ul das amostras nos tubos powerbead
- 2- Vortexar gentilmente
- 3- Se a solução C1 estiver precipitada aquecer até 60°C até que dissolva
- 4- Adicione 60ul de solução C1 na amostra. Vortexar brevemente
- 5- Prender os tubos Powerbead horizontalmente usando o adaptador MO BIO
Vortexar em velocidade máxima por 10 minutos
- 6- Centrifugue os tubos a 10,000 x por 1 minuto a temperatura ambiente

- 7-Transferir o sobrenadante para um tubo Collect limpo
- 8-Adicione 250ul de solução C2 E vortex por 5 segundos. Incubar por 5 minutos a 4 °C
- 9- Centrifugar todos os tubos na temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 g
- 10- Transferir todo o volume do sobrenadante para um tubo collection de 2 ml, evitando o pellet
- 11-Adicionar 200ul de solução C3 e vortexar levemente. Incubar por 5 minutos a 4 °C
- 12- Centrifugar todos os tubos na temperatura ambiente por 1 minuto a 10,000 g
- 13- Transferir todo o volume do sobrenadante para tube collection de 2 ml, evitando o pellet
- 14- Misture a solução C4 antes de usar. Adicione 1200 ul da solução c4 ao sobrenadante e vortex por 5 segundos
- 15- Adicione aproximadamente 675 ul no spin filter e centrifugar novamente a 10,000 xg por 1 minuto a temperatura ambiente
- 16- Adicione 500 ul da solução C5 e centrifugar a 10.000xg por 30 segundos a temperatura ambiente
- 17- Descarte o que passou
- 18- Centrifugue de novo a 10,000 xg por 30 segundos a temperatura ambiente
- 19- Coloque carinhosamente o spin filter em um tubo collection de 2 ml
- 20- Adicione 50 ul da solução c6 no centro do filtro
- 21- Centrifugue a 10.00 xg por 30 segundos a temperatura ambiente
- 22- Descarte o spin filter

5. Descrição da quantificação e da avaliação de qualidade do DNA extraído

PROCOLO DE QUANTIFICAÇÃO E ANÁLISE DA QUALIDADE

- 1- Diluir 10 µL de DNA purificado tratado com RNase em 90 µL de TE.

- 2- Medir a absorção em 230 nm, 260 nm e 280 nm com um espectrofotômetro NanoDrop
- 3 - Corrigir os valores de A280 e A260 ao subtrair A230 deles
- 4 - Calcular a concentração de DNA a partir da Lei de Lambert–Beer
 - $[DNA] \text{ (ng/}\mu\text{L)} = A260 * 10 * 50$ (fator de conversão)
- 5 - Avaliar a pureza das amostras pelo cálculo das razões A260/A280 e A260/A230 (Tabela 1)

Razão	Pode indicar	Valor esperado
A260/A280	contaminação por proteínas	entre 1,5 e 2,0
A260/A230	contaminação por tampões e outros compostos	entre 2,0 e 2,2

Tabela 1: Razões entre absorbâncias de uma mesma amostra de DNA que indicam sua pureza. A280 sinaliza a concentração de proteínas em uma solução devido a absorção de luz com esse comprimento de onda por aminoácidos aromáticos. A230 pode sinalizar concentração de outros componentes.

6. Descrição da preparação das bibliotecas de NGS para a região hipervariável ribossomal 16S

O sequenciamento genômico permite que informações como mutações, modificação na expressão gênica, presença de transposons, modificações metabólicas e estrutura e função dos genes sejam analisadas (Nierman et al., 2000). A tecnologia NGS (Next Generation Sequencing), começou a ser comercializada em 2005 e desde então permitiu com que o sequenciamento passasse de alguns kilobases para milhões de pares de bases em uma única corrida.

Apesar da diversidade de tecnologias de sequenciamento, como o método Sanger, o NGS tem se tornado um dos métodos mais utilizado pelos pesquisadores, uma vez que possui vantagens como o baixo custo e tempo de corrida reduzido, resultando em uma maior quantidade de projetos em que o objetivo é sequenciar genomas inteiros (Schendure e Ji, 2008).

Embora existam algumas plataformas para o desenvolvimento do Sequenciamento de Nova Geração, será focado na plataforma Illumina. O princípio desse método baseia-se na síntese da fita complementar de DNA por meio da enzima DNA polimerase, onde são adicionados adaptadores, primer, nucleotídeos não modificados e didesoxinucleotídeos terminadores reversíveis contendo fluoróforos.

No preparo da biblioteca deve-se primeiramente clivar o DNA coletado para o sequenciamento. Os fragmentos gerados pela técnica de nebulização, ligam-se através dos adaptadores (plataforma illumina) a outros adaptadores complementares contidos em uma placa, gerando várias cópias do mesmo fragmentos pela tecnologia PCR até a formação de milhares de clusters. O uso de fluoróforos nessa técnica permite visualizar por bioinformática a fluorescência emitida por cada base possibilitando o sequenciamento.

7. Descrição do protocolo de sequenciamento da biblioteca da região hipervariável ribossomal 16S

O protocolo de sequenciamento foi realizado pela tecnologia de nova geração (NGS) seguindo a metodologia criada pela plataforma Illumina. O DNA fragmentado pelo processo de nebulização é adicionado a adaptadores (Figura 2- A). A partir disso tem-se a mistura de DNA com os adaptadores que é colocada em uma placa especial contendo adaptadores complementares. Neste sentido, os fragmentos de DNA ligam-se à placa (Figura 2-B). Na etapa seguinte são adicionados nucleotídeos (A, T, C e G) não modificados para que ocorra o processo de amplificação juntamente com a DNA polimerase (Figura 2-C). Após esse passo, o DNA amplificado é desnaturado até que a fita se rompa em dois fragmentos (Figura 2- D e E). Todo o processo recomeça quando o DNA amplificado é ligado novamente a adaptadores livres (Figura 2- F) até a formação de vários clusters (Figura 2-G). Por fim, adiciona-se nucleotídeos modificados com fluoróforos, isso permite com que luz fluorescente seja emitida por meio da incidência de um laser responsável por excitar esses fluoróforos. Nas etapas seguintes

(Figura 2- I, J, K e L) a emissão de luz é detectada e pela análise de bioinformática é possível fazer o sequenciamento.

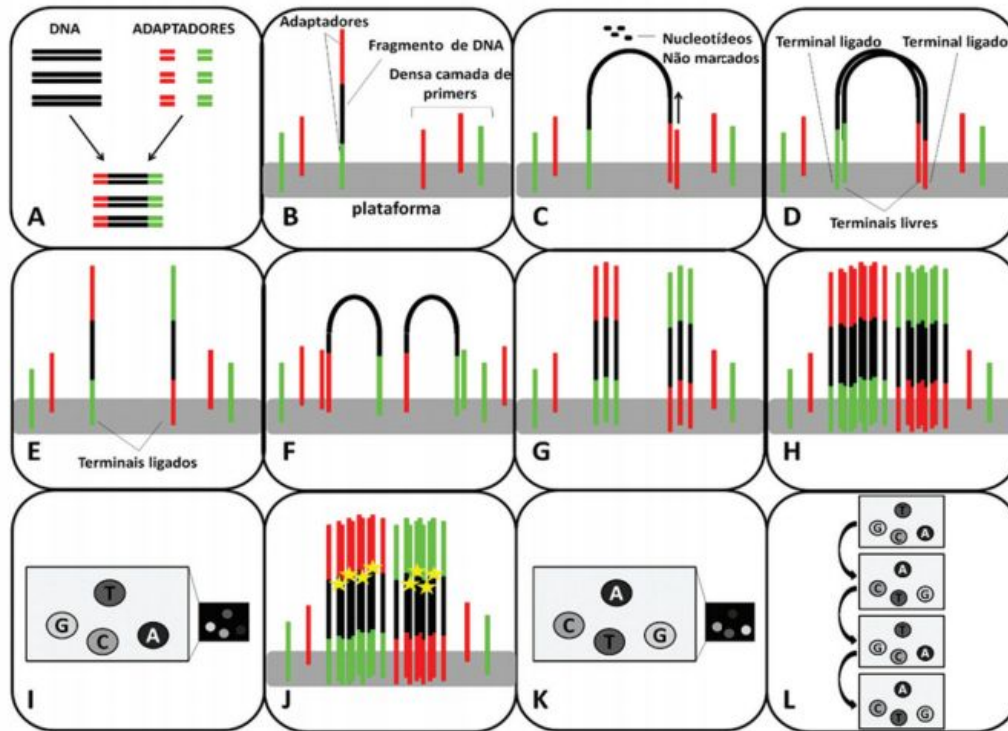


Figura 1: Descrição do funcionamento da plataforma Illumina (NGS)

8. Descrição da análise de qualidade do sequenciamento da biblioteca de hipervariável ribossomal 16S

A análise dos resultados do sequenciamento revelaram uma grande variabilidade entre as quantidades de leituras das diferentes amostras (Figura 2). Primeiramente, foram excluídas amostras coletadas em 2017. Em seguida, os dados foram filtrados com as configurações padrões do Microbiome Analyst, que determinaram a eliminação de features com poucas leituras em poucas amostras e features com pouca variância. Por fim, para possibilitar análises comparativas, foi abordada a variabilidade entre as quantidades de leituras pela normalização dos dados.

