



SEQUENCIAMENTO DE DNA APLICADO À ANÁLISE DA VARIABILIDADE GÊNICA ENTRE CEPAS BACTERIANAS MULTIRRESISTENTES

Hirisleide Bezerra Alves¹; Hirisdiane Bezerra Alves²; Adriana Raquel Araújo Pereira Soares³; Guilherme César Soares⁴; Fábio Rodrigo Araújo Pereira⁵.

¹ Pós-Graduada em Microbiologia Clínica/ Faculdade Maurício de Nassau-CG, hirisleidebezerra@gmail.com

² Graduada em Enfermagem/ Faculdade Maurício de Nassau-CG, dianyalves06@gmail.com

³ Graduada em Enfermagem/ Universidade Estadual da Paraíba – CG, dinharaquel@hotmail.com

⁴ Graduado em Medicina/ Faculdade de Ciências Médicas – CG, fraper21@gmail.com

⁵ Docente/ Faculdade Maurício de Nassau-CG, Doutorando em Agronomia – Universidade Federal da Paraíba, fabiorodrigopereira@hotmail.com

RESUMO

O aparecimento de cepas bacterianas multirresistentes foi, é e provavelmente continuará a ser um dos grandes problemas de saúde pública, sendo causada pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural dando vantagens aos mais aptos. A resistência bacteriana pode ser transferida por mecanismos diversos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações. Os mecanismos de mobilização de genes entre cepas bacterianas de mesma espécie, bem como entre espécies diferentes, propicia elevado potencial à distribuição de genes de resistência, diminuindo a sensibilidade das mesmas aos antimicrobianos e potencializando sua capacidade de disseminação. Diante disso, o presente trabalho objetiva apresentar a técnica de sequenciamento de DNA como metodologia voltada à análise da variabilidade gênica entre cepas multirresistentes. Para tal, realizou-se uma revisão bibliográfica integrativa na qual as bases de dados do MEDLINE/PUBMED, LILACS, *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), DOT LIB e Revistas Eletrônicas de Saúde foram consultadas para o levantamento de artigos científicos publicados em periódicos indexados e livros, compreendidos no período de 2005 a 2017. Na estratégia de busca, foram utilizados os descritores: Resistência bacteriana; Antimicrobianos; Cepas multirresistentes; Sequenciamento genômico. Entre 31 fontes encontradas, 20 foram selecionadas a constituir tal revisão integrativa. O sequenciamento do genoma bacteriano constitui uma técnica primordial à identificação e diferenciação entre cepas de modo fidedigno, a partir da análise das sequências de nucleotídeos (DNA). Através de técnicas de sequenciamento é possível caracterizar cepas com diferentes genes de resistência, bem como identificar diferenças genômicas entre cepas de mesma espécie por análise de elementos genéticos móveis divergentes. Entre as técnicas de sequenciamento genômico, destaca-se atualmente o Next Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração), que engloba principalmente a Plataforma 454 e Solexa.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência Bacteriana; Sequenciamento Genômico; Plataformas de Sequenciamento.

INTRODUÇÃO

A multirresistência bacteriana consiste em um grave problema no contexto hospitalar, caracterizando-se como principal entrave no controle de infecções nosocomiais, as quais são comuns e problemáticas devido a sua frequência, morbidade e mortalidade (GARCIA et al.,



2012). Infecção nosocomial (infecção hospitalar) corresponde a toda infecção relacionada à hospitalização, assim considerada quando o período de incubação do patógeno causador da infecção for desconhecido e não houver evidência clínica e/ou dado laboratorial de infecção no momento da internação; ou o surgimento de qualquer manifestação clínica de infecção a partir de 72 horas após a admissão, estando o paciente com diagnóstico de infecção comunitária e for isolado um microrganismo diferente, seguido do agravamento das condições clínicas do mesmo (NOGUEIRA et al., 2009).

