

Desenho e Validação de *Primers* In Silico para Detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano

Design and Validation of *Primers* In Silico for Detection of Human Respiratory Syncytial Virus

Jackson Alves da Silva Queiroz¹, Luciane Soares Alves¹, Deusilene Souza Vieira Dall'acqua², Luan Felipe Botelho Souza³

¹Bacharel em Biomedicina – Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA), ²Professora, Doutora – Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA), ³Pesquisadora, Doutora – Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (FIOCRUZ-RO), ³Professor, Mestre – Faculdades Integradas Aparício Carvalho (FIMCA)

RESUMO

Introdução: O desenvolvimento de *primers* é extremamente importante para pesquisas moleculares. **Objetivos:** O presente estudo objetivou desenhar e validar *primers in silico* para detecção do vírus sincicial respiratório humano (RSVH). **Materiais e Métodos:** Foi construído um banco de 100 sequências de genoma completo do Vírus Sincicial Respiratório Humano (RSVH) depositadas no *Genbank (NCBI)*. Realizado um alinhamento múltiplo global utilizando o algoritmo *Clustal W*, mapeadas as regiões conservadas e selecionado os *primers*. Posteriormente submetidos à análise dos parâmetros especificidade, pela ferramenta *BLAST*, concentração de GC%, *T_Mmelting*, comprimento, formação de *dímeros* e *hairpin* utilizando o *software Oligo Analyser*, validando-os para uso *in vitro*. Para discussão dos resultados, foram selecionados 14 *primers* de estudos realizados, submetidos à metodologia proposta neste estudo, comparando os dados obtidos. A região alvo escolhida foi o gene da Glicoproteína G, pela presença de sítios conservados. **Resultados:** Os *primers* amplificam um fragmento de 381pb, que submetido a uma segunda PCR, resulta em 109 pb correspondente ao tipo A do vírus e 168 pb para o tipo B, permitindo a detecção viral e a distinção de genótipos. Os *primers* possuem tamanho de 21 a 24 pb, com uma temperatura de melting entre 48,9° C e 55,3° C. A concentração de GC% varia de 33,3% a 52,4%. O número de bases complementares na análise de *dímeros* e *hairpin* manteve-se abaixo de 5 bases. A Energia Livre de Gibbs (Delta G) acima de -9 kcal.mole(-1) como desejado. **Conclusão:** Os valores obtidos na validação dos *primers* estão em concordância com os já utilizados em estudos de referência, validando assim o seu uso *in vitro*. **Palavras-chave:** Desenho de *primers*. Bioinformática. Vírus Sincicial Respiratório. Análise In Silico. *Dímeros*. *Hairpin*.

ABSTRACT

Introduction: Developing *primers* is extremely important to molecular researches. **Objectives:** This study aims to drawing and validate *in silico primers* for detection of Human Respiratory Syncytial Virus (RSVH). **Materials and Methods:** It was built a database of 100 complete genome sequences of Human Respiratory Syncytial Virus (RSVH) deposited in the Genbank (NCBI), carried out a global multiple alignment using the algorithm Clustal W, thus mapping the conserved regions, and selecting *primers*, subsequently submitted to analysis of parameters such as specificity, by the BLAST tool, concentration of GC% *T_Mmelting*, length, and formation of dimers and hairpins using the software Oligo Analyser, validating them to use *in vitro*. For discussion of the results, we selected 14 *primers* of studies already carried out and submitted the methodology proposed in this study, comparing the data obtained. The selected target region was the gene encoding the Glycoprotein G, by the presence of conserved sites. **Results:** The *primers* selected amplifies a fragment of 381 bp in the 1st PCR, which subjected to a second PCR results in 109 bp corresponding to the type A of the virus and 168 base pairs for the type B what allows not only viral detection, as the distinction of the type to which it belongs. The *primers* have size from 21 to 24 base pairs, having a melting temperature (*T_Mmelting*) between 48,9° C and 55,3° C and GC% concentration ranging from 33.3% to 52.4%. The number of complementary bases in the dimers and hairpins analysis was maintained below 5 bases, while the Gibbs free energy (Delta G) was kept above kcal.mole -9(-1) as desired. **Conclusion:** All values obtained in the validation of the *primers* are in agreement with the ones already used in the reference studies, thereby validating its use *in vitro*. **Key words:** Drawing primers, Bioinformatics, Respiratory Syncytial Virus, In Silico Analysis, Dimers, Hairpin.

INTRODUÇÃO

Desenvolvida em 1983 e que concedeu a Kary B. Mullis o Prêmio Nobel de química (MULLIS, 1990, SMITH; CANTOR, 1987) a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, PCR, têm crescido a cada dia como método de diagnóstico molecular para agentes infecciosos estando em constante avanço no meio científico e deve ser cada vez mais explorado (CAVALCANTI, 2008). Esta técnica, em estudos comparativos, apresenta uma maior eficiência e sensibilidade no diagnóstico de vírus respiratórios quando comparado com a técnica de

Imunofluorescência (MINALI; DEBUR; FERRARI, 2015). O uso da técnica de multiplex PCR, uma variação da PCR, também já é uma realidade, permitindo a detecção de diferentes espécies de vírus em uma mesma reação (HAMMITT et al., 2011, COIRAS et al., 2003). Para realizar a PCR, alguns componentes são necessários, como DNTPs (Nucleotídeos) que irão compor a nova fita de DNA, tampão, responsável por proporcionar o pH ideal para a reação, a DNA Polimerase, enzima que sintetiza a nova fita e o cloreto de magnésio, co-fator essencial para sua atividade (ALBERTS et al., 2002). Para que a Polimerase exerça sua função, é necessária a presença de oligonucleotídeos, denominados *primers*, que se ligam ao DNA alvo, indicando a região do genoma a ser amplificada (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Sendo assim, é imprescindível que se tenha um par de *primers* específico capaz de se ligar exclusivamente na região genômica de interesse, para se obter um produto de PCR que seja satisfatório (KUBISTA et al., 2006).

Graças ao avanço da bioinformática como ferramenta a ser utilizada nas pesquisas atuais (ARBEX; SILVA; COSTA, 2006) e ao gigantesco aumento de sequências depositadas no GenBank do NCBI (banco central de dados genômicos) desde 1982 (NCBI, 2015), pode-se dispor de ferramentas e softwares de bioinformática para aplicação no desenho de *primers*. Esta etapa é considerada como a mais importante de uma PCR, pois a bioinformática propicia informações sobre os vírus, possibilitando selecionar genomas de diferentes países e a partir desses dados desenhar *primers* de alta qualidade, assegurando que os resultados da PCR sejam adequados (BEASLEY et al., 1999,

BUTLER; RUITBERG; VALLONE, 2001). Ao desenhar *primers*, deve-se compreender o conceito do alinhamento de sequências, essencial para a realização de tarefas mais complexas. O software busca meios de alinhá-las, inserindo espaços em posições arbitrárias de maneira que haja correspondência dos nucleotídeos semelhantes, levando em conta o grau de semelhança entre elas, permitindo então a visualização das regiões conservadas e variáveis (SETUBAL; MEIDANIS, 1997). Para isso os softwares utilizam de algoritmos desenvolvidos ao longo do tempo, como por exemplo, o FASTA e o BLAST, úteis também na pesquisa de DNA, sequências e proteínas. Existem outras opções mais atuais, modernas e mais sensíveis, porém que demandam computadores com hardware potente (PEARSON; LIPMAN, 1988, ALTSCHUL et al., 1990).