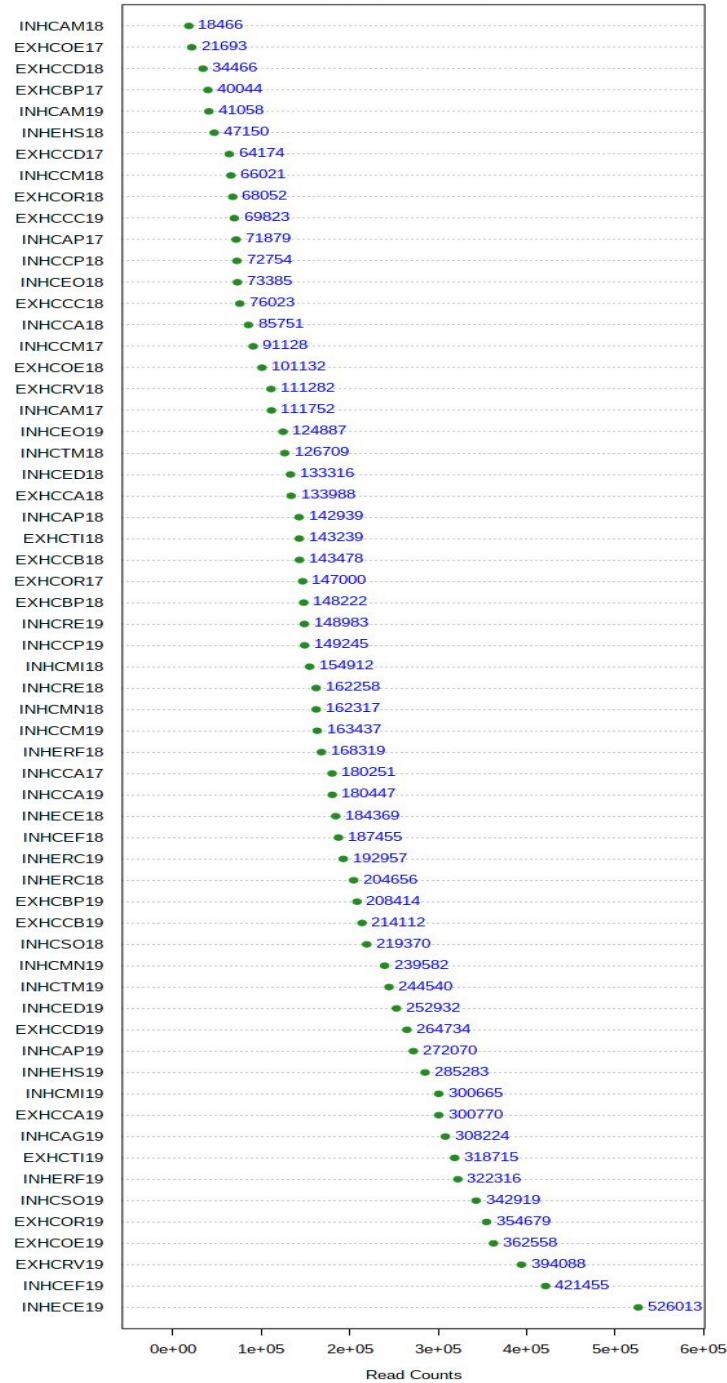
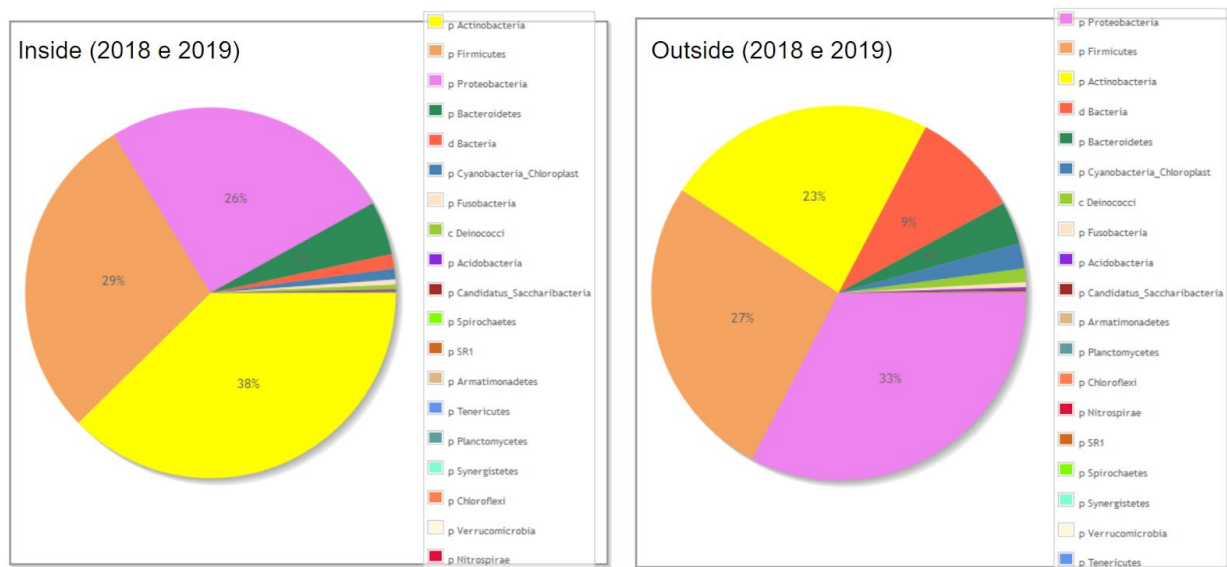


Figura 2: Visão geral sobre o tamanho da biblioteca. Mostra as quantidades de leituras para cada amostra antes da filtragem e normalização dos dados. Revela uma grande variabilidade entre as amostras, sugerindo necessidade de normalização.

9. Descrição dos resultados da análise dos dados do Microbiome Analyst

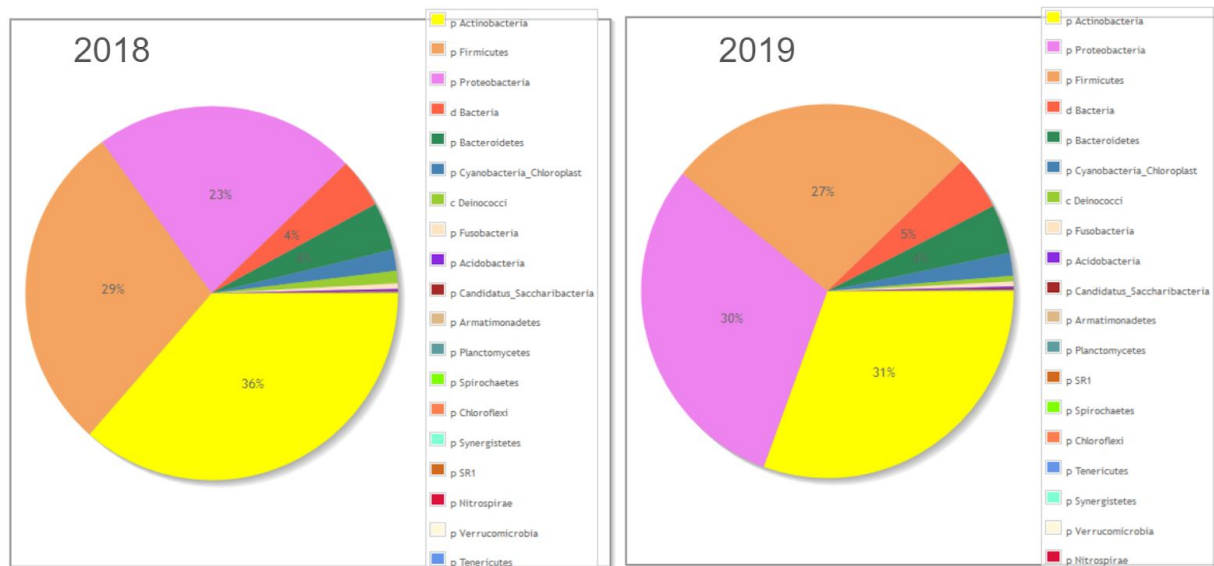
I. Quais são as diferenças de abundância quantitativa e qualitativa entre os filios nos anos de 2018 e 2019, considerando-se os locais de coleta?

A presença dos filios *Firmicutes*, *Actinobactérias* e *Bacteroidetes* é maior no ambiente interno do hospital enquanto que a *Proteobacteria* é mais presente no ambiente externo do hospital (fig 3). Já comparando as diferenças anuais é visível o aumento de *Actinobacteria* de 2018 para 2019 e a redução de *Firmicutes* e *Proteobactérias* (fig 4).



Filo	Inside (%)	Outside (%)	Inside/Outside
Proteobactéria	26	33	0,78
Firmicutes	29	27	1,07
Actinobactéria	38	23	1,65
Bacteroidetes	5	4	1,25

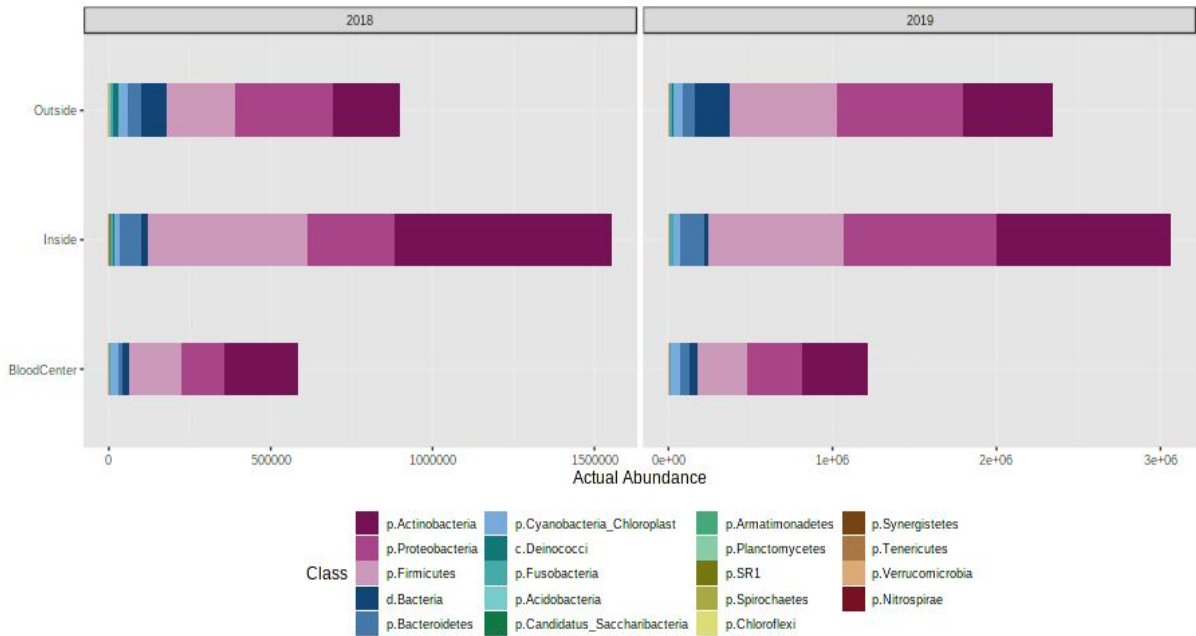
Figura 3: Porcentagem dos principais filios dentro (inside) e fora (outside) do HC nos anos de 2018 e 2019. A tabela mostra relação Inside/Outside para os filios mais abundantes. Observe que a presença de *Firmicutes*, *Actinobactérias* e *Bacteroidetes* é maior no ambiente interno.



Filo	2018 (%)	2019 (%)	2018/2019
Actinobactéria	36	31	1,16
Firmicutes	29	30	0,96
Proteobactéria	23	30	0,76
Bacteroidetes	4	4	1

Figura 4: Porcentagem dos principais filios nos anos de 2018 e 2019. Tabela mostra relação 2018/2019 para os filios mais abundantes. Observe que a *Actinobacteria* aumentou de 2018 para 2019, porém houve redução de *Firmicutes* e *Proteobactérias*.

Na parte externa do hospital, do ano de 2018 para 2019, houve um aumento de Actinobacterias, Proteobacterias e Firmicutes. Na parte interna, entre 2018 e 2019, houve o aumento de Proteobacterias, mas um declínio de Actinobacterias e Firmicutes. Já no Hemocentro, houve apenas um pequeno aumento de Proteobacterias e uma pequena queda de Actinobacterias (fig 5).



Filo	BloodCenter (Actual Abundance)		Inside (Actual Abundance)		Outside (Actual Abundance)	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019
c.Deinococci	455	426	1003	1228	3892	1099
p.Acidobacteria	162	202	245	373	655	396
p.Actinobacteria	26900	21210	100933	89544	36617	36347
p.Bacteroidetes	2148	3140	10600	13336	7108	6361
p.Candidatus_Saccharibacteria	75	118	234	259	160	232
p.Cyanobacteria_Chloroplast	3613	3763	1653	3068	4576	3149
p.Firmicutes	18050	17476	76021	68508	37654	44259
p.Fusobacteria	234	212	1013	1286	840	572
p.Proteobacteria	18147	22709	41734	74463	54549	55760

Figura 5: Abundância real dos diferentes Filos de bactérias nos anos de 2018 e 2019 na área externa do HC (outside), na área interna (Inside) e no Hemocentro (Blood Center). Na parte inferior da figura os 9 filios mais abundantes com a abundância real em cada área e ano de coleta.

II. Para os filios que apresentarem variação quantitativa entre os anos e/ou locais de coleta, quais são os prováveis gêneros ou espécies de bactérias que são patogênicas, e que podem estar influenciando as variações identificadas?

A tabela a seguir mostra gêneros e espécies associados aos filios que mais sofreram variação entre os anos de 2018 e 2019 e um exemplo de doença associada a cada gênero ou espécie.