A propagação das infecções nosocomiais é favorecida por aspectos intrínsecos ao próprio ambiente hospitalar, que reúne pessoas com diferentes vulnerabilidades a infecções, apresenta inúmeros procedimentos invasivos, além de propiciar à seleção de agentes infecciosos resistentes devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos (ALOUSH et al., 2006). Essa manipulação inadequada de antibióticos aumenta a pressão seletiva sobre bactérias, condicionando à aquisição de mecanismos de resistência (GARCIA et al., 2012). Na atualidade, a resistência bacteriana adquirida é descrita em praticamente todas as espécies de bactérias, configurando um agravante ao potencial de disseminação das mesmas (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas (ALANIS, 2005). Estes genes podem codificar enzimas inativadoras dos antimicrobianos, capazes de promover a transferência de agrupamentos químicos ou possuem atividade hidrolítica, como as conhecidas β -lactamases que clivam anéis β -lactâmicos de penicilinas e cefalosporinas, desencadeando a perda da função antimicrobiana (CAUMO et al., 2010). Além disso, os genes podem conferir características celulares que interferem na atividade dos antimicrobianos, como a composição bioquímica da parede celular bacteriana, as quais conferem impermeabilidade a determinadas substâncias; diminuição de receptores de membrana para antibióticos e presença de proteínas específicas para a exportação de substâncias nocivas ao metabolismo celular (bombas de efluxo) (OLIVEIRA; SILVA, 2008).

A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o DNA cromossômico, responsáveis pelo código genético (MOTA et al., 2005). A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e



conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídeos (elementos genéticos extracromossomais tipicamente circulares e pequenos com replicação autônoma presentes no interior da célula bacteriana; podem conter genes de resistência a antibióticos e existir livremente no organismo ou, ainda, integrar o DNA cromossômico bacteriano) e transposons (que são segmentos móveis especializados de DNA e que podem estar inseridos aleatoriamente em plasmídeos e/ou cromossomos bacterianos e ser transferidos entre bactérias de mesma espécie ou entre bactérias de diferentes cepas ou espécies) (CAUMO et al., 2010; TOLEMAN, 2006).

Os mecanismos de mobilização de genes entre cepas bacterianas de mesma espécie, bem como entre espécies diferentes, propicia elevado potencial à distribuição de genes de resistência, diminuindo a sensibilidade das mesmas aos antimicrobianos e potencializando sua capacidade de disseminação. Nesse contexto, a análise e identificação de cepas bacterianas multirresistentes é primordial à avaliação do mecanismo de adaptabilidade e evolução das mesmas. Logo, a técnica de sequenciamento de DNA constitui ferramenta chave na análise genômica bacteriana, permitindo identificar plasmídeos, transposons e outros elementos genéticos móveis que foram incorporados ao genoma, e principalmente possibilitar a diferenciação fidedigna de cepas multirresistentes.

Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo abordar a técnica de sequenciamento de DNA como método de identificação de cepas bacterianas multirresistentes, apresentando as principais metodologias de sequenciamento genômico.

METODOLOGIA

A pesquisa corresponde a uma revisão bibliográfica integrativa, na qual as bases de dados do MEDLINE/PUBMED, LILACS, *Scientific Electronic Library Online* (SCIELO), DOT LIB e Revistas Eletrônicas de Saúde foram consultadas para o levantamento de artigos científicos publicados em periódicos indexados e livros, compreendidos no período de 2005 a 2017. Na estratégia de busca, foram utilizados os descritores: Resistência bacteriana; Antimicrobianos; Cepas multirresistentes; Sequenciamento genômico. Entre 31 fontes encontradas, 20 foram selecionadas a constituir tal revisão integrativa, utilizando-se como critérios de inclusão livros e artigos em português e inglês intrínsecos ao tema, com ênfase na problemática proposta. Após uma ampla seleção, os artigos e livros foram sistematicamente lidos e analisados com objetivo de confrontar as variáveis de interesse do estudo com os achados da literatura.



RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sequenciamento do genoma bacteriano constitui uma técnica primordial à identificação e diferenciação entre cepas de modo fidedigno, a partir da análise das sequências de nucleotídeos (DNA). Através de técnicas de sequenciamento é possível caracterizar cepas com diferentes genes de resistência, bem como identificar diferenças genômicas entre cepas de mesma espécie por análise de elementos genéticos móveis divergentes. Entre as técnicas de sequenciamento genômico, destaca-se atualmente o Next Generation Sequencing (Sequenciamento de Nova Geração), que engloba principalmente a Plataforma 454 e Solexa.

A Plataforma 454 (Pirosequenciamento) corresponde a tecnologia voltada ao sequenciamento de DNA com base no princípio do "sequenciamento por síntese", com elevada eficiência e rapidez, disponibilizada no mercado pela empresa Roche (sequenciador 454 GS20) (MARDIS, 2008).

Este método pode ser dividido em três etapas: preparo da amostra, PCR em emulsão e sequenciamento. Na primeira etapa, o DNA é fragmentado aleatoriamente por nebulização, sendo selecionados os fragmentos com tamanho adequado. Em seguida, liga-se dois adaptadores (A e B) às extremidades dos fragmentos selecionados. Os fragmentos obtidos são ligados à microesferas magnéticas por meio do pareamento do adaptador B com sequências curtas complementares presentes na superfície da microesfera, onde ocorrerá a amplificação deste fragmento. O adaptador A, por sua vez, servirá de molde para anelamento do *primer* responsável pelo início da amplificação (MARGULIES et al., 2005; MOREIRA, 2015).

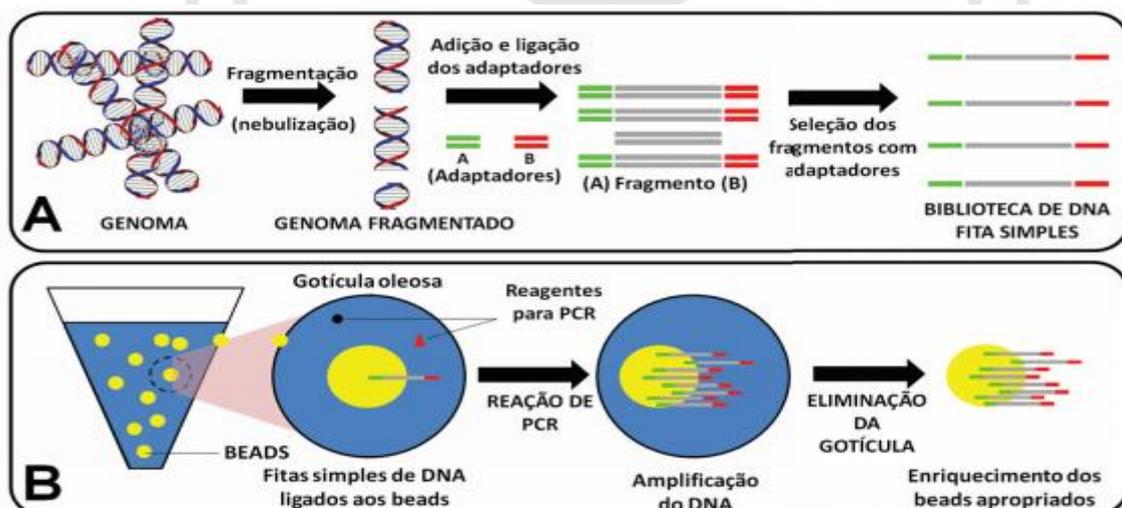
As microesferas ligadas aos fragmentos únicos de fita simples são então emulsionadas em uma mistura de água e óleo com reagentes de PCR para amplificação clonal do fragmento fita simples em cerca de 1 milhão de cópias. Desta forma, estas microesferas agem como reatores de amplificação individual produzindo milhares de cópias de um único molde. Na PCR em emulsão, o óleo em solução aquosa forma micelas, nas quais as microesferas são capturadas (CARVALHO; SILVA, 2010). Cada micela funcionará como um microrreator, produzindo muitas cópias idênticas de um mesmo fragmento isoladamente em um microsuporte. Na última etapa, estas microesferas são adicionadas a uma placa de modo que cada orifício da placa receba uma única microesfera. Posteriormente são adicionados os reagentes necessários para sequenciamento do DNA (MARDIS, 2008).