Entre os tipos de alinhamento mais utilizados, encontra-se o do tipo global e o local. No global, o algoritmo busca o melhor alinhamento entre sequências inteiras, sendo aplicado quando se tem sequências similares e de tamanho parecido, e recomendado, por exemplo, na análise de mutações por trocas de bases. No Alinhamento local, o algoritmo busca regiões conservadas entre elas, alinhando-as, porém este possui uma maior utilidade quando se tem sequências de tamanhos diferentes (PERANCONI, 2005). Para que os *primers* sejam específicos e proporcionem um bom resultado na PCR é necessário que sua composição não favoreça a formação de estruturas indesejáveis, o que impede a sua ligação com o DNA alvo. Entre tais estruturas, pode ser citado o hetero-dímero, estrutura formada pela presença de muitas bases complementares entre os pares

de primers, influenciada diretamente pelo comprimento do primer (WANG; SEED, 2003). A temperatura de melting também é um fator importante, por ser relacionada à temperatura necessária para dissociação das fitas sintetizadas na PCR, sendo necessário que haja equivalência entre os diferentes iniciadores (BROWN, 2003).

A formação de hairpin (auto anelamento) deve ser evitada com a análise das bases complementares na composição do primer e da Tmelting que possibilite essa ligação (SANTORO, 2008). Outra característica é a distribuição de bases nitrogenadas, Guanina e Citosina, que pela sua ligação estável podem interferir elevando a temperatura de dissociação, bem como a alta quantidade de Adenina e Timina que leva a sua diminuição (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000).

Os softwares de bioinformática possibilitam a análise destes parâmetros, permitindo o desenho de *primers* para detecção de diversos agentes. Neste estudo, o agente escolhido como modelo foi o Vírus Sincicial Respiratório Humano (RSVH). O RSVH foi isolado no ano de 1956, por Morris, em chimpanzés denominados inicialmente como causador da Coriza do Chimpanzé, devido aos sintomas respiratórios observados na espécie em questão e foi associado. No ano seguinte, por Chanock e seus colaboradores a infecções humanas, por notarem a semelhança dos sintomas dos animais com os apresentados em duas crianças (BEEM et al., 1960, KOPELMAN; MIYOSHI, 1999).

Este é relacionado a Infecções Respiratórias Agudas, (IRAs) que podem ser causados por vários agentes biológicos (MACEDO et al., 2003), dentre os quais outros agentes virais são descritos como o

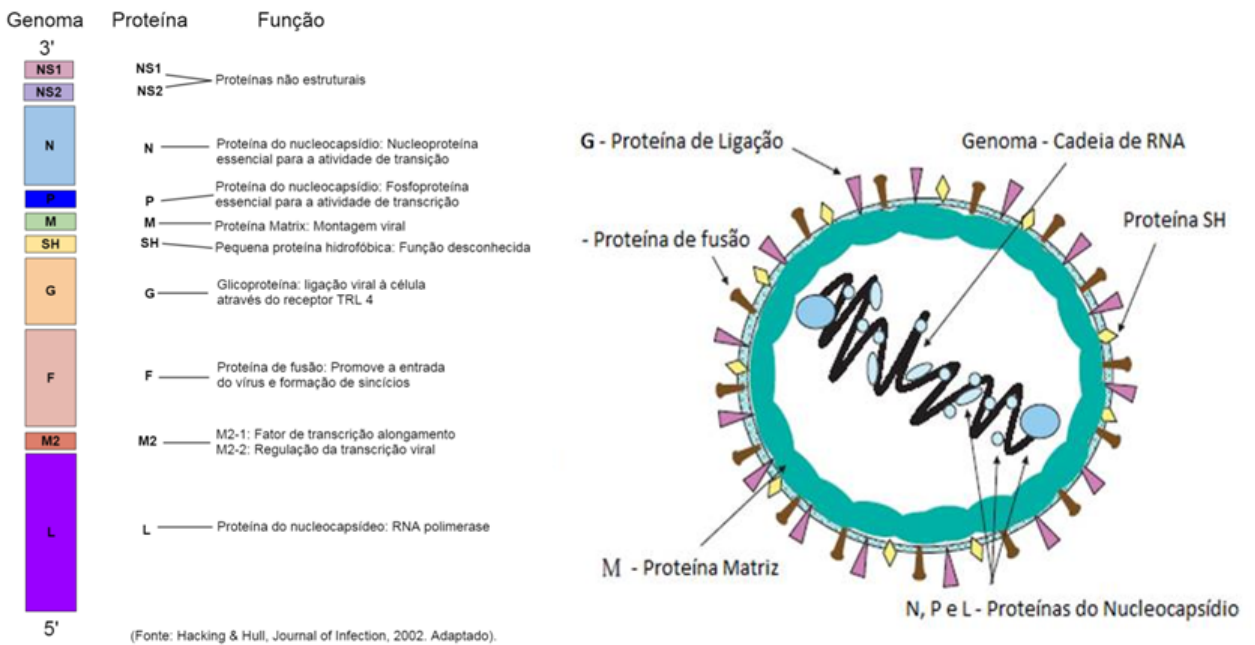
vírus Influenza, sorotipo A e B, Parainfluenza, Coronavírus, Adenovírus, Rinovírus e Bocavírus (DUNN, J. J; MILLER, 2014). Segundo dados da OPAS/OMS cerca de 40% a 60% das consultas ambulatoriais pediátricas têm como motivo as infecções respiratórias agudas, (IRAs) (BRASIL, 1991, MACEDO et al., 2003), sendo uma das principais causas de mortalidade em crianças menores de 5 anos no Brasil (BRASIL, 1993), e ao lado de doenças diarreicas são responsáveis por cerca de 2 milhões de mortes por ano no mundo (WILLIAMS et al., 2002).

O RSVH é um dos principais vírus respiratório descrito em países em desenvolvimento, estando relacionado com diversos fatores socioeconômicos e ambientais (BERMAN, 1991), sendo também altamente incidente a nível nacional, já retratado desde a década de 1980 em diversos estudos (SUTMOLLE et al., 1995, MIYAO et al., 1999, MOURA et al., 2003).

O vírus se multiplica nas vias aéreas superiores, desencadeando processos inflamatórios, ocasionando lesões do tecido mucoso (HALL; DOUGLAS, 1991), e ao atingir as vias aéreas inferiores desenvolvem quadros de bronquiolite e pneumonia, sendo estas as manifestações mais comuns (WELLIVER, 1998), porém seu agravo depende de alguns fatores de predisposição (ALVAREZ et al., 2013).