Filo	Gêneros e Espécies	Doenças associadas
Actinobacteria	<i>Actinomyces</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Propionibacterium</i>	Actinomicose, Difteria, Hanseníase, Nocardiose, acne.
Proteobacteria	<i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> <i>Cholerae</i> , <i>Helicobacter</i>	Diarreia, intoxicação alimentar, cólera, gastrite e úlcera péptica.
Firmicutes	<i>Clostridium</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>Mycoplasma</i> <i>genitalium</i> , <i>Mycoplasma</i> <i>pneumoniae</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Enterococcus</i> <i>faecalis</i> , <i>Listeria</i> .	Botulismo, escarlatina, Erisipelóide, Uretrite, pneumonia bacteriana atípica, Antrax, intoxicação alimentar, infecção urinária, listeriose

Tabela 2: Na primeira coluna os filios que mais sofreram variação entre os anos de 2018 e 2019, na segunda coluna gêneros ou espécies associados a patologias humanas e na terceira coluna é um exemplo de doença associada a cada gênero ou espécie dito na segunda coluna.

III. Refazendo as análises selecionando o gênero como opção podemos observar a presença dos gêneros sugeridos anteriormente?

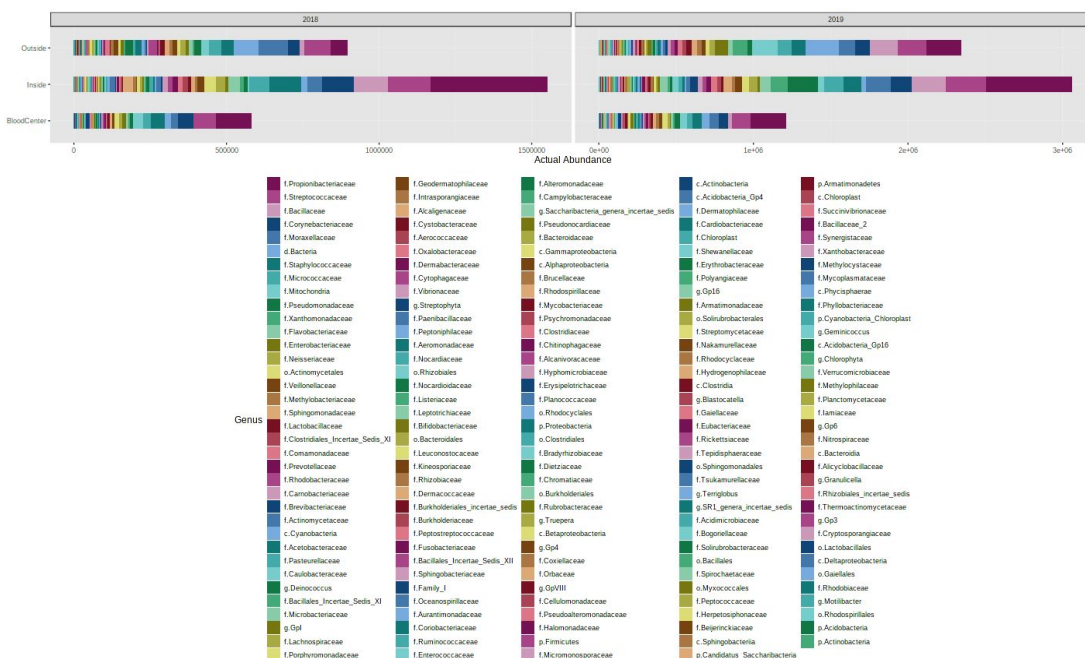


Figura 6: Abundância real das diferentes famílias de bactérias nos anos de 2018 e 2019 na área externa do HC (outside), na área interna (Inside) e no Hemocentro (Blood Center).

Nos anos de 2018 e 2019 o pode-se observar que o grupo mais abundante de bactérias à nível de família no ambiente interno do HC foi de Propionibacteriaceae, que são bactérias gram positivas encontradas principalmente em produtos lácteos e no trato gastrointestinal (Ver figura 6). Em segundo lugar há a família Streptococcaceae, também tratam-se de bactérias gram-positivas, nessa família se encontram os gêneros lactococcus e streptococcus, esses últimos estão presentes no microbioma humano da pele, intestino, boca bem como no trato respiratório superior. Portanto, parece natural que essas duas famílias estejam em abundância no ambiente hospitalar interno, pois fazem parte do microbioma humano e dos alimentos que consumimos.

Já no ambiente externo, em 2018 a família mais abundante é a Moraxellaceae constituída por gammaproteobacterias abundantes no solo e água, em segundo lugar temos novamente a família Streptococcaceae, sendo que em 2019 essas posições se invertem e a família Streptococcaceae, por sua vez, torna-se mais abundante, o que talvez indique uma maior movimentação de pessoas no ambiente externo.

A Família Bacillaceae é bem presente no ambiente interno do ano de 2018 e 2019 e aumenta no ambiente externo do ano de 2019, trata-se de uma família de bactérias gram-positivas capazes de formar endósporos, encontrada especialmente no solo e plantas, a maioria não é patogênica, mas algumas do gênero bacillus são conhecidas por causarem doenças em humanos, como o *B. anthracis*, que causa Carbúnculo; e *B. cereus*, que causa intoxicação alimentar.

Outra família que aumentou no ambiente interno no ano de 2019 foi a Corynebacteriaceae, bactérias gram-positivas e aeróbias. A maior parte dessas bactérias vivem em situação comensal com a microbiota de seus hospedeiros animais, inclusive de humanos. Mas algumas são patogênicas, como a *C. diphtheriae*, citada na tabela 2, e podem causar infecções oportunistas através de feridas, especialmente em pacientes imunodeprimidos. De modo geral as famílias e gêneros que sofreram aumento não foram os mesmos previstos na tabela 2.

IV. Análise da alfa diversidade

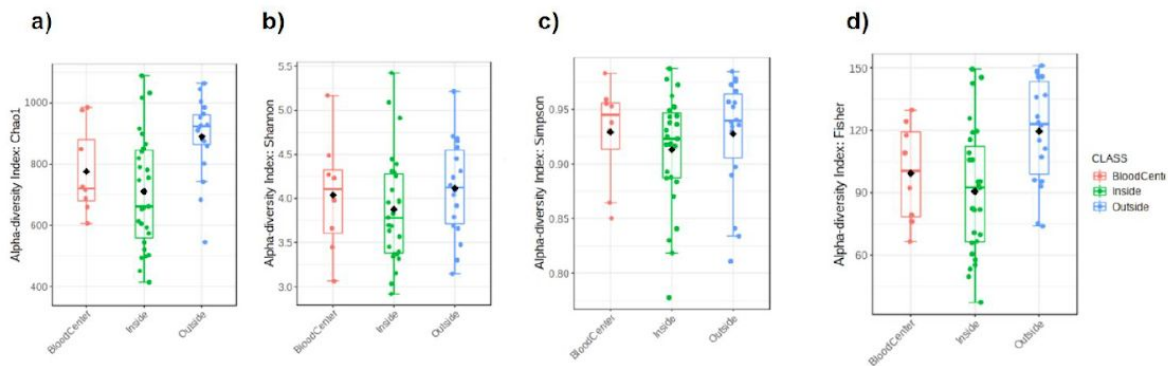
A. Conceito de alfa diversidade.

Alfa diversidade equivale à diversidade das espécies dentro de um mesmo local ou habitat. Pode ser definida como a riqueza de espécies observadas dentro de um habitat.

B. Análise da alfa diversidade por zona e ano. Para cada análise, há diferenças entre as medidas de diversidade Chao1, Shannon, Simpson e Fisher?

Em todos os métodos, Shannon, Chao1, Fisher e Simpson a área externa do HC apresenta maior média de alfa diversidade, exceto no método de Simpson, em que alfa diversidade da área externa e interna são similares (fig 7, fig 8).

Quanto aos anos, nos métodos de Chao1 e Fisher, a alfa diversidade foi maior no ano de 2018. Já nos métodos de Shannon e Simpson, a alfa diversidade entre os dois anos é muito similar, apontando apenas um aumento muito pequeno no ano de 2019 (fig 9, fig 10).



e)

Local/ Método	Chao1	Shannon	Simpson	Fisher
Inside	800	4	0,925	105
Outside	900	4,125	0,925	120
Bloodcenter	700	3,9	0,9125	90

Figura 7: Boxplot dos valores de alfa diversidade nos anos de 2018 e 2019 no Hemocentro (Blood Center, em vermelho), Hospital das Clínicas área interna (inside, em verde) e área externa (outside, em

azul) para cada medida de diversidade. a) Índice de Chao1. b) Índice de Shannon. c) Índice de Simpson. d) Índice de Fisher. e) tabela com valores aproximados da média obtida em cada método para área interna e externa do HC e hemocentro.

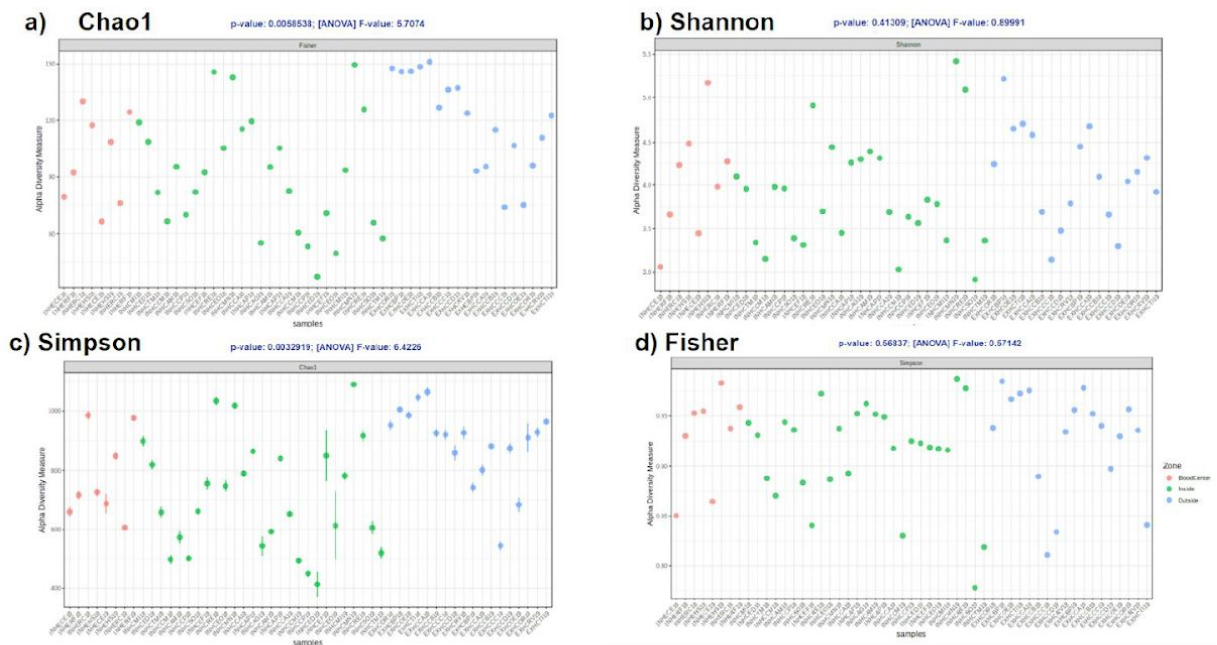
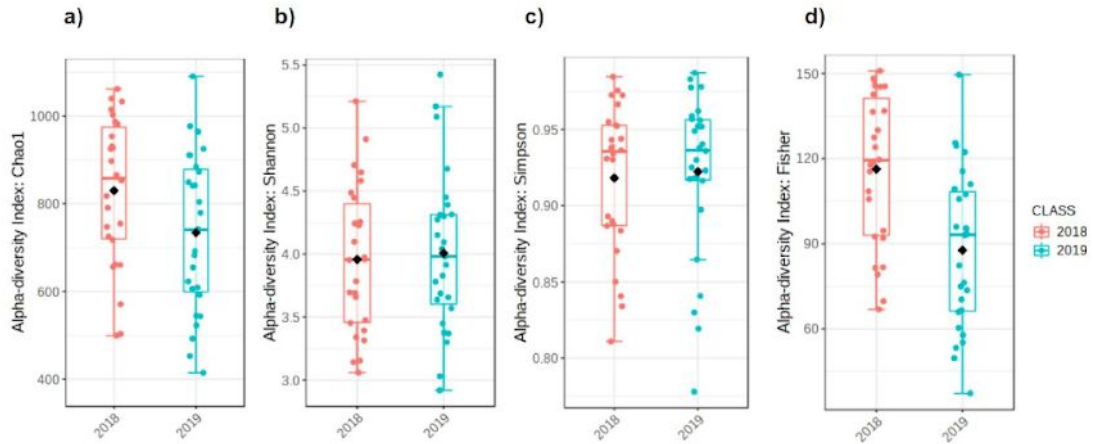