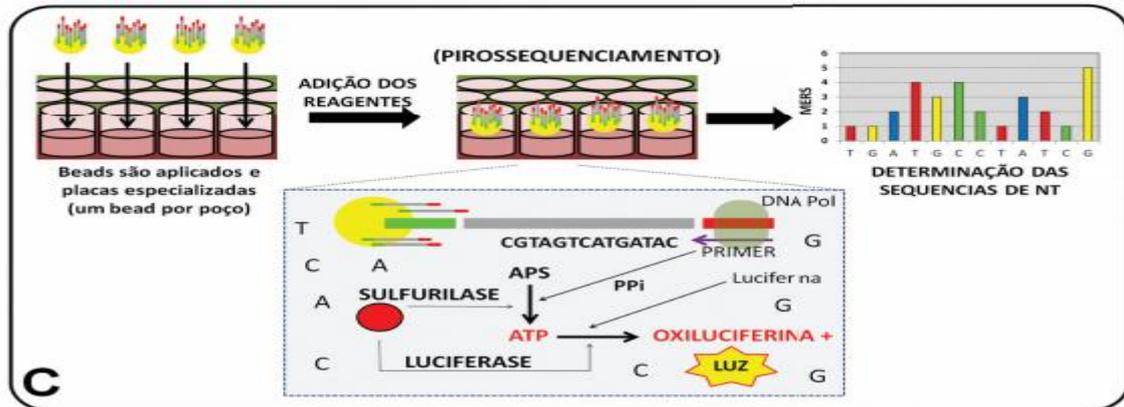
As reações de sequenciamento ocorrem em cada poço, para um único tipo de fragmento ligado à microesfera, não havendo, portanto, competição por reagentes com outros fragmentos

da biblioteca (MOREIRA, 2015). Pirofosfato inorgânico (PPi) é liberado a cada incorporação de um nucleotídeo complementar a fita molde. Este PPi livre é convertido, pela enzima ATP sulfurilase, em ATP, que por sua vez fornece energia para oxidar a luciferina à oxiluciferina. Como consequência desta reação, temos a emissão de luz. Desta forma, cada incorporação de nucleotídeo à cadeia de DNA nascente emitirá luz, imediatamente convertida em pirogramas. A interpretação destes “pirogramas” permite identificar as sequências de nucleotídeos do DNA molde (MOROZOVA; MARRA, 2008). Todas as etapas estão representadas na Figura 1.

O sequenciamento é realizado em ciclos, e a cada ciclo um tipo determinado de nucleotídeo é adicionado à reação. Se o nucleotídeo adicionado for incorporado à sequência em síntese, um sinal de luz é emitido, sendo a intensidade desse sinal um reflexo do número de nucleotídeos desse tipo específico que foram sucessivamente incorporados na molécula. Como o nucleotídeo que é adicionado a cada ciclo é conhecido, o sinal de luz emitido pode ser diretamente utilizado como informação de sequência. As leituras produzidas possuem geralmente cerca de 250 pb (CARVALHO; SILVA, 2010).