O RSVH pertencente ao gênero Pneumovírus e à família Paramixoviridae, apresenta uma estrutura envelopada, esférica e com um diâmetro de aproximadamente 150 nm (Figura 1). Mais internamente encontra-se um genoma linear composto de RNA fita simples de carga negativa,

Figura 1. Estrutura do Vírus sincicial respiratório e o seu genoma composto de 10 genes e suas respectivas proteínas codificadas.



de tamanho aproximado de 15 kb, que codifica 10 proteínas, sendo oito estruturais (N, P, M, SH, F, G, M2, L) e 2 não estruturais (NS1, e NS2) (EXPASY, 2015). O Gene G codificador da Glicoproteína é responsável pela ligação do vírus à célula hospedeira para o início da replicação, e também é o gene que apresenta a maior variabilidade entre os grupos A e B do vírus, e o Gene L, maior gene, codificador da enzima Polimerase, é o que detém os sítios mais conservados do genoma, tanto pra variante A quanto para a B do vírus (MACHADO, 2012).

Partindo de todos esses princípios, a presente pesquisa teve como objetivo desenhar e validar *primers* in silico para a detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano (RSVH), dispondo de ferramentas de bioinformática gratuitas, sendo realizado em três etapas: A análise do genoma viral para mapeamento das regiões conservadas, seguido da seleção dos *primers* candidatos, e por último a validação in silico.

MATERIAIS E MÉTODOS

A busca das sequências referência de genoma completo, se deu no Genbank do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Na guia RefSeq Home, utilizou-se a expressão “human respiratory syncytial vírus complete genome” como palavra-chave. As cepas resultantes desta busca foram selecionadas, de modo que houvesse representantes de diversos países. O total foi de 100 cepas, sendo 50 do RSV tipo A e 50 do tipo B, exibidas no formato Genbank. Estas foram convertidas para o formato FASTA Text no próprio sistema do banco de dados e realizado o Download. As sequências foram agrupadas e exportadas para um software de edição de textos simples (bloco de notas do sistema operacional Windows), dando origem a dois bancos de sequências, um contendo as do tipo A e outro as do tipo B. Cada uma foi devidamente identificada com o local de origem, seu respectivo código de identificação no GenBank, e o tipo viral a qual

pertence, RSV A ou B. Para o alinhamento, foi utilizado o software MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0), onde se criou um documento novo de alinhamento de DNA, e adicionado os dois bancos de sequências resultantes do passo anterior. O algoritmo utilizado foi o Clustal W contido no próprio software Mega6, que realiza alinhamento do tipo Múltiplo global.

Por meio do alinhamento foram analisadas as regiões do genoma quanto a sua conservação ou variabilidade. Foi dado prioridade ao Gene G e L, pelo seu relato na literatura como genes que contem regiões conservadas (MACHADO, 2012). As regiões semelhantes em ambos os tipos virais serviram para o desenho de *primers* capazes de detectar o Sincicial Respiratório, enquanto as regiões exclusivas do tipo A ou B, para o desenho de *primers* que diferenciasses os genótipos.

Os *primers* foram selecionados observando alguns parâmetros como critérios de inclusão ou exclusão. A região escolhida deveria apresentar cerca de 20 nucleotídeos e uma boa distribuição de bases guanina e citosina, no máximo 60% para evitar a elevação da temperatura de anelamento e dissociação. As regiões com muitas adeninas e timinas também foram evitadas para não haver a diminuição dos mesmos.

A validação final foi feita com uso da ferramenta online Oligo Analyzer 3.1. Foi verificada a possível formação de self dímeros, hetero-dímeros e hairpin. Na análise de dímeros, os *primers* não poderiam apresentar energia livre de Gibbs abaixo de $-9 \text{ kcal/mole}^{-1}$, ou muitas bases complementares. Na análise de Hairpin, além dos valores de Delta G, foi verificada a temperatura de

melting que possibilitasse o auto anelamento, sendo recomendado valores inferiores a 50° C .

A Tmelting foi calculada estimando-se que os valores entre cada par de *primers* fossem próximos, visando posteriormente estabelecer uma média na padronização da PCR. As temperaturas não poderiam ser tão divergentes, sendo que no caso de alta variação, foram excluídas ou acrescentadas algumas bases na sequência do primer, até se obter um resultado satisfatório.

RESULTADOS

A análise do genoma do Vírus Sincicial Respiratório através do alinhamento permitiu a confirmação do que a literatura descreve em relação à presença de sítios conservados localizados no gene da Polimerase (Gene L) e o gene da Glicoproteína de superfície (Gene G) (MACHADO, 2012). A região alvo escolhida para desenho foi o Gene G, pela presença de regiões conservadas que distinguiam os tipos virais, e pela boa distribuição de GC. Várias regiões dentro do gene foram selecionadas, e calculadas o possível tamanho do fragmento de amplificação na PCR, até que se pudesse chegar a um conjunto de *primers* que se encaixassem nos parâmetros descritos na metodologia.

Os *primers* escolhidos apresentam um tamanho de aproximadamente 21 pb, sendo que as sequências respectivas, bem como a posição no gene de interesse estão descritas na Tabela 1. As temperaturas de fusão (*Tmelting*) apresentam um intervalo entre $48,9^\circ \text{ C}$ e $55,3^\circ \text{ C}$ e a concentração de GC%, de 33,3% a 52,4%, com uma variação entre os pares de no máximo 5° C .

Tabela 1. Primers para a região da Glicoproteína G, que contém os principais sítios conservados e que diferenciam os tipos A e B.

Primers HRSV					
	Posição	Sequência 5' - 3'	Sentido	Melt Temp	% GC
HRSV-1	150 a 170	TTTGGCAATGATAATCTCAAC	Sense	48,9°C	33,3
HRSV-A	236 a 259	GGCTTGTTCATCTTGTATGATTG	Antisense	55°C	41,7
HRSV-B	295 a 318	GCTAACCCCTTCTGGTGAGAC	Antisense	55,3°C	52,4
HRSV-2	511 a 531	GGYACAAAGTTGAACACTTC	Antisense	53°C	45,2

