



Universidade de São Paulo - USP
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Curso de Ciências Biomédicas - Turma V
RCB 300 - Biotecnologia III



Projeto Microbioma Hospitalar

Discentes:

Filipe Camargo Rodrigues

Giulia Scarcella Cancelliero

Jéssica Bellotto Werlang

Maria Luiza Pellicer Teixeira

Vinícius Bottura Apolloni

Ribeirão Preto - SP
Fevereiro de 2021

1. Descrição do objetivo geral do projeto:

O objetivo do projeto consiste em analisar o microbioma do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e arredores em termos de quais filos e gêneros bacterianos são encontrados ali, a fim de encontrar possíveis rotas de contaminação e identificar a presença de bactérias patogênicas que podem causar infecções hospitalares. Além disso, a comparação dos dados obtidos em diferentes zonas (hemocentro, área interna e externa do hospital) permite avaliar as características do microbioma de cada uma.

2. Perguntas definidas pelo grupo:

- Qual a prevalência filogenética das amostras coletadas? Qual é a relação deste dado com a literatura?
 - O conhecimento da população microbiana que habita nas superfícies hospitalares e em suas proximidades é importante pois pode ter influência na recuperação de pacientes e em seus prognósticos (LAX; SANGWAN; SMITH; LARSEN; HANDLEY; RICHARDSON; GUYTON; KREZALEK; SHOGAN; DEFAZIO, 2017).
- O que se pode observar quanto a diversidade bacteriana nas diferentes zonas em que foram coletadas as amostras? O que este dado pode influenciar?
 - A redução da diversidade microbiana, acontecimento comum em ambientes hospitalares, é um fator negativo. Logo, a observação e comparação dos dados de diversidade entre as diferentes zonas é de suma importância (LAX; SANGWAN; SMITH; LARSEN; HANDLEY; RICHARDSON; GUYTON; KREZALEK; SHOGAN; DEFAZIO, 2017).

3. Descrição dos locais de coleta escolhidos pelo grupo:

Os locais de coleta selecionados pelo grupo eram contidos no Hemocentro de Ribeirão Preto, bem como no Terminal de Ônibus do Hospital das Clínicas.

No caso do Hemocentro, foram colhidas amostras na recepção dos doadores de sangue, em locais como balcão, cadeiras e corrente de contenção.

Já no Terminal de Ônibus do Hospital das Clínicas, a coleta foi mais abrangente, sendo realizada no balcão e corrente de contenção da recepção do Hospital, orelhão, balcão de compra de passagens, poste, corrimão da entrada do ônibus da linha N-207 e mesas.

Abaixo, temos a relação da identificação dos tubos de ensaios contendo cada amostra, juntamente com a solução estabilizadora:

Tubo	Local	Coleta
A	Hemocentro de Ribeirão Preto	Balcão, cadeiras e corrente de contenção
B	<i>idem</i>	<i>idem</i>
27	Recepção Hospital das Clínicas	Corrente de proteção e Balcão
28	<i>idem</i>	<i>idem</i>
30	Terminal de Ônibus Hospital das Clínicas	Orelhão
31	<i>idem</i>	<i>idem</i>
32	Terminal de Ônibus Hospital das Clínicas	Balcão de compra de passagens e poste
33	<i>idem</i>	<i>idem</i>
34	Terminal de Ônibus Hospital das Clínicas	Corrimão do ônibus da linha N-207
35	<i>idem</i>	<i>idem</i>
36	Terminal de Ônibus Hospital das Clínicas	Mesas, postes e corrimão
37	<i>idem</i>	<i>idem</i>

De forma geral, as coleta foram realizadas com muita facilidade por se tratarem de locais públicos, além disso, na grande maioria das amostras, o *swab* ficou sujo muito rápido, o que nos garantiu que realmente teríamos uma porção segura de amostra para analisar. Seria interessante que grupos posteriores pudessem realizar a coleta de amostras também na sala onde ocorre a doação de sangue, pois muitos dos doadores possuem familiares ou amigos internados e doam em nome dos mesmos, então circulam entre o Hemocentro e o Hospital das Clínicas, servindo como transporte para os microorganismos presentes nesses locais.

4. Descrição da extração de DNA das amostras coletadas:

A extração de DNA das amostras foi realizada com o *PowerSoil DNA isolation kit*, da marca QIAGEN, seguindo o protocolo abaixo:

1. Adicionar 500µL da amostra em solução estabilizadora ao tubo *power bead*
2. Agitar gentilmente;
3. Se a solução C1 apresentar precipitado, aqueça em 60°C até diluição completa;
4. Adicional 60µL da solução C1 e incubar à 70°C e 550 rpm;

A solução C1 é responsável por lisar as membranas das células.

5. Homogeneizar as amostras em agitador horizontal durante 10 minutos;
6. Centrifugar os tubos à 10.000 xg, por 30 segundos;
7. Transferir o sobrenadante para o tubo de coleta;
8. Adicionar 250µL de solução C2 e vortexar por 5 segundos, Logo após, incubar à 4°C por 5 minutos;

A solução C2 possui a propriedade de separar o DNA de alta qualidade (ou seja, ideal para análise) do resto do material genético presente na amostra.

9. Centrifugar os tubos em temperatura ambiente, a 10.000xg, por 1 minuto;
10. Transferir sobrenadante para um tubo de coleta;
11. Adicionar 200µL da solução C3 e vortexar. Incubar a 4°C por 5min;

A solução C3 é adicionada pela sua propriedade de decantar os componentes celulares que não são o DNA, bem como contaminantes inorgânicos.

12. Repetir o passo 9;
13. Repetir o passo 10;
14. Homogeneizar a solução C4 , adicionar 1,2 mL da mesma ao sobrenadante e vortexar por 5s;

A solução C4 apresenta alta concentração de sal e possui a função de induzir o acoplamento do DNA à sílica do tubo *spin filter*.

15. Adicionar 675µL da solução a um *spin filter* e centrifugar a 10.000xg por um minuto, em temperatura ambiente. Descartar o filtrado e adicionar mais 675µL, repetindo os passos anteriores duas vezes;
16. Adicionar 500µL da solução C5 e centrifugar a 10.000xg, por 30 segundos, em temperatura ambiente;

A solução C5 é feita à base de etanol, e possui a função de retirar o DNA acoplado a sílica do *spin filter*.