Figura 1. Esquema do processo de sequenciamento usando uma plataforma 454. Em (A) o DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A (verde) e B (vermelho) em suas extremidades. Em (B) os fragmentos da biblioteca são ligados às microesferas magnéticas por meio do pareamento do adaptador B. As microesferas são então capturadas individualmente em gotículas oleosas, onde a PCR em emulsão deverá ocorrer. Então (C) as microesferas ligadas às sequências alvo de fita simples são capturadas individualmente em poços no suporte de sequenciamento. Em seguida, são fornecidos os reagentes para a reação de pirosequenciamento. Cada nucleotídeo incorporado, em cada um dos poços da placa de sequenciamento, liberará um pirofosfato que será convertido em luz e, conseqüentemente, registrado na forma de pirograma.





FONTE: MOREIRA (2015)

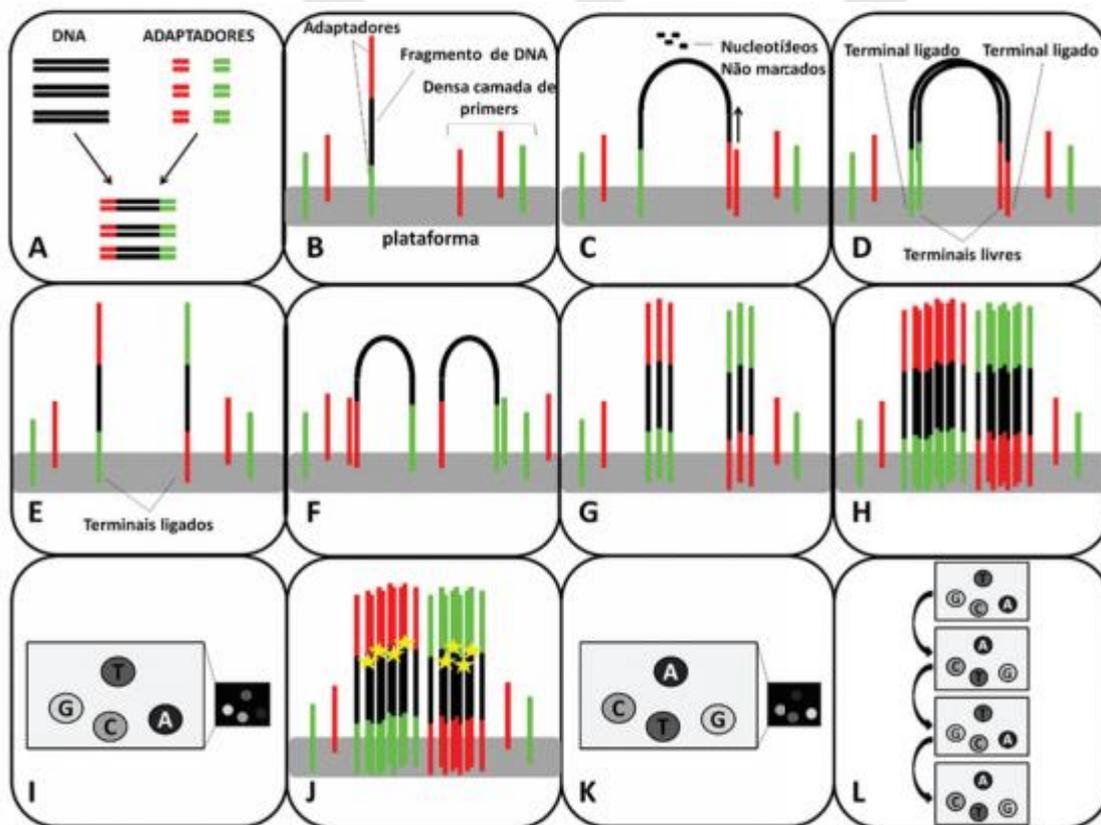
O desenvolvimento da plataforma Illumina® (Solexa) ocorreu devido ao trabalho conjunto de quatro companhias: Solexa, Lynx Therapeutics, Manteia Predictive Medicine e Illumina, baseando-se na metodologia proposta por Turcatti (2008) e colaboradores. Esta parceria resultou no desenvolvimento do sequenciador *Illumina Genome Analyser*. O princípio desta metodologia é similar ao método proposto por Sanger, pois temos em ambas a síntese de uma fita complementar ao DNA alvo utilizando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A fluorescência emitida após a incorporação de cada nucleotídeo é registrada como imagem e no final, através de uma decodificação destas imagens, tem-se a sequência de interesse (MOREIRA, 2015).