Estes iniciadores foram desenhados propondo sua utilização em duas PCRs. Na 1ª PCR utiliza-se os *primers* RSV-1 e RSV-2 que amplificam um fragmento de 381 pares de base. O fragmento resultante desta etapa é submetido a 2ª PCR, uma *Semi-Nested*, onde mantém-se o *primer Sense* RSV-1, e acrescenta-se dois *primers Antisense* distintos, RSV-A e RSV-B. Caso o vírus pertença ao tipo A, na segunda PCR, amplifica-se um fragmento de 109 pb, e caso pertença ao tipo B, o fragmento amplificado é de 168 pares. O uso de *primers Antisense* distintos para cada variante viral, permite essa diferenciação, por meio de diferentes tamanhos de fragmentos, possibilitando assim a genotipagem os isolados. As 100 sequências obtidas do *Genbank* para o alinhamento múltiplo, e utilizadas no desenho dos *primers* estão ilustradas na árvore filogenética (Figura 2). Cada uma devidamente identificada com o código de identificação do banco de dados, o local de origem onde foi isolado, e o tipo viral a qual pertence, destacadas em vermelho as sequências pertencentes ao tipo A, e em verde ao tipo B. Para ilustração do alinhamento, foram selecionadas 21 sequências, das 100 obtidas, tendo o cuidado de contemplar todas as diferentes localidades, e

alinhadas com cada primer, permitindo a visualização da região de ligação destes (Figuras 3-6). As regiões alvos são altamente conservadas e com algumas mutações pontuais. A análise de especificidade foi realizada com o auxílio do alinhamento simples local no BLAST (NCBI) (Figuras 7-10). Verificou-se a especificidade dos primers na detecção somente do vírus de interesse, e o seu gene alvo (Gene G). Os valores de identidade foram de 100%, representando uma alta especificidade. Destacado como exceção, o primer RSV-2 obteve um valor de identidade de 95%, o que pode ser explicado pela presença de uma base degenerada em sua composição (Tabela 1). Entretanto, este valor ainda é relevante, o que não compromete de maneira significativa sua eficiência.

Nas figuras 7 e 10 verifica-se que os *primers* RSV 1 e 2 são específicos para a região do Gene G. A distinção dos genótipos pelos *primers Antisense* usados na *Semi-Nested* também ficam evidentes (Figura 8 e 9), onde os *primers* A e B se mostram específicos para a detecção do tipo viral para o qual foram desenvolvidos. Na análise da formação de *hairpin*, os resultados também foram favoráveis. A análise realizada pelo *software*

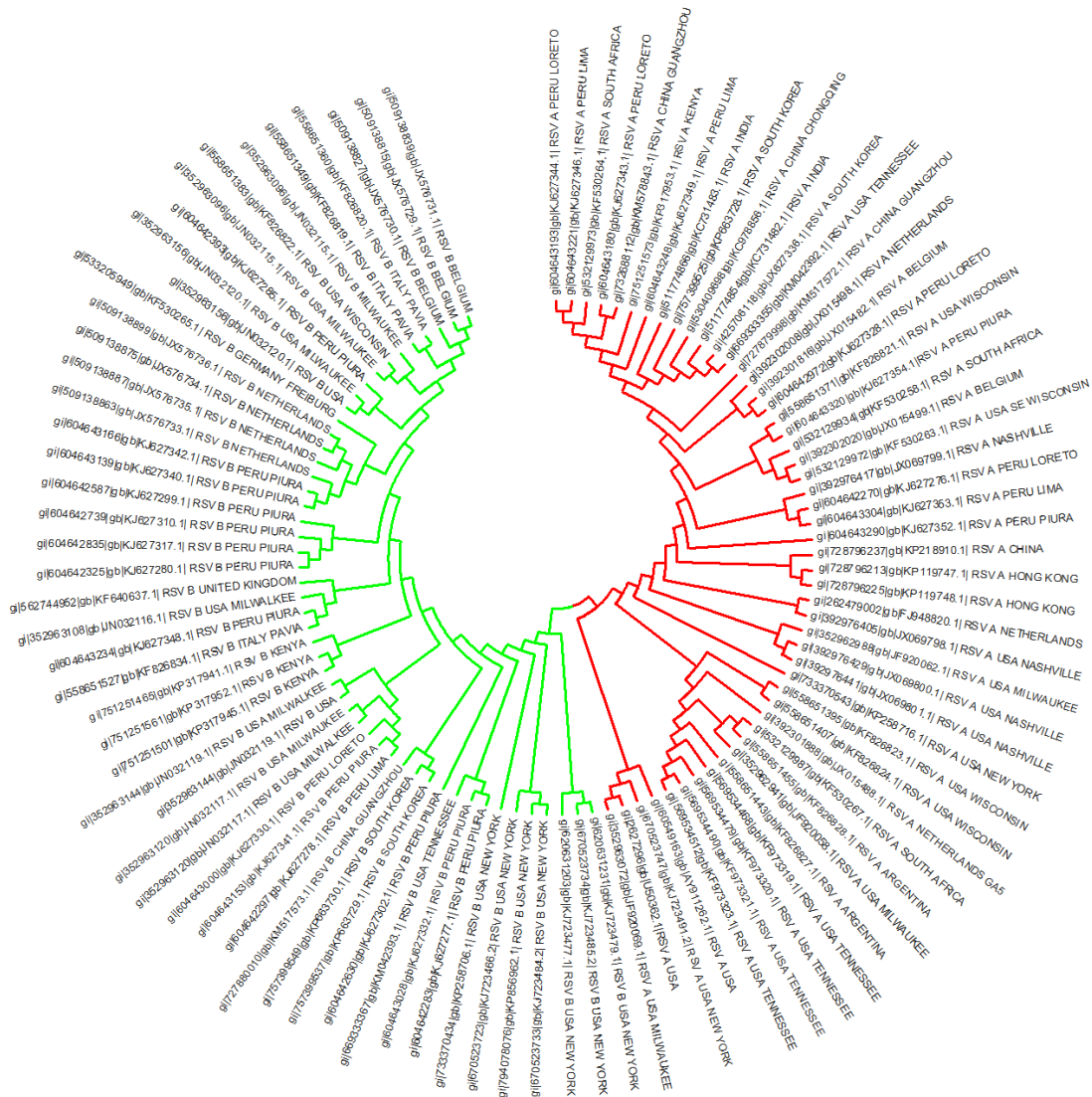


Figura 2. Representação genômica dos vírus A e B, por meio de árvore filogenética.

apresenta a possível estrutura formada, o valor de *Delta G*, e a Temperatura de *melting* necessários para que ocorra a formação deste arranjo (Figura 11). As temperaturas de *melting* mantiveram-se abaixo de 43,8° C, sendo necessário evitar tais valores na padronização da reação. Os valores de *Delta G* não ultrapassaram limiar de -9Kcal.mole⁻¹, conforme esperado. Quanto aos resultados referentes à avaliação de *self dímeros* (Figura 12) e *hetero dímeros* (Figura 13), observou-se que os *primers* em questão apresentaram um número de bases complementares variando entre 3 e 5 bases seguidas. Assim como na análise de *hairpin*, os

valores de *Delta G* permaneceram acima de -9 kcal.mole⁻¹. A análise de *hetero-dímeros* foi feita levando em conta a possível interação entre os pares de *primers* nas duas PCR.