17. Descartar o líquido filtrado;
18. Centrifugar à 10.00xg, em temperatura ambiente, por um minuto;
19. Colocar o filtro em outro tubo;
20. Adicionar 100µL da solução C6 na membrana;

A solução C6 é muito hipotônica e possui a função de remover qualquer resíduo de DNA que possa ter ficado acoplado na membrana.

21. Centrifugar em temperatura ambiente, a 10.000xg, por 30 segundos;
22. Descartar o *spin filter*, o DNA estará no tubo.

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

A quantificação e avaliação da qualidade do DNA extraído foram feitas sequencialmente utilizando técnicas de espectrofotometria e medidas NanoVue (GE Healthcare). Utilizou-se protocolo de registro envolvendo absorvâncias nos comprimentos de onda 260, 280 e 320nm; validou-se a contaminação por proteínas a partir da razão 260/280 dos comprimentos de onda; registrou-se a contaminação por impurezas de reagentes ao comprimento de 320nm (e.g. reagentes buffer); registrou-se a pureza do DNA nos comprimentos 280 e 320nm. O protocolo é descrito a seguir:

1. Diluição de 10 μ L do DNA purificado e tratado com 90 μ L de RNAses em TE seguindo a escala 1:10;
2. Registro da absorvância nos comprimentos de onda iguais a 260, 280 e 320nm;
3. Correção das absorvâncias registradas a 260 e 280nm através da subtração de seus valores em relação ao valor de absorvância registrado no comprimento de onda 320nm;
4. Validação da concentração do DNA extraído (ng/ μ L): cálculo a partir da relação da absorvância registrada em 260 nm multiplicado pelo fator de diluição ($F_d=10$) multiplicando também pelo fator de conversão ($F_c=50$), assim tendo a seguinte relação: $A_{260} \times 10 \times 50$;
5. Executar a razão das absorvâncias A_{260}/A_{280} .

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

A preparação das bibliotecas NGS consiste no sequenciamento de nosso alvo após a sua extração, quantificação e avaliação de qualidade. Neste caso, nosso alvo será a região 16S ribossomal hipervariável. Esse processo envolve alguns passos como execução da digestão do DNA, amplificação por PCR, purificações e quantificação de nossa biblioteca. Os passos são descritos a seguir:

1. Digestão do DNA alvo, de forma randômica, através do uso de transposases, para manutenção das pontas coesivas dos fragmentos de DNA. A etapa inclui também a adição de Adenina na extremidade 3’;
2. Execução de PCR para amplificação da região hipervariável 16S ribossomal. Executa-se a junção de 25uL fragmentos obtidos com 10uL primers específicos, sendo 5uL forward e 5 uL reverse. Dilui-se, também, 12,5 uL de mix X KAPA HiFi HotStart Ready contendo DNA polimerases, dNTP e buffers. Com o termociclador, executa-se os ciclos de amplificação, e as amostras vão correr ao gel de agarose para visualização da correta amplificação.
3. Execução da purificação do produto do PCR utilizando etapas de centrifugação a 1000G em temperatura 24°C por 1 minuto. Passagem para placa mid PCR. Utilização de beads magnéticas vortexadas por 30 segundos e adição de 20 uL dessa solução em cada um dos poços da placa. Execução de homogeneização up and down de 10 a 16 vezes. Incubação por 5 minutos. Deposição em suporte magnético apropriado por um tempo de 2 minutos. Descarte do sobrenadante e lavagem das beads com solução de etanol 80%, duas vezes, e aguardar 30 segundos para a retirada da solução. Deixar as beads secarem ao ar, ainda no suporte, por um tempo de 10 minutos. Remoção da placa do suporte, e adição de TRIS buffer 10 mM. Homogeneização up and down novamente e incubação por 2 minutos da placa. Transferir 50 uL da solução sobrenadante final de DNA para uma nova placa.
4. Execução de um segundo PCR para adição de sequências adaptadoras aos DNAs alvo. Utilização de primers portadores das sequências adaptadoras para a segunda amplificação. . Transferência de 5uL do DNA template para uma nova placa de PCR. Adição de 25 ul do KAPA HiFi HotStart Ready Mix, 5 ul de primer index 1, 5ul de primer index 2, 10 ul de água de PCR. Homogeneização up and down de 10 a 16 vezes e centrifugação a 1000G a temperatura 20°C por 1 minuto. Transferência para o termociclador para realizar a inserção das sequências adaptadoras.
5. Execução da purificação do produto do segundo PCR, executada conforme consta o item 3 do protocolo, utilizando os mesmos passos referentes às beads magnéticas. Desse modo, já pode-se afirmar que a biblioteca está pronta.
6. Quantificação da biblioteca por processos de fluorimetria. Execução da quantificação utilizando primers específicos para os adaptadores utilizando kit Nextera XT Index, a

fim de encaixar os adaptadores Illumina para a realização do sequenciamento NGS e geração de reads para posterior análise com ferramentas de bioinformática (mais detalhado a seguir).

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

Após a preparação da biblioteca de *Next Generation Sequencing* (NGS), os fragmentos de DNA são transferidos para uma célula de fluxo. A célula de fluxo é um suporte sólido composto por microcanais, para permitir a reação de sequenciamento (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). Na superfície deste dispositivo estão presentes sequências de oligonucleotídeos complementares aos adaptadores (LU; SHEN; WARREN; WALTER, 2016). Dessa maneira, a extremidade do fragmento acoplada ao adaptador é ligada na superfície da célula por emparelhamento de base. Após os eventos descritos, a sequência complementar do fragmento é feita por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). A presença de oligonucleotídeos na superfície da célula de fluxo permite a amplificação, por ponte, dos fragmentos de DNA. Para tal, os adaptadores presentes em ambas as extremidades do DNA são usados como substrato para as repetidas reações de amplificação, na superfície da célula de fluxo (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). Após o alongamento da sequência pela enzima DNA polimerase, o fragmento fica associado à superfície da célula de fluxo pelas suas fitas sense e antisense. Em seguida, o processo de desnaturação forma duas fitas cópias dos fragmentos ligados ao suporte. Para amplificação do sinal, a reação de PCR é repetida ciclicamente para formar um grande número de cópias a partir do fragmento original (LU; SHEN; WARREN; WALTER, 2016).