Figura 8: Valores de alfa diversidade em 2018 e 2019 de cada amostra obtida do hemocentro (Blood Center, em vermelho), do Hospital das Clínicas área interna (inside, em verde) e da área externa (outside, em azul) para cada medida de diversidade. a) Índice de Chao1. b) Índice de Shannon. c) Índice de Simpson. d) Índice de Fisher

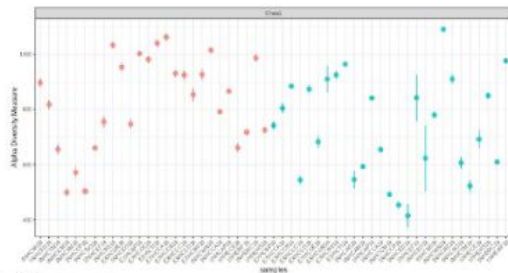


e)

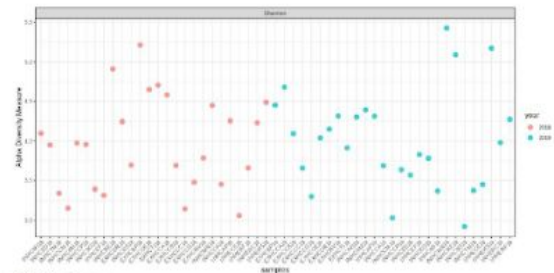
Ano/ Método	Chao1	Shannon	Simpson	Fisher
2018	830	3,9	0,925	119
2019	750	4	0.920	83

Figura 9: Valores de alfa diversidade em 2018 (vermelho) e 2019 (azul) para cada medida de diversidade. a) Índice de Chao1. b) Índice de Shannon. c) Índice de Simpson. d) Índice de Fisher. e) Tabela com valores aproximados da média obtida em cada método para os anos de 2018 e 2019.

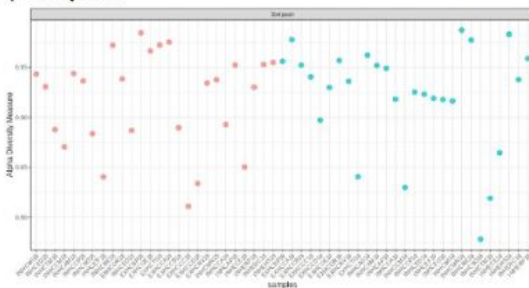
a) Chao1



b) Shannon



c) Simpson



d) Fisher

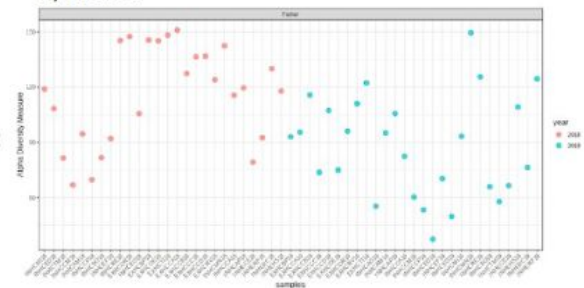


Figura 10: Valores de alfa diversidade por amostra em 2018 (vermelho) e 2019 (azul) para cada medida de diversidade. a) Índice de Chao1. b) Índice de Shannon. c) Índice de Simpson. d) Índice de Fisher.

V. Análise de beta diversidade:

A. Conceito de beta diversidade.

Beta diversidade se refere à variação da composição das espécies em um local em comparação a outros locais (amostras, comunidades dentre outros). Pode ser definida como a razão entre a diversidade regional e local de espécies (RICOTTA, 2017).

B. Análise da beta diversidade por zona e ano;

No geral, as amostras nos anos e nas zonas tiveram uma grande sobreposição, indicando que a diversidade era similar. Porém, houveram grupos outliers, como INHDMI19 (UETDI: Unidade Especial de Tratamento de Doenças Infecciosas) que estavam fora da beta diversidade esperada para a zona Inside (fig 11). Analisando a Beta diversidade dos de 2018 e 2019 também houveram outliers, a saber: INHDMI19 (UETDI), EXHCOR19 (Ponto de ônibus) e EXHCRV18 (Cantina) (fig 12).

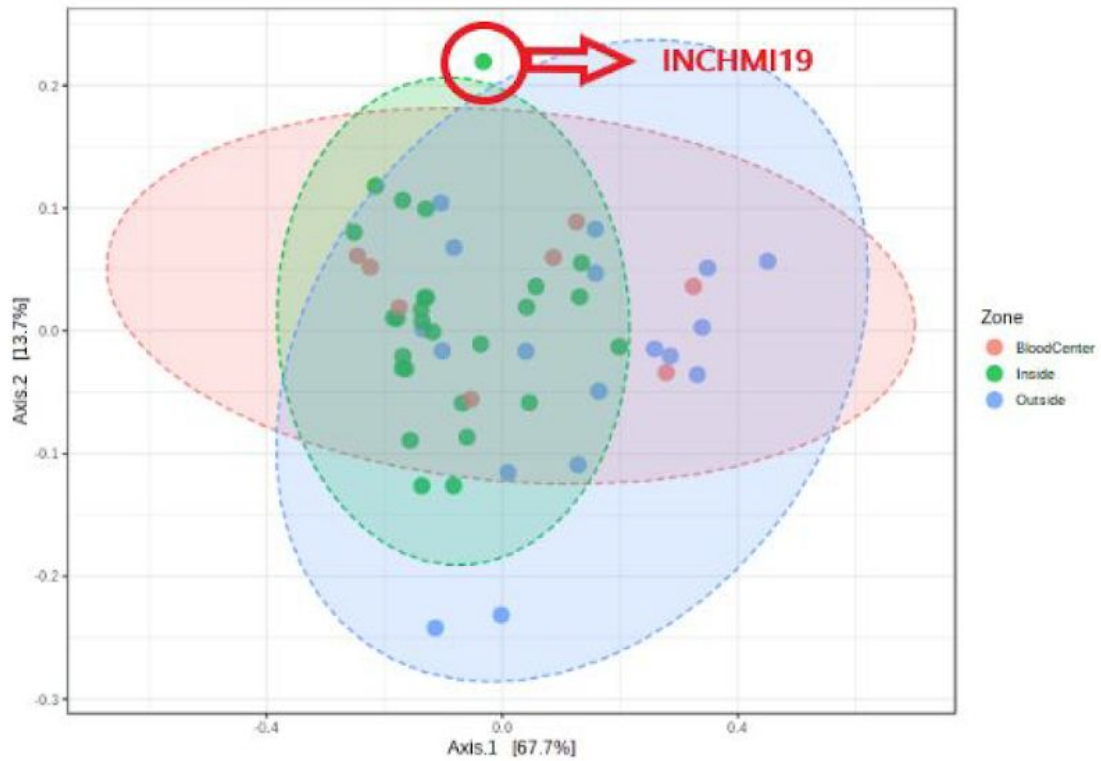


Figura 11: Gráfico PcoA; Beta diversidade a nível de filo em 2018 e 2019 entre as amostras obtidas do hemocentro (Blood Center, em vermelho), do Hospital das Clínicas área interna (inside, em verde) e da área externa (outside, em azul).

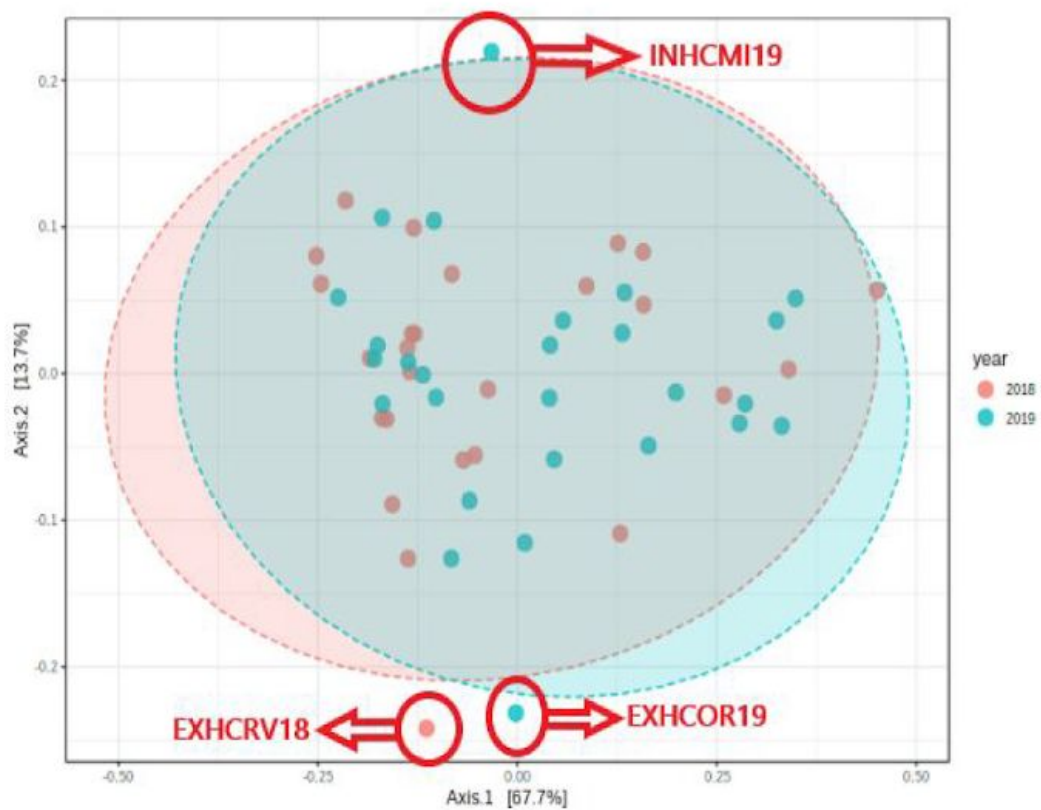


Figura 12: Gráfico PcoA; Beta diversidade a nível de filo em 2018 (vermelho) e 2019 (azul) das amostras obtidas do hemocentro e do Hospital das Clínicas.