Para comparar os resultados obtidos, foram selecionados 14 sequências de *primers* empregados em diversos estudos para detecção do Vírus Sincial Respiratório por meio de PCR convencional ou PCR em Tempo Real (Tabela 2). Estes iniciadores foram avaliados conforme os parâmetros descritos nesta metodologia, fazendo uso das mesmas ferramentas. Os *primers* na posição 1 à 14 são descritos nos estudos de

1. RSV 1	-----TTTGGCAATGATAATCTCAAC-----
2. gi 392976417 gb JX069799.1 RSV A NASHVILLE	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
3. gi 392302020 gb JX015499.1 RSV A BELGIUM	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
4. gi 511774854 gb KC731482.1 RSV A INDIA	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
5. gi 392302008 gb JX015498.1 RSV A NETHERLANDS	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
6. gi 530409698 gb KC978856.1 RSV A CHINA CHONGQING	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
7. gi 604643180 gb KJ627343.1 RSV A PERU LORETO	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
8. gi 532129934 gb KF530258.1 RSV A SOUTH AFRICA	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
9. gi 670523747 gb KJ723491.2 RSV A USA NEW YORK	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
10. gi 728796213 gb KP119747.1 RSV A HONG KONG	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
11. gi 751251573 gb KP317953.1 RSV A KENYA	AAATCACATTATCTATTTGGCAATGATAATCTCAACTCACT'
12. gi 533205949 gb KF530265.1 RSV B GERMANY FREIBURG	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
13. gi 558651349 gb KF826819.1 RSV B ITALY PAVIA	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
14. gi 352963120 gb JN032117.1 RSV B USA MILWAUKEE	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
15. gi 509138815 gb JX576729.1 RSV B BELGIUM	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
16. gi 509138863 gb JX576733.1 RSV B NETHERLANDS	AAATAGCGCTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
17. gi 562744952 gb KF640637.1 RSV B UNITED KINGDOM	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
18. gi 604642297 gb KJ627278.1 RSV B PERU LIMA	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
19. gi 727880010 gb KMS17573.1 RSV B CHINA GUANGZHOU	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
20. gi 751251561 gb KP317952.1 RSV B KENYA	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
21. gi 757399549 gb KP663730.1 RSV B SOUTH KOREA	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCT'
22. gi 620631203 gb KJ723477.1 RSV B USA NEW YORK	AAATAGCACTATCAGTTTGGCAATGATAATCTCAACTCTCTCT'

Figura 3. Alinhamento do primer RSV 1 usando o software MEGA6 demonstra alta semelhança com as sequências escolhidas do RSV A e B na posição 150 a 170 do gene G.

1. RSV A	-----CAATCATACAAGTGCAACAAGCC-----
2. gi 392976417 gb JX069799.1 RSV A NASHVILLE	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACACAGATCAA(
3. gi 392302020 gb JX015499.1 RSV A BELGIUM	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
4. gi 511774854 gb KC731482.1 RSV A INDIA	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
5. gi 392302008 gb JX015498.1 RSV A NETHERLANDS	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
6. gi 530409698 gb KC978856.1 RSV A CHINA CHONGQING	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
7. gi 604643180 gb KJ627343.1 RSV A PERU LORETO	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
8. gi 532129934 gb KF530258.1 RSV A SOUTH AFRICA	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
9. gi 670523747 gb KJ723491.2 RSV A USA NEW YORK	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
10. gi 728796213 gb KP119747.1 RSV A HONG KONG	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(
11. gi 751251573 gb KP317953.1 RSV A KENYA	CACATAACAACCTGCAATCATACAAGATGCAACAACGAAACAGATCAA(

Figura 4. Alinhamento do primer RSV A usando o software MEGA6 demonstra alta semelhança com as sequências escolhidas do RSV A na posição 236 a 259 do gene G.

11. RSV B	-----GTCTCACCAGAAAGGGTTAGC-----
12. gi 533205949 gb KF530265.1 RSV B GERMANY FREIBURG	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
13. gi 558651349 gb KF826819.1 RSV B ITALY PAVIA	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
14. gi 352963120 gb JN032117.1 RSV B USA MILWAUKEE	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
15. gi 509138815 gb JX576729.1 RSV B BELGIUM	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
16. gi 509138863 gb JX576733.1 RSV B NETHERLANDS	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
17. gi 562744952 gb KF640637.1 RSV B UNITED KINGDOM	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
18. gi 604642297 gb KJ627278.1 RSV B PERU LIMA	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
19. gi 727880010 gb KMS17573.1 RSV B CHINA GUANGZHOU	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
20. gi 751251561 gb KP317952.1 RSV B KENYA	ACAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
21. gi 757399549 gb KP663730.1 RSV B SOUTH KOREA	ATAAACCACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCCCATCC.
22. gi 620631203 gb KJ723477.1 RSV B USA NEW YORK	ATCACTACCTACCTTACTCAAGTCTCACCAGAAAGGGTTAGCTCATCC.

Figura 5. Alinhamento do primer RSV B usando o software MEGA6 demonstra alta semelhança com as sequências escolhidas do RSV B na posição 295 a 318 do gene G.

1. RSV 2	-----GAAGTGTTCACCTTTGTWCCC-----
2. gi 392976417 gb JX069799.1 RSV A NASHVILLE	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
3. gi 392302020 gb JX015499.1 RSV A BELGIUM	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
4. gi 511774854 gb KC731482.1 RSV A INDIA	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
5. gi 392302008 gb JX015498.1 RSV A NETHERLANDS	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
6. gi 530409698 gb KC978856.1 RSV A CHINA CHONGQING	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
7. gi 604643180 gb KJ627343.1 RSV A PERU LORETO	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
8. gi 532129934 gb KF530258.1 RSV A SOUTH AFRICA	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
9. gi 670523747 gb KJ723491.2 RSV A USA NEW YORK	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
10. gi 728796213 gb KP119747.1 RSV A HONG KONG	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
11. gi 751251573 gb KP317953.1 RSV A KENYA	AATGATTTTCACCTTTGAAGTGTTCACCTTTGTACCTTCGTCAGCAGATA
12. gi 533205949 gb KF530265.1 RSV B GERMANY FREIBURG	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
13. gi 558651349 gb KF826819.1 RSV B ITALY PAVIA	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
14. gi 352963120 gb JN032117.1 RSV B USA MILWAUKEE	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
15. gi 509138815 gb JX576729.1 RSV B BELGIUM	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
16. gi 509138863 gb JX576733.1 RSV B NETHERLANDS	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
17. gi 562744952 gb KF640637.1 RSV B UNITED KINGDOM	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
18. gi 604642297 gb KJ627278.1 RSV B PERU LIMA	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
19. gi 727880010 gb KMS17573.1 RSV B CHINA GUANGZHOU	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTTGTTCCCTGTTAGTATA
20. gi 751251561 gb KP317952.1 RSV B KENYA	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA
21. gi 757399549 gb KP663730.1 RSV B SOUTH KOREA	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTTGTTCCCTGTTAGTATA
22. gi 620631203 gb KJ723477.1 RSV B USA NEW YORK	GATGATTACCATTTTGAAGTGTTCACCTTCGTTCCCTGTTAGTATA