Após a amplificação clonal, é feito o sequenciamento pelo método *sequence-by-synthesis*. Neste processo, sequências *de primers* e oligonucleotídeos fusionados com fluoróforos e um terminador reversível são adicionados à reação. Durante o processo, um único nucleotídeo é adicionado à sequência recém sintetizada a cada ciclo de sequenciamento. A cada ciclo, o terminador presente na extremidade 3'-OH livre é clivado, permitindo a inserção do próximo nucleotídeo (AMBARDAR; GUPTA; TRAKROO; LAL; VAKHLU, 2016). Após a incorporação do nucleotídeo, os repórteres fluorescentes são excitados por uma fonte de luz, desencadeando a emissão de sinal e a subsequente detecção

por um sensor óptico. Assim, o equipamento é capaz de detectar as cores que representam cada base recém adicionada aos grupos de fragmentos (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). A informação óptica de cada sequência em alongamento é convertida para um banco de dados. Para sequenciamento de extremidades emparelhadas, iniciadores promovem o sequenciamento da fita sense e da antisense de cada fragmento. Como os adaptadores possuem um código de barras único, no formato de oligonucleotídeo, múltiplas amostras podem ser sequenciadas em uma única célula de fluxo (LU; SHEN; WARREN; WALTER, 2016). Para melhor compreensão, os procedimentos discutidos são sumarizados na figura 1.

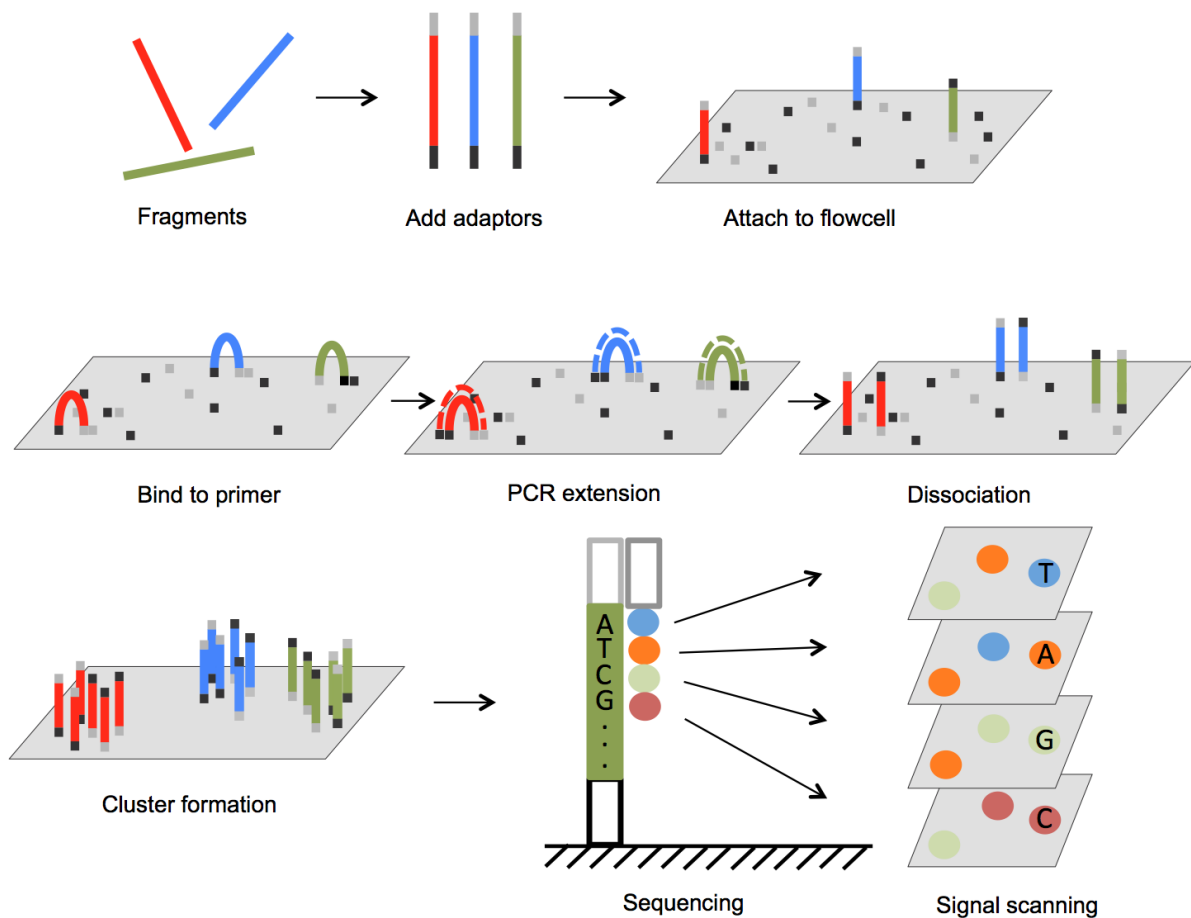


Figura 1: Ilustração do processo de sequenciamento e análise do DNA. Após a formação dos fragmentos de DNA (1), os adaptadores são adicionados e se anelam na extremidade livre dos fragmentos (2). Em seguida, a biblioteca é transferida para uma célula de fluxo e os fragmentos se ligam à superfície do dispositivo (3). As sequências são amplificadas por meio de uma reação PCR e formam grupos de fragmentos (4). Durante cada ciclo de sequenciamento, nucleotídeos conjugados com fluoróforos são anelados na sequência em formação. A emissão de luz por nucleotídeos fluorescentes, após a excitação por um laser, pode ser detectada por um sensor óptico (5). Ao final, o terminador da sequência é removido e o próximo ciclo de sequenciamento é iniciado. Imagem retirada de (LU; SHEN; WARREN; WALTER, 2016).

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

Para garantir a fidelidade das sequências obtidas, uma análise de qualidade é realizada após o sequenciamento. Durante esse processo, os dados são submetidos a um pré-processamento para remover as sequências dos adaptadores e leituras de baixa qualidade. De fato, a exclusão dessas sequências “contaminantes” é fundamental para prevenir erros durante a montagem das sequências e de interpretações (LU; SHEN; WARREN; WALTER, 2016). Além disso, uma análise de erros gerados a partir do sequenciamento pode ser realizada, em razão do grande volume de informações, permitindo identificar artefatos da técnica e as sequências biológicas (SLATKO; GARDNER; AUSUBEL, 2018). Em seguida, as sequências são mapeadas para referência genômica ou do alinhamento *de novo* das sequências lidas (GRADA; WEINBRECHT, 2013). Um último passo consiste na compilação das sequências para posterior análise dos dados por técnicas de bioinformática. A análise de sequências permite identificar e compreender, por exemplo, variações genéticas, novos genes, elementos regulatórios (GRADA; WEINBRECHT, 2013) e avaliar a diversidade microbiana presente em um determinado local. Neste presente projeto, as sequências obtidas foram geradas no formato FASTQ e, em seguida, submetidas aos processos descritos anteriormente. As sequências foram compiladas e organizadas em grupos taxonômicos operacionais (OTUs). Após os procedimentos descritos, os dados foram compartilhados com os graduandos e analisados pelo programa *MicrobiomeAnalyst*.