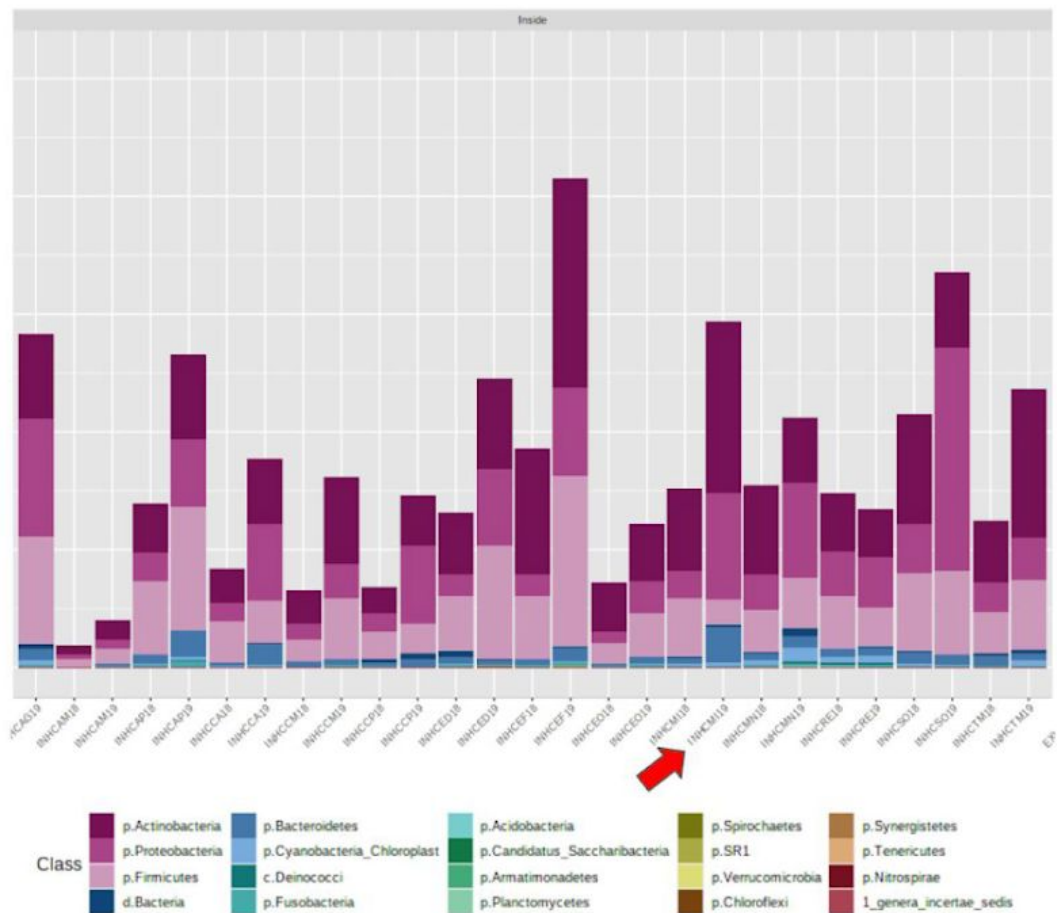


Figura 13: Análise de bactérias (filo) com padrão outlier no setor de unidades infecciosas do HC no ano de 2018 e 2019.

Observa-se também um aumento do filo Bacteroidetes na amostra INHCMI19 quando comparada às demais da área interna do hospital (fig 13). Esse filo comporta três principais classes: as flavobactérias, bacteroides e sphingobacterias. Flavobactérias são bactérias gram-negativas em forma de bastonete que são encontradas no solo e na água doce de diversos locais. Várias espécies causam doenças em peixes de água doce (PILARSKI, 2008). Bacteroides são bactérias anaeróbicas gram-negativas em forma de bacilo. Elas são normalmente mutualistas e constituem uma porção considerável da microbiota intestinal (WEXLER, 2007).

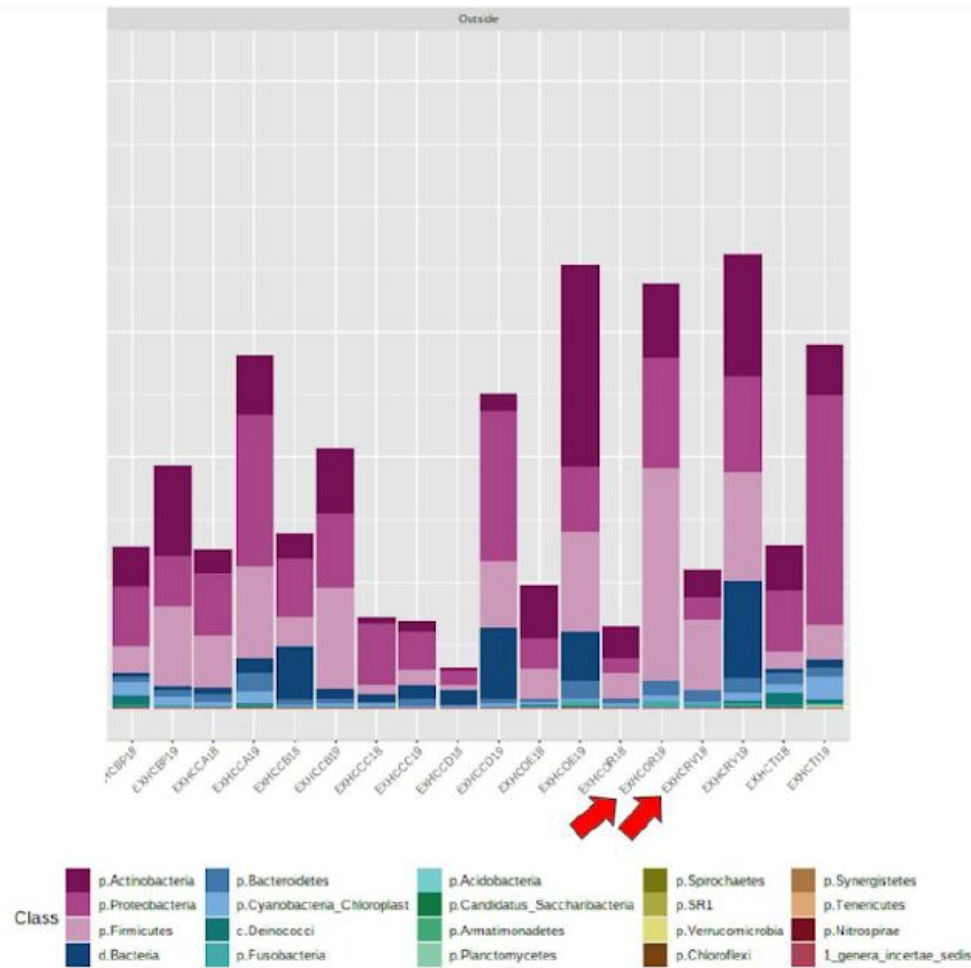


Figura 14: Análise dos filis da área externa mais especificamente das cadeiras ao lado da cantina do Valter (EXHCRV18) e Ponto de Ônibus (EXHCOR19) no Hospital das Clínicas

Há uma prevalência de bactérias do filo firmicutes tanto na área da cantina como no ponto de ônibus. Já na área do ponto de ônibus também observa-se um pequeno aumento das proteobactérias quando comparado às outras áreas do hospital (fig 14). As bactérias do filo firmicutes são gram positivas e apesar de não estarem comumente associadas a doenças patogênicas, estão amplamente presente no intestino de indivíduos obesos. Esse filo gera uma atividade metabólica que facilita o armazenamento de calorias ingeridas, além de ser capaz de extrair mais energia de dietas calóricas quando comparados a indivíduos saudáveis (Moreira, 2018). Nesse

sentido, é esperado o aumento desse filo no ambiente da cantina hospitalar bem como nas áreas ao redor do ponto de ônibus, onde há constantemente pessoas alimentando-se devido a proximidade com a cantina, esse dado pode ser explicado pelo fato de os lanches comumente vendidos ser mais calóricos do que uma dieta saudável.

Apesar de o filo das firmicutes não estarem geralmente associados a doenças patogênicas, as proteobactérias presentes no ponto de ônibus estão comumente associadas a processos inflamatórios e inclui uma ampla diversidade de espécie como a *Escherichia*, *salmonella*, *vibrio* e *helicobacteria*. A *salmonella*, por exemplo, é uma espécie relacionada difundida por contaminações alimentares como a *S. typhi*, causadora da febre tifóide que leva o paciente a desenvolver, além da febre septicemia, diarreia e vômitos (Shinohara, 2008). Portanto, a presença desses microrganismos no ponto de ônibus pode indicar tanto um sobrepeso pela presença das firmicutes, quanto um aumento de doenças transmitidas por alimentos, pela presença das proteobactérias.

C. Conceito de "core microbiome" e análise por zona e ano.

"Core microbiome" se refere à prevalência de determinados microorganismos em uma comunidade microbiana.

Analisando-se os anos e todas as áreas, isto é, no geral, há uma prevalência de *Propionibacterium* e *Streptococcus*. Na área interna predominam ($p=1$) *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium* e *Staphylococcus*. Enquanto que na área externa, assim como no Hemocentro, predominam ($p=1$) *Propionibacterium* e *Streptococcus* (ver tabela 3 e figura 15).

O gênero *Rothia* teve $p>0,6$ somente na área interna do HC, enquanto que o gênero *Methylobacterium* teve $p>0,6$ na área externa. O hemocentro não teve nenhum gênero exclusivo com $p>0,6$. (Tabela 3)

O gênero *Methylobacterium* abrange espécies imóveis e aeróbicas que habitam geralmente solo ou folhas. Muito raramente, espécies desse gênero podem infectar humanos hospitalizados, podendo causar infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos. Quando essas bactérias são detectadas em hospitais,

geralmente são encontradas em água de torneira e endoscópios. Elas possuem uma certa capacidade de resistir à higienização porque formam biofilmes e podem exibir tolerância a agentes de limpeza e desinfecção e a altas temperaturas e secagem (KOVALEVA; DEGENER; MEI, 2014) .

Rothia spp. são cocos-bacilos Gram-positivos que causam várias infecções graves, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos, mas raramente foi relatada em hospedeiros saudáveis. Essas bactérias fazem parte da comunidade normal de micróbios residentes na boca e no trato respiratório. *Rothia* spp. estão associadas às cáries dentárias e doença periodontal. As síndromes clínicas associadas à infecção por *Rothia* incluem bacteremia, endocardite, meningite, peritonite, infecções ósseas e articulares, pneumonia, infecção de pele e tecidos moles, endoftalmite e infecção de dispositivo protético (RAMANAN, 2014).

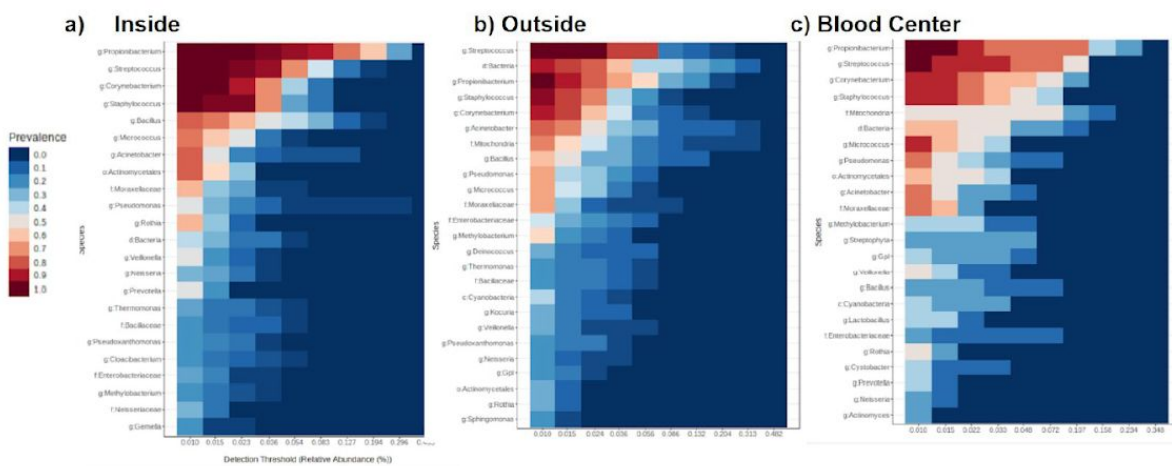


Figura 15: Predominância de gêneros de bactéria nos anos de 2018 e 2019 nas diferentes zonas. a) HC parte interna, b) HC parte externa e c) Hemocentro.