Figura 6. Alinhamento do primer RSV 2 usando o software MEGA6 demonstra alta semelhança com as sequências escolhidas do RSV A e B na posição 511 a 531 do gene G.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6074 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781405.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_7048 attachment glycoprotein (G) gene_comple	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781404.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6804 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781402.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_5881 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781401.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3026 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781400.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3859 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781399.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3830 attachment glycoprotein (G) gene_partial_c	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781398.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3572 attachment glycoprotein (G) gene_partial_c	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781396.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_2753 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781395.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3779 attachment glycoprotein (G) gene_partial_c	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781394.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_4139 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781393.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3576 nonfunctional attachment glycoprotein (G)	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781392.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3756 attachment glycoprotein (G) gene_comple	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781391.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_5787 attachment glycoprotein (G) gene_partial_c	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781390.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_5522 attachment glycoprotein (G) gene_partial_c	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KT781389.1

Figura 7. Alinhamento local do *primer* RSV 1 no *software* BLAST do NCBI demonstrando 100% de identidade do *primer* com as cepas de interesse (Fonte: NCBI).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Mutant Human respiratory syncytial virus strain Lonq recombinant complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU707921.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/98E-415-01/1995 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316180.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/79E-191-01/1979 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316178.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/90-184A-01-01/1990 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316176.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/78-016A-01-01/1977 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316171.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/95-103A-01-01/1995 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316170.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/85-040A-01-01/1985 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316167.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/81G-411-01/1977 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316166.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/93-134A-01-01/1993 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316161.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/79I-050A-01-01/1979 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316157.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/84E-072-01/1984 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316148.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/96E-033-01/1996 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316145.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/82G-164-01/1982 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316143.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/83I-026A-01-01/1982 complete qenc	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316142.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/87E-053-01/1987 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316138.1
Human respiratory syncytial virus strain RSV/A/Homo sapiens/USA/79E-040-01/1979 complete genome	48.1	48.1	100%	0.002	100%	KU316137.1

Figura 8. Alinhamento local do *primer* RSV A no *software* BLAST do NCBI demonstrando 100% de identidade do *primer* com as cepas de interesse (Fonte: NCBI).

Abels et al. 2001, Hu et al. 2002, Jokela et al. 2010, Whiley et al. 2002 e Zlateva et al. 2007. Apenas as informações referentes a sequência dos *primers* retirados destes estudos foram extraídas. Os valores dos parâmetros apresentados nesta tabela correspondem à análise seguindo esta metodologia. Os *primers* na posição 15 a 18 são os mesmos descritos na Tabela 1.

DISCUSSÃO

Analisando os resultados da Tabela 2, em análise geral, pode ser verificado que os valores obtidos na avaliação dos parâmetros estão em concordância

com os estudos já realizados. É importante ressaltar que os *primers* desses autores já foram utilizados in vitro, e obtiveram ótimos resultados (ABELS et al., 2001, HU et al., 2002, JOKELA et al., 2010, WHILEY et al., 2002 e ZLATEVA et al., 2007). De maneira mais descritiva, pode ser observado que os valores da concentração de GC dos *primers* se mantiveram abaixo de 60% conforme recomendado. Observando o *primer* 10, é possível verificar a influência da sua concentração de GC, que foi de 53,48%, no aumento da temperatura de *melting* que é de 62,9°C, uma correlação já descrita na literatura pela estável ligação de bases

Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/TH-22/2013, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU839638.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/TH-29/2013, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU839636.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/TH-34/2014, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU839633.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/TH-62/2013, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU839632.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/TH-49/2014, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU839625.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/94-157A-01-01/1994, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316179.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/93E-049-01/1993, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316163.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/96I-065A-01-01/1995, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316159.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/89P-004-01/1989, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316156.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/87E-012-01/1987, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316136.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/94P-045-01/1994, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316134.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/95-016A-01-01/1995, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316117.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/80-058A-01-01/1980, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316115.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/93I-084A-01-01/1993, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316114.1
Human respiratory syncytial virus strain RSVB/Homo sapiens/USA/92E-135-01/1992, complete genome	42.1	42.1	100%	0.048	100%	KU316111.1

Figura 9. Alinhamento local do *primer* RSV B no *software* BLAST do NCBI demonstrando 100% de identidade do *primer* com as cepas de interesse (Fonte: NCBI).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Human respiratory syncytial virus isolate HN_7048 attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781404.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6664 nonfunctional attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781402.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3630 attachment glycoprotein (G) gene, partial cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781398.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_7214 attachment glycoprotein (G) gene, partial cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781382.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6961 attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781381.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6377 nonfunctional attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781379.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6448 attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781377.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_6035 attachment glycoprotein (G) gene, partial cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781373.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_5946 attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781370.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_5582 attachment glycoprotein (G) gene, partial cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781369.1
Human respiratory syncytial virus isolate HN_3695 attachment glycoprotein (G) gene, complete cds	39.4	39.4	100%	0.32	95%	KT781363.1

Figura 10. Alinhamento local do *primer* RSV 2 no *software* BLAST do NCBI demonstrando 100% de identidade do *primer* com as cepas de interesse (Fonte: NCBI).

GC (LEHNINGER; NELSON; COX, 2000). A temperatura de *melting* variou entre 51°C e 63°C, sendo a maior temperatura correspondente ao *primer* 10, e o de menor valor, correspondente ao *primer* 2. Os intervalos das temperaturas entre os pares de *primers* não ultrapassaram os 5°C, facilitando a escolha de uma média para a etapa de anelamento da PCR. Quanto ao comprimento, os tamanhos variam de 20 a 30 nucleotídeos, onde os maiores atingem uma extensão de 29 e 30 nucleotídeos (HACKING; HULL, 2002, JOKELA et al., 2010). *Primers* de alta extensão devem ser evitados pois favorecem a presença de bases complementares (WANG; SEED, 2003).

Os valores observados na análise de especificidade pelo BLAST foram equivalentes, sendo que todos

apresentaram alta especificidade onde a maioria atingiu valores de 100%, o restante com resultados de 96%. Apenas o *primer* 18 atingiu 95% de identidade, e atribui-se este valor a presença de uma base degenerada em sua composição.

Ao comparar os valores de Delta G (ΔG) na análise de self-dímeros, pode-se verificar uma variação de -3,14 a -9,5 kcal.mole⁻¹. Durante a realização desta avaliação, esperava-se encontrar valores positivos, porém verificou-se que os demais estudos analisados também apresentavam valores negativos, entretanto nenhum menor que -9 kcal.mole⁻¹ como era previsto, com exceção do *primer* 7 que atingiu -9,5 kcal.mole⁻¹, o que possibilitaria a formação de um self-dímero. Semelhantemente, o *Delta G* correspondente à

HRSV 1				HRSVA			
Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
1		-0.15	27.3	1		-1.48	43.8
2		0.13	20.3	2		-1.13	38.8

HRSV 2				HRSV B			
Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)	Structure Name	Image	$\Delta G(\text{kcal.mole}^{-1})$	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
1		-0.89	37.7	1		-0.87	33.8
2		-0.88	36.8	2		-0.5	31.9

Figura 11. Análise da formação de *hairpin*.