9. Descrição de dois resultados da análise dos dados:

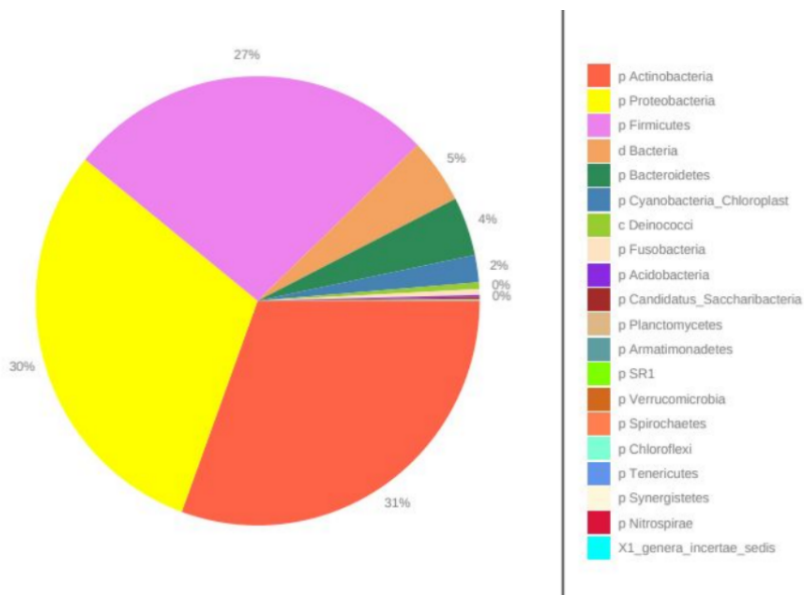


Figura 2: Análise qualitativa conjunta dos filos de bactérias totais nas amostras coletadas no hemocentro e nos ambientes externos e internos do hospital em 2018. Os dados mostraram uma predominância de Actinobacterias (36%), Firmicutes (29%) e Proteobacterias (23%) no ano de 2018.

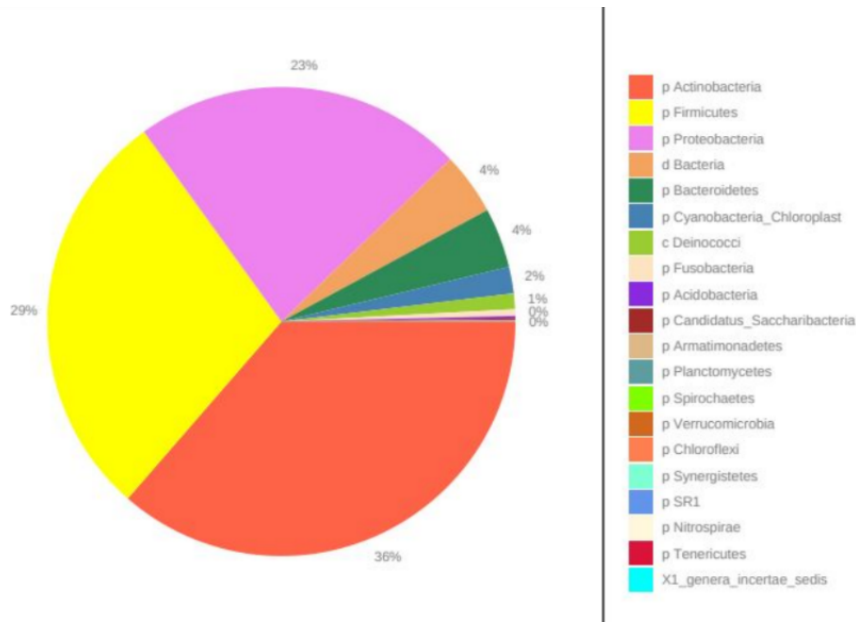


Figura 3: Análise qualitativa conjunta dos filos de bactérias totais nas amostras coletadas no hemocentro e nos ambientes externos e internos do hospital em 2019. Os dados mostraram uma predominância de Actinobacterias (31%), Proteobacterias (30%) e Firmicutes (27%) no ano de 2019.

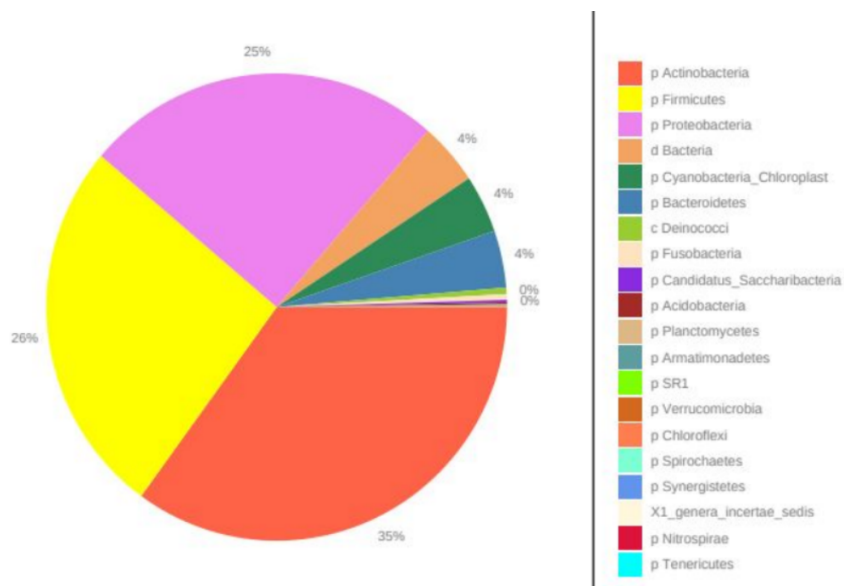


Figura 4: O gráfico representa uma análise qualitativa conjunta dos filos de bactérias totais detectadas nas amostras coletadas no Hemocentro nos anos de 2018 e 2019. É possível observar uma predominância de Actinobacterias (35%), Firmicutes (26%) e Proteobactérias (25%) nos anos de 2018 e 2019. Além disso, 4% de Cianobacterias, Bacteroidetes e de bactérias desconhecidas que não apresentam identidade e/ou similaridade com dados de microorganismos presentes nos bancos de dados.