Área	Gênero p=1	Gênero p ≥ 0,6
Inside	Propionibacterium, Streptococcus, Corynebacterium e Staphylococcus	Propionibacterium, Streptococcus, Corynebacterium, Staphylococcus, Bacillus, Micrococcus, Actinebacter, Actinomicetales, Moraxellaceae, Rothia
Outside	Propionibacterium e Streptococcus	Propionibacterium, Streptococcus, Corynebacterium, Staphylococcus, Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Methylobacterium , Actinebacter, Moraxellaceae, Micrococcus
Bloodcenter	Propionibacterium e Streptococcus	Propionibacterium, Streptococcus, Corynebacterium, Staphylococcus, Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Actinebacter, Actinomicetales, Moraxellaceae

Tabela 3: Gêneros bacterianos com prevalência igual a 1 (p=1) em cada área analisada e gêneros bacterianos com prevalência igual ou maior que 0.6 (p ≥ 0,6) .

Para analisar melhor esses dados os grupos prevalentes na área interna (inside) do HC (p>0,6) foram comparados com os grupos da área externa (outside) e hemocentro (bloodcenter) como mostra a figura 16:

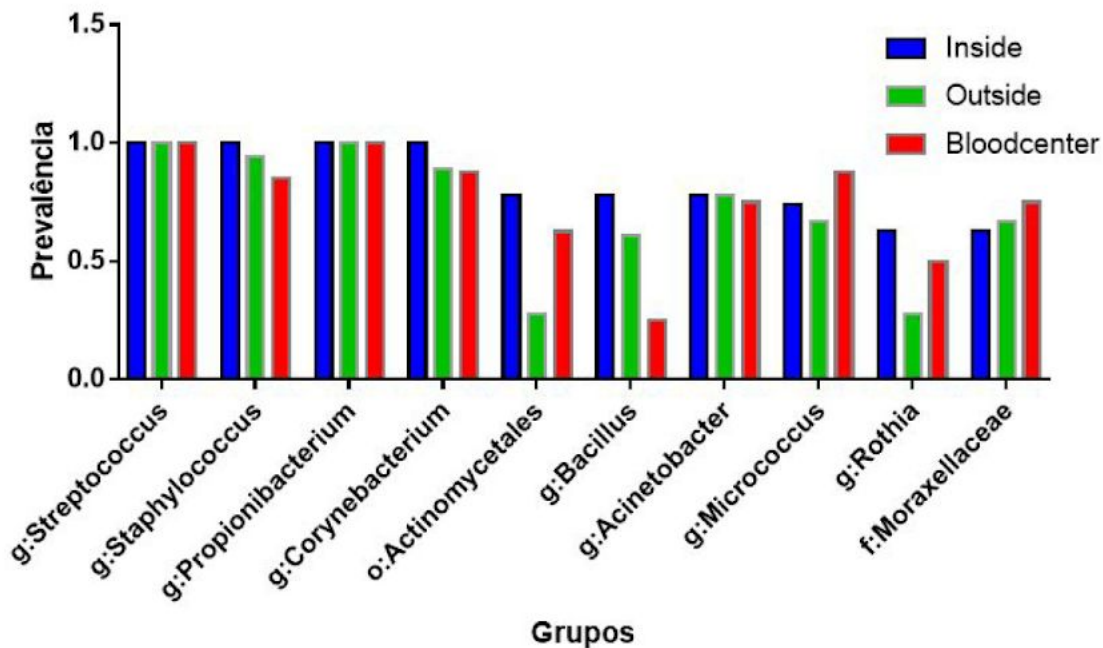


Figura 16: Grupos prevalentes na área interna (inside-azul) do HC ($p > 0,6$) e comparados com os da área externa (outside-verde) e hemocentro (bloodcenter-vermelho). Observe que Actinomycetales e Rothia são bem inferiores na área externa.

Tanto no ano de 2018 como de 2019 os gêneros de bactéria mais abundantes ($p=1$) foram Propionibacterium e Streptococcus (fig 17). No ano de 2018 a Staphylococcus teve $p=1$ e em 2019 $p=0,92$, ou seja, uma diferença pequena. Em 2019 o gênero Micrococcus ($p=0.6666666666666667$) e a ordem Actinomycetales ($p=0.518518518518518$) reduziram sua prevalência, enquanto que o gênero Acinetobacter ($p=0.851851851851852$) aumentou (fig 18, Tabela 4). Ademais, a prevalência de Acinetobacter na área interna e externa do hospital foi de ,0.777777777777778 e a ordem Actinomycetales predominou na área interna do hospital (fig 16).

O Micrococcus é normalmente encontrado na microbiota da pele humana, e costuma não ser patogênico, mas pode causar infecções respiratórias em pacientes imunodeprimidos. Já a ordem Actinomycetales consiste de um grupo heterogêneo composto por bactérias filamentosas, são encontrados em diversos ambientes, inclusive no trato gastrointestinal humano. Essa ordem possui diversos gêneros como

Actinomyces, Propionibacteria, Bifidobacteria, Nocardia, Streptomyces, e Rhodococcus. O gênero Actinomyces, por exemplo, é composto por bactérias comensais que não causam doenças, exceto em situações de desregulação do equilíbrio do microbioma humano (GILLESPIE,1994). Desse modo é possível que a redução de Actinomycetales e Micrococcus estejam relacionadas a melhora da limpeza no ambiente hospitalar.

Já o gênero Acinetobacter está relacionado a diversas infecções hospitalares, se trata de um gênero de patógenos oportunistas. Especialmente a Acinetobacter baumannii, que pode se tornar rapidamente epidêmica entre os pacientes hospitalizados, causando geralmente pneumonia e infecções de pele (SCARCELLA, 2017). O aumento desse gênero, portanto, é preocupante para o ambiente hospitalar, já que pode indicar o início de uma epidemia entre os pacientes hospitalizados e em estado grave.

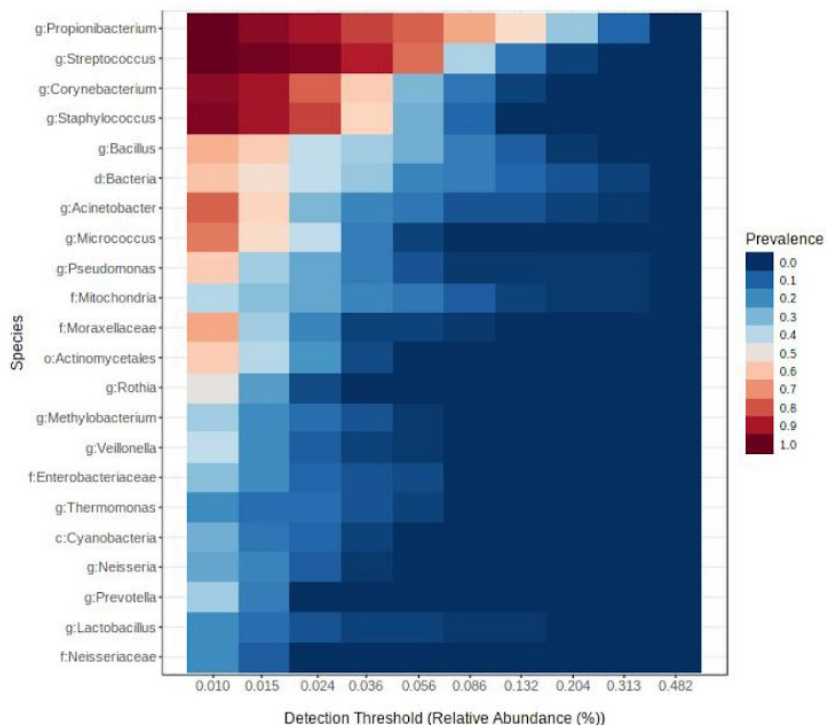


Figura 17: Prevalência geral de gêneros bacterianos dos anos de 2018 e 2019 no HC (interno e externo) e Hemocentro

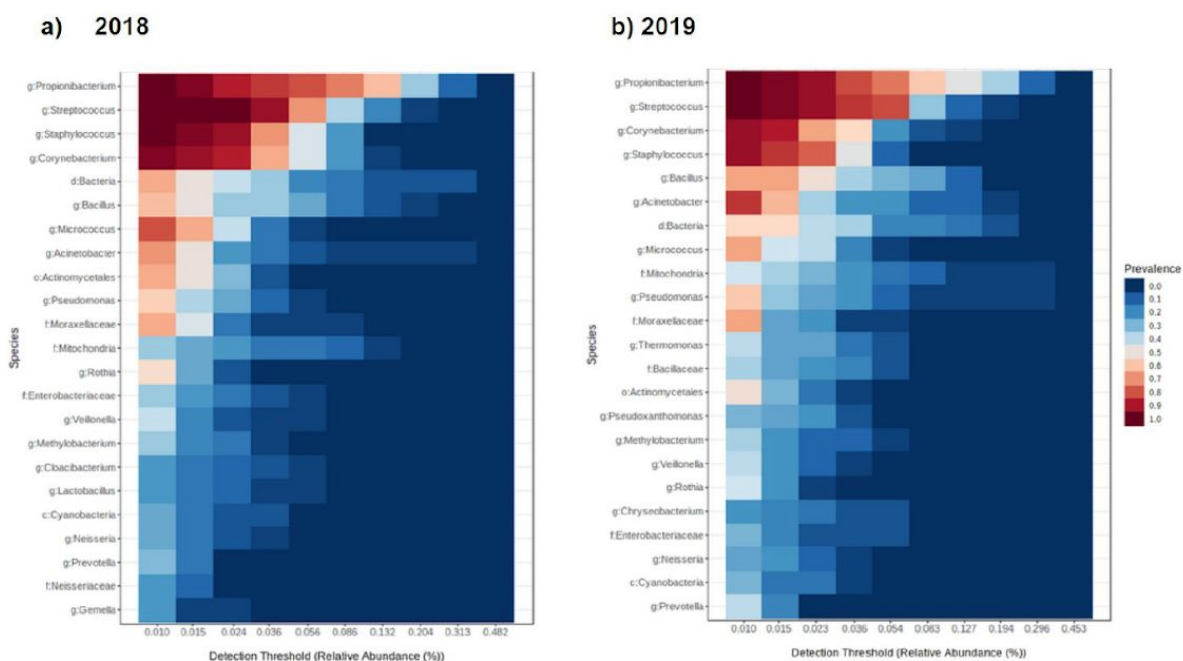


Figura 18: Predominância de gêneros de bactéria nos anos a) 2018 e 2019.

Ano	Gênero p=1	Gênero p ≥ 0,6
2018	Propionibacterium, Streptococcus, Staphylococcus	Pseudomonas, Actinomycetales, Rothia, Moraxellaceae, Acinobacter, Micrococcus, Bacillus, Corynebacterium
2019	Propionibacterium, Streptococcus	Pseudomonas, Corynebacterium, Moraxellaceae, Acinobacter, Bacillus, Staphylococcus

Tabela 4: Gêneros bacterianos com prevalência igual a 1 (p=1) em cada ano analisado e gêneros bacterianos com prevalência igual ou maior que 0.6 (p ≥ 0, 6)

VI. Clustering e correlation (Heatmap clustering, Dendrogram analysis, correlation network (SparCC) e Pattern search) para o ano de 2018 dos Grupos 1 e 2.