HRSV 1		HRSVA	
Delta G: -3.9 kcal/mole	Base Pairs: 3	Delta G: -7.05 kcal/mole	Base Pairs: 4
5' TTTGGCAATGATAATCTCAAC	:::	5' GGCTTGTTCATCTTGTATGATTG	: : : :
3' CAACTCTAATAGTAACGGTTT		3' GTTAGTATGTTCTACGTTGTTCCG	

HRSV 2		HRSV B	
Delta G: -5.04 kcal/mole	Base Pairs: 4	Delta G: -4.41 kcal/mole	Base Pairs: 3
5' GGGYACAAAGTTGAACACTTC		5' GCTAACCCOTTTCTGGTGAGAC	:: ::: ::
3' CTTCACAAGTTGAACAYGGG		3' CAGAGTGGTCTTTCCCAATCG	

Figura 12. Análise da formação de *self* dímeros.

Delta G: -6.82 kcal/mole	Base Pairs: 5	HRSV-1 + HRSV-2
5' TTTGGCAATGATAATCTCAAC	::	
3' CTTCACAAGTTGAACAYGGG		
Delta G: -7.04 kcal/mole	Base Pairs: 4	HRSV-1 + HRSV-A
5' TTTGGCAATGATAATCTCAAC	:	
3' GTTAGTATGTTCTACGTTGTTCCG		
Delta G: -6.7 kcal/mole	Base Pairs: 5	HRSV-1 + HRSV-B
5' TTTGGCAATGATAATCTCAAC	:	
3' CAGAGTGGTCTTTCCCAATCG		

Figura 13. Análise da formação de hetero dímeros.

formação de *hairpin* também se manteve acima de -9 Kcal.mol, com alguns valores positivos, onde a grande maioria não atingiu valores próximos de -2 kcal.mol, o que minimiza a probabilidade de uma possível formação de *hairpin*. As ferramentas de

bioinformática empregadas neste estudo se mostraram suficientes, permitindo a análise do genoma viral e da verificação dos parâmetros que podem levar a formação de estruturas capazes de interferir na eficiência do *primer*, permitindo

Tabela 2 . Análise comparativa dos *primers*.

ID	Sequencia	Fonte	Sentido	GC%	Tm°	Tamanho (pb)	Identidade (BLAST)	Self Dimero (ΔG: kcal/mole)	Hairpin (ΔG: kcal/mole ⁻¹)
1	GTCTTACAGCCGTGATTAGG	ABELS et al 2001	Sense	50%	52,7°C	20	100%	-3,61	-0,27
2	GGGCTTCTTTGGTTACTTC	ABELS et al 2001	Antisense	45%	51,5°C	20	100%	-3,14	1,2
3	GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA	HU et al 2002	Sense	38,5%	55,7°C	26	100%	-5,47	-1,08
4	TGCTCCGTTGGATGGTGATT	HU et al 2002	Antisense	47,6%	56,6°C	21	100%	-4,64	-0,37
5	GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA	HU et al 2002	Sense	38,5%	55,4°C	26	100%	-4,85	-1,6
6	TGTCAATATTATCTCCTGTACTACGTTGAA	HU et al 2002	Antisense	33,3%	55,5°C	30	100%	-7,8	0,51
7	TGGAAACATACGTGAACAARCTTCA	Jokela et al 2010	Sense	38%	56,1°C	25	96%	-9,5	-1
8	GCACCCATATTGTWAGTGATGCA	Jokela et al 2010	Antisense	43,5%	55,5°C	23	96%	-7,05	-1,75
9	GCACCCATATTGTWAGGATGCA	WHILEY et al 2002	Sense	43,5%	55,5°C	23	96%	-7,05	-1,75
10	AGCATCACTTGCCCTGAACCATAGGC	WHILEY et al 2002	Antisense	53,48%	62,9°C	26	96%	-6,21	-1,67
11	CTGTGATGARTTCCAACAAAAGAACA	ZLATEVA et al 2007	Sense	35,22%	54,7°C	27	96%	-8,27	0,6
12	AGTTACACCTGCATTAACACTAAATTC	ZLATEVA et al 2007	Antisense	35,7%	55,6°C	28	100%	-7,05	-0,42
13	GGCTCCAGAAATATAGGCATGATTC	ZLATEVA et al 2007	Sense	45,8%	55,3°C	24	100%	-5,38	-0,35
14	TGGTTATTACAAGAGCAGCTATACACAGT	ZLATEVA et al 2007	Antisense	37,9%	57,5°C	29	100%	-6,34	0,23
15	TTTGGCAATGATAATCTCAAC	Deste Estudo	Sense	33,3%	48,9°C	21	100%	-3,9	-0,15
16	GGCTTGTTCATCTTGTATGATTG	Deste Estudo	Antisense	41,7%	55°C	24	100%	-7,05	-1,48
17	GCTAACCCCTTCTGGTGAGAC	Deste Estudo	Antisense	52,4%	55,3°C	21	100%	-4,41	-0,87
18	GGGYACAAAGTTGAACACTTC	Deste Estudo	Antisense	45,2%	53°C	21	95%	-5,04	-0,89

assim minimizar erros posteriores, durante a reação de PCR.

Os *softwares* empregados são todos gratuitos, e facilmente disponíveis, porém exigem um conhecimento prévio de bioinformática. A metodologia descrita concede meios para observar a variabilidade do genoma e mutações presentes em determinadas regiões. O desenho de *primers* pode também ser empregado no desenvolvimento de *primers* microssatélites (SAMBROOK; RUSSEL, 2001), ou como em alguns estudos, aplicados no desenho de sondas para PCR em tempo real (HU et al., 2002, JOKELA et al., 2010).

Um bom desenho de *primer* deve ser priorizado no diagnóstico molecular, pois é imprescindível que estes sejam específicos na detecção do gene de interesse, excluindo a possibilidade de amplificação de regiões inespecíficas, e a formação

de estruturas indesejadas como também a não detecção de alguma cepa mutante.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de *primers* é extremamente importante para pesquisas moleculares. Por meio de ferramentas de bioinformática obtêm-se resultados satisfatórios quanto a eficiência dos *primers* na amplificação de sequências de DNA, favorecendo assim o estudo e a prevenção de possíveis erros que interfiram na PCR. Sua utilização representa economia de tempo e de recursos em testes laboratoriais, e concede autonomia ao pesquisador na escolha das regiões que se pretende estudar, com o auxílio de uma gama de dados disponíveis em banco de dados. Outro ponto a ser considerado é que os resultados desse estudo podem servir como orientação a

pesquisadores na seleção de *primers* fornecendo uma base dos parâmetros que devem ser levados em conta durante sua análise, e citando algumas das ferramentas disponíveis que possibilitem esta avaliação.

Por conseguinte, os valores obtidos na validação dos *primers* corroboram para um bom desempenho *in vitro*, disponibilizado então para uso na detecção do Vírus Sincicial Respiratório Humano.