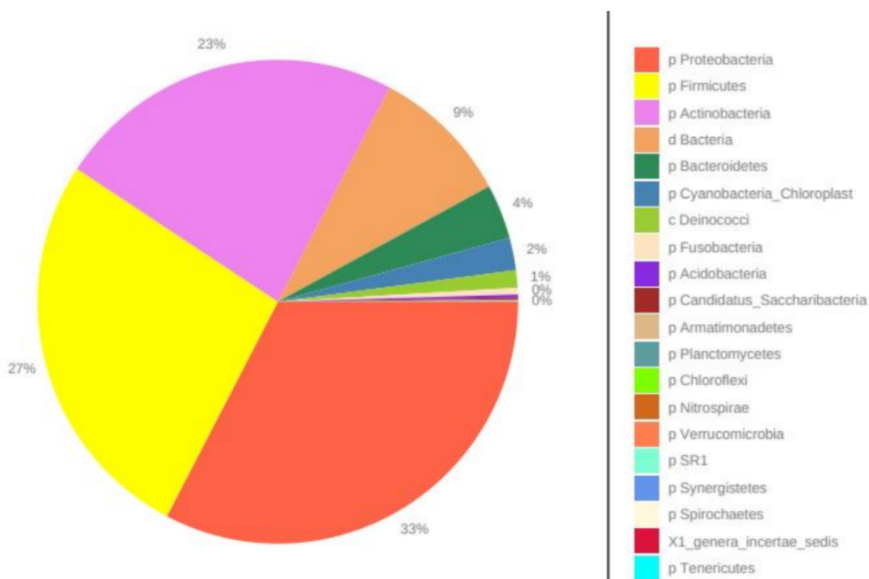


Figura 5: O gráfico representa uma análise qualitativa conjunta dos filos de bactérias totais encontradas nas amostras coletadas na zona externa ao hospital nos anos de 2018 e 2019. Ademais, observa-se uma predominância de Proteobacterias (33%), Firmicutes (27%) e Actinobacterias (23%) nos anos de 2018 e 2019. Além disso, 9% das bactérias detectadas na área externa, em ambos os anos, não apresentam identidade e/ou similaridade com dados de microorganismos presentes nos bancos de dados.

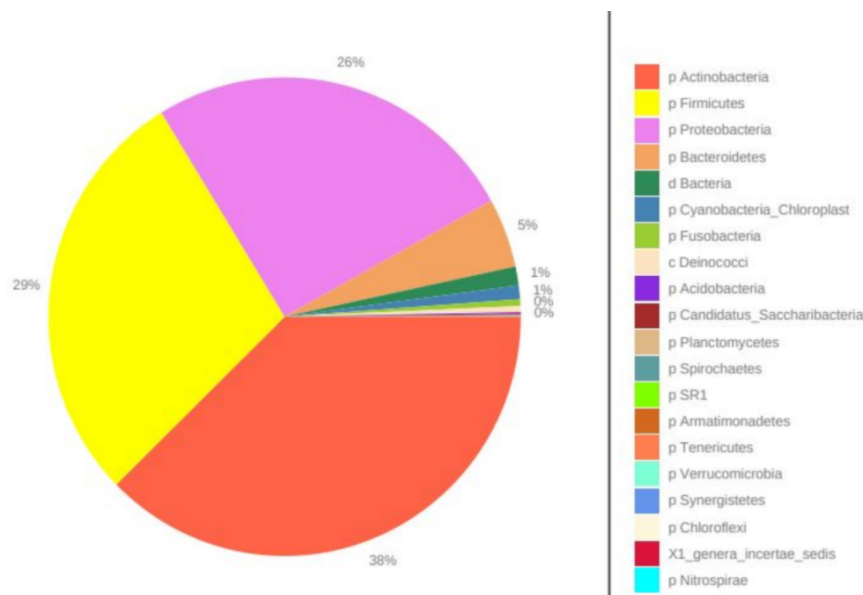


Figura 6: O gráfico representa uma análise qualitativa conjunta dos filos de bactérias totais encontradas nas amostras coletadas na zona interna do hospital nos anos de 2018 e 2019. Os dados mostraram uma predominância de Actinobacterias (38%), Firmicutes (29%) e Proteobacterias (26%) nos anos de 2018 e 2019. Além disso, 1% das bactérias detectadas na área interna, em ambos os anos, não apresentam identidade e/ou similaridade com dados de microorganismos presentes nos bancos de dados.

Nas figuras 2 e 3 é possível observar que há prevalência de bactérias dos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* nas zonas em que as amostras foram coletadas (hemocentro e áreas externa e interna do hospital). Esses filos são comumente associados à microbiota da pele humana, sendo consideradas bactérias comensais, pois exercem um papel protetor contra bactérias patogênicas (CHILLER; SELKIN; MURAKAWA, 2001) (DETHLEFSEN; MCFALL-NGAI; RELMAN, 2007). Assim, como as superfícies analisadas são frequentemente tocadas por pessoas, é condizente com a literatura que as amostras das superfícies analisadas apresentem esse perfil.

Nas figuras 4, 5 e 6 também foi possível observar maior prevalência de bactérias dos filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria* nas diferentes zonas no período de 2018 e 2019. Porém, vale ressaltar a diferença na prevalência de bactérias não identificadas, que não apresentam identidade e/ou similaridade com dados de microorganismos presentes nos bancos de dados, entre as zonas. No hemocentro e no ambiente externo do hospital, respectivamente 4% e 9% das bactérias não foram identificadas, enquanto este número cai para 1% no interior do hospital. Pode-se hipotetizar que os diferentes protocolos de limpeza e o número de pessoas que circulam nesses locais tem influência nesta população.