Analisando o dendograma podemos ter uma visão mais clara da semelhança entre as amostras. Dois grandes nodos foram gerados, no nodo I se agruparam 100% das amostras vindas do interior do HC e no nodo II se agruparam 55,5% das amostras da área externa do HC e 50% do Hemocentro. As amostras do nodo II provinham de setores de comércio, como cantinas, e transporte, isto é, do terminal de ônibus próximo ao HC. Podemos observar que algumas dessas amostras vindas da área externa do HC se encontram em clusters junto à amostras da área interna. Como as amostras EXHCRV18 (Cadeiras ao lado da cantina do Valter) e EXHCCA18 (Cantina Externa I) agrupadas no subnodo Ib onde estão amostras do C.T.I adulto (INHCCA18), Recepção HCFMRP/USP (INHCRE) Recepção do HC Criança (INHCAP), e C.T.I. Pediátrico (INHCCP), isso sugere um compartilhamento de bactérias entre os pacientes (pediátricos e adultos) as cantinas e as C.T.I's, possivelmente os visitantes dos pacientes nas C.T.I's comem nessas cantinas e então trazem as bactérias para a recepção e C.T.I's (fig 19).

O subnodo Ia, por sua vez, tem 2 amostras da área externa referente ao setor de transportes, a EXHCOE18 e EXHCOR18 ambos referentes ao ponto de ônibus HCFMRP-USP, onde chegam e partem pacientes e estudantes. EXHCOE18 se clusterizou com INHCMN18 (Corrimão escada dos docentes e residentes) o que mostra um compartilhamento de bactérias entre funcionários e o HC. A amostra EXHCOR18 se clusterizou com INHCED18 (Elevadores dos docentes e residentes) o que novamente reforça esse achado de compartilhamento de bactérias entre funcionários, ônibus e áreas de facilities no Hospital (fig 19).

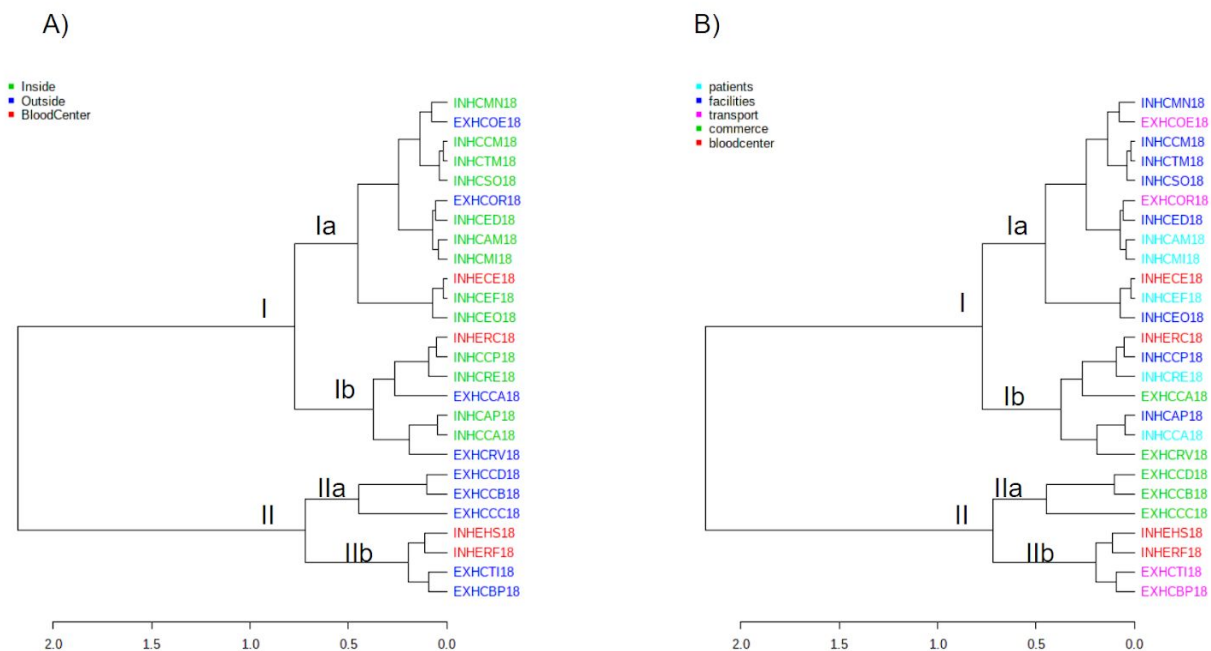


Figura 19: Dendrograma à nível de filo, revelando em (A) grupos (HC interno e externo, e hemocentro) e em (B) setores (pacientes, facilities, transporte, comércio e hemocentro).

Em seguida realizamos dois heatmaps. Um com organização por zona e outro sem organização (fig 20), cujas observações redigimos a seguir:

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

Na área externa, as que apresentam maior abundância são as Fusobacteria, Armatimonadetes e Deinococci. As fusobacterium estão envolvidas em infecções que levam à necrose tecidual, septicemia e infecções intra-amnióticas que podem levar a parto prematuro. As com menor abundância são as Synergistetes e Spirochaetes. Como haviam amostras externas que se clusterizavam com amostras externas resolvemos analisar seus filos predominantes utilizando o heatmap:

A. EXHCOR18 e INHCED18

A amostra EXHCOR18 corresponde ao ponto de ônibus HCFMRP-USP, onde há um grande fluxo na entrada e saída de pacientes, funcionários e estudantes do hospital. A amostra INHCED18 corresponde aos elevadores utilizados pelos docentes e residentes do HC. Essas duas amostras clusterizaram-se, mostrando que há um compartilhamento de bactérias entre funcionários, pacientes, ônibus e facilities do hospital. No caso da EXHCOR18, as bactérias mais abundantes foram as Candidatus_Saccharibacteria, Nitrospirae e Chloroflexi. Na amostra INHCED18, as bactérias mais abundantes foram comum a área EXHCOR18; com a presença de Candidatus_Saccharibacteria, além de apresentar as bactérias Spirochae.

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

B. EXHCRV18, EXHCCA18, INHACCA18, INHCAP18, INHCCP e INHCRE

O dendrograma agrupa áreas externas como EXHCV18 e EXHCCA18 com áreas internas como o INHACCA18. A EXHCRV18 (Cadeiras do lado da cantina do Valter) demonstrou uma predominância do filo fusobacterium e firmicutes em relação

às demais bactérias presentes. Quando analisamos a área interna do CTI adulto (INHCCCA18) e a recepção do HC criança (INHCAP) pode-se observar que o filo firmicutes também foi o mais abundante. O filo Firmicutes é um dos filos predominantes na microbiota intestinal humana, é composto por mais de 200 gêneros diferentes como Lactobacillus, Bacillus, Clostridium, Enterococcus, and Ruminococcus (Diagrama 1). O aumento de firmicutes na microbiota está relacionado com a obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes do tipo II e hipertensão arterial e tem-se demonstrado cada vez um problema de saúde pública (Rinninella et al, 2019). A abundância desse filo tanto ambiente externo (EXHCRV18) como o ambiente interno do hospital (INHACCA18) e (INHCAP) sugere que uma possível rota de contaminação proveniente do ambiente externo como mostrado no dendograma.

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



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

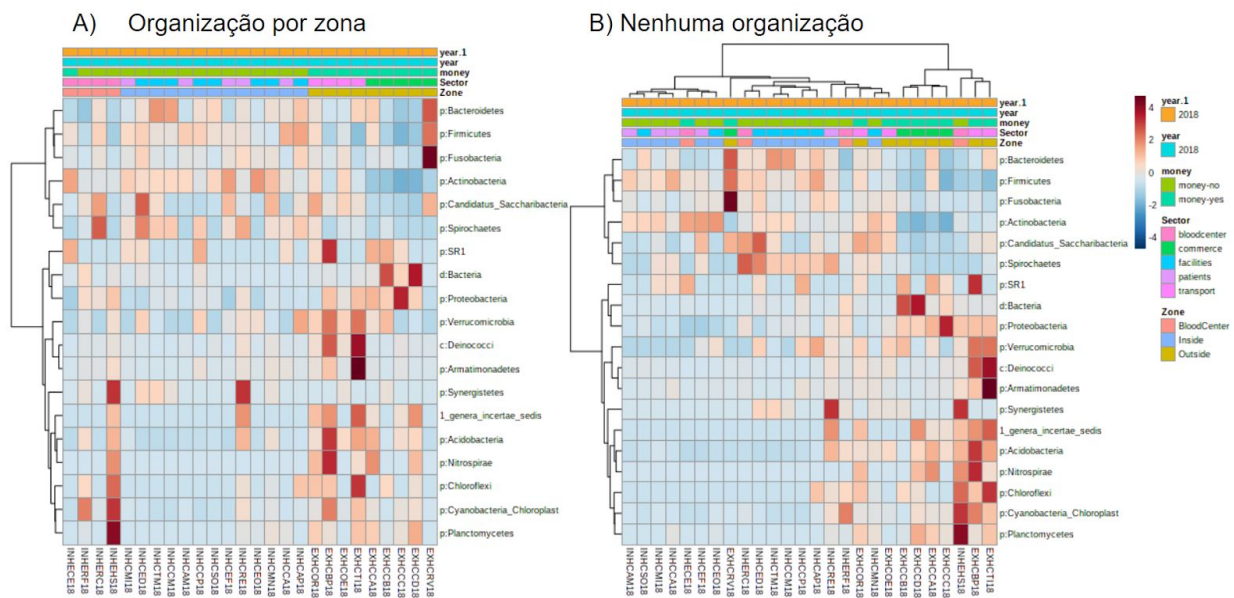


Figura 20: Heatmap a nível de Filo em (A) supervisionada por zona; bloodcenter, inside e outside. E em (B) sem supervisão.

Analisando a correlação entre filós (fig 21) percebemos que os táxons que estabelecem mais conexões (excetuando d.Bacteria, cujo gênero não é conhecido) são Cianobacteria e Deinococci que estabelecem entre si uma correlação significativa. Deinococci se correlaciona também com Verrucomicrobia e Armatimonadetes enquanto que a Cianobactéria se correlaciona com Spirochaetes, Planctomycetes e Acidobacteria. A Deinococci é mais presente na área externa, no setor de transportes, enquanto que a Cianobactéria é mais presente no Hemocentro, e também está presente na área externa no setor de transporte. O filo Spirochaetes é a única em contato com a Cianobacteria que é predominante no ambiente interno do HC em especial no setor dos pacientes. O filo Spirochaetes é composto por bactérias de forma helicoidal ou espiral, os espécimes do gênero Spirochaeta são de vida livre e os de Cristispira são comensais. Porém, alguns representantes dos gêneros Treponema, Borrelia, e Leptospira são considerados patogênicos. O gênero leptospira está associado a leptospirose, o Treponema pallidum é o agente da sífilis e Borrelia burgdorferi da Borreliose ou doença de Lyme, cuja transmissão se dá pelo carrapato, essa última espécie é incomum no Brasil (Cole, 1990).