REFERÊNCIAS

ABELS, S. et al. Reliable detection of respiratory syncytial virus infection in children for adequate hospital infection control management. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 9, p. 3135-3139, 2001.

ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell** (Garland Science, New York, NY). 2002.

ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ALVAREZ, A.E. et al. Epidemiological and genetic characteristics associated with the severity of acute viral bronchiolitis by respiratory syncytial virus. **Jornal de pediatria**, v. 89, n. 6, p. 531-543, 2013.

ARBEX, W.; COSTA, V.S.; SILVA, M.V.G. Bioinformática como ferramenta nas pesquisas atuais. **Anais do III Encontro de Genética e Melhoramento, Viçosa, UFV**, 2006.

BEASLEY, E.M. et al. PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, **Academic press**, p. 55–71, San Diego, 1999.

BEEM, M. et al. Association of the chimpanzee coryza agent with acute respiratory disease in children. **New England Journal of Medicine**, v. 263, n. 11, p. 523-530, 1960.

BERMAN, S. Epidemiology of acute respiratory infections in children in developing countries. **Revista infectious disease**, v. 13, 1991.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de normas para infecção respiratória aguda**. Sociedades brasileiras de pediatria e pneumologia, p. 1-27, 1991.

BROWN, T.A. Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução. **Artmed**, 4ed, 240p, 2003.

BUTLER, J.M.; RUITBERG, C.M.; VALLONE, P.M. Capillary electrophoresis as a tool for optimization of multiplex PCR reactions. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 369, n. 3, p. 200-205, 2001.

CAVALCANTI, M.P.C. et al. AVANÇOS BIOTECNOLÓGICOS PARA O DIAGNÓSTICO DAS DOENÇAS NEFRÓTIAS E PARASITÁRIAS. **Revista de patologia tropical**, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008.

COIRAS, M.T. et al. Simultaneous detection of influenza A, B, and C viruses, respiratory syncytial virus, and adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription nested-PCR assay. **Journal of medical virology**, v. 69, n. 1, p. 132-144, 2003.

DUNN, James J.; MILLER, Melissa B. Emerging respiratory viruses other than influenza. **Clinics in laboratory medicine**, v. 34, n. 2, p. 409-430, 2014.

EXPASY. Bioinformatics Resource Portal. **Viral zone**. Disponível em: <<http://viralzone.expasy.org/>>. Acesso em 20 ago. 2015. 19:50:23.

HACKING, Doug; HULL, J. Respiratory syncytial virus—viral biology and the host response. **Journal of infection**, v. 45, n. 1, p. 18-24, 2002.

HALL, Caroline Breese; DOUGLAS, R. Gordon. Modes of transmission of respiratory syncytial virus. **The journal of pediatrics**, v. 99, n. 1, p. 100-103, 1981.

HAMMITT, Laura L. et al. Added value of an oropharyngeal swab in detection of viruses in children hospitalized with lower respiratory tract infection. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 6, p. 2318-2320, 2011.

HU, Aizhong et al. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 149-154, 2003.

JOKELA, P. et al. Detection of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by duplex real-time RT-PCR assay in comparison with direct fluorescent assay. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 10, p. 1568-1573, 2010.

KOPELMAN, B. I.; MIYOSHI, M. H. Infecção pelo vírus sincicial respiratório. **Pediatria moderna**, v.35, n. 4, p. 233-9, 1999.

KUBISTA, Mikael et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular aspects of medicine**, v. 27, n. 2, p. 95-125, 2006.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. **Sarvier**, p.839, São Paulo, 2000.

MACEDO, Sílvia Elaine Cardozo et al. Infecção pelo vírus respiratório sincicial em crianças menores de um ano de idade internadas por doença respiratória aguda em Pelotas, RS. **Jornal de pneumologia**. v.29, n. 1, p. 4-8, 2003.

MACHADO, Daniela Bandeira Brancante et al. **Identificação e caracterização molecular do vírus sincicial respiratório humano em crianças com infecções respiratórias de 2006 a 2010**. 2012. Tese de Doutorado. Instituto Oswaldo Cruz.

MINALI, C.C.; DEBUR, M. do C.; FERRARI, L.P. Comparação entre as técnicas de imunofluorescência indireta e PCR Multiplex para detecção de vírus respiratórios. **Saúde**, v. 1, n. 9, 2014.

MIYAO, C.R. et al. Infecções virais em crianças internadas por doença aguda do trato respiratório inferior. **J Pediatr (Rio J)**, v. 75, n. 5, p. 334-44, 1999.

MOURA, F. E. A. et al. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças Aceito para publicação em 28/01/03 atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**. Rio de Janeiro, ed. 4, v.39, p. 275-282, 2003.

MULLIS, K.B. et al. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, n. 4, p. 56-61, 1990.

NCBI: National Center for Biotechnology Information Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em 20 agos. 2015. 16:15:48.

PEARSON, W.R.; LIPMAN, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2444-2448, 1988.

PERANCONI, D.S. Alinhamento de seqüências biológicas em arquiteturas com memória distribuída. 2005. **Dissertação de mestrado**. Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

SAMBROOK, J. et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.

SANTORO, A. Caracterização e validação de marcadores microssatélites para golfinhos-rotadores (*Stenella longirostris*). 2008. **Trabalho de Conclusão (Bacharelado – Ciências Biológicas)**. Universidade Estadual Paulista

SETUBAL, J.C.; MEIDANIS, J.; SETUBAL-MEIDANIS. **Introduction to computational molecular biology**. PWS Pub., 1997.

SMITH, C.L.; CANTOR, C.R. [28] Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 449-467, 1987.

SUTMÖLLER, F. et al. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. **Clinical infectious diseases**, v. 20, n. 4, p. 854-860, 1995.

WANG, X.; SEED, B. A PCR primer bank for quantitative gene expression analysis. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 24, p. e154-e154, 2003.

WELLIVER, R.C. Respiratory syncytial virus immunoglobulin and monoclonal antibodies in the prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. In: **Seminars in perinatology**. WB Saunders, 1998. p. 87-95.

WHILEY, D.M. et al. Detection of human respiratory syncytial virus in respiratory samples by LightCycler reverse transcriptase PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4418-4422, 2002.

WILLIAMS, B.G. et al. Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 1, p. 25-32, 2002.

ZLATEVA, K.T. et al. Subgroup prevalence and genotype circulation patterns of human respiratory syncytial virus in Belgium during ten successive epidemic seasons. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3022-3030, 2007.

Citar esse artigo: Queiroz JAS, Alves LS, Dall'acqua DSV, Souza LFB. Desenho e Validação de *Primers* In Silico para Detecção do Vírus Sincial Respiratório Humano. *RevFIMCA* 2017;4(1):17-30.

Autor para Correspondência: Jackson Alves da Silva Queiroz, queiroz.jas@gmail.com

Recebido em: 21 Agosto 2017

Aceito em: 03 Novembro 2017