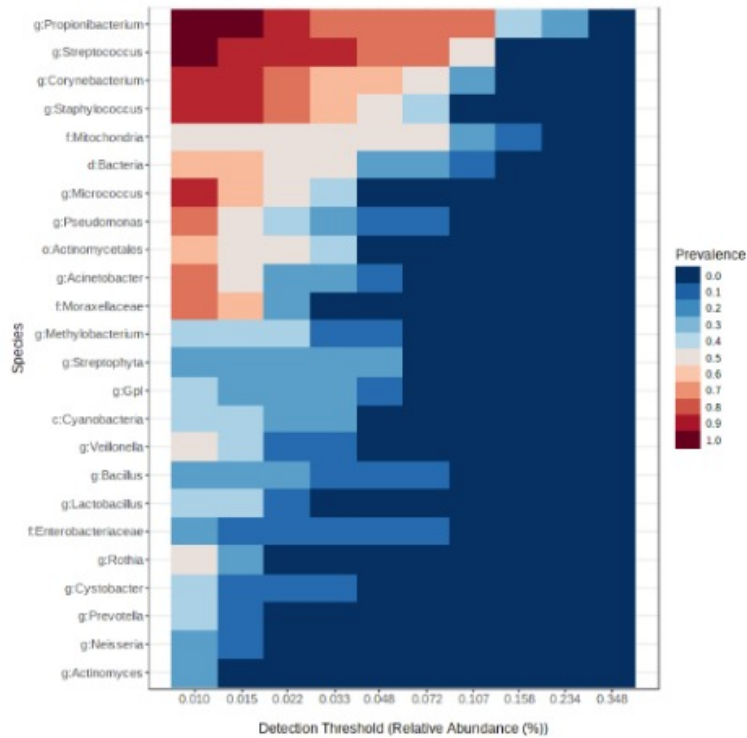


Figura 7: O core microbiome representado na figura mostra a prevalência dos gêneros de bactérias presentes nas amostras coletadas no Hemocentro nos anos de 2018 e 2019. O gradiente de cores mostra a prevalência das bactérias, sendo vermelho mais prevalente e azul menos prevalente. Nota-se uma prevalência de *Propionibacterium* e *Streptococcus*.

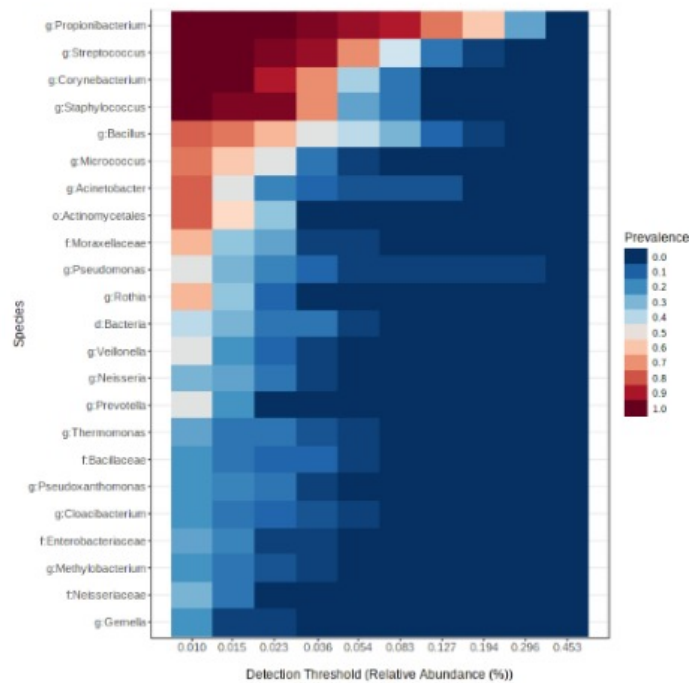


Figura 8: O core microbiome representado na figura mostra a prevalência dos gêneros de bactérias presentes nas amostras coletadas na zona interna do hospital nos anos de 2018 e 2019. O gradiente de cores mostra a prevalência das bactérias, sendo vermelho mais prevalente e azul menos prevalente. Nota-se uma prevalência de *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, e *Staphylococcus*. De fato, os dois últimos gêneros de bactérias podem estar associados às infecções hospitalares.

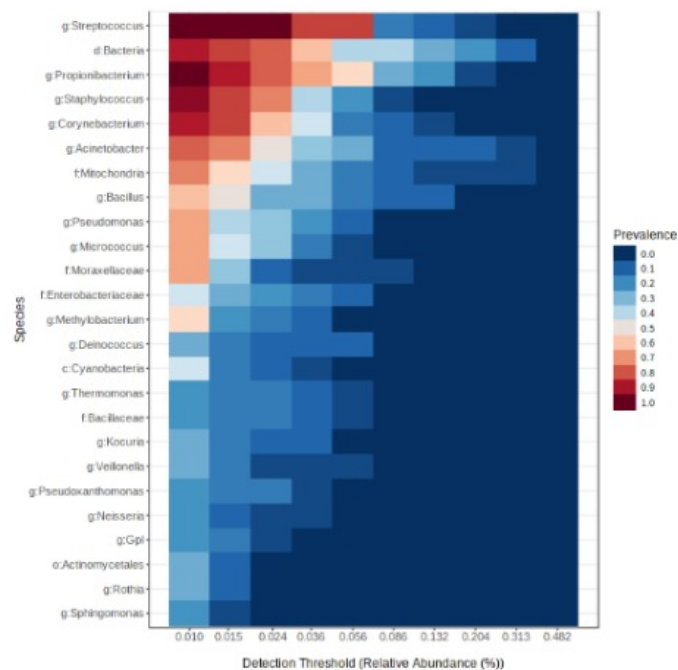


Figura 9: O core microbiome representado na figura mostra a prevalência dos gêneros de bactérias presentes nas amostras coletadas na zona externa do hospital nos anos de 2018 e 2019. O gradiente de cores mostra a prevalência das bactérias, sendo vermelho mais prevalente e azul menos prevalente. Nota-se uma prevalência de *Streptococcus*, *Propionibacterium*, bem como de bactérias desconhecidas.

Como podemos observar nas figuras 7, 8 e 9 há uma grande prevalência de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* nas amostras das zonas analisadas. Isso é importante pois, apesar do apresentado anteriormente, algumas bactérias dos filos mais prevalentes estão relacionadas à infecções em seus hospedeiros. Por exemplo, as bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, ambas firmicutes, estão relacionadas a patologias como pneumonias, endocardite, sepse e meningite (CHILLER; SELKIN; MURAKAWA, 2001). Além disso, espécies do gênero *Staphylococcus* estão relacionadas a infecções hospitalares por bactérias resistentes a antibióticos, como a *S. aureus* resistente à meticilina (LEMMEN; HÄFNER; ZOLLDANN; STANZEL; LÜTTICKEN, 2004).