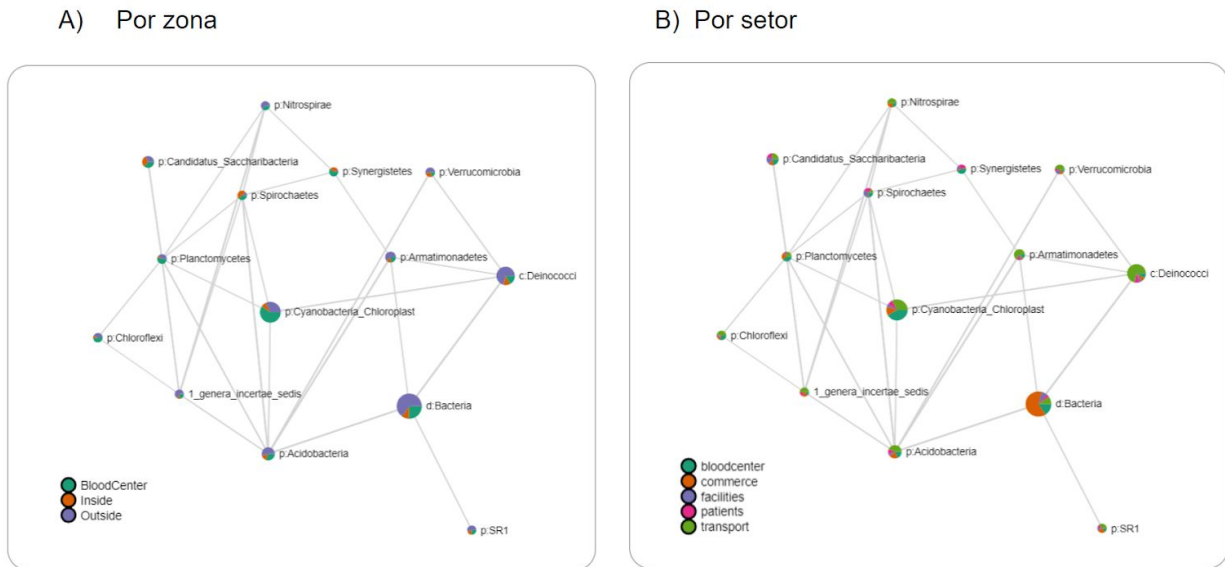


Figura 21: Gráfico de correlação a nível de filo supervisionado por (A) zona e (B) setor. Cada nodo representa um gênero e seu tamanho é baseado no número de conexões para esse gênero. Dois gêneros são conectados por uma linha se a correlação entre eles é significativa ($p < 0.05$). Os nodos também mostram relação de abundância do gênero em questão em cada zona (A) ou setor (B).

Depois analisamos a correlação entre os gêneros. Os gêneros com maior coeficiente de correlação entre HC interno, externo e hemocentro, são também os mais presentes na área externa do HC, são eles: Sphingomonadales, Mucilaginibacter, Giliamella, Beijerinckia, Terriglobus, Gp16, Spartobacteria, Gaiella, Gp3, Rickettsia, Gaiellaceae (família) e Rhizobiales (ordem). Enquanto que na área interna prevalecem gêneros com menor coeficiente de correlação são eles; Finegoldia e Propionibacterium, e no Hemocentro; Amaricoccus, Cystobacteracea (família), Sphingobacteria, Pseudorhodoferas, Bergeyella, Nesterenkonia, Bacillales, Methylophilus, Alcanivorax, Actinomycetales e Alloscardovia (fig 22B). É curioso o aparecimento do gênero Rickettsia nessa análise, visto que se trata de bactérias presentes em artrópodes como carrapatos, pulgas e piolhos, e que causam doenças nos seres humanos tais como tifo epidêmico e a febre escaronodular ou botonosa. Como o hospital se localiza dentro do Campus Ribeirão Preto (USP) que contém muita vegetação nativa além de aves e animais pode ser que artrópodes que habitam essa fauna e flora tenham trazido essas

bactérias para o ambiente hospitalar, naturalmente elas são mais abundantes na área externa do HC.

Já os gêneros com maior coeficiente de correlação entre os setores (Hemocentro, comércio, facilities, pacientes e transporte) tiveram maior abundância no setor de transporte e dos pacientes, esses táxons são; Stomatobaculum, Gp16, Gaiella, Arthrobacter, Cellulomonas, Rhodobactereaceae, Deinococcus, Burkholderiales, Actinobacteria, Betaproteobacter, Rubellimicrobium, Moraxella, Arsenicococcus, Turicibacter, Gaiellaceae, Rhodococcus, Armatimonadetes, Craurococcus, Modestobacter, Rhizobiales, Geodermatophilac e Anaerococcus. Sendo que somente os taxons Actinobacteria, Gaiellaceae, Rhodococcus e Rhizobiales não foram abundantes no setor de pacientes (fig 22A).

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

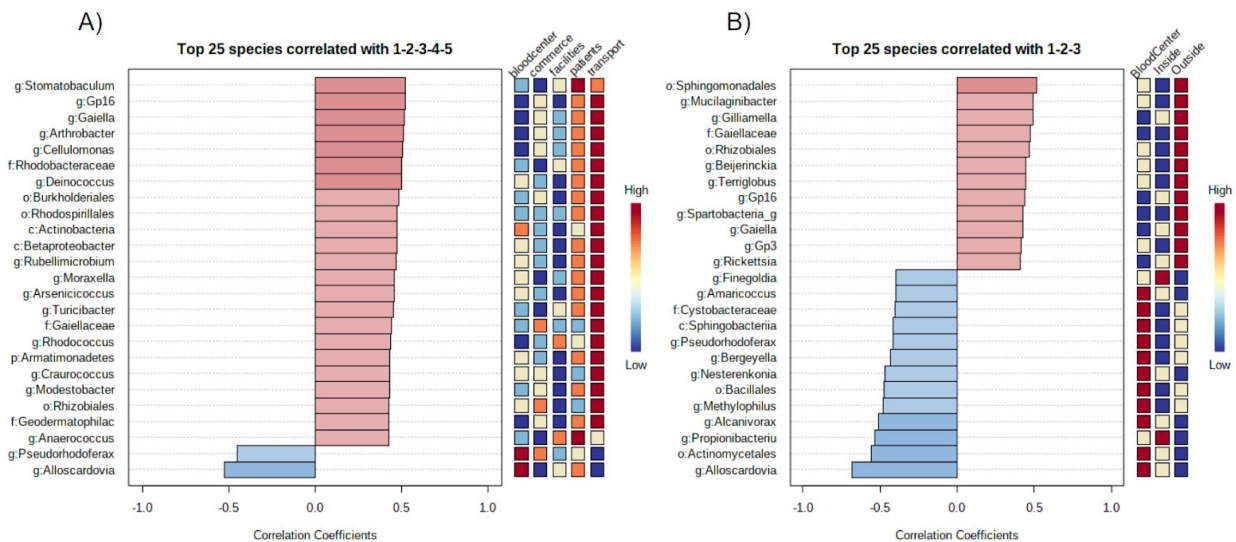


Figura 22: Gráficos de padrões pelo método de Pearson. Mostra os 25 gêneros mais correlacionados com os setores (A) e com as zonas (B). Os gêneros estão ranqueados pela correlação, sendo que as barras vermelhas representam um coeficiente de correlação positiva e as barras azuis, um coeficiente de correlação negativa. Na direita de cada gráfico, há um pequeno heatmap indicando a abundância do gênero em cada grupo.

10. Conclusão do estudo

Algumas alterações tanto no ambiente externo como no ambiente interno do hospital das clínicas (HC) foram observadas entre os anos de 2018 e 2019. No entanto, no hemocentro essas alterações foram pouco significativas. O ambiente interno do HC demonstrou um aumento considerável de bactérias Streptococcaceae, uma família que inclui gêneros que são encontrados em diversas partes do organismo humano, e, inclusive, organismos patogênicos. Já a análise de alfa diversidade permitiu observar que as amostras da área externa do HC em média são mais diversas que as amostras do hemocentro e da área interna do HC. A análise da Beta diversidade por sua vez permitiu a identificação de amostras outliers: INHCMI19 (UETDI), EXHCOR19 (Ponto de ônibus) e EXHCRV18 (Cantina) que talvez mereçam mais atenção em estudos futuros. A análise do core microbiome permitiu a identificação de flutuações na prevalência de bactérias entre os anos de 2018 e 2019, ressaltamos aqui o gênero *Acinetobacter*, que aumentou de 2018 para 2019 tanto na área interna quanto externa do hospital, o que é relevante dado que esse gênero está associado a infecções hospitalares epidêmicas entre os pacientes hospitalizados.

Em conjunto os achados permitem elaborar possíveis rotas microbianas entre o sistema de transporte e áreas de facilities (como escadas e elevadores dos funcionários), mostrando que os funcionários, residentes e alunos servem como um vetor para entrada de bactérias no hospital. Há também uma possível rota entre as cantinas, sistema de transporte, recepções e C.T.'s adultas e pediátricas. A partir dos resultados apresentados é possível pensar na implementação de um plano de mudanças que vise a melhoria das condições de assepsia hospitalar, evitando contaminações e a transmissão de patógenos.

11. Referências

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

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

GILLESPIE, S. H. Gram-positive bacilli. In Medical Microbiology Illustrated (pp. 30–43). Elsevier. 1994 <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-0187-0.50008-0>

KOVALEVA, J.; DEGENER, J. E.; MEI, H. C. van Der. Methylobacterium and Its Role in Health Care-Associated Infection. Journal Of Clinical Microbiology, [s.l.], v. 52, n. 5, p. 1317-1321, 15 jan. 2014. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.03561-13>.

MAYNARD, Dayanne da Costa. OBESIDADE, FIRMICUTES E BACTEROIDETES: UMA REVISÃO DA LITERATURA. 2018. 17 f. Tese (Doutorado) - Curso de Nutrição, Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2018.

Moreira, G., Dayanne Da Costa, D., & Brasília, M. (n.d.). CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA-UniCEUB FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE CURSO DE NUTRIÇÃO OBESIDADE, FIRMICUTES E BACTEROIDETES: UMA REVISÃO DA LITERATURA.

PILARSKI, F.; ROSSINI, AJ.; CECCARELLI, PS. Isolation and characterization of Flavobacterium columnare (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. Braz. J. Biol., São Carlos , v. 68, n. 2, p. 409-414, May 2008 .

RAMANAN, P., BARRETO, J.N., OSMON, D.R., TOSH, P.K. Rothia Bacteremia: a 10-Year Experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota *Journal of Clinical Microbiology* Aug 2014, 52 (9) 3184-3189; DOI: 10.1128/JCM.01270-14

RICOTTA, C. Of beta diversity, variance, evenness, and dissimilarity. *Ecology and evolution*, 7(13), 4835–4843. 2017 <https://doi.org/10.1002/ece3.2980>

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

SCARCELLA, A. C. de A., SCARCELLA, A. S. de A., & BERETTA, A. L. R. Z. Infection related to health assistance associated to *Acinetobacter baumannii*. LITERATURE REVIEW. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 49(1). 2017 <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600361>

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

Shinohara, N. K. S., De Barros, V. B. Jimenez, S. M. C. Machado, E. D. C. L., Dutra, R. A. F. De Lima Filho, J. L. (2008). *Salmonella* spp., important pathogenic agent transmitted through foodstuffs. *Ciência e Saúde Coletiva*, 13(5), 1675–1683. <https://doi.org/10.1590/s1413-81232008000500031>

WEXLER, H. M., *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Oct; 20(4): 593–621. doi: 10.1128/CMR.00008-07

Schendure J e Ji H (2008). Next Generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26(10), 1135-45

NIERMAN, W. C.; EISEN, J. A.; FLEISCHMANN, R. D. et al. Genome data: what do we learn? *Curr Opin Struct Biol*, v. 10, p. 343-348, 2000.