A inovação dessa plataforma consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo também conhecido como PCR de fase sólida (FEDURCO et al., 2006; TURCATTI et al., 2008). A superfície de clonagem (*flowcells*) é dividida em oito linhas que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização (MOREIRA, 2015).

Os fragmentos de DNA da amostra são também ligados aos adaptadores em ambas as extremidades, o que permite sua fixação ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados. No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são fornecidos para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A alta densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento (MARDIS, 2008). Após o ciclo de

anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 35 vezes e assim as cerca de mil cópias geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um *cluster* de sequenciamento (CARVALHO; SILVA, 2010). A Figura 2 ilustra o processo de sequenciamento via Plataforma Illumina.

Figura 2. Princípio da técnica Illumina. Em (A) tem-se a fragmentação do DNA a ser sequenciado, com posterior ligação de adaptadores em ambas as extremidades. Em (B), estes fragmentos são colocados em uma placa de vidro (*flowcell*) densamente povoada por adaptadores complementares aos adaptadores contidos nas extremidades dos fragmentos, de maneira que os fragmentos possam então se ligarem à placa. Em (C), ocorre a incorporação de nucleotídeos não marcados com fluorescência até que toda a extensão do fragmento seja amplificada. Em (D) tem-se a formação da estrutura em ponte. Em (E) ocorre a desnaturação do duplex. Em (F) os adaptadores livres se ligam a adaptadores complementares na placa, iniciando um novo ciclo. Em (G), temos o *cluster* sendo formado, o qual provavelmente conterá mais de um milhão de cópias do mesmo fragmento. Em (H) adiciona-se os quatro tipos de didesoxinucleotídeos terminadores reversíveis contendo fluoróforos, junto com a enzima DNA polimerase, que fará a incorporação do didesoxinucleotídeo apropriado. Em “I” ocorre o registro da imagem correspondendo a incorporação do primeiro didesoxinucleotídeo. “J” e “K” representam sucessivos ciclos de incorporação de didesoxinucleotídeos marcados, incidência de raios laser, emissão de luz e registro da imagem. Por fim, em “L”, as imagens registradas em cada ciclo são decodificação para determinar a sequência de bases de cada *cluster* na placa.



FONTE: MOREIRA (2015)



Etapas de desnaturação são necessárias para a separação dos duplex formados e, nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada *cluster*. A alta densidade dos *clusters* de sequenciamento possibilita que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Até 50 milhões de *clusters* podem ser produzidos por linha, correspondendo a uma representação satisfatória da amostra (MOREIRA, 2015; TURCATTI et al., 2008).

Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, a leitura do sinal de fluorescência é realizada. Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes e remoção do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento. Em geral, leituras de 25-35 bases são obtidas de cada *cluster* (FEDURCO et al., 2006).

A *flowcell* pode ser dividida em regiões (chamadas de canais ou linhas). No entanto, dependendo do objetivo do pesquisador, é possível sequenciar várias amostras por região (multiplex). Para isto, é necessário adicionar um pequeno adaptador que difere para cada uma das amostras a serem sequenciadas. O número de amostras a serem sequenciadas, em uma única corrida, está diretamente relacionado com a cobertura desejada (MOREIRA, 2015).