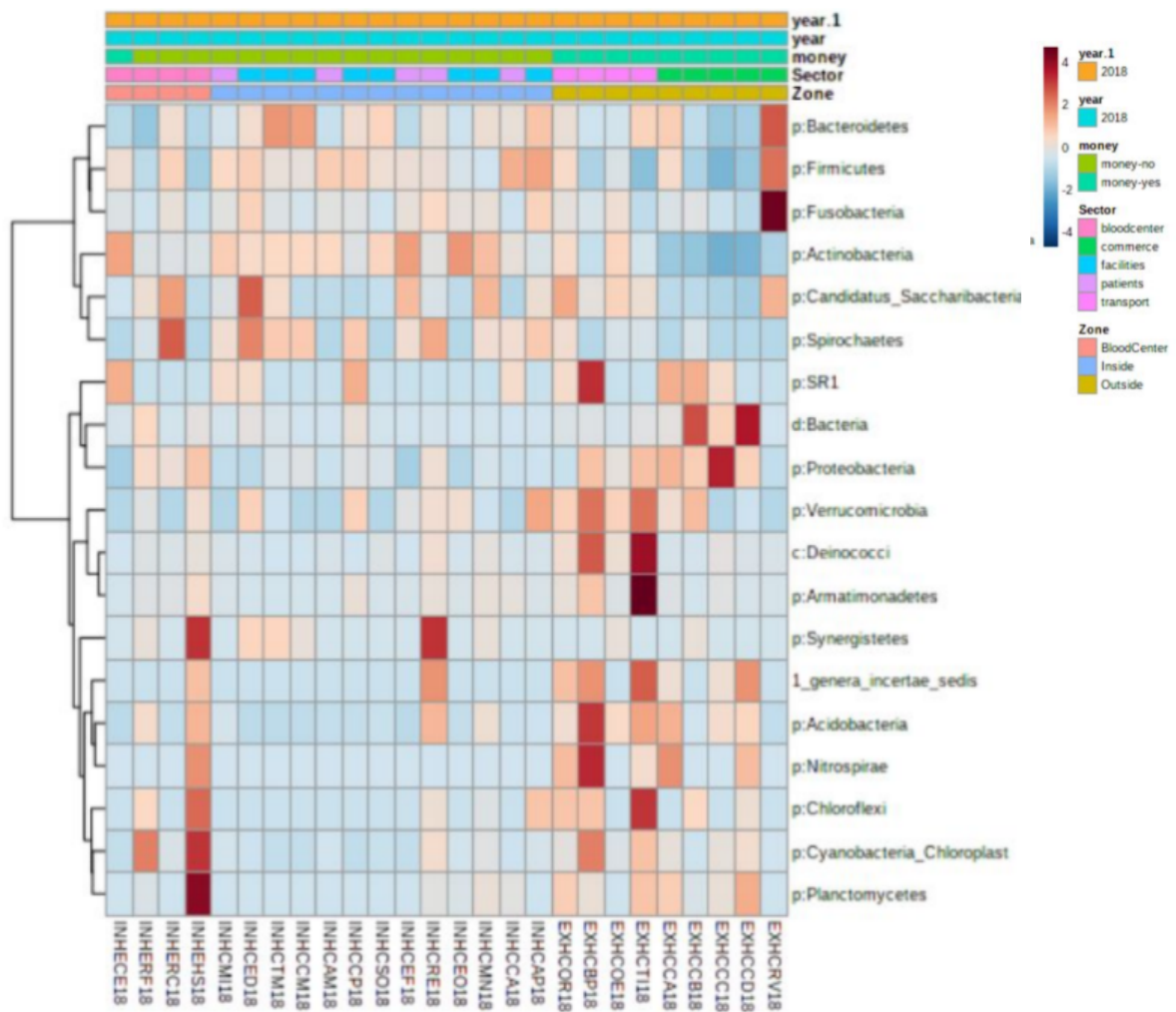


Figura 10: Heatmap clustering das amostras do ano de 2018 organizadas pelas respectivas zonas de coletas, Hemocentro, zona interna do hospital e zona externa do hospital.

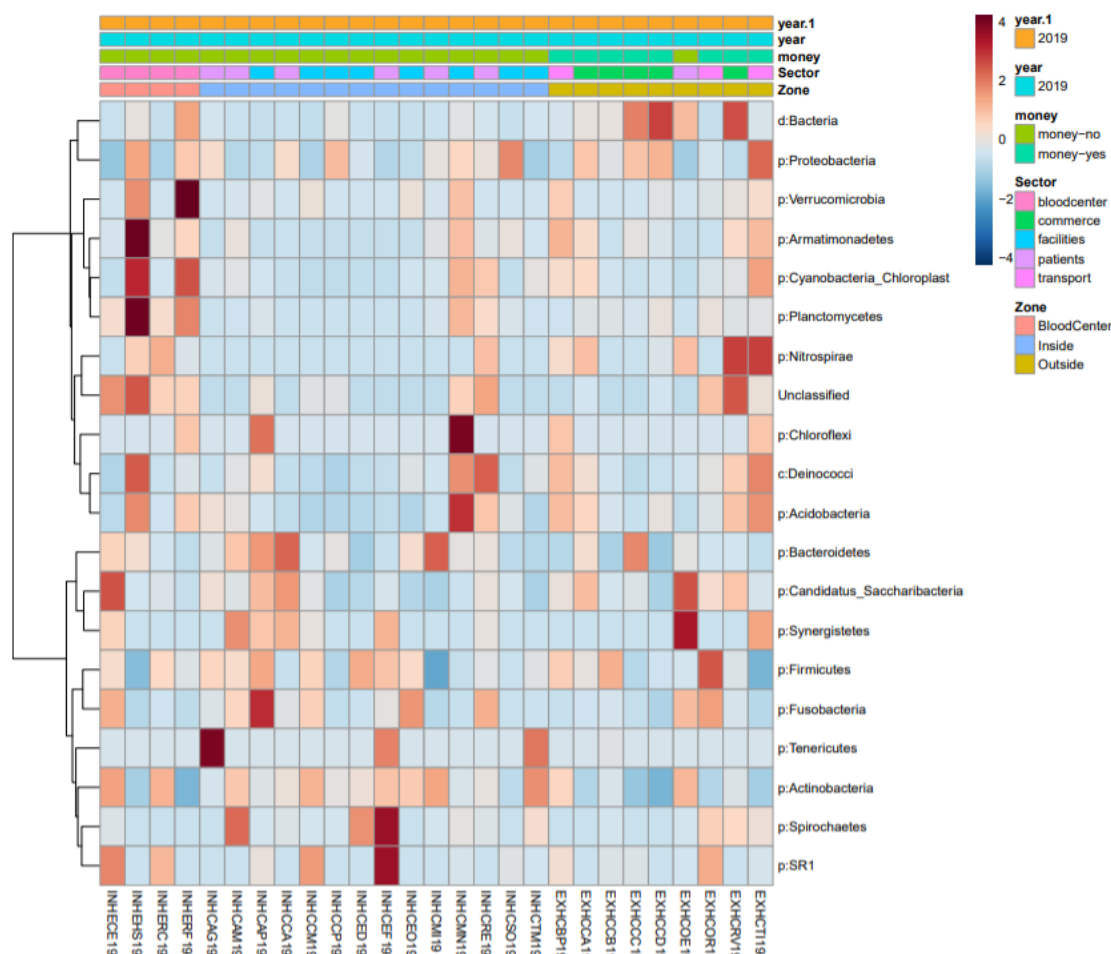


Figura 11: Heatmap clustering das amostras do ano de 2019 organizadas pelas respectivas zonas de coletas, Hemocentro, zona interna do hospital e zona externa do hospital.

Nas figuras 10 e 11, as amostras do ambiente interno hospitalar e do hemocentro apresentam populações bacterianas com menor diversidade filogenética em comparação com às amostras do ambiente externo hospitalar. Assim, é possível concluir que no ambiente externo hospitalar a população bacteriana é mais heterogênea em relação às outras zonas. Essa diferença entre os padrões ocorre, provavelmente, por conta da maior circulação de pessoas nos ambientes externos, bem como pelos diferentes protocolos de higienização que são estabelecidos para cada um dos ambientes. Essa análise é importante, pois, a menor diversidade bacteriana, comum à ambientes hospitalares, está relacionada a doenças imunológicas como asma e alergias (LAX; SANGWAN; SMITH; LARSEN; HANDLEY; RICHARDSON; GUYTON; KREZALEK; SHOGAN; DEFAZIO, 2017). Além disso, é possível observar a existência de bactérias desconhecidas (“d.bacteria”) em todas as zonas, principalmente no ambiente externo. É provável que isso esteja relacionado à grande circulação de pessoas nestes locais.

10. Conclusão do estudo:

A partir da análise dos resultados acima, podemos concluir que os filos mais prevalentes nas amostras de 2018 e 2019, tanto do hemocentro quanto das áreas interna e externa do hospital, foram *Firmicutes*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*. Bactérias que pertencem a esses filos são comumente encontradas na microbiota da pele humana. Como as superfícies em que as amostras foram coletadas são frequentemente tocadas por pessoas, esse dado é condizente com o esperado a partir da literatura.

Ademais, com a análise dos gêneros, foi possível identificar uma maior presença de *Corynebacterium* e *Staphylococcus* na área interna do hospital em relação às outras zonas, e bactérias desses gêneros podem estar envolvidas em infecções hospitalares.

No que diz respeito à diversidade da comunidade microbiana, as amostras do hemocentro e da área interna do hospital apresentam menor diversidade filogenética em comparação com as amostras do ambiente externo hospitalar. A menor diversidade está associada a doenças imunológicas e favorece a presença de bactérias patogênicas, o que pode ser prejudicial para os pacientes que circulam ali.

Por fim, estudos como esse são úteis para avaliar a segurança do ambiente hospitalar, entender como as comunidades bacterianas são constituídas e o papel dos ambientes externos aos hospitais nessa composição. Além disso, fornecem base teórica para o estabelecimento de medidas sanitárias que reduzam as infecções hospitalares e promovam o bem estar dos pacientes.

11. Referências

AMBARDAR, Sheetal; GUPTA, Rikita; TRAKROO, Deepika; LAL, Rup; VAKHLU, Jyoti. High Throughput Sequencing: an overview of sequencing chemistry. **Indian Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 56, n. 4, p. 394-404, 9 jul. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

CHILLER, Katarina; SELKIN, Bryan A.; MURAKAWA, George J.. **Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin**. Journal Of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, [S.L.], v. 6, n. 3, p. 170-174, dez. 2001. Elsevier BV.

DETHLEFSEN, Les; MCFALL-NGAI, Margaret; RELMAN, David A.. **An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease**. Nature, [S.L.], v. 449, n. 7164, p. 811-818, out. 2007. Springer Science and Business Media LLC.

GRADA, Ayman; WEINBRECHT, Kate. Next-Generation Sequencing: methodology and application. **Journal Of Investigative Dermatology**, [S.L.], v. 133, n. 8, p. 1-4, ago. 2013. Elsevier BV.

LAX, Simon; SANGWAN, Naseer; SMITH, Daniel; LARSEN, Peter; HANDLEY, Kim M.; RICHARDSON, Miles; GUYTON, Kristina; KREZALEK, Monika; SHOGAN, Benjamin D.; DEFAZIO, Jennifer. **Bacterial colonization and succession in a newly opened hospital**. Science Translational Medicine, [S.L.], v. 9, n. 391, p. 0-0, 24 maio 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

LEMMEN, S.W; HÄFNER, H; ZOLLDANN, D; STANZEL, S; LÜTTICKEN, R. **Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment**. Journal Of Hospital Infection, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 191-197, mar. 2004. Elsevier BV.

LU, Yuan; SHEN, Yingjia; WARREN, Wesley; WALTER, Ronald. Next Generation Sequencing in Aquatic Models. **Next Generation Sequencing - Advances, Applications And Challenges**, [S.L.], p. 62-79, 14 jan. 2016. InTech.

SLATKO, Barton E.; GARDNER, Andrew F.; AUSUBEL, Frederick M.. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. **Current Protocols In Molecular Biology**, [S.L.], v. 122, n. 1, p. 1-15, abr. 2018. Wiley.