Além das plataformas envolvidas no sequenciamento de nova geração, o sequenciamento do Loco CRISPR constitui uma ferramenta chave na genotipagem de cepas. CRISPR (do inglês *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespçadas, consiste em pequenas porções do DNA bacteriano compostas por repetições de nucleotídeos. Cada uma dessas repetições encontra-se adjacente a um “protoespaçador” (“espaçador de DNA”), que corresponde a uma região codificante inserida no DNA bacteriano após o contato com genomas invasores provenientes de bacteriófagos ou plasmídeos (PEREIRA, 2016).

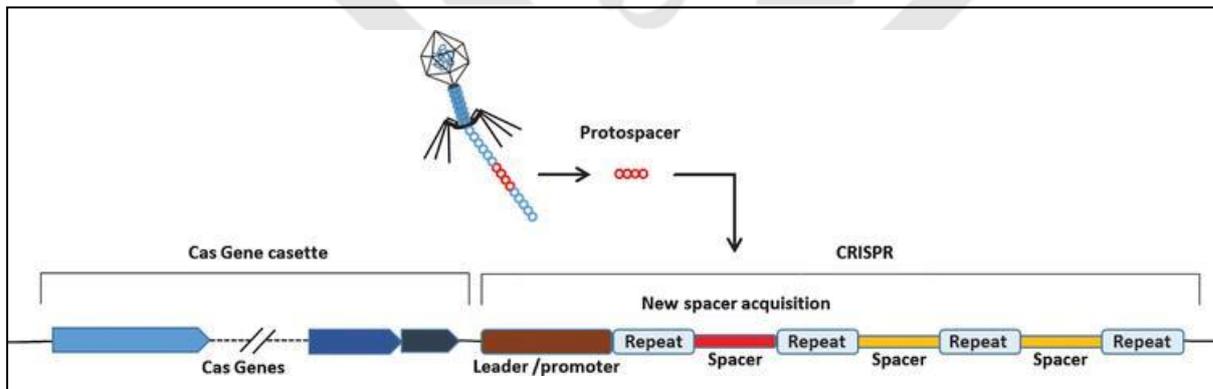
O loco (região) CRISPR foi identificado em 1987, pelo pesquisador Yoshizumi Ishino e colaboradores da Universidade de Osaka (Japão), no genoma da bactéria *Escherichia coli*, correspondendo a um loco peculiar constituído por uma configuração incomum: sequências repetidas e sequências espaçadoras intercaladas e de função desconhecida. Tais sequências foram investigadas independentemente em 1993, e em 2000 elas foram identificadas nos

genomas de diferentes bactérias e Archaea (BARRANGOU et al., 2007; PEREIRA, 2016).

As sequências espaçadoras foram identificadas em 2005 por três grupos independentes de pesquisadores, os quais mostraram que as mesmas têm origem extracromossômica, isto é, são derivadas de plasmídeos ou de vírus. Adicionalmente, foi também descrito que vírus são incapazes de infectar com sucesso bactérias que possuem espaçadores cujas sequências são correspondentes a trechos de seus genomas (BOLOTIN et al., 2005). Adjacente ao loco CRISPR foi discernido um conjunto de genes nomeados genes *Cas*, exemplificados por nucleases, polimerases e helicases, fundamentais no funcionamento do loco como um todo, constituindo o sistema CRISPR-*Cas* (PEREIRA, 2016).

À medida que a bactéria é infectada pela primeira vez pelo vírus, algumas enzimas codificadas pelos genes *Cas* clivam o DNA do patógeno em pequenos segmentos (24-48 pares de bases) e os integram no loco CRISPR como novos espaçadores (ou seja, entre as sequências repetidas). A partir deste momento, a bactéria está imunizada contra futuras invasões deste mesmo agente (MAKAROVA et al., 2011). A Figura 16 ilustra a incorporação do material genético exógeno ao loco CRISPR.

Figura 16. Incorporação do material genético do agente invasor ao loco CRISPR.



FONTE: PEREIRA (2016).

Este sistema e seus elementos são variáveis entre as diferentes espécies em termos de ocorrência, composição gênica, sequências, número e tamanho. Em especial, a composição dos espaçadores pode variar até mesmo entre indivíduos da mesma espécie, visto que elas derivam de contatos anteriores com diferentes patógenos (BOLOTIN et al., 2005). Pesquisas tem revelado a importância do funcionamento do sistema CRISPR-Cas para inúmeras aplicações: resistência bacteriana a fagos; controle da disseminação de genes, via transferência horizontal; genotipagem de cepas (baseada na hipervariabilidade dos



espaçadores) e estudo da dinâmica populacional microbiana (PEREIRA, 2016).

Denotando a variabilidade genética intrínseca ao loco CRISPR, o sequenciamento do mesmo representa relevante aplicabilidade a fim de identificar genótipos, principalmente, cepas bacterianas patogênicas com resistência a antimicrobianos, posto que, tal característica comumente decorre da inserção de material genético exógeno à bactéria (PASTERNAK, 2007).

CONCLUSÃO

A multiresistência bacteriana constitui um entrave à propagação de infecções hospitalares, sendo caracterizada pela capacidade da bactéria sobreviver sob ação de antimicrobianos de amplo espectro. A aquisição de genes de resistência geralmente ocorre através de plasmídeos e transposons, envolvendo transferência entre as bactérias. Logo, diferentes cepas apresentam a incorporação de elementos genéticos variáveis dependendo da exposição a estes.

Dessa forma, a identificação das cepas variantes a partir de sequenciamento genômico é imprescindível à caracterização das mesmas, visto que há divergências entre cepas de mesma espécie. Nesse contexto, plataformas de sequenciamento do DNA permitem a anotação do genoma e consequente comparação, fornecendo dados cruciais ao conhecimento gênico e análise de sequências de genes de resistência.

REFERÊNCIAS

ALANIS, J. A. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? **Archives of Medical Reserch**. v. 36, p. 697-705, 2005.

ALOUSH, Valerie. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 43-48, 2006.

BARRANGOU, Rodolphe. et al. CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1709-1712, 2007.

BOLOTIN, Alexander. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, v. 151, n. 8, p. 2551-2561, 2005.

CARVALHO, Mayra Costa da Cruz Gallo; SILVA, Danielle Cristina Gregório.
Sequenciamento de DNA de nova geração e suas



aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 735-744, 2010.

CAUMO, Karin. et al. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. **Revista Liberato**, v. 11, n. 16, 2010.

FEDURCO, Milan. et al. BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 3, p. 10-22, 2006.

GARCIA, Lúcia Maria. et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.

MARAKOVA, Kira S. et al. Evolution and classification of the Crispr-Cas systems. **Microbiology**, v. 9, n. 6, p. 467-477, 2011.

MARDIS, Elaine R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 9, p. 387-402, 2008.

MARGULIES, Marcel. et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, v. 437, p. 376-380, 2005.

MOREIRA, Leandro Márcio. **Ciências Genômicas: Fundamentos e Aplicações**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2015.

MOROZOVA, Olena; MARRA, Marco A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, n. 5, p. 255-264, 2008.

MOTA, Rinaldo Aparecido. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NOGUEIRA, Paula Sacha Frota. et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. **Revista de Enfermagem**, v. 17, n. 1, p. 96-101, 2009.

OLIVEIRA, Adriana Cristina; SILVA, Rafael Souza. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189-197, 2008.

PASTERNAK, Jack J. **Uma Introdução à Genética Molecular Humana**. 2. ed. Rio de



Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

PEREIRA, Tiago Campos. **Introdução à técnica de CRISPR**. 1. ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2016.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 70, n. 2, p. 296 - 316, 2006.

TURCATTI, Gerardo. et al. A new class of cleavable fluorescent nucleotides: synthesis and optimization as reversible terminators for DNA sequencing by synthesis. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 4, p. 13-25, 2